

# 쥐의 척수강 내로 투여한 고려 홍삼의 항통각효과에 대한 아드레날린성 및 콜린성 수용체 역할

<sup>1</sup>전남대학교 의과대학 마취통증의학교실, <sup>2</sup>두뇌한국21사업 전남대학교 의생명 인력사업단

김세열<sup>1</sup> · 윤명하<sup>1,2</sup> · 이형곤<sup>1</sup> · 김웅모<sup>1</sup> · 이재담<sup>1</sup> · 김여옥<sup>1</sup> · 황란희<sup>2</sup> · 최금화<sup>2</sup>

## The Role of Adrenergic and Cholinergic Receptors on the Antinociception of Korean Red Ginseng in the Spinal Cord of Rats

Se Yeol Kim, M.D.<sup>1</sup>, Myung Ha Yoon, M.D.<sup>1,2</sup>, Hyung Gon Lee, M.D.<sup>1</sup>, Woong Mo Kim, M.D.<sup>1</sup>, Jae Dam Lee, M.D.<sup>1</sup>, Yeo Ok Kim, M.S.<sup>1</sup>, Lan Ji Huang, M.D.<sup>2</sup>, and Jin Hua Cui, M.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Medical School, Chonnam National University, <sup>2</sup>Brain Korea 21 Project, Center for Biomedical Human Resources at Chonnam National University, Gwangju, Korea

**Background:** Experimental evidence indicates that ginseng modulate the nociceptive transmission. Authors examined the role of adrenergic and cholinergic receptors on the antinociceptive action of Korean red ginseng against the formalin-induced pain at the spinal level.

**Methods:** Catheters were inserted into the intrathecal space of male Sprague-Dawley rats. Fifty  $\mu$ l of 5% formalin solution was injected to the hindpaw for induction of pain and formalin-induced pain (flinching response) was observed. The role of spinal adrenergic and cholinergic receptors on the effect of Korean red ginseng was assessed by antagonists (prazosin, yohimbine, atropine and mecamlamine).

**Results:** Intrathecal Korean red ginseng produced a dose-dependent suppression of the flinching response in the rat formalin test. All of prazosin, yohimbine, atropine and mecamlamine antagonized the antinociception of Korean red ginseng.

**Conclusions:** Spinal Korean red ginseng is effective against acute pain and facilitated pain state evoked by formalin injection. All of alpha 1, alpha 2, muscarinic and nicotinic receptors may play an important role in the antinociceptive action of Korean red ginseng at the spinal level. (Korean J Pain 2008; 21: 27-32)

**Key Words:** adrenergic and cholinergic receptors, antinociception, formalin test, Korean red ginseng, spinal cord.

### 서 론

인삼은 복통이나 가슴통증 등 다양한 통증을 경감시키기 위한 전통적인 민간요법 약제로 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 그러나 동물실험에 의하면 인삼의 추출물로 주성분인

ginsenosides는 통증 종류에 따라 효과가 다르며 그 진통 작용기전은 명백히 밝혀져 있지 않다.<sup>2,4)</sup>

한편, 척수후각에 존재하는 아드레날린성 및 콜린성 수용체는 유해자극의 전달과 조절에 관여하며<sup>5,6)</sup> 척수강 내로 투여한 아드레날린성 수용체 작용제나 항콜린에스테라제는 여러 연구에서 항통각효과를 보였다.<sup>7,8)</sup> 이전

접수일 : 2008년 2월 22일, 승인일 : 2008년 4월 1일  
책임저자 : 윤명하, (501-757) 광주광역시 동구 학동 8번지  
전남대학교병원 마취통증의학과  
Tel: 062-220-6893, Fax: 062-232-6294  
E-mail: mhyoon@jnu.ac.kr  
이 논문은 2006년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Received February 22, 2008, Accepted April 1, 2008  
Correspondence to: Myung Ha Yoon  
Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Chonnam National University Hospital, 8, Hak-dong, Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea  
Tel: +82-62-220-6893, Fax: +82-62-232-6294  
E-mail: mhyoon@jnu.ac.kr  
This study was financially supported by Chonnam National University.

보고에 의하면 ginsenosides는 니코틴 수용체를 통하여 항스트레스 작용 등을 나타낸다고 하여 척수 수준에서 인삼과 콜린성 수용체와의 연관성을 시사하였다.<sup>9-11)</sup> 반면 척수강 내 ginsenosides의 항통각작용에 대한 척수 아드레날린성 및 콜린성 수용체의 역할에 관해서는 보고된 바가 없다.

저자들은 포르말린 실험모형을 이용하여 척수강 내로 투여한 고려홍삼의 효과를 관찰하고 그 효과에 대한 척수 아드레날린성 및 콜린성 수용체 길항제의 효과를 평가하여 고려홍삼의 항통각효과에 대한 척수 아드레날린성 수용체 및 콜린성 수용체의 역할을 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

### 대상 및 방법

모든 실험은 본 대학교 의과학 연구소의 동물 위원회 승인을 얻은 후 규정에 따라 시행하였다. 실험 대상은 수컷 Sprague-Dawley (250-300 g) 쥐로 하였으며 동물사 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 해주었으며 5일 정도 환경에 적응시킨 후 실험을 시행하였다.

약물 투여를 위해 척수강 내 카테터는 Yaksh와 Rudy의<sup>12)</sup> 방법을 이용하여 거치하였다. 먼저 enflurane 마취하에서 백서를 뇌 정위 장치에 고정하고 두개골 위에서 정중선을 따라 양 귀 2 cm 하방까지 절개하여 근육과 근막을 견인하여 환추후두막을 찾은 후 23G 바늘 끝으로 이 경막을 절개하여 polyethylene (PE-10) 카테터를 8 cm 하방까지 삽입하였다. 반대측 카테터 상부는 피하로 튜넬링한 후 두개골 상부에 고정하고 28G 철사로 막아놓았다. 절개 부위를 3-0 실크로 봉합한 후 마취에서 각성시켰다. 카테터 거치 후 운동 기능 장애를 보인 쥐는 바로 사망시켰고 운동 기능이 정상인 쥐만을 각각의 케이지에 넣었다가 카테터 거치 5일 후에 행동학적 실험을 시행하였다.

본 연구를 위해 사용한 약물은 고려홍삼(red ginseng saponin)이었고 한국담배인삼공사에서 기증받았으며 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 10  $\mu$ l로 하여 기어 장치 수동식 주사기에 카테터를 연결하여 척수강 내로 주입하였으며 카테터 내의 사강 용적을 고려하여 약물 주입 후 생리식염수 10  $\mu$ l를 추가로 주입하였다.

통증 유발 모형으로는 포르말린 시험을 사용하였다.<sup>13)</sup> 30계이지 바늘을 이용하여 쥐 뒷발바닥의 피하 조직으로 5% 포르말린 용액 50  $\mu$ l를 주입하였다. 포르말린을

주입 받은 쥐는 주입 받은 발을 자발적으로 바닥에서 들었다 놔다 하는 특징적인 행동(flinching)을 보이는데 이를 통증 반응으로 간주하였다. 따라서 자발적인 통증 행동 횟수를 주기적으로 기록하여 정량화하였다. 이를 위해 포르말린을 주사한 1, 5분 후 1분간 그리고 10분 후부터 60분까지는 5분 간격으로 1분간 자발적인 통증 행동 횟수를 기록하였다. 포르말린 주입 후 통증 행동은 이상성(biphasic) 형태로 나타나므로 포르말린 주입 후 9분까지는 제 1상으로 10-60분까지는 제 2상으로 정의하였다. 1시간 동안의 실험 기간이 끝나면 흡입 마취제를 과다 투여하여 모든 실험 쥐를 즉시 사망시켰다.

척수강 내 카테터 거치 4-5일 후 실험 쥐는 10  $\times$  10  $\times$  30 cm 크기의 실린더에 옮기고 약 15-20분 정도의 적응 기간이 지나면 실험을 실시하였다. 대조군은 DMSO로 하였다. 포르말린 주입 10분 전에 척수강 내로 고려홍삼(30, 100, 300  $\mu$ g)을 투여하고 포르말린 주입에 의해 유발된 통증 행동을 60분 동안 관찰하였다. 고려홍삼의 효과에 대한 아드레날린성 수용체 및 콜린성 수용체의 영향을 알아보기로 alpha 1 수용체 길항제인 prazosin (3  $\mu$ g), alpha 2 수용체 길항제인 yohimbine (10  $\mu$ g), 무스카린성 수용체 길항제인 atropine (10  $\mu$ g) 그리고 니코틴성 수용체 길항제인 mecamylamine (10  $\mu$ g)을 고려홍삼(100  $\mu$ g) 주입 10분 전에 척수강 내로 먼저 투여하였다. 고려홍삼 주입 10분 후에 포르말린 시험을 시행하였다. 각 길항제의 용량은 예비실험을 시행하여 포르말린 자극에 영향을 주지 않는 최대 용량으로 하였다. 각 약물은 DMSO나 생리식염수에 녹인 후 사용하였다.

모든 측정값은 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였다. 시간 반응 자료는 분당 통증 행동 횟수로 하였고 용량 반응 자료는 최대 가능 억제 효과(maximal possible inhibitory effect, MPIE) 백분율(%MPIE)로 하였다. %MPIE는 아래 공식을 이용하여 구했다.

$$\%MPIE = \frac{\text{약물 투여군에서 제 1상(2상) 통증 행동 횟수 총합계}}{\text{대조군에서 제 1상(2상) 통증 행동 횟수 총합계}} \times 100$$

통계적 분석은 Jonckheere test나 unpaired t-test를 이용하였다. P값이 0.05 미만일 때를 통계적 유의수준으로 하였다.

**결 과**

실험 쥐 뒷발바닥의 피하조직에 포르말린을 주입하면 실험 쥐는 주입 받은 발을 바닥에서 떼었다 놔다 하는 특징적인 통증 행동을 보였고 이러한 통증 행동은 이상성으로 나타났다.

Fig. 1은 포르말린 주입 10분 전에 척수강 내로 투여한 고려홍삼의 시간 경과에 따른 항통각효과를 보여주고

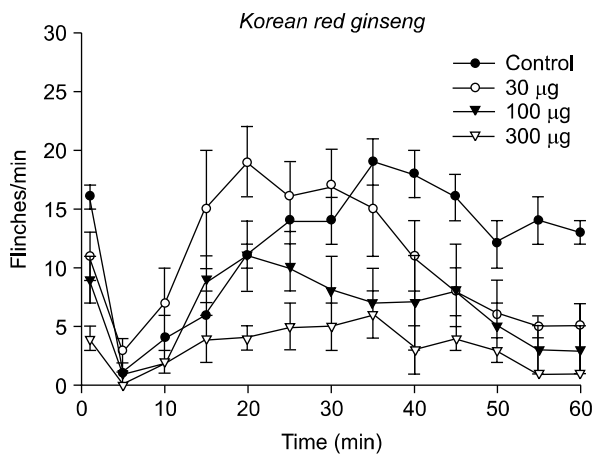
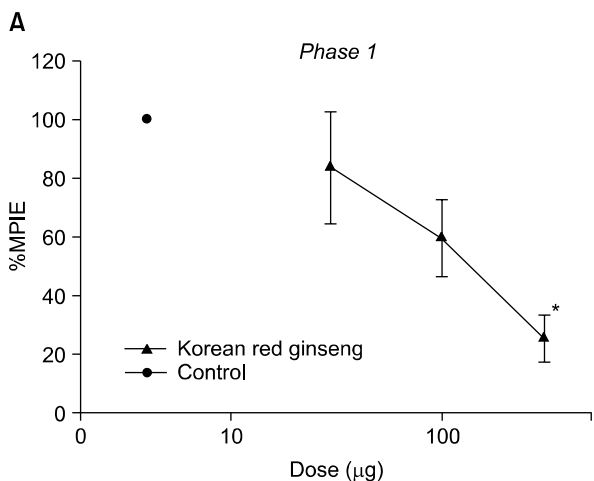


Fig. 1. Time effect curve of Korean red ginseng for the flinching in the formalin test. Korean red ginseng was intrathecally administered at time -10 min and the formalin was injected subcutaneously at time 0. Data are presented as the number of flinches. Each line represents as mean  $\pm$  SEM of 6-7 rats.



**고 찰**

본 실험에서 척수강 내로 투여한 고려홍삼은 포르말린 실험의 제 1상과 제 2상 모두에서 통증 행동 반응을 억제하였다. 이는 고려홍삼이 척수 수준에서 급성 통증 및 촉진성 통증 상태를 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

포르말린을 피하로 주입하면 구심성 C섬유의 자발적 활성화도가 즉각적이고 강력하게 증가하였다가 이어서 감소하게 되며 이후에는 활성화도가 매우 낮게 유지된다. 행동학적 통증 반응도 포르말린 주입 후 바로 증가하였다가 이후 점차 감소하며 거의 통증 반응을 보이지 않다가 다시 통증 반응이 증가한다. 이와 같은 이상성 반응은 척수의 wide dynamic range (WDR) 세포의 활성화를 의미한다.<sup>14)</sup> 즉 구심성 섬유의 낮은 활성화에도 불구하고 WDR 세포는 제 2상에서 제 1상과 유사한 정도의 강력한 반응을 보이게 된다. 포르말린 주입에 의해 발생하는

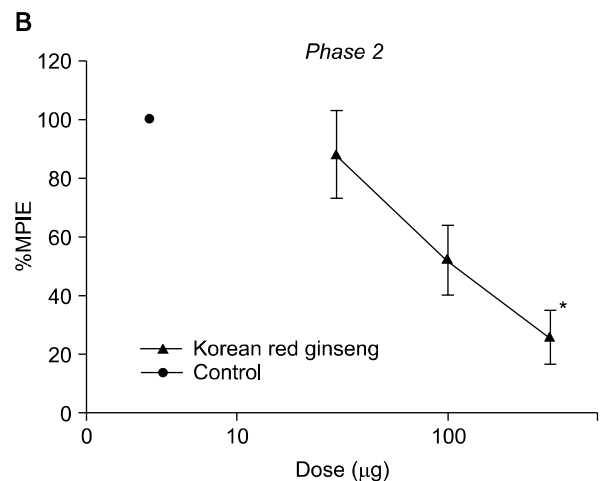
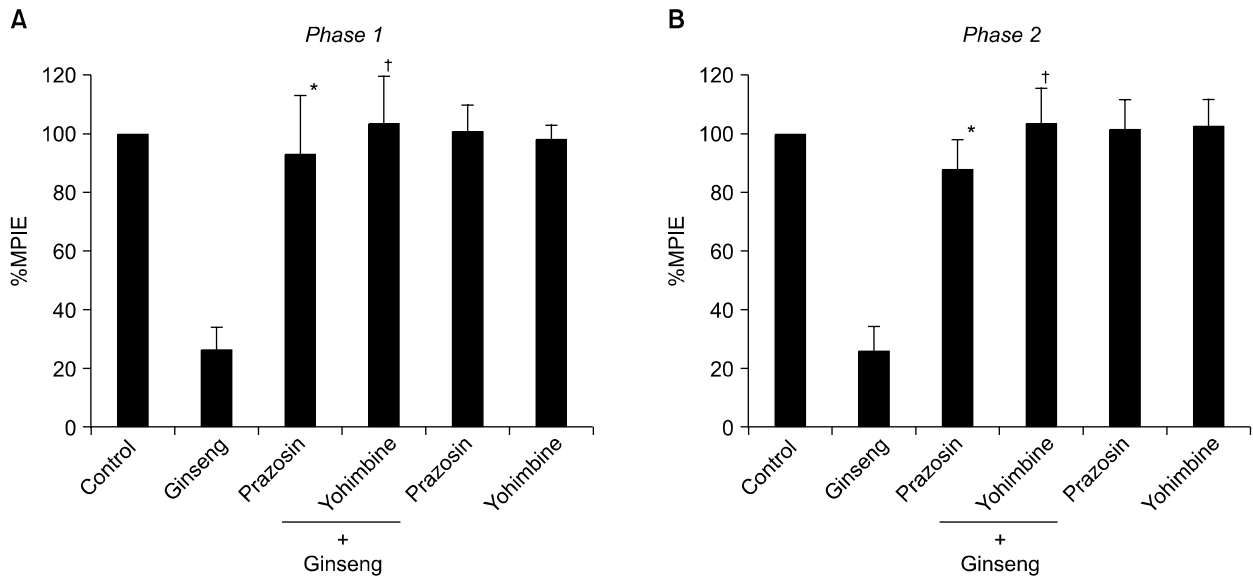
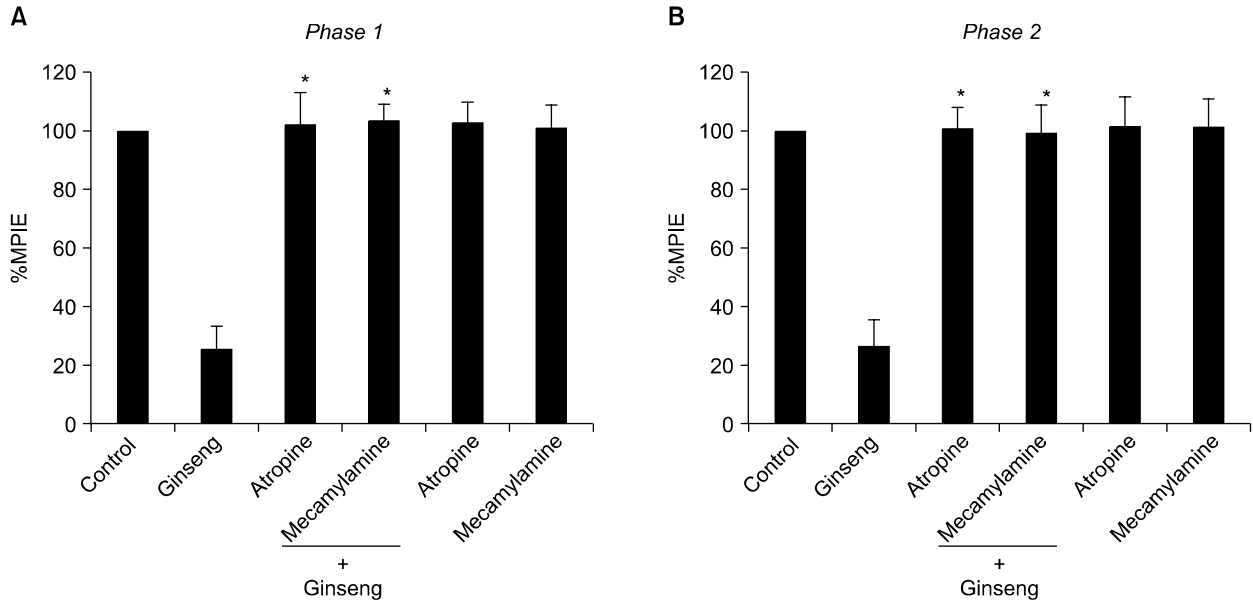


Fig. 2. Dose-response curve of intrathecal Korean red ginseng for the flinching during phase 1 (A) and phase 2 (B) in the formalin test. Data are presented as percentage of maximal possible inhibitory effect (%MPIE) in each phase. Intrathecal Korean red ginseng produced a dose-dependent suppression of flinching in both phases. Each line represents as mean  $\pm$  SEM of 6-7 rats. Compared with the control (DMSO), \* $P < 0.05$ .



**Fig. 3.** The antagonistic effects of intrathecal alpha 1 adrenergic receptor antagonist (prazosin) and alpha 2 adrenergic receptor antagonist (yohimbine) for the antinociception of intrathecal Korean red ginseng during phase 1 and 2 in the formalin test. Two antagonists and Korean red ginseng were given 20 or 10 min before the injection of formalin, respectively. Both prazosin and yohimbine reversed the effect of Korean red ginseng during phase 1 (A) and phase 2 (B) of the formalin test. Data are presented as percentage of maximal possible inhibitory effect (%MPIE) in each phase. Each bar represents as mean ± SEM of 5 rats. Compared with Korean red ginseng, \* $P < 0.01$ , † $P < 0.001$ .



**Fig. 4.** The antagonistic effects of intrathecal muscarinic receptor antagonist (atropine) and nicotinic receptor antagonist (mecamylamine) for the antinociception of intrathecal Korean red ginseng during phase 1 and 2 in the formalin test. Two antagonists and Korean red ginseng were given 20 or 10 min before the injection of formalin, respectively. Both atropine and mecamylamine reversed the effect of Korean red ginseng during phase 1 (A) and phase 2 (B) of the formalin test. Data are presented as percentage of maximal possible inhibitory effect (%MPIE) in each phase. Each bar represents as mean ± SEM of 5 rats. Compared with Korean red ginseng, \* $P < 0.001$ .

이러한 이상성 현상은 포르말린 실험에서 제 1상과 2상 반응의 발생기전이 기본적으로 서로 다르다는 것을 의미한다. 즉 포르말린 주입에 의해 유발된 구심성 자극은 포르말린 주입 직후 척수에서 통증 유발 물질인 glutamate 및 neurokinins와 같은 흥분성 아미노산과 펩타이드를 유리시켜 제 1상 통증 반응을 일으킨다. 이후 얼마간의 휴식기를 거친 후 포르말린 자극에 의해 척수에서 분비된 glutamate 및 neurokinins들이 NMDA 수용체와 neurokinin-1 수용체에 각각 결합함으로써 연속적 반응이 개시되고 세포 내  $Ca^{2+}$  증가 및 kinase의 활성화<sup>15)</sup> 등을 통하여 다시 통증 행동 반응을 보이는 제 2상 반응을 나타낸다. 이러한 상태는 약한 자극에도 불구하고 강력한 통증 반응을 보인다 하여 촉진성 통증 상태라 불린다.

인삼은 스트레스나 질병에 의해 약해진 생리적 기능을 개선시키거나 항진시키기 위해 동양에서 전통적으로 사용되는 약물로 여러 형태의 통증에 대한 진통제로도 널리 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 화학적으로 ginsenosides는 4개의 고리를 가지고 있으며 당분이 붙어있는 steroid 유사체로 acetylcholine, adrenaline 혹은 아편유사제와 비슷한 특성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> 많은 보고들은 ginsenosides의 진통효과를 제시하였다. 피하나 복강 내로 투여한 ginsenosides는 포르말린 시험 제 2상 통증 반응을 억제하였으나 포르말린 시험 제 1상에는 효과가 없었으며 이러한 진통효과는 opioid 체계와는 무관하다고 하였다.<sup>2,3)</sup> 척수강 내로 투여한 ginsenosides는 포르말린 시험 제 1상 및 2상 모두에서 진통효과를 나타냈으며 이는 척수의 연접 전 및 연접 후 모두를 중재하여 나타난다고 하였다.<sup>4)</sup> Ginsenoside Rf는 kappa opioid 작동제 진통효과를 증가시켰으며 이러한 상승작용은 opioid, 칼슘 통로 및 GABA<sub>A</sub>와는 무관하다고 하였다.<sup>17)</sup> 또한 감각 신경원에서 칼슘 통로 조절이 ginsenosides의 항통각효과 기전으로 제시되었지만 alpha 2-adrenergic, muscarinic, GABA<sub>B</sub> 및 opioid 체계와는 무관하다고 하였다.<sup>18-20)</sup> 최근 연구에 의하면 척수강 ginsenosides는 절개형 통증 모델에서 opioid 수용체를 중재하여 진통효과를 보였으나 GABA 수용체와는 무관하였다.<sup>21)</sup> 이상의 소견으로 볼 때 ginsenosides는 척수 수준에서 칼슘 통로를 억제하여 진통효과를 나타낼 것으로 생각하나 어떤 기전을 중재하는지는 분명하지 않다.

한편, 본 실험결과 척수강 내로 투여한 atropine, mecamylamine, prazosin 및 yohimbine은 고려홍삼의 진통효과를 길항시켰다. 이는 척수수준에서 고려홍삼의 작용기전이 아드레날린성 수용체 및 콜린성 수용체와 연관이

있다는 것을 시사한다. 한편 본 연구로는 alpha 1 수용체, alpha 2 수용체, 무스카린성 수용체 및 니코틴성 수용체 중 어떤 수용체가 고려홍삼의 진통작용에 더 기여하는지는 알 수 없었고 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론적으로 척수강으로 투여한 고려홍삼은 포르말린 주입에 의해 유발된 급성 통증과 촉진성 통증을 억제하였다. 이러한 고려홍삼의 항통각작용은 척수에서 alpha 1 수용체, alpha 2 수용체, 무스카린성 수용체 및 니코틴성 수용체의 중재가 관여되는 것으로 생각한다.

### 참 고 문 헌

1. Liu CX, Xiao PG: Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol* 1992; 36: 27-38.
2. Mogil JS, Shin YH, McCleskey EW, Kim SC, Nah SY: Ginsenoside Rf, a trace component of ginseng root, produces antinociception in mice. *Brain Res* 1998; 792: 218-28.
3. Shin YH, Jung OM, Nah JJ, Nam KY, Kim CY, Nah SY: Ginsenosides that produce differential antinociception in mice. *Gen Pharmacol* 1999; 32: 653-9.
4. Yoon SR, Nah JJ, Shin YH, Kim SK, Nam KY, Choi HS, et al: Ginsenosides induce differential antinociception and inhibit substance P induced-nociceptive response in mice. *Life Sci* 1998; 62: PL 319-25.
5. Bouchenafa O, Livingston A: Autoradiographic localisation of alpha 2 adrenoceptor binding sites in the spinal cord of the sheep. *Res Vet Sci* 1987; 42: 382-6.
6. Villiger JW, Faull RL: Muscarinic cholinergic receptors in the human spinal cord: differential localization of [<sup>3</sup>H]pirenzepine and [<sup>3</sup>H]quinuclidinylbenzilate binding sites. *Brain Res* 1985; 345: 196-9.
7. Buerkle H, Schäpsmeier M, Bantel C, Marcus MA, Wüsten R, Van Aken H: Thermal and mechanical antinociceptive action spinal vs peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model. *Br J Anaesth* 1999; 83: 436-41.
8. Yoon MH, Choi JJ, Jeong SW: Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47: 1079-84.
9. Sala F, Mulet J, Choi S, Jung SY, Nah SY, Rhim H, et al: Effects of ginsenoside Rg2 on human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 1052-9.
10. Tachikawa E, Kudo K: Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: suppression of adrenal medullary function in vitro by ginseng. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 140-4.
11. Lee BH, Jeong SM, Ha TS, Park CS, Lee JH, Kim JH, et al: Ginsenosides regulate ligand-gated ion channels from the

- outside. *Mol Cells* 2004; 18: 115-21.
12. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.
  13. Yoon MH, Choi JI, Park HC, Bae HB, Jeong SW, Jeong CY: Analysis of interactions between serotonin and gabapentin or adenosine in the spinal cord of rats. *Pharmacology* 2005; 74: 15-22.
  14. Dickenson AH, Sullivan AF: Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post-formalin. *Pain* 1987; 30: 349-60.
  15. Wilcox GL, Seybold V: Pharmacology of spinal afