

# 황금 추출물의 신경병증성 통증 유발 흰쥐에 미치는 영향

황민섭 · 강석용 · 강안나 · 김수진<sup>1</sup> · 정효원 · 박용기\*

동국대학교 한의과대학, 1: 동국대학교 의과대학

## Effects Study of Scutellariae Radix Extract on the Neuropathic Pain in Tibial and Common Peroneal Nerve Transected Rats

Min Sub Hwang, Seok Yong Kang, An Na Kang, Su Jin Kim<sup>1</sup>, Hyo Won Jung, Yong Ki Park\*

College of Korean Medicine, Dongguk University, 2: College of Medicine, Dongguk University

TRPA1 and TRPV1 are members of the TRP superfamily of structurally related, nonselective cation channels. TRPA1 and TRPV1 are often co-expressed in sensory neurons and play an important role in mechanical hyperalgesia and allodynia during neuropathic pain. Scutellariae Radix was reported to possess anti-inflammation properties and similar patterns of therapeutic action against different diseases. also Baicalin(a known principal constituent of Scutellaria Radix) was shown to down-regulate the mRNA expression levels of TRPV1. In this study, we observed the effects of Scutellariae Radix extract(SRE) in neuropathic pain induced SD rats via modulation of TRPV1 and TRPA1. Oral administration of a Scutellaria Radix extract(in doses of 300mg/kg, SRE(300)) showed a meaningful increase in the withdrawal threshold of mechanical allodynia and showed a meaningful decrease in the expression of c-fos compared to the control group. SRE(100) and SRE(300) showed a meaningful decrease in the expression of TRPV1 level compared to the control group. These results suggest that Scutellariae Radix extract could decrease mechanical allodynia by down-regulate the TRPV1 on the model of neuropathic pain.

keywords : Neuropathic pain, Scutellariae Radix, c-fos, TRPV1, TRPA1

### 서론

신경병증성 통증(neuropathic pain)은 체성감각신경계(somatosensory system)의 병변이나 질병에 의해 발생하는 통증으로 다양한 질환이나 병변에 의해 발생하는 증후군이다<sup>1)</sup>. 임상적으로 다양한 증상들이 나타날 수 있는데, 특히 자발통(spontaneous pain), 이질통(allodynia), 과통증(hyperalgesia)이 특징적으로 관찰된다<sup>2)</sup>. 1892년 Mitchell이 처음으로 기술한 이래 많은 환자들에게서 발견되었으며, 우리나라에서도 이와 유사한 통증을 호소하는 환자들이 많이 있으나<sup>3,4)</sup>, 아직까지 신경병증성 통증의 약물 치료는 만족스럽지 못한 상황이다<sup>5)</sup>.

일과성 수용체 전압(transient receptor potential, TRP) 이온 채널은 1997년 Caterina 등이 바닐로이드(vanilloid) 수용체를 보고한 이후 통증 연구 분야에 있어서 TRP 채널에 대한 관심이 집중되고 있다<sup>6)</sup>. 많은 TRP 이온 채널 중 통증과 관계가 있는 TRP 이온 채널은 온도자극에 반응하는 이온 채널과 기계적 자극에 대하여 반응하는 이온 채널로 Transient receptor potential vanilloid type 1(TRPV1)과 Transient receptor potential ankyrin

1(TRPA1) 등이 여기에 해당한다<sup>7)</sup>.

TRPV1은 열 자극에 의해서 활성화되는 TRP 이온 채널로서 유해감각수용기의 중요한 신호통합자로서 신경병증성 통증에서 중요한 역할을 한다. TRPV1과 함께 감각신경세포에서 공동으로 발현되는 TRPA1은 냉통증을 담당하는 이온 채널로서 한냉자극에 의해 발현된다고 알려져있다<sup>8,9)</sup>.

황금은 꿀풀과에 속한 다년생 초본 식물인 황금(黃芩, Scutellaria baicalensis)의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로서<sup>10)</sup>, 항염증<sup>11)</sup>, 항세포자연사<sup>12)</sup>, 척수 조직 손상에 대해 항염증 효능<sup>13)</sup> 및 운동기능장애 개선 효능<sup>14)</sup> 등의 연구보고가 있다. 또한, 황금의 주요 활성 성분인 baicalin은 세포실험에서 TRPV1의 발현을 하향조정하는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>15)</sup>.

이에 저자는 황금을 이용한 치료가 온도 수용체 겸 통증 수용체인 TRP 이온 채널의 조절을 통해 신경병증성 통증 치료에 유의한 효과가 있을 것으로 생각되어, 신경병증성 통증이 유발된 흰쥐의 이질통에 대한 회피반응 및 뇌 중심 회백질에서 c-fos 발현, 후근신경절(Dorsal Root Ganglion(DRG))에서 TRPV1 및 TRPA1 발현 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* Corresponding author

Yong Ki Park, College of Korean Medicine, Dongguk University, 27, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea

E-mail : yongki@dongguk.ac.kr ·Tel : +82-54-770-2661

·Received : 2017/11/07 ·Revised : 2017/12/12 ·Accepted : 2018/12/27

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.02.32.1.35

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 황금(Scutellariae Radix)은 광명당제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입하여 추출물 제조에 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Tissue protein lysis buffer(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), Protein assay dye reagent, Precision plus dual color standards, Acrylamide/Bis solution 30% 29:1, Ammonium persulfate, Temed, Tris/Glycine buffer, Tris/Glycine/SDS buffer, Goat-anti-mouse, Goat-anti-rabbit, Clarity western ECL substrate(Bio-Rad Laboratories, California, USA), anti-TRPV1 antibody, anti-TRPA1 antibody(Novus Biologicals, Colorado, USA) anti- $\beta$ -actin antibody(sigma aldrich, Missouri, USA), anti-c-Fos antibody(Cell signaling Technology, Massachusetts, USA) 등이며, 실험에 사용된 기기는 추출기(Daihan saientific, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd, Japan), 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea), Protein 전기영동장치, Transfer장치, ChemiDocTMMP imaging system(Bio-Rad Laboratories, California, USA), Precise Tactile Sensory Evaluator(Ugo basile, Varese, Italy) 등을 사용하였다.

