포르말린 유발 통증 백서모델에서 척수강 Epigallocatechin-3-gallate의 효과

¹전남대학교 의과대학 마취통증의학교실, ²두뇌한국21사업 전남대학교 의생명 인력사업단, ³전남대학교 의과학연구소
윤명하^{1,2,3*} · 이형곤¹ · 김웅모¹ · 이미경¹ · 김여옥¹ · 황란희²

Effect of Intrathecal Epigallocatechin-3-gallate on Formalin-induced Pain Rat Model

Myung Ha Yoon^{1,2,3*}, Hyung Kon Lee¹, Woong Mo Kim¹, Mi Kyoung Lee¹, Yeok Ok Kim¹ and Lan Ji Huang²

¹Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Medical School, Chonnam National University,
²Brain Korea 21 Project, Center for Biomedical Human Resources at Chonnam National University,
³Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, Gwangju, Korea

Green tea is being widely consumed as a health beverage. Recently, green tea polyphenols have been shown to possess potent anti-inflammatory property by inhibiting the production of prostaglandins; in particular, systemic green tea is shown to produce an antinociceptive effect. We examined the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), one of green tea catechins, administered at the spinal level, on the nociception. Male Sprague-Dwaley rats were used. Nociception was induced by subcutaneous injection of formalin solution (5%, 50 μ l) into the paw of the rat. For EGCG administration, intrathecal catheter was inserted into the subarachnoid space of the spine. Formalin-induced pain behavior (flinching response) was observed for 60 min and divided into the two phases, Intrathecal EGCG did not affect the flinching responses during both phase 1 and phase 2. These findings suggest that intrathecal EGCG may be ineffective against acute pain and facilitated state pain evoked by subcutaneously injected formalin.

Keywords: Tea; Pain; Spinal cord; Rat

서 론

염증 혹은 신경 손상 등은 척수에서 신경원의 과흥분성 반응을 일으켜 통각 과민 및 이질통 등 통증 반응을 보인다.¹ 이러한 통증을 감소시키기 위해 비스테로이드성 항소염제, 아편양제 등이 널리 쓰이고 있지만 만성 염증성 통증이나 신경 손상 후 통증은 고식적인 약제에 잘 반응을 보이지 않는다. 따라서 통증 전달 조절에 관여하는 물질들에 대

한 연구를 통하여 진통제 개발 등이 활발하게 이루어지고 있다.²

녹차(green tea)는 *Camellia sinensis*의 잎으로 음료로 오랫동안 널리 사용되어 왔으며 최근에 들어서는 녹차 추출물을 이용한 의학적 연구가 다양한 분야에서 진행되고 있다.³ 녹차의 주요 성분인 polyphenols는 녹차 catechins으로 알려진 epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechingallate (ECG) 및 epicatechin (EC) 등 4종류이며 이들이 지질감소, 항염증작용, 항암작용 및 항산화작용과 같은 생리학적 작용을 나타내는 것으로 생각된다.⁴ 최근 동물실험 보고에 의하면 녹차나 녹차 추출물은 통

게재결정: 2008년 7월 21일

*교신저자: 윤명하, 501-757, 전남대학교병원 마취통증의학과, Phone: 062-220-6893, Fax: 062-232-6294, E-mail : mhyoon@chonnam.ac.kr

증을 억제하였다.⁵⁻⁷ 그러나 녹차가 통증 조절에 관여하는지에 대해서 아직 정립되어 있지 않은 상태이다. 특히 척수 수준에서 효과는 보고된 적이 없다.

저자들은 포르말린 주입에 의해 유발된 급성 통증이나 촉진성(facilitation) 통증에⁸ 대한 EGCG의 효과를 관찰하여 진통제로서의 녹차의 효용성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

외과학 연구소의 동물 위원회로부터 실험 계획에 대한 승인을 얻은 후 규정에 따라 모든 실험을 진행하였다. 수컷 Sprague-Dawley (250~300 g) 백서를 대상으로 실험하였으며 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

2. 척수강 카테터 삽입술

척수강 내 카테터는 Yaksh와 Rudy의 방법⁹으로 거치하였다. Enflurane 마취 하에서 백서를 뇌 정위 고정 장치에 고정하고 두개골 위에서 정중선을 따라 양귀 2 cm 하방까지 절개하고 근육과 근막을 견인한 후 환추후두막을 찾은 다음 이 경막을 23 게이지 바늘 끝으로 절개한 후 polyethylene (PE-10) 카테터를 8.5 cm 하방까지 삽입하였다. 카테터 외부는 피하를 통하여 두개골 상부에서 고정된 다음 28 게이지 철사로 막아 놓았다. 절개부위를 3-0 실크로 봉합하고 마취에서 각성시켰다. 카테터 삽입 후 신경학적 손상을 보인 백서는 실험에서 제외하고 흡입 마취제 과다 투여로 바로 사망시켰으며 정상 소견을 보이는 백서는 각각의 케이지에 넣어 수술 5일 후에 본 실험을 시행하였다.

