

## Evaluation of MAPK pathway activation in brainstem induced by the masseter muscle inflammation

Michiko Nakatsuka<sup>1\*</sup>, Shunji Kumabe<sup>1</sup>, Shoko Gamoh<sup>2</sup>, Hironori Akiyama<sup>2</sup>, Seong-Suk Jue<sup>3</sup>, Ji-Youn Kim<sup>3</sup>, Katsura Ueda<sup>1</sup>, Yoshifumi Matsuda<sup>1</sup>, Kimishige Shimizutani<sup>2</sup>, Je-Won Shin<sup>3</sup> and Yasutomo Iwai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Anatomy, Osaka Dental University, <sup>2</sup>Department of Oral Radiology, Osaka Dental University, Osaka, JAPAN, <sup>3</sup>Department of Oral Anatomy, Graduate School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, KOREA

### 서 론

턱관절 근막동통 (myofascial pain of temporomandibular disorder)은 턱관절 장애 (temporomandibular disorder, TMD)의 주요한 증상으로 이러한 통증을 호소하는 환자들이 늘어나는 추세이다. 국제통증연구학회 (International Association for the Study of Pain, IASP)는 턱관절 근막동통의 원인으로 저작근의 과부하 (강하게 깨물기), 경미한 외상, 국소적인 근육의 염증 등을 보고하였다.

턱관절 근막동통은 근막동통 증후군(myofascial pain syndrome, MPS)의 일종으로 생각된다. 일반적인 치료법으로는 이악물기 습관(tooth contacting habit)의 제거와 splint 장착 등을 실시한다. 그러나 splint의 효과가 없을 시 증상은 전신에까지 영향을 미치게 되고 만성화되어 섬유근육통(fibromyalgia syndrome, FMS)으로 이행된다<sup>1)</sup>. 현재 TMD환자는 약 33 % 이고, 그 중 중증환자는 약 3.6 %-7 %로 보고되고 있다<sup>2-4)</sup>. 또한 광범위한 근육, 골격계통의 동통을 일으키는 FMS 환자는 약 0.5 %-5 %로 보고되고 있다<sup>5-6)</sup>.

MPS나 FMS는 특별한 이상소견은 없지만, 근육이나 근막에 통증유발점(trigger

\* Author to whom all correspondence

Michiko Nakatsuka

Department of Oral Anatomy, Osaka Dental University,

8-1, Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka, JAPAN

E-mail: naka-m@cc.osaka-dent.ac.jp

point)이 있고, 국소염증에 의한 다형 유해수용기(polymodal nociceptor)의 감각이 동통과민이나 연관통으로 나타나는 특징이 있다<sup>7-9)</sup>. 또한 FMS는 중추성 감각에 의해 동통과민이나 이질통(allo-dynia)의 유발<sup>10-11)</sup>, 도파민계(dopamine system)의 기능과괴가 보고되었다<sup>12)</sup>.

그러나 최근 FMS 환자의 근육에서 uncoupling protein (UCP)이 만성적으로 활성화되는 것이 밝혀졌다. 그리고 ATP 농도의 감소 등이 밝혀졌다<sup>13)</sup>. 따라서 MPS 및 FMS 발병에는 중추성감각 뿐만 아니라 국소적인 조직학적 변화도 관여할 가능성이 있다<sup>14)</sup>.

최근 미세아교세포(microglia)가 염증성통각과민에 영향을 미친다는 보고가 있었다. 척수에 있는 아교세포(glial cell)의 활성화가 염증성동통이나 신경장애성 동통, 통각과민, 이질통 발생 메커니즘에 관여하고 있음을 시사하였다<sup>15-20)</sup>. 또 삼차신경꼬리핵(trigeminal subnucleus caudalis, Vc)에 존재하는 아교세포가 중추성감각을 야기하는 것<sup>21)</sup>, 치주손상 때에 Vc에 존재하는 별아교세포(astrocyte)가 가소적 변화를 일으키는 것<sup>22)</sup>, 뇌에 있는 아교세포 활성화에 transient receptor potential (TRP) vanilloid 4 (TRPV4)가 관여하고 있다는 사실이 밝혀졌다<sup>23)</sup>.

구강악안면영역에서 발병하는 만성동통에 관하여, 신경이 손상된 병태에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있어 중추 및

국소적인 변화에 대한 많은 의문점들이 해결되었다. 그러나 턱관절 근막동통의 병태에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 바가 없고, 치료방법도 확립되지 않았다. 게다가 저작근통(masticatory muscle pain) 동물모델도 아직 개발되지 않았기 때문에 턱관절 근막동통에 관한 실험이 충분히 진행되고 있지 않은 상태이다.

본 연구에서는 저작근통장애의 치료법을 개발하기 위해 우선 저작근통장애 동물모델의 제작을 시행하여<sup>24-25)</sup>, 깨물근(masseter muscle)에 실험적으로 염증을 유발하여 깨물근 및 뇌줄기(brainstem)에서의 조직학적 변화를 확인하였다.

## 재료 및 방법

본 연구는 국제동통학회 (IASP) 가이드라인에 따라 실시하였다<sup>27)</sup>. 또한 the Animal Research Committee of Osaka Dental University의 승인을 받았다 (승인번호 : 14-01011호).