#### 3) 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 6주령 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 Rat(170-190g)을 (주)코아텍(경기도, 한국)으로부터 공급받아 1주일 동안 순화시킨 후 동물모델 제작에 사용하였다. 실험기간동안 일정량의 고형사료(200g)와 정수된 물(500 ml)을 섭취시켰으며, 명암은 12시간 (Day light 08:00~20:00) 주기로, 23±2°C의 실내온도와 50±10%의 습도를 유지하여 실험종료까지 일정한 사육조건을 유지시켰다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물 실험 윤리위원회 심의 (IACUC-2017-007)에 따라 관리하였다.

### 2. 방법

#### 1) 황금추출물 제조

황금추출물은 황금 200g을 물로 95°C에서 3시간 추출하였으며, 3겹 거즈 및 와트만 거름종이(Whatman No. 1)로 거른 후 회전식 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 이를 냉동시킨 후 동결건조기로 건조하였으며 이때 수율은 35.3%였다. 건조된 황금추출물은 미세하게 마쇄한 후 일정 용기에 담아 냉동 보관하였으며, 실험직전 생리식염수에 일정 농도로 완전 용해시켜 시험약물로 사용하였다.

#### 2) 신경병증성 통증 동물모델제작(spared nerve injury(SNI model))

흰쥐를 isoflurane 2.5 %로 도입, 전신마취 후 우측 고관절 후측의 피부를 면도하고 절개한 후 biceps femoris muscle 사이의 sciatic nerve을 찾아 tibial nerve와 common peroneal

nerve 및 sural nerve를 확인한 후 microforcep으로 주변조직 및 혈관으로부터 분리시켰다. 이후 sural nerve는 남겨두고, tibial nerve 와 common peroneal nerve는 5.0 silk thread로 결찰한 후 그 말단부를 2 mm 가량 절단하여 제거하였다. 절개된 부위는 kanamycin을 점적하고 피부를 봉합하였다.

#### 3) 군 분리

모두 25마리의 흰쥐는 정상군(N, n=5), SNI 모델 방식으로 신경병증성 통증을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(C, n=5), 신경병증성 통증을 유발시킨 후 황금추출물 100mg/kg을 경구 투여한 약물군(SRE(100), n=5), 신경병증성 통증을 유발시킨 후 황금추출물 300mg/kg을 경구투여한 약물군(SRE(300), n=5), Tramadol 64 mg/kg을 경구 투여한 양성 대조약물군(Tra, n=5)으로 나누었다.

4) Von Frey filament 및 acetone 자극으로 유발된 이질통 측정 물리적 자극은 von Frey filament를, 화학적(냉각) 자극은 acetone을 이용하여, 신경병증성 통증 모델 제작 전(0일째) 이질통을 측정 후 수술하였으며, 수술 후 5일째부터 5일 마다 1회씩 기계적 자극과, 화학적(냉각) 자극에 대한 회피반응(withdrawal response)을 관찰하였다.

##### (1) 기계적 이질통 검사

von Frey filament(Touch test 4.93, north coast medical Inc, 영국)를 이용하여 발바닥에 물리적인 자극을 가한 뒤 발바닥에서 유발된 회피반응 역치를 측정하였다. 발의 회피반응을 측정하기 위해서 쥐를 격자가 3mm 철망 위에 올려진 투명한 아크릴통(28 × 28 × 10cm)에 넣고 환경에 적응 할 수 있는 시간을 주었다. 약 5분 정도의 시간이 경과 후, 쥐의 순응 여부를 확인하고 철망 격자 사이로 정량화된 von Frey filament로 환측 발 내측 부위를 자극하였다. von Frey filaments가 약간 구부러질 정도로 환측 발 내측 부위를 수초 간격으로 총 5회 자극(2초에 1회의 빈도)에서 3회 이상 회피반응이 나오는 경우 양성 반응으로 간주하였다. 검사시 0.02 g에서 60g 사이의 filament를 사용하였으며, 60g을 넘어도 회피 반응을 나타내지 않거나 0.02 g에서 회피 반응을 나타내면 더 이상의 자극을 가하지 않고 이를 한계치로 하였다.

##### (2) Acetone 자극에 의한 냉 이질통 검사

환측 발 내측 부위에 5분 간격으로 2ml씩 10회를 자극하여, 발의 회피반응의 횟수를 얻어 백분율로 표시하였다.

#### 4) 약물투여

약물 투여는 통증 유발 수술 후 6일째부터 시작하여, 실험종료까지 15일간 매일 1회 경구 투여하였으며, 양성 대조약물로 Tramadol(64mg/kg)을 매일 1회 15일간 경구 투여하였다.