3. 통증 모형

통증 모형으로는 포르말린 시험을 이용하였다. 이는 5% 포르말린 용액 50 μ l를 백서 뒷발바닥의 피하 조직에 30 게이지 바늘을 이용하여 주입하여 통증을 유발하는 시험이다. 포르말린을 주입 받은 백서는 주입 받은 발을 바닥에서 들었다 놔둔다는 움찔반응(flinching)이라는 특징적인 행동을 보이게 되는데 이를 통증 반응으로 간주하고 그 횟수를 기록하여 정량화하였다. 이를 위해 포르말린을 주사한 1, 5분 후 1분간 그리고 10분 후부터 60분까지는 5분 간격으로 1

분간 자발적인 움찔반응 횟수를 기록하였다. 또한 포르말린 주입 후 보이는 움찔반응은 이상성(biphasic) 형태로 나타나므로 포르말린 주입 후 0~9분까지는 제1상 반응으로 10~60분까지는 제2상 반응으로 분리하여 평가하였다. 1시간 동안의 관찰 기간이 끝나면 모든 실험 백서는 흡입 마취제 과다 투여로 희생시켰다.

4. 약물 및 투여

본 연구의 실험 약물은 EGCG (Sigma, St. Louis, MO, USA)이었다. 약물은 증류수에 용해시켰으며 척수강 내로 투여하기 위해서는 투여량을 10 μ l로 하여 수동식 기어장치 주사기에 카테터를 연결하여 척수강 내로 주입하고 카테터 내의 사강 용적을 고려하여 실험약물 주입 후 생리식염수 10 μ l를 추가로 주입하였다.

5. 실험 방법

총 38마리의 백서를 사용하였으며 모든 실험은 처치된 약물에 대해 모르는 관찰자에 의해 시행되었다.

5. 1. EGCG 진통효과

척수강 카테터 거치 5일 후 실험 백서를 10×10×30 cm 크기의 실린더로 옮긴 후 약 20~30분 정도의 순응기간을 거쳐 실험을 진행하였다. 실험 백서는 한번만 사용하였으며 실험자는 투여 약물의 종류와 용량에 대해서 알지 못하였다. 대조군(n=7)은 증류수를 투여한 백서로 하였다. 포르말린 주입 10분전에 척수강 내로 EGCG (3 μ g, n=5; 10 μ g, n=6; 100 μ g, n=5; 300 μ g, n=5; 600 μ g, n=5)을 투여하고 포르말린 주입에 의해 유발된 통증 행동을 60분 동안 관찰하였다.

5. 2. EGCG행동 변화

EGCG에 의한 행동 변화를 알아보기 위하여 다른 백서를 이용하여(n=5) EGCG (300 μ g)를 투여한 후 이개(pinna) 반사(PE-10 카테터로 외이도를 자극하면 귀를 움직이는 반사), 각막(corneal) 반사(PE-10 카테터로 각막을 자극하면 눈을 움직이는 반사)를 관찰하고 운동 기능의 평가를 위해 위치-보행(placing-stepping) 반사(실험백서를 책상의 모서리에 두면 발로 꼭잡고 올라서려는 반응) 및 바로 잡기(righting) 반사(실험백서를 책상 바닥에 뒤집어 두면 바른 자세를 취하려는 반응)를 관찰하였다. EGCG 600 μ g 이상 용량을 투여했을 때에는 실험백서가 모두 다음 날 사

망하였으므로 투여용량을 $300\ \mu\text{g}$ 으로 하였다. 운동기능 변화는 다음과 같이 점수화 하였다: 0, 정상; 1, 경미한 결손; 2, 경미한 결손; 3, 심한 결손. 각막 반사와 이개 반사는 반사기능 존재 유무로 판단하였다: 0, 정상; 1, 비정상.