본 실험에서는 Sprague-Dawley rat (수컷, 30 마리, 250 g, Japan SLC Inc., Japan)을 사용하였다.

Sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p., Nembutal, Dainippon Sumitomo Pharma, Japan) 로 마취하여, 아래 조건으로 자극을 주었다<sup>24-26)</sup>.

L-L group (control, 30 마리); rat left masseter muscle (LMM)에 lipopolysaccharide (LPS) 2  $\mu$ g/kg (100  $\mu$ l)

을 주사하였다. 24시간 후, 동일 부위에 LPS 동일량을 주사하였다. L-S6 group (experimental, 30 마리); rat LMM 에 LPS 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (100  $\mu\text{l}$ ) 를 주사하였다. 24시간 후, 동일 부위에 6 % 고장성 식염수 (hypertonic saline) (S6, 100  $\mu\text{l}$ , 5 times per 90 min) 를 주사하였다<sup>24-26</sup>). LPS는 면역과 염증 요인으로써, S6는 침해 요인으로써 투여하였다<sup>24-26</sup>).

시약 투여 후 1일 (10 마리), 7일 (10 마리), 14일 (10 마리)에 4 % para-formaldehyde (PFA, 100 ml)로 관류 고정을 하여, LMM, rat right masseter muscle (RMM), 뇌줄기를 적출하였다. 4 % PFA로 다시 고정 (LMM 및 RMM: 24 hours (h), 뇌줄기: 48 h) 후, 30 % sucrose에 담갔다 (48 h).

Leica CM3050S cryostat (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany)<sup>27</sup>) 를 사용하여 동결절편을 제작하였다 (LMM 및 RMM: 두께 15  $\mu\text{m}$ , 뇌줄기 (bregma 에서 -7.22 mm부터 -15.66 mm까지): 두께 30  $\mu\text{m}$ , -20  $^{\circ}\text{C}$ ). 제작된 LMM 및 RMM 동결절편으로 Hematoxylin-Eosin (HE) 염색과 면역염색을 시행하였다.

LMM 및 RMM은 아래의 1차 항체 (rabbit anti-TNF $\alpha$  (1:200, 1 h, room temperature (RT); Chemicon, USA), rabbit anti-TNF $\alpha$  (1:200, 1 h, room temperature (RT); Chemicon, USA), rabbit anti-bradykinin receptor

B2 (BKRB2, 1:250, 1 h, RT; ENZO Life science, USA))를 사용하여 효소항체법염색을 시행하였다.

뇌줄기는 아래의 1차 항체 (rabbit anti-phosphorylated-p38 mitogen activated-protein kinase (p-p38 MAPK), 1:500, 1 h, RT; R&D Systems), rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1, 1:200, 1 h, RT; Chemicon, USA)<sup>28</sup>)를 사용하여 효소항체법염색을 시행하였다.

LMM, RMM, 뇌줄기 모두 아래의 2차 항체 (biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:400, 30 minutes (min), RT; Vector Laboratories, USA), avidin-biotin-peroxidase complex (30 min, RT, Elite ABC kit; Vector Laboratories))를 사용하였다. 증류수에 0.05 % 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories), 0.2 % nickel sulfate, 0.01 % hydrogen peroxide를 넣어 섞고, 실온에서 2 분간 반응시켰다.

LMM, RMM, 뇌줄기 절편을 관찰하면서 (Olympus BX41 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan), Olympus FX380 3CCD digital camera system (OS: Windows 7; Microsoft, CA, USA)) 사진을 촬영하였다. LMM 및 RMM은 10 개 구역을 선택하여 (area = 200 $\times$ 200  $\mu\text{m}^2$  square), TNF $\alpha$  와 BKRB2-immunoreactive (IR) 세포

수를 측정하였고, Student's *t*-test (Excel 2010, Microsoft, USA)를 이용하여 면역양성세포수의 시간 경과적 변화를 통계학적으로 분석하였다. 뇌줄기도 10개 구역을 선택하여 (area=400×400  $\mu$  m<sup>2</sup> square), p-p38 MAPK와 Iba1-IR 세포수를 측정하였고, Student's *t*-test (Excel 2010)를 이용하여 면역양성세포수의 시간 경과적 변화를 통계학적으로 분석하였다.

### 결 과

자극 1일 후에는 L-L group (control) 와 L-S6 group (experimental) 두 그룹 모두 TNF $\alpha$ -IR 세포가 현저하게 나타났다 (Fig. 1-a). 자극 7일 후에는 TNF $\alpha$ -IR 세포가 L-L group와 L-S6 group 두 그룹 모두 혈관주위에서만 일부 산재되어 나타났고, 이것은 자극 1일 후 발현 세포 수의 약 10 % 정도였다 (Fig. 1-a). 또 자극 14일 후에는 TNF $\alpha$ -IR 세포 발현이 거의 없었고, L-S6 group이 L-L group보다 약간 많이 나타났지만 L-L group와 L-S6 group 사이에 유의한 차이는 없었다 (Fig. 1-b). 근육섬유도 자극 1일 후에는 두 그룹 모두에서 보이지 않았지만, 자극 14일에는 조직이 재생된 것을 확인 할 수 있었다.