#### 5) Western blotting analysis

##### (1) Dorsal Root Ganglia (DRG)

실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 시술 측(우측) 척수 후근신경절(dorsal root ganglia, DRG)을 적출하여 말초조직의 온도감수성일시적전위통로(transient receptor protein, TRP)인 TRPV1과 TRPA1의 발현 변화를 확인하기 위해 Western blotting analysis를 하였다. 즉, 각 조직에 Tissue protein lysis buffer를 넣고 마쇄기(homogenizer)를 이용하여 조직액을 분리한 후

14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 단백질의 양을 Protein assay dye reagent 용액으로 측정하고, 총 30 ug 단백질을 SDS-PAGE 방법으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% Skim milk 용액을 이용하여 실온에서 1시간 비특이반응을 제거하기 위한 blocking을 실시하였고, TRPV1과 TRPA1에 대한 1차 항체(TRPV1, 1:500, Novus; TRPA1, 1:500, Novus)를 넣고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 TBST buffer(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체(Goat-anti-mouse, 1:2000; Goat-anti-rabbit, 1:2000)와 상온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer로 3회 세척한 후 ChemiDoc™MP imaging system을 이용하여 밴드 유무를 관찰하였다.

(2) Brain(central gray matter)

실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 뇌조직을 적출 후, 혈액 등 이물질을 제거하기 위하여 phosphate buffered saline을 이용하여 1회 세척 후 Tissue protein lysis buffer를 넣고 마쇄기를 이용하여 조직을 분쇄하여 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 단백질의 양을 측정하고, 총 20 ug 단백질을 SDS-PAGE 방법으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% Skim milk 용액을 이용하여 실온에서 1시간 비특이반응을 제거하기 위한 blocking을 실시하였고, 1차 항체를 (c-fos, 1:500, Cell signaling) 넣고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체 (Goat-anti-mouse, 1:2000; Goat-anti-rabbit, 1:2000)와 상온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer로 3회 세척한 후 ChemiDoc™MP imaging system을 이용하여 밴드 유무를 관찰하였다.

각 밴드는 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 density를 측정하여 β-actin 발현에 대한 상대적 비율로 계산하여 3회 반복실험에 대한 결과를 그래프(Histogram)로 나타내었다.

6) 통계학적 검정

모든 실험결과는 최소 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, CA, USA)을 이용하여 two-way ANOVA(Bonferroni post hoc multiple comparison tests) and one-way ANOVA(Tukey's test)를 이용하여 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. Von Frey filament에 의한 기계적 이질통에 미치는 효과

황금추출물의 경구투여가 tibial & common peroneal nerve의 말단부를 제거하여 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 von Frey filament 자극으로 유발된 기계적 이질통에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, 대조군의 회피반응 역치는 5일째 8.60±3.97g, 10일째 1.44±1.49g, 15일째 2.36±1.51g, 20일째 4.00±1.41g을 나타내어

정상군에 비해 유의하게 낮았으며, 이에 비하여 SRE(300) 투여군은 15일째 19.40±6.02g, 20일째 23.80±4.92g로 기계적 자극에 대한 반응역치가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, Tramadol 투여군도 20일째 36.00±23.11g으로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.05)(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Withdrawal threshold to Mechanical Allodynia on the Neuropathic Pain in Rats

Days Group	0	5	10	15	20
Normal	60.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	39.60±18.62	60.00±0.00
Control	53.20±15.21###	8.60±3.97###	1.44±1.49###	2.36±1.51###	4.00±1.41###
SRE(100)	60.00±0.00	1.32±0.18	16.20±5.89	19.40±6.02	19.40±6.02
SRE(300)	53.20±15.21	1.80±1.30	14.20±6.94	19.40±6.02	23.80±4.92*
Tramadol	53.20±15.21	16.00±24.93	15.20±25.16	11.60±13.15	36.00±23.11**

Mechanical withdrawal threshold to a von Frey filament was measured on day 0(base), 5, 10, 15 and 20 after surgery. Scutellariae Radix Extract was orally administrated a single dose of 100 and 300 mg/kg on the rats for 15days. Tramadol was orally administrated a single dose of 64 mg/kg on the rats for 15days. The task and treatments were started on the 6th day after inducing neuropathic pain. Results are shown as means±S.E. ### : P<0.001, Control group versus normal group; \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, SRE(300), Tramadol group versus Control group.

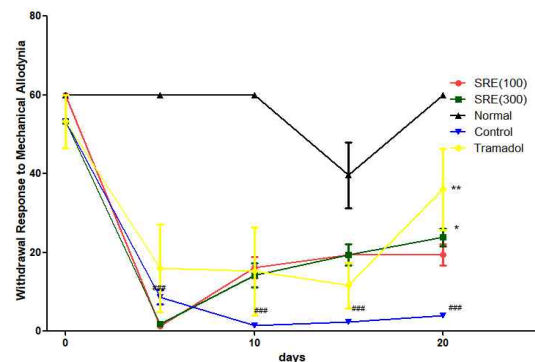


Fig. 1. Effects of oral administration of Scutellariae Radix Extract on the neuropathic pain(mechanical allodynia) induced by spared nerve injury in rats. Control : neuropathic pain induced and no treatment. SRE(100) : neuropathic pain induced and oral administration of a single dose of 100 mg/kg Scutellariae Radix Extract. SRE(300) : neuropathic pain induced and oral administration of a single dose of 300 mg/kg Scutellariae Radix Extract. Tramadol : neuropathic pain induced and oral administration of a single dose of 64 mg/kg tramadol. ### : P<0.001, Control group versus normal group; \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, SRE(300), Tramadol group versus Control group.

2. Acetone에 의한 냉 이질통에 미치는 효과

황금추출물의 경구투여가 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 acetone 자극으로 유발된 냉 이질통에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, 대조군은 5일째 22.00±14.83%, 10일째 44.00±11.40%, 15일째 52.00±27.75%, 20일째 36.00±15.17%를 나타내어 정상군에 비해 회피 반응률이 유의하게 증가하였으며, 이에 비하여 SRE(100) 투여군은 15일째 46.00±13.42%, 20일째 24.00±15.17%를, SRE(300) 투여군은 15일째 50.00±33.17%, 20일째 24.00±20.74%로 반응률이 비교적 감소하였으나 통계적으로 의미 있는 수준은 아니었으며, Tramadol 투여군은 15일째 14.00±21.91%, 20일째 16.00±8.94%로 유의하게 감소하였다(p<0.05)(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Withdrawal Response to Cold Allodynia on the Neuropathic Pain in Rats

Days Group	0	5	10	15	20
Normal	0.00±0.00	0.00±0.00	4.00±5.48	0.00±0.00	14.00±8.94
Control	8.00±17.89	22.00±14.83 <sup>###</sup>	44.00±11.40 <sup>###</sup>	52.00±27.75 <sup>###</sup>	36.00±15.17 <sup>###</sup>
SRE(100)	0.00±0.00	24.00±24.08	24.00±20.74	46.00±13.42	24.00±15.17
SRE(300)	12.00±8.37	84.00±30.50	48.00±38.99	50.00±33.17	24.00±20.74
Tramadol	0.00±0.00	34.00±32.09	18.00±13.04*	14.00±21.91*	16.00±8.94**

Withdrawal Response to Cold Allodynia using Acetone drop method was measured on day 0(base), 5, 10, 15 and 20 after surgery. Scutellariae Radix Extract was orally administrated a single dose of 100 and 300 mg/kg on the rats for 15days. Tramadol was orally administrated a single dose of 64 mg/kg on the rats for 15days. The task and treatments were started on the 6th day after inducing neuropathic pain. Results are shown as means±S.E. <sup>###</sup> : P<0.001, Control group versus normal group; \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, Tramadol group versus Control group.

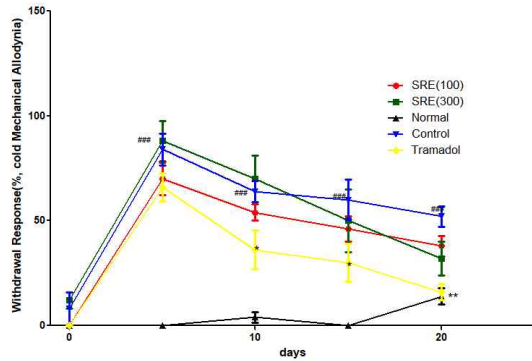


Fig. 2. Effects of oral administration of Scutellariae Radix Extract on the neuropathic pain(cold allodynia) induced by spared nerve injury in rats. <sup>###</sup> : P<0.001, Control group versus normal group; \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, Tramadol group versus Control group.

3. c-fos 단백질 수준에 미치는 효과

항금추출물의 경구투여가 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 뇌 중심 회백질 부위에서의 c-fos 단백질 수준에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 증가하는 것으로 나타났으나 통계적으로 의미있는 차이를 보이지는 않았으며, SRE(100) 투여군과 SRE(300) 투여군, Tramadol 투여군에서 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으며 특히 SRE(300) 투여군에서는 유의하게 감소하였다.(p<0.05)(Fig. 3).

4. TRPV1, TRPA1 단백질 수준 결과

항금추출물의 경구투여가 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 TRPV1과 TRPA1 단백질 수준에 미치는 영향을 확인하기 위해 수술 측(우측) L5 DRG의 TRPV1과 TRPA1에 대한 Western blotting 분석을 실시하였다. L5 DRG에서 TRPV1 단백질 수준은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었으며, SRE(100) 투여군, SRE(300) 투여군, Tramadol 투여군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.(p<0.005)(Fig. 4). TRPA1 단백질 수준 또한 대조군이 정상군에 비해 증가되어 있었으나, 통계적인 유의성이 있는 수준은 아니었으며, SRE(100) 투여군, SRE(300) 투여군, Tramadol 투여군 모두 대조군에 비해 감소되어 있었으나, SRE(100) 투여군만 유의한 감소를 나타내었다.(p<0.01)(Fig. 4).

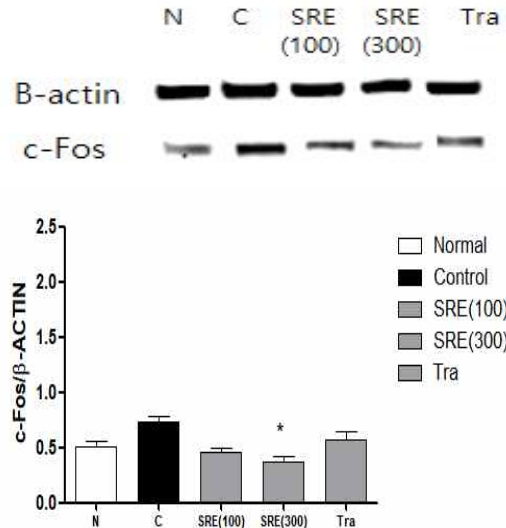


Fig. 3. Effects of oral administration of Scutellariae Radix Extract on the activity of c-fos protein in the central gray of brain in the neuropathic pain induced by spared nerve injury in rats. \* : P<0.05, SRE(300) group versus Control group.

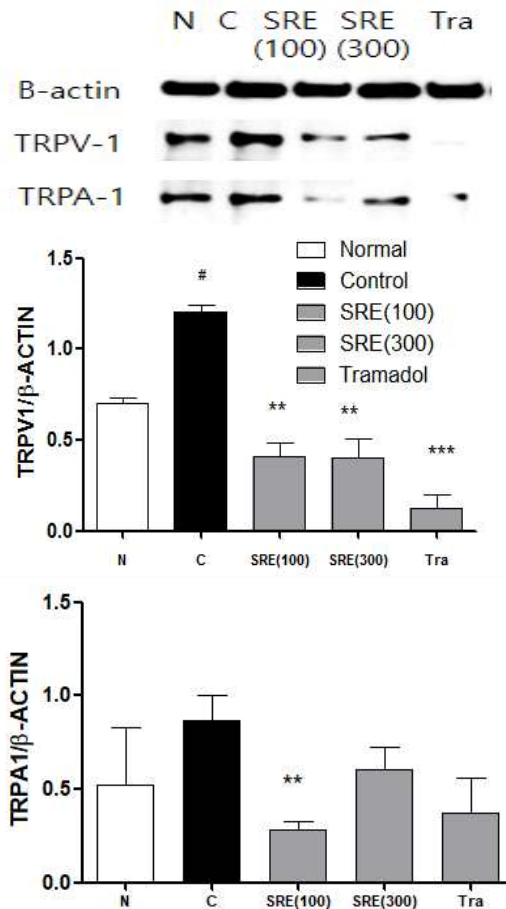


Fig. 4. Western blotting analysis of TRPV1 and TRPA1 levels in ipsilateral L5 DRG in normal, controle, SRE(100), SRE(300) and Tramadol groups. # : P<0.05, Control group versus normal group; \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001, SRE(100), SRE(300), Tramadol group versus Control group.

## 고 찰

침해성 통증(nociceptive pain)은 조직 손상의 위협이나 실질적인 조직 손상에 대한 경고성 감각으로 우리 몸을 보호하는 말초신경계와 중추신경계의 기본적인 생리 기능이다. 진통제 치료에 잘 반응하며 유해 자극이 제거되거나 조직 손상이 치유되면 자연히 감소하게 된다<sup>16,17</sup>. 그러나 신경계의 손상은 손상 부위가 치유되고 난 후에도 수개월에서 수년 까지도 지속적인 통증을 일으키기도 한다. 이때 통증은 외상이나 질환에 의해 말초신경, 척수 후근, 척수, 뇌 부분에서 손상이 발생하며 이러한 신경계 손상의 결과 발생하는 통증을 신경병증성 통증이라고 한다<sup>18</sup>.

임상적 증상은 유발 자극에 의해 나타나는 증상들과 유발 자극 없이 나타나는 증상들로 나눌 수 있다. 유발 자극에 의한 증상은 보통의 통증 자극에 대해 낮아진 역치나 과도한 통증을 보이는 통각과민(hyperalgesia)과 보통 통증을 느껴야 하지 않는 자극에 의해 통증이 유발되는 이질통(allodynia)이 대표적이다. 유발 자극 없이 나타나는 증상은 쑤시는 듯한 통증, 전격통, 화끈거리는 통증 등으로 표현되는 자발통증(spontaneous pain)과 감각저하(hypoesthesia), 무감각(anesthesia) 등이 대표적이다<sup>19</sup>.

현재 서양의학에서는 약물치료 위주로 아편유사제(opioids), 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants), 항경련제(anticonvulsants), 비스테로이드 항염증약(NSAIDs) 등이 사용되고 있으나, 그 효과는 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있어 새로운 치료 방법에 대한 연구들이 이루어지고 있다<sup>16</sup>.

이러한 신경병증성 통痛的 발생 기전을 연구하기 위한 동통모델의 필요성 때문에 여러 가지 신경병증성 통증 모델이 개발되어왔는데, 기계적인 말초신경 손상을 이용한 동물 모델로는 Bennett 등<sup>20</sup>의 chronic constriction injury(CCI) 모델, Seltzer 등<sup>21</sup>의 Partial sciatic nerve ligation(PSL) 모델, Kim 등<sup>22</sup>의 Spinal nerve ligation(SNL) 모델, Decosterd 등<sup>23</sup>의 spared nerve injury(SNI)모델이 있다. 본 실험에서는 신경손상의 정도와 증상발현을 비교적 일정하게 할 수 있는 장점이 있는 SNI 모델을 이용하여 실험하였다<sup>24</sup>.

일과성 수용체 전압(transient receptor potential, TRP) 이온 채널은 1997년 Caterina 등이 바닐로이드(vanilloid) 수용체를 보고한 이후 통증 연구 분야에 있어서 TRP 이온 채널에 대한 관심이 집중되고 있다<sup>6</sup>. 특히 TRPV1은 유해감각수용기의 중요한 신호통합자로서 신경병증성 통증에서 중요한 역할을 한다<sup>25</sup>. 활성화된 TRPV1은 다양한 신경 손상의 원인으로 유발되는 기계적 이질통과 열적 통각과민에 영향을 주며, 또한 TRPV1의 길항체는 이질통과 통각과민을 억제할 수 있다<sup>26</sup>. TRPV1과 함께 감각신경세포에서 공동으로 발현되는 TRPA1은 냉통증을 담당하는 이온 채널로서 한랭 자극에 의해 발현된다. TRPV1과 함께, TRPA1 또한 포유류에서 유해 자극의 전달에 관여하고 있다. 사실, 어느 정도 두 채널사이의 상호작용이 보고되고 있어서, 약 30%의 TRPV1 발현 감각 뉴런에서 TRPA1의 발현 또한 나타난다<sup>8,9</sup>.

최근, 한약의 한열 약성을 객관적으로 밝히기 위해 한약 투여에 따른 TRP 채널의 발현 변화에 대한 연구들이 진행되어, 한성

약물에 속하는 황련과 대황은 25°C 이하의 온도에 의해 활성화되는 Transient receptor potential ion channel melastatin subtype 8(TRPM8)의 발현은 증가시키고, 43°C 이상의 뜨거운 온도에 반응하는 TRPV1의 발현은 억제하는 효과가 확인되었다<sup>27</sup>. 또한, 한성 약물인 황금의 주요 활성 성분인 baicalin은 세포실험에서 TRPV1의 발현을 하향조정하는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>15</sup>.

황금(Scutellaria radix)은 여러해살이 초본식물 중 꿀풀과에 속하는 황금(黃芩, Scutellaria baicalensis)의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로서 중국이 원산지로 알려져 있으며 한국, 중국, 몽골, 및 시베리아 동부 등지에 분포한다<sup>10</sup>.

예로부터 동아시아 지역에서 해열, 이노, 지사, 이담 및 소염제의 효능으로 민간처방 및 한약재로서 사용해왔으며, 주성분은 flavonoid계 화합물로서 baicalein, baicalin, wogonin, wogonoside, oroxylin-A 및 chrysin 등의 30여 종이 분리된 것으로 알려져 있다<sup>28</sup>. 최근에 밝혀진 연구에서는 황금의 활성성분으로 알려진 baicalein, baicalin, wogonin 등에 의해서 항염증, 항산화, 항고혈압, 항알레르기, 항균, 항바이러스 및 항당뇨 등의 효과를 가지는 것으로 보고된 바 있다<sup>29-31</sup>.

또한, 황금의 주요 성분인 baicalein, baicalin, wogonin 등의 뇌신경세포 보호효능에 대해서 많은 연구 보고가 있으며<sup>32</sup>, 척수손상의 신경세포 자연사, 운동기능장애에도 효능이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>14,33</sup>. 아직 황금의 신경통에 대한 진통효과에 대한 실험적 보고는 없는 상태이나, 황금의 주요 활성 성분인 baicalin은 세포실험에서 TRPV1의 발현을 하향조정하는 작용이 있다고 연구결과에서 TRP 채널의 조절을 통해 신경병증성 통증에도 좋은 효과가 나타날 것으로 생각된다.

서양의학에서 Tramadol은 신경병증성 통증치료에 일차 혹은 이차 약제로 사용될 수 있는 약물로<sup>34</sup> 아편제로서 약한  $\mu$ -opioid 수용체의 작용제이며, serotonin과 noradrenaline의 재흡수를 억제하는 작용이 있어, 진통제이면서 또한 항우울제로서 고려되기도 한다<sup>35</sup>. 본 실험에서는 양성 대조약물군으로 Tramadol(64mg/kg)을 경구투여한 Tramadol 투여군을 추가로 관찰하여 황금추출물 투여군과의 효과를 비교해 보고자 하였다.

본 연구에서는 황금추출물(SRE)의 신경병증성 통증 유발 흰쥐 모델에 미치는 영향을 알아보기 위해 정상군(Normal)과 tibial & common peroneal nerve transection으로 통증을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(Control), 신경병증성 통증 유발 흰쥐에 황금 300mg/kg을 경구 투여한 약물군(SRE(300)), 황금 100mg/kg을 경구투여한 약물군(SRE(100)), Tramadol 64 mg/kg을 경구 투여한 양성 대조약물군(Tramadol)으로 나누어 von frey filament를 이용하여 기계적 이질통에 대한 회피반응 역치 변화, acetone을 이용한 냉 이질통에 대한 회피반응을 변화, 뇌 중뇌회백질에서 c-fos 발현, 환측 L5 DRG에서 TRPV1 및 TRPA1의 발현 변화를 관찰하였다.

본 실험에서 시행한 행동학적 검사 중 물리적 자극에 의한 회피반응의 측정에 사용한 von Frey filament는 구부러질 때의 압력이 일정하여 동일한 자극을 가할 수 있으며 이때 기계적 이질통은

회피반응으로 나타나 이를 정량화하여 객관적으로 증명할 수 있어 가장 많이 사용하는 방법이고<sup>36)</sup>, 또한 냉각 자극에 대한 회피반응은 100% acetone를 접촉시켜 증발에 의한 표면온도의 감소를 이용하는 방법으로 비록 비특이적이기는 하지만 신경병증성 통증에서 민감도가 큰 척도<sup>37)</sup>이므로 본 실험에서 이 방법들을 채택하였다.

Von Frey filament를 이용한 기계적 이질통에 대한 회피반응 역치 검사 결과에서 대조군은 5, 10, 15, 20일째 정상군에 비해 기계적 자극에 대한 회피반응 역치가 유의하게 낮았으며, 이에 비하여 SRE(100) 투여군은 회피반응 역치가 증가하였으나 통계적으로 유의한 수치는 아니었으며, SRE(300) 투여군은 20일째 회피반응 역치가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, Tramadol 투여군도 15, 20일째 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. acetone을 이용하여 냉 이질통 회피반응 결과에서, 대조군은 5, 10, 15, 20일째 정상군에 비해 반응률이 현저하게 증가하였으며, 이에 비하여 SRE(100) 투여군과 SRE(300) 투여군은 회피반응률이 대조군에 비해 유의하게 감소하지 않았으나, Tramadol 투여군은 회피반응률이 대조군에 비해 15, 20일째 유의하게 감소하였다.

결과를 보면 기계적 이질통을 감소시키는 효과는 SRE(100) 투여군에 비해 고농도군인 SRE(300) 투여군에서 유의한 효과를 나타내었으며, 이는 황금추출물이 신경병증성 통증이 유발된 흰쥐의 낮아진 통증에 대한 역치를 높여줌으로써 나타난 결과이며 그 효과는 용량 의존적(dose-dependent)인 경향이 있음을 나타낸 것으로 사료된다.

c-Fos는 다양한 자극에 의해 신경세포에서 빠르고 일시적으로 발현되어 c-Fos 단백질의 생성을 코딩하게 되는 조기발현유전자로 Hunt의 발표 이후로 물리적·화학적·열 자극 등의 다양한 유해 자극에 의해 뇌와 척수에 c-Fos 발현이 일어난다는 많은 연구들이 있어왔다<sup>38)</sup>. 현재 c-Fos 발현은 통증에 대한 신경세포의 반응을 파악하는 유용한 척도 중 하나로 여겨지고 있다<sup>39)</sup>. 본 실험에서는 뇌 중시회백질 부위에서의 c-Fos 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하였는데, 그 결과 대조군에서는 정상군에 비하여 c-fos 단백질 수준이 증가되는 경향을 보였으나 유의한 수치는 아니었으며, 이에 비하여 SRE(100) 투여군과 SRE(300) 투여군에서 대조군에 비하여 c-fos 단백질 수준이 감소되는 것으로 나타났으며 특히 RES(300)에서 유의한 감소를 보였다. 이는 황금추출물이 신경병증성 통증 감소에 유의한 효과가 있음을 보여주는 것으로 생각된다.

TRPV1 이온 채널의 통증에 대한 여러 연구 결과들을 종합해 보면, TRPV1 이온 채널은 열자극 및 매운 자극의 정보를 전달할 뿐만 아니라 염증 등의 환경에 의해 통증의 증가를 유발 시키는 데 관여하는 것으로 판단된다. 따라서 TRPV1 이온 채널의 조절물질을 통한 진통제 발굴은 새로운 분야로 각광받고 있다<sup>7)</sup>. 본 실험에서 L5 DRG에서의 TRPV1 단백질 수준은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하는 것으로 나타나 신경병증성 통증으로 인해 TRPV1의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 신경병증성 통증에서 나타나는 이질통은 TRPV1의 발현 증가와 깊은 관련성이 있다는 것을 보여주는 것으로 생각된다. 또한, SRE(100) 투여군, SRE(300) 투여군, Tramadol 투여군에서는 대조군에 비해 TRPV1 단백질 수준이 유의하게 감소되었으며, 이러한 사실에서 황금

추출물이 TRPV1 발현 억제작용을 통해 기계적 이질통 감소 작용을 나타낸 것이라고 추정할 수 있다.

TRPA1 단백질 수준은 대조군에서 정상군에 비해 유의한 증가 나타나지 않았으며, 약물투여군에서는 SRE(100) 투여군에서 대조군에 비해 TRPA1 단백질 수준의 유의한 감소가 나타났으나 SRE(300) 투여군에서는 유의한 감소가 나타나지 않았다. TRPA1 채널이 냉통증과 깊은 관련성을 가지는 이온 채널임을 고려할 때 본 실험의 신경병증성 통증에서 냉 이질통의 증가와 TRPA1의 발현 증가가 관련성이 있을 것으로 생각되나, 통계적인 유의성은 확인되지 않았다. 또한, SRE(100) 투여군, SRE(300) 투여군의 냉 이질통 회피반응 결과에서 대조군에 비해 유의한 감소가 관찰되지 않고, TRPA1 단백질 발현도 대조군과 비교하여 SRE(100) 투여군에서만 유의한 감소가 나타난 것을 볼 때, 황금추출물의 냉 이질통 감소 작용은 기계적 이질통 감소 작용에 비해 약하며, TRPA1 발현 억제 효과 또한, TRPV1 발현 억제 효과에 비해 약한 것으로 생각된다. 이러한 사실은 苦寒한 황금의 약성이 TRPA1에 비해 TRPV1의 발현 억제에 더 강한 작용을 나타내게 하는 것으로 생각되며, 또한 이러한 기전에서 냉 이질통에 비해 기계적 이질통에 대한 통증 감소 효과가 더 유의한 것으로 나타났다고 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 신경병증성 통증 흰쥐 모델에 황금추출물의 경구투여가 기계적 이질통에 의한 회피반응, c-Fos 및 TRPV1 단백질 발현 감소에 있어서 유의한 효과를 보인 것을 확인할 수 있었다. 또한, 황금추출물이 TRPV1 발현 억제를 통해 신경병증성 통증의 억제 효과가 나타난다는 것을 알 수 있었다. 향후 황금추출물의 투여 횟수 및 기간에 따른 효과 차이, 부작용 등에 대한 연구가 필요하며 임상적 적용을 위해 실험적 모델에 대한 임상적 연관성에 대한 상세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

황금추출물의 농도별 경구투여가 Spared nerve injury 흰쥐 모델의 신경병증성 통증에서 기계적 이질통, 냉 이질통, c-fos 단백질 발현 및 L5 DRG의 TRPV1과 TRPA1 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Von Frey filament 자극으로 유발된 기계적 이질통의 변화를 대조군과 비교 관찰한 결과, SRE(300) 투여군에서 회피반응 역치의 유의한 증가를 나타내었다.

Acetone 자극으로 유발된 냉 이질통의 변화를 대조군과 비교 관찰한 결과, SRE(100) 투여군과 SRE(300) 투여군 모두 회피반응의 유의한 감소가 나타나지 않았다.

c-fos 단백질 발현을 대조군과 비교 관찰한 결과, SRE(300) 투여군에서 유의한 감소가 나타났다.

TRPV1 단백질 발현은 SRE(100) 투여군, SRE(300) 투여군 모두에서 유의한 감소를 나타냈다.

TRPA1 단백질 발현은 SRE(100) 투여군에서 유의한 감소가 나타났다.

이상의 실험결과를 종합해 봤을 때 황금추출물의 경구 투여가 신경병증성 통증이 유발된 흰쥐 모델에 대해 통증 억제 효과가 있

다고 생각되며, 이러한 작용은 TRPV1 발현 억제 작용에 의한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 “한의씨앗과제”의 연구비 지원을 받아 수행된 연구입니다(HI17C1649).

## References

- Jensen TS, Baron R, Haanpaa M et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011;152:2204-5.
- Maag R, Baron R. Neuropathic pain : translational research and impact for patient care. *Curr Pain Headache Rep*. 2006;10(3):191-8.
- Devor M. Nerve pathophysiology and mechanisms of pain in causalgia. *J Auton Nerv syst*. 1983;7:371-84.
- Bonica JJ. Causalgia and other reflex sympathetic dystrophies. *The management of pain*. Edited by Bonica JJ. Pennsylvania: Lea and Febiger Publishers. 1990:220-43.
- R. Baron, “Mechanisms of disease: neuropathic pain. A clinical perspective,” *Nature Clinical Practice Neurology*, 2006;2(2):95-106.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.
- Jung SJ. The Role of Transient Receptor Potential Channel in Pain. *hanyang medical reviews* 2011;31(2):116-22.
- Vellani V, Kinsey AM, Prandini M et al. Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Mol Pain*. 2010;6:61.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003;112:819-29.
- Kim, HC. *Textbook of herbal pharmacology*. Seoul:Jipmundang;2001. p. 129-33.
- SB Yoon, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae HS, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS, Park WS. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-Activated RAW264.7 Macrophages *J Ethnophar*. 2009;125:286-90.
- Choi J, Conrad CC, Malakowsky CA, Talent JM, Yuan CS, Gracy RW. Flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1571:201-10.
- Yang KY, Choi WI, Shin JW, Park SH, Kim SJ, Lee JS, Sohn NW. Effects of Root of *Scutellariae Radix* against Inflammatory Response in the Spinal Cord Contusion Injury in Rats. *J Oriental Rehab Med*. 2011;21(3):1-11.
- Kim ES, Kim PS, Kim BH, Shin JW, Kim SJ, Sohn NW. Effects of *Scutellariae Radix* on Locomotor Dysfunction of Contusion Spinal Cord Injury Induced Rats, *The Journal of Koreana Acupuncture & Moxibustion Society*. 2011;28(3):33-42.
- Sui F, Zhang CB, Yang N, Li LF, Guo SY, Huo HR, Jiang TL. Anti-nociceptive mechanism of baicalin involved in intervention of TRPV1 in DRG neurons in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;129:361-6.
- Butera JA. Current and emerging targets to treat neuropathic pain. *J Med Chem*. 2007;50(11):2543-6.
- Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihofner C. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacology*. 2012;22:81-91.
- Yun DM. Neuropathic pain. *The Korean Journal of Pain*. 1995;8(2):219-24.
- Honore PH, Basnet A, Laila Eljaja L et al. Neuropathic pain models in the development of analgesic drugs. *Scandinavian Journal of Pain*. 2011;2(4):172-7.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33:87-107.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990;43:205-18.
- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992;50:355-63.
- Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000;87:149-58.
- Dowdall T, Robinson I, Meert TF. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;80(1):93-108.
- E. Palazzo, L. Luongo, V. de Novellis, L. Berrino, F. Rossi, and S. Maione, “Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief,” *Molecular Pain*, 2010;6:article 66.
- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ et al., The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;304(1):56-62.
- Wan HY, Kong XY, Li XM, Zhu HW, Su XH, Lin N.

- Effect of traditional Chinese medicines with different properties on thermoregulation and temperature-sensitive transient receptor potential channel protein of rats with yeast-induced fever. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2014;39(19):3813-8.
28. Lim BO, Choi SY, Choi DK, Park PJ, Choi WS, Kim JD, Shin HM. Inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* root extract on chemical mediator release and immune response. *Korean. J. Medicinal Crop Sci*. 2007;15:132-7.
29. Burnett BP, Jia Q, Zhao Y, Levy, RM. A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation. *J. Med. Food*. 2007;10:442-51.
30. Gao, Z, Huang, K, Yang, X, Xu, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim. Biophys. Acta*. 1999;1472:643-50.
31. Huang, Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5:177-84.
32. Tu XK, Yang WZ, Shi SS, Wang CH, Chen CM. Neuroprotective effect of baicalin in a rat model of permanent focal cerebral ischemia *Neurochem Res*. 2009;34(9):1626-34.
33. Bahn HJ, Jo JJ, Kim BH, Park SH, Shin JW, Kim SJ, Sohn NW. Effects of *Scutellariae Radix* on Neuronal Apoptosis of Spinal Cord Contusion Injury in Rats. *J Oriental Rehab Med*. 2011;21(4):13-22.
34. Jongen JL, Hans G, Benzon HT, Huygen F, Hartrick CT. Neuropathic pain and pharmacological treatment. *Pain Pract*. 2014;14(3):283-95.
35. Barber J. Examining the use of tramadol hydrochloride as an antidepressant. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2011;19(2):123-30.
36. Heavner JE, Calvillo O, Racz GB. Thermal grill illusion and complex regional pain syndrome type I (reflex sympathetic dystrophy). *Reg Anesth*. 1997;22(3):257-9.
37. Wahren LK, Torebjork E, Nystrom B. Quantitative sensory testing before and after regional guanethidine block in patients with neuralgia in the hand. *Pain*. 1991;46(1):23-30.
38. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull*. 1998;45(1):1-8.
39. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol*. 2005;77(5):299-352.