6. 자료 및 통계 분석

모든 측정값은 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 포르말린 시험에서 시간 반응 자료는 분당 flinches 횟수로 하고 용량 반응 자료는 움찔반응 총합계로 하였다. 통계분석은 Jonckheere test를 이용하였고 p값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

행동변화를 관찰하기 위하여 사용한 용량($300\ \mu\text{g}$)에서 척수강 EGCG는 이개 반사, 및 각막 반사, 위치-보행 반사 및 바로잡기 반사에 영향이 없었다(Table 1). 진통효과를 평가하기 위한 포르말린 시험에서 $600\ \mu\text{g}$ 을 투여 받은 백서는 모두 다음 날 사망하였다. 따라서 $600\ \mu\text{g}$ 의 효과는 본 연구결과에 포함시키지 않았고 행동변화 시험은 시행하지

Table 1. Behavioral score of EGCG (n=5)

	PR	CR	PSR	RR
EGCG (300 ug)	0	0	0	0

PR, pinna reflex; CR, corneal reflex; PSR, placing-stepping reflex; RR, righting reflex. 0 means normal.

Fig. 2. Dose response curve of intrathecal EGCG for flinching in the formalin test. Data are presented as the sum of flinches. EGCG failed to alter flinches in phase 1 (A) and phase 2 (B) in the formalin test. Each line represents the mean $\pm$ SEM of 5~7 rats.

않았다.

증류수만을 투여 받은 대조군 백서는 포르말린 주입에 의한 특징적인 통증 행동인 움찔반응을 보였고 이 반응은 이상성으로 나타났다(Fig. 1). 척수강 내로 투여한 EGCG는 포르말린 시험 제1상($p>0.05$)과 제2상($p>0.05$) 모두에서 움찔반응을 억제하지 못했다(Fig. 2).

고 찰

포르말린을 주입하면 백서는 즉각적으로 주입 받은 발을

Fig. 1. Time effect curve of intrathecal EGCG for flinching in the formalin test. EGCG was administered 10 min before the formalin injection. Formalin was injected at time 0. Data are presented as the number of flinches. Each line represents the mean $\pm$ SEM of 5~7 rats.

자발적으로 바닥에서 들었다 놔다 하는 특징적인 통증 행동 반응을 보이다가 점차 감소하여 반응을 거의 보이지 않는 제1상 반응과 약 10분 후부터 통증 반응이 다시 증가하는 제2상 반응의 이상성 형태로 나타난다. 즉 제1상 반응은 포르말린 주입에 의해 구심성 C섬유의 자발적 활성화도가 즉각적으로 그리고 강력하게 증가한 상태를 반영하는 급성 통증 상태를 의미하고 제2상 반응은 포르말린 자극에 의해 척수에서 분비된 glutamate 및 neurokinins들이 NMDA 수용체와 neurokinin-1 수용체에 각각 결합함으로써 개시되고 세포내 Ca^{++} 증가나 prostaglandin 생성 증가 등을 통하여 나타나는 촉진성 통증 상태를 반영한다.¹⁰

본 실험결과 척수강 내로 투여한 EGCG는 포르말린 시험의 제1상과 2상 모두에서 통증반응을 억제하지 못했다. 이는 녹차 성분 중 하나인 EGCG는 척수 수준에서 포르말린 주입에 의해 유발된 급성 통증이나 촉진성 통증을 억제하지 못한다는 것을 시사한다.

*Camellia sinensis*의 마른 잎에서 추출한 녹차는 오랫동안 음료로 사용되어왔다. 최근 건강에 대한 관심이 증가되면서 의학의 여러 분야에서 녹차에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다.³ 녹차에서 발견된 polyphenols는 흔히 catechins로 알려져 있으며 마른 녹차 잎의 고형성분 중 30~40%를 차지한다. 녹차 polyphenols는 강한 항염증성 작용이 있고 종양세포에서 nitric oxide (NO) 생성을 억제한다고 알려져 있다.¹¹ 보고에 의하면 녹차 polyphenols는 inducible NO synthase (iNOS)의 선택적 억제제이다.¹² NO는 척수에서 통증을 매개하는 물질이며 NOS 억제제는 통증을 억제한다고 한다.¹³ EGCG는 인간의 연골세포와 대식세포에서 iNOS 활성도를 억제한다고 한다.^{11,14} 당뇨병성 통증유발 백서에서 복강 내로 투여한 녹차 추출물은 열성 자극 유발 통증에 진통효과를 보였으며 또한 모르핀의 진통효과를 증가시켰다. 이러한 진통효과는 NO 억제제에 의해 약화되었다.⁵ 또한 iNOS 억제제는 모르핀의 진통효과를 강화시킨다고 한다.¹⁵ 이상의 소견은 녹차가 NO 생성을 억제하여 진통효과를 나타낸다는 것을 시사한다. 반면, 다른 보고에 의하면 백서의 복강 내로 투여한 녹차 추출물은 염증성 통증을 억제하였으며 이러한 효과는 cyclooxygenase 2를 차단함으로써 나타난다고 한다.⁶ 아울러 EGCG는 interleukin-1 β 를 차단한다고 한다.¹⁶ 최근 보고에 의하면 녹차를 먹인 백서에서 신경병성 통증이 감소하였다.⁷ 따라서 녹차는 NO생성억제뿐만 아니라 다른 회로를 통하여도 진통효과를 나타낼 수 있을 것으로 예측된다. 그러나 본 실험결과 백서의 척수강

내로 투여한 EGCG는 포르말린 주입에 의해 유발된 통증을 전혀 억제하지 못했다. 이와 같은 결과의 차이를 본 실험만으로는 정확히 알 수 없었다. 그러한 차이는 실험동물, 약물, 통증유발 방법 및 약물 투여경로 등의 차이에 의해 발생할 수 있을 것으로 추측된다. 그러나 본 실험결과 600 μ g 이상 용량을 투여했을 때는 다음날 모든 백서가 사망하였다. 이는 EGCG가 척수수준에서 효과가 없으며 독성 작용이 있다는 것을 시사하나 그 기전에 대해서는 정확히 알 수가 없었다. 또한 본 연구의 한계점으로는 첫째, 녹차 catechins 중 EGCG 효과만을 관찰하였고 그 외 다른 catechins의 효과를 평가하지 못한 점이다. 둘째, 본 실험에서 사용한 포르말린 시험 이외의 다른 통증 실험에서 EGCG의 효과를 평가해보지 못한 점이다. 셋째, 행동학적 방법 이외의 다른 전기생리학적인 방법을 이용하여 EGCG 효과를 평가를 시행하지 못한 점이다. 따라서 향후 이러한 차이와 제한을 보완하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 EGCG 척수강 내 주입은 포르말린 유도 통증 백서 모델에서 급성통증 및 촉진성 통증에 대한 행동학적 평가상 진통효과를 나타내지 못하였다.

알 림

이 논문은 전남대학교 의과대학연구소 학술연구비에 의하여 연구되었음.

References

1. Sawynok J. Purines in pain management. *Curr Opin CPNS Invest Drugs* 1999;1:27-38.
2. Rane K, Segerdahl M, Gojny M, Sollevi A. Intrathecal adenosine administration: a phase 1 clinical safety study in healthy volunteers, with additional evaluation of its influence on sensory thresholds and experimental pain. *Anesthesiology* 1998;89:1108-15.
3. Weisburger JH. Tea and health: the underlying mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220:271-5.
4. Miura S, Watanabe J, Tamita T, Sano M, Tomita I. The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu^{2+} mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 1994;17:1567-72.
5. Singal A, Anjaneyulu M, Chopra K. Modulatory role of green tea extract on antinociceptive effect of morphine in diabetic mice. *J Med Food* 2005;8:386-91.
6. Kaur S, Anurag A, Tirkey N, Chopra K. Reversal of LPS-induced

- central and peripheral hyperalgesia by green tea extract. *Phytother Res* 2005;19:39-43.
7. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 β -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1097-105.
 8. Yoon MH, Yaksh TL. The effect of intrathecal gabapentin on pain behavior and hemodynamics on the formalin test in the rat. *Anesth Analg* 1999;89:434-9.
 9. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal sub-arachnoid space. *Physiol Behav* 1976;17:1031-6.
 10. Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 1995;15:2768-76.
 11. Singh R, Ahmed S, Islam N, Goldberg VM, Haqqi TM. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1 β -induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum* 2002;46:2079-86.
 12. Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem* 2000;48:5768-72.
 13. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993;52:127-36.
 14. Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 1999;58:911-5.
 15. Grover VS, Sharma A, Singh M. Role of nitric oxide in diabetes-induced attenuation of antinociceptive effect of morphine in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;399:161-4.
 16. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 β -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1097-105.