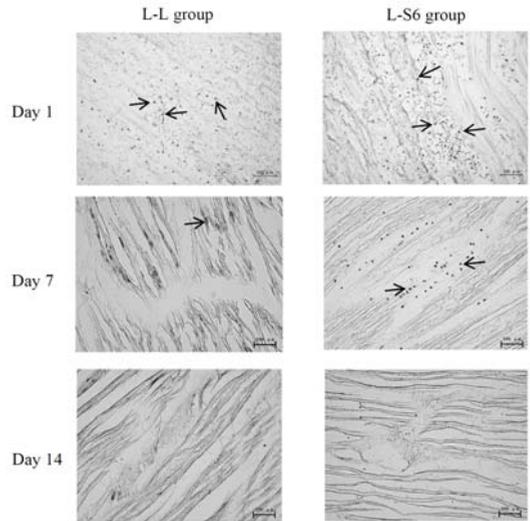


Fig. 1-a. TNF $\alpha$ -IR cells in the left masseter (LMM). In the specimens of 1 day after nociception, TNF $\alpha$ -IR cells (arrows) are particularly localized in the LMM. However, after 7 or 14 days of nociception, the TNF $\alpha$ -IR cells are found to be with little localization. Scale bar: 100  $\mu$  m.

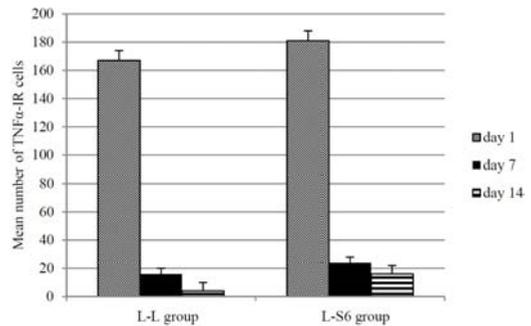


Fig. 1-b. Expressions of TNF $\alpha$ -IR cells in the LMM. The number of TNF $\alpha$ -IR cells is not significantly different between L-L group and L-S6 group. Error bars: S.E.M.

BKRB2 receptor는 급성동통에 관여하여, 통각수용기(nociceptor), 포식세

포(macrophages), 섬유모세포(fibroblasts) 등에 발현한다. 자극 1일 후에는 L-L group과 L-S6 group 두 그룹 모두 BKRB2-IR 세포가 현저하게 나타났다 (Fig. 2-a). 자극 7일 후에는 BKRB2-IR 세포 발현이 L-L group과 L-S6 group 두 그룹 모두 산재되어 나타났지만, 두 그룹 모두 자극 1일 후의 약 10 % 정도 밖에 나타나지 않았다 (Fig. 2-a). 또 자극 14일 후에는 BKRB2-IR 세포 발현이 두 그룹 모두 거의 나타나지 않았고, L-L group과 L-S6 group 사이에 유의한 차이는 없었다 (Fig. 2-b).

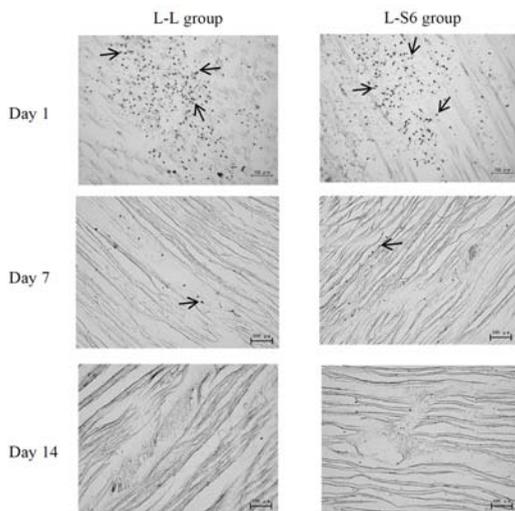


Fig. 2-a. Bradykinin receptor B2 (BKRB2)-IR cells in the LMM. In the specimens of 1 day after nociception, BKRB2-IR cells (arrows) are particularly localized in the LMM. However, after 7 or 14 days of nociception, the BKRB2 expression is found to be with little localization. Scale bar: 100  $\mu$  m.

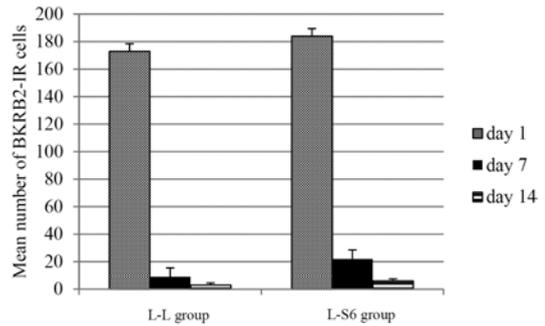


Fig. 2-b Expressions of BKRB2-IR cells in the LMM. The number of BKRB2-IR cells is not significantly different between L-L group and L-S6 group. Error bars: S.E.M.

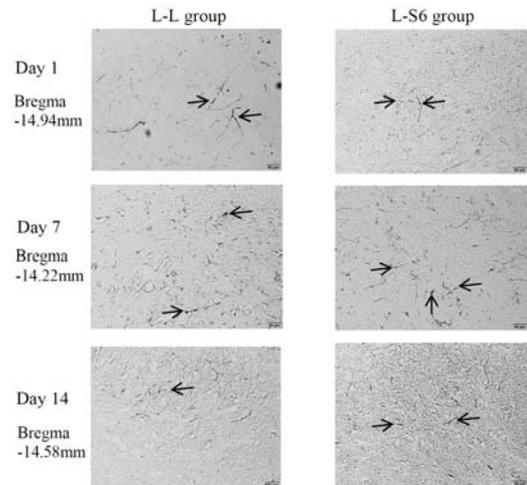


Fig. 3-a. Phosphorylated p38 (p-p38) MAPK-IR cells in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc). Microphotographs of the rat brainstem Vc ipsilateral side. In the specimens of 1 day after nociception, p-p38 MAPK-IR cells (arrows) are shown in the Vc of both groups. p-p38 MAPK-IR cells are found in the Vc not only dorsomedial region but also laterodorsal side and central region. p-p38 MAPK-IR cells are observed so as to overlap Iba1-IR cells partly (data not shown). Scale bar: 50  $\mu$  m.

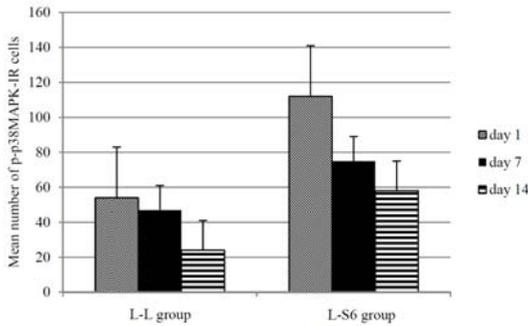


Fig. 3-b. Expressions of p-p38 MAPK-IR cells in the Vc. The number of p-p38 MAPK-IR cells of L-S6 group is increased more than L-L group ( $p=0.095$ ). Error bars: S.E.M.

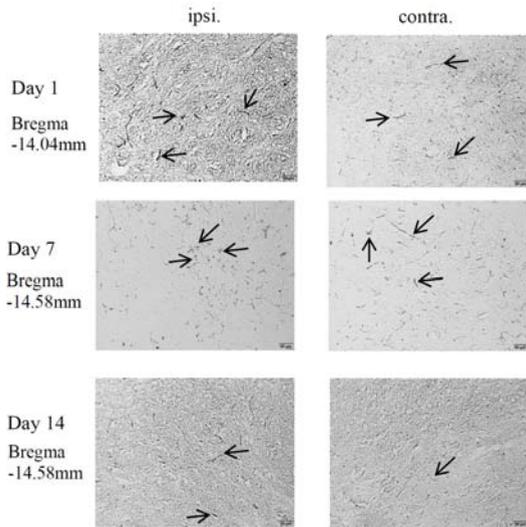


Fig. 3-c. p-p38 MAPK-IR cells in the Vc (L-S6 group). In the specimens of 1 day after nociception, p-p38 MAPK-IR cells (arrows) are particularly localized in the Vc ipsilateral of all specimens. However, 7 days after nociception, the p-p38 MAPK-IR cells are found in the Vc not only dorsomedial region but also laterodorsal side and central region. p-p38 MAPK-IR cells are observed so as to overlap Iba1-IR cells partly (data not shown). Scale bar: 50  $\mu$  m.

p-p38 MAPK-IR세포는 염증요인 LPS 및 침해요인 S6를 투여한 L-S6 group이 L-L group보다 많이 나타났다 (Fig. 3-a, b). 특히 자극 1일 후에는 L-S6 group이 L-L group보다 약 2배, 자극 14일 후에는 L-S6 group이 L-L group보다 약 3배 많이 나타났다 (Fig. 3-b). 그러나 p-p38 MAPK-IR 세포 발현은 L-L group과 L-S6 group 사이에 유의한 차이가 없었다 ( $p=0.095$ ). p-p38 MAPK-IR세포는 Vc 뒤안쪽 부위(dorsomedial region)뿐만 아니라 뒤가쪽 부위(dorsolateral region)나 중앙부위(central region)에서도 확인할 수 있었다. 일부 p-p38 MAPK-IR 세포는 Iba1-IR세포와 동일한 부위에서 발현되었다 (data not shown).

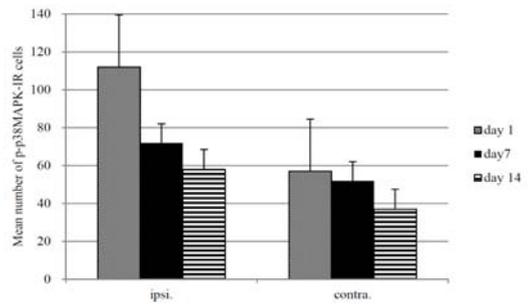


Fig. 3-d. Expressions of p-p38 MAPK-IR cells in the Vc (L-S6 group). The number of p-p38 MAPK-IR cells of ipsilateral side is increased than that of contralateral side ( $p=0.14$ ). Error bars: S.E.M.

L-S6 동일측과 반대측을 비교하면 자극 1일 후에는 p-p38 MAPK-IR세포가 주로 동일측 Vc 뒤안쪽 부위에서 나타났지

만, 자극 7일 후에는 Vc 중앙부위에서도 확인되었다 (Fig. 3-c, d). 또 p-p38 MAPK-IR세포는 자극 1일 후에는 동일측이 반대측보다 약 2배 많이 나타났다 (Fig. 3-d). 자극 7일, 14일 후에는 p-p38 MAPK-IR세포가 반대측에서도 나타났다 (Fig. 3-c, d). 그러나 반대측의 p-p38 MAPK-IR 세포 수는 자극 7일 후에는 동일측의 약 85 % 정도였고, 자극 14일 후에는 동일측의 약 65 % 정도였다. (Fig. 3-d). 그러나 p-p38 MAPK-IR 세포 발현은 동일측과 반대측 사이에 유의한 차이가 없었다 ( $p=0.14$ ).

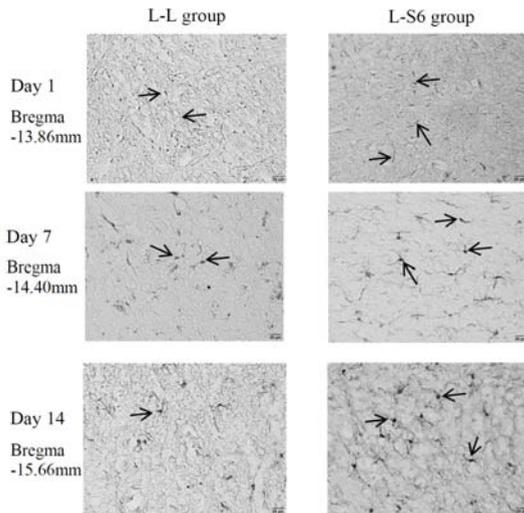


Fig. 4-a. Iba1-IR cells in the Vc. In the specimens of 7 and 14 days after nociception, Iba1 (an indicator for microglia activity)-IR cells (arrows) in the Vc of L-S6 group display hypertrophic morphologies. On the other hand, 14 days after nociception, the cells in the Vc of L-L group are found less than the cells of L-S6 group. Scale bar: 20  $\mu$  m.

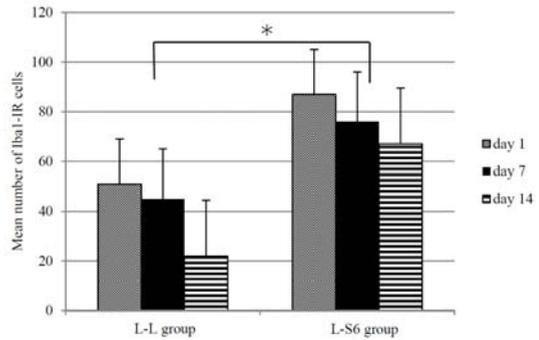


Fig. 4-b. Expressions of Iba1-IR cells in the Vc. The number of Iba1-IR cells of L-S6 group is more significantly increased than L-L group ( $*p<0.05$ ). Error bars: S.E.M.

Iba1-IR 세포는 자극 1일 후에는 주로 L-S6 group에서 확인되었다 (Fig. 4-a). 자극 1일과 자극 7일 후에는 L-S6 group이 L-L group보다 약 1.6 배 많이 발현되었고, 자극 14일 후에는 L-S6 group이 L-L group보다 약 3배 더 많이 발현되었다 (Fig. 4-b). 자극 7일, 14일 후에는 활성화 미세아교세포로 생각되는 비대한 Iba1-IR세포가 나타났다 (Fig.4-a). 또 자극 1일 후에는 Iba1-IR세포는 주로 긴돌기미세아교세포의 형태(ramified form)로 관찰되었지만, 자극 7일, 14일후에는 아메바형태(ameboid form)로 관찰되었다 (Fig. 4-a). 자극 7일 후 Iba1-IR세포는 두 그룹 모두에서 현저히 발현되었지만 자극 14일후에는 다시 L-S6 group에서만 주로 Iba1-IR세포가 확인되었다 ( $p<0.05$ , Fig. 4-b). Iba1-IR세포는 Vc 뒤안쪽 부위뿐만 아니라 뒤가쪽부위나 중앙부위

에서도 확인할 수 있었다.

## 총괄 및 고안

본 연구에서는 깨물근에 장애를 야기하여 동통 만성화 및 p38 MAPK의 역할에 대하여 확인하였다<sup>24-26)</sup>. 그 결과, 깨물근 장애로 야기될 Vc에 존재하는 p-p38 MAPK-IR 세포는 자극 직후에는 자극 측에서 관찰되었고 자극 7일 후에는 비 자극측에서도 나타났다.

그러나 깨물근에서는 자극 1일 후에는 L-L group과 L-S6 group 두 그룹 모두에서 염증매개물질(inflammatory mediator)인 TNF $\alpha$ - 와 BKRB2-IR 세포가 현저히 나타났지만, 자극 7일 후에는 일부가 산재되어 나타났다. 또 자극 14일 후에는 TNF $\alpha$ - 와 BKRB2-IR 세포 발현이 거의 없었다.

선행연구에서는 혀를 formalin으로 자극하였을 때, 생리식염수로 자극하였을 때보다 TNF $\alpha$  발현이 유의하게 증가하였다<sup>29)</sup>. TNF $\alpha$ 에 관한 다른 연구들은 TNF $\alpha$ 가 염증 시에 각질세포(corneocyte)나 섬유모세포에서 합성, 분비되고<sup>30-31)</sup>, 손상 후에는 말초신경 슈반세포(Schwann cell) 등에서 합성된다고 보고하였다<sup>32)</sup>. 또 TNF $\alpha$ 를 피하에 주사하기 때문에 C fiber가 존재하는 침해수용세포가 흥분되어 동통이 유발되고<sup>33-35)</sup>, 또한 TNF $\alpha$ 를 염증부위에 투여하면 통각과민 반응이 야기된다고 보고하였다<sup>35-37)</sup>.

게다가 BKRB2는 포식세포나 섬유모세포에 작용하고, 급성통증에 관여한다고 알려져 있다<sup>38)</sup>. 본 실험에서 자극 1일 후에는 L-L group과 L-S6 group 두 그룹 모두 BKRB2-IR 세포가 현저하게 나타났다. 그러나 자극 7일 후에는 BKRB2-IR 세포 발현이 산재되어 나타났고, 자극 14일 후에는 BKRB2-IR 세포 발현이 거의 없었다. 따라서 이러한 결과는 본 실험에서 일과성으로 통각수용기가 흥분되었던 것과 동통이 나타났던 것, 또 자극 1주 이내에 국소부위 통각수용기 흥분과 동통이 진정된 것을 설명해준다.

Bradykinin receptor (BKR)에는 B1과 B2가 있다. 본 실험에서는 BKRB2에 대한 발현양상만 확인하였다. BKRB1는 염증이 나타났을 때 발현하는 수용체이다. 염증이 지속될 때, BK가 대량으로 발현되고 동통이 심해진다. 본 실험 결과에 의하면 자극 7일 후에는 급성통증이 진정화된 것으로 추측되지만 추후에 BKRB1의 발현양상 또한 확인하여 국소의 상태를 더 자세하게 검토할 필요가 있다.

p-p38 MAPK-IR 세포는 염증요인 LPS 및 침해요인 S6를 투여한 L-S6 group이 L-L group보다 더 많이 나타났지만, p-p38 MAPK-IR 세포 발현은 L-L group과 L-S6 group 사이에 유의한 차이가 없었다.

선행연구에서는 rat 장딴지근(gastrocnemius)에 LPS 및 S6를 투여하고 장애를 유발하였을 때, 자극 후 2주 이후

부터 비장애측으로 반응이 항진되기때문에 만성통증 동물모델로 유용하다고 보고되었다<sup>24-26)</sup>. LPS는 gram음성세균의 균체성분으로 포식세포 등에 작용하여 염증성 시토카인 등의 생산을 유도한다<sup>39)</sup>. 또 6 % 고장성 식염수를 근육 속에 주입하면 주입한 국소 부위에서 떨어진 부위에서도 동통이 야기된다<sup>40)</sup>.

본 연구는 국소염증에 따른 만성동통과 연관통에 관해 확인해보고자 하였다. LPS만 또는 6 % 고장성 식염수만 투여하였을 때 장기간에 걸친 동통유발 행동이 나타나지 않았다는 보고가 있다<sup>24-26)</sup>. 본 연구 결과 또한 생리식염수만 투여한 group에서는 자극 7일 이후는 p-p38 MAPK-IR와 Iba1-IR 세포 모두 거의 나타나지 않았다 (data not shown). 따라서 본 연구에서는 LPS만 투여한 group, LPS와 6 % 고장성 식염수를 투여한 group으로 나누어 검토하였다<sup>24-26)</sup>.

Iba1-IR 세포수는 L-L group과 L-S6 group 사이에 유의한 차이가 있었지만, p-p38 MAPK-IR 세포수는 두 그룹 사이에서 유의한 차이가 없었다. L-S6 group에서는 활성화 미세아교세포 마커로 사용된 Iba1가 자극 7일, 14일 후에 비대한 활성화 미세아교세포에서 발현되었다. 추가 실험이 진행되어야 하겠지만, 이상의 결과는 6 % 고장성 식염수를 투여한 것이 미세아교세포 활성화가 장기화된 요인이라 추측된다. 염증을 야기하는 LPS 및 동통을 야기하는 고장성 식염수를

투여하면 동통이 지속될 가능성이 있다.

또, 자극 7일 후에는 p-p38 MAPK-IR 세포 수가 반대측이 동일측의 약 85 %, 자극 14일 후에는 반대측이 동일측의 약 65 % 정도였지만 p-p38 MAPK-IR 세포 발현은 동일측과 반대측 사이에 유의한 차이가 없었다. 이 결과에 의하면 시간 경과에 따라 비자극측에서도 동통을 느끼고 있을 가능성이 있다고 생각된다. 그러나 앞으로 추가적인 실험이 진행되어야 하고, 본 연구에서 사용된 동물모델이 만성동통 동물모델로써 적합한지에 대한 검토가 필요하다.

본 연구에서는 L-S6 group에서 TNF $\alpha$  및 BKRB2-IR 세포의 발현이 진정화되어도 자극측과 비자극측에서 Vc에 존재하는 p-p38 MAPK-IR 세포가 지속적으로 발현되고 있는 것을 확인하였다. 또 자극측에서 Iba1-IR 세포도 지속적으로 발현되고 있는 것을 확인하였다. 따라서 국소적 염증반응이 진정화되어도 중추에서는 Vc에서 p38 MAPK와 미세아교세포가 활성화되었을 것이라 추측된다. 이것은 rat 장판지근에 장애를 유발했던 선행연구 결과와도 유사하다<sup>24-26)</sup>. 만성동통 발병은 말초조직보다 중추조직의 가소적인 변화가 관여한다고 보고되었고<sup>24-26, 41)</sup>, 본 연구 결과 또한 이것을 뒷받침한다.

## 결론

Vc에 존재하는 p38 MAPK 및 미세

아교세포는 깨물근을 자극할 때 반응하여 활성화된다. 특히 미세아교세포는 LPS와 고장성 식염수를 투여하면 시간이 경과함에 따라 반응이 증가한다.

자극 직후, 자극측에서 동통을 느끼지만, 시간이 경과함에 따라 비자극측에서도 동통을 느끼게 될 가능성이 있다. 이것은 국소적으로 통각수용기의 흥분이 진정화되어도 지속된다. 따라서 만성동통이 발병할 때, 말초성인 변화보다 중추성인 변화가 더 중요함을 시사한다. p38 MAPK 활성화도 그것에 관여한다고 추측된다.

## 사 사

본 연구의 일부는 오사카치과대학 국제 교류조성에 의하여 실시하였다.

## 참고문헌

1. Velly AM, Look JO, Schiffman E et al. : The effect of fibromyalgia and widespread pain on the clinically significant temporomandibular muscle and joint pain disorders: a prospective 18-month cohort study. *J Pain* 11:1155-1164, 2010.
2. American Academy of Orofacial Pain. de Leeuw R, ed. : Orofacial pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis and Management. 4th ed. Chicago: Quintessence, 2008.

3. Wright EF, Sarah LN : Mant and Treatment of Temporomandibular Disorders: A Clinical Perspective. *J Man Manip Ther* 17(4):247-254, 2009.
4. Okeson JP : Management of temporomandibular Disorders and Occlusion. 6<sup>th</sup> ed. St. Louis, MO: CV Mosby, 2008.
5. Branco JC, Bannwarth B, Failde I et al. : Prevalence of fibromyalgia: a survey in five European countries. *Semin Arthr Rheum* 39:448-453, 2010.
6. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG et al. : Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: part II. *Arthr Rheum* 58: 26-35, 2008.
7. Svensson P. Muscle pain in the head: overlap between temporomandibular disorders and tension-type headaches. *Curr Opin Neurol* 20: 320-325, 2007.
8. Ge HY: Prevalence of myofascial trigger points in fibromyalgia: the overlap of two common problems. *Curr Pain Headache Rep* 14:339-345, 2010.
9. Mense S, Gerwin R.D. (eds.): Muscle Pain: Understanding the Mechanisms. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.
10. Gracely RH et al. : Functional

- magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis Rheum* 46(5):1333-1343, 2002.
11. Staud R et al.: Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(2):90-98, 2006.
  12. Wood, PB et al.: Reduced pre-synaptic dopamine activity in fibromyalgia syndrome demonstrated with positron emission tomography: a pilot study. *J. Pain* 8, 51-58, 2007.
  13. Gerdle B, Fsgren MF, Bengtsson A et al.: Decreased muscle concentrations of ATP and PCR in the quadriceps muscle of fibromyalgia patients - A (31) P-MRS study. *Eur J Pain* 17(8):1205-1215, 2013.
  14. Staud R: Is it all central sensitization? Role of peripheral tissue nociception in chronic musculoskeletal pain. *Curr Rheumatol Rep* 12(6):448-454, 2010.
  15. Kim SY, Bae JC, Kim JY et al.: Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. *Neuroreport* 13: 2483-2486, 2002.
  16. Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ et al.: p38 mitogen-activated 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: 4017-4022, 2003.
  17. Svensson CI, Marsala M, Westerland A et al.: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. *J Neurochem* 86: 1534-1544, 2003.
  18. Ji RR: Mitogen-activated protein kinases as potential targets for pain killers. *Curr Opin Investig Drugs* 5: 71-75, 2004.
  19. Svensson CI, Fitzsimmons B, Azizi S et al.: Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization. *J Neurochem* 92: 1508-1520, 2005.
  20. Tsuda M, Inoue K, Salter MW: Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 28: 101-107, 2005.
  21. Xie YF, Zhang S, Chiang CY et al.: Involvement of glia in central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (Medullary dorsal horn). *Brain, Behavior, and Immunity* 21: 634-641, 2007.
  22. Canzobre MC, Rios H: Pulpar tooth injury induces plastic changes in S100B positive astroglial cells in the trigeminal subnucleus cau-

- alis. *Neuroscience Letters* 470: 71-75, 2010.
23. Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Pathophysiological roles of transient receptor potential channels in glial cells. *YAKUGAKU ZASSHI* 130 (3): 281-287, 2010. (in Japanese)
24. Hashimoto T, Sakurai H, Ohmichi Y et al.: A trial to develop an experimental model for chronic myopathic pain. *PAIN RESEARCH* 20:15-20, 2005. (in Japanese)
25. Hashimoto T, Kumazawa T: Assessment of chronic pain-like behaviors in rats induced by muscle lesion. *JJSAM* 56(5):809-814, 2006. (in Japanese)
26. Yamaguchi Y, Hashimoto T, Sakurai H et al.: Low rather than high dose lipopolysaccharide 'priming' of muscle provides an animal model of persistent elevated mechanical sensitivity for the study of chronic pain. *Eur J Pain* 15:724-731, 2011.
27. Zimmerman M: Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.
28. Ito D, Imai Y, Ohsawa K et al.: Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res* 57: 1-9, 1998.
29. Huang HC, Nakatsuka M, Iwai Y: Activation of microglial cells in the trigeminal subnucleus caudalis evoked by inflammatory stimulation of the oral mucosa. *Okajimas Folia Anat Jpn* 89(4) : 137-145, 2013.
30. Corsini E, Galli CL: Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett.* 102-103 : 277-282, 1998.
31. Fujisawa H, Wang B, Kondo S et al.: Costimulation with ultraviolet B and interleukin-1 alpha dramatically increase tumor necrosis factor-alpha production in human dermal fibroblasts. *J Interferon Cytokine Res* 17 : 307-313, 1997.
32. Wagner R., Janjigian M, Myers RR: Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and neuronal TNF- $\alpha$  expression. *Pain* 74 : 35-42, 1998.
33. Hensellek S, Brell P, Schaible HG et al.: The cytokine TNF $\alpha$  increases the proportion of DRG neurons expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci* 36: 381-391, 2007.
34. Spicarova D, Palecek: Tumor necrosis factor  $\alpha$  sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine. *J Neuroinflammation* 7:49-54, 2010.
35. Junger H, Sorkin Linda S: Noci-

- ceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF $\alpha$ . *Pain* 85 : 145-151, 2000.
36. Watkins LR, Wiertelakb EP, Goehlerc LE et al.: Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain res* 654 : 15-26, 1994.
37. Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B et al.: Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Br J Pharma* 121 : 657-670, 1994.
38. Kishi R, Mizuno T, Waki Y et al.: Pathogenesis of pain caused by bone Metastasis from malignancies and pain relief by drug therapy. *Jpn J Pharm Palliate Care Sci* 1 : 3-9, 2008. (in Japanese)
39. Kawai T, Adachi O, Ogawa T et al.: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11(1):115-22, 1999.
40. Kellgren JH: On the distribution of pain arising from deep somatic structures. *Clin Sci* 4 : 35, 1939.
41. Kato F: Towards the understanding of the neurobiological process underlying pain chronification. *J Musculoskelet Pain Res* 6:52-57, 2014. (in Japanese)

## ABSTRACT

### Evaluation of MAPK pathway activation in brainstem induced by the masseter muscle inflammation

Michiko Nakatsuka<sup>1\*</sup>, Shunji Kumabe<sup>1</sup>, Shoko Gamoh<sup>2</sup>, Hironori Akiyama<sup>2</sup>, Seong-Suk Jue<sup>3</sup>, Ji-Youn Kim<sup>3</sup>, Katsura Ueda<sup>1</sup>, Yoshifumi Matsuda<sup>1</sup>, Kimishige Shimizutani<sup>2</sup>, Je-Won Shin<sup>3</sup> and Yasutomo Iwai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Anatomy, Osaka Dental University, <sup>2</sup>Department of Oral Radiology, Osaka Dental University, Osaka, JAPAN, <sup>3</sup>Department of Oral Anatomy, Graduate School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, KOREA

To evaluate the inflammatory hyperalgesia induced by noxious stimulation of the masticatory muscles, we performed an immunohistochemical study on the expressions of phosphorylated-p38 (p-p38) mitogen activated-protein kinase (MAPK) and the distribution of activated microglia in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc). The left masseter muscle (LMM) of Sprague Dawley rats (male, 250 g, n=60) was stimulated in the following methods: 1) L-L group (control); the LMM was injected with lipopolysaccharide (LPS, 2  $\mu$ g/kg, 100  $\mu$ l) on the 1<sup>st</sup> day of the experiment. On day 2, the same site was injected with the LPS again. 2) L-S6 group (experimental); the LMM was injected with LPS (2  $\mu$ g/kg, 100  $\mu$ l) on the 1<sup>st</sup> day of the experiment. On day 2, the same site was injected with 6 % sodium chloride solution (S6, 100  $\mu$ l, 5 times per 90 min). Rats were allowed to survive for 1 day, 7 days or 14 days after the last injection. The brainstems were dissected and cut with a cryostat (at 30  $\mu$ m thickness). These specimens were investigated with anti-TNF $\alpha$  (masseter muscle), the bradykinin receptor B2 (BKRB2, masseter muscle), anti-p-p38 MAPK (brainstem) and anti-Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1: Iba1, a marker for microglial activity; brainstem) enzyme-labeled antibody method. The specimens were observed and evaluated using a light microscope

(LM) mounted with an Olympus FX380 3CCD digital camera system connected with a FLvFs software (Flovel Image Filling System, Tokyo, Japan). In both groups, the TNF- $\alpha$  and the BKRB2-immunoreactive (IR) cells were observed until 7 days after stimulation. In the experimental group, the LM histology indicates that p-p38 MAPK and Iba1-IR cells were particularly localized in the left Vc until 14 days after stimulation. In the experimental group, 7 days or 14 days after nociception, the p-p38 MAPK-IR cells were recognized in the contralateral and ipsilateral in the Vc. The results suggest that the prolonged MAPK activity in the Vc is related to central sensitization in chronic pain of the masseter muscle.

Key Words: masseter muscle; chronic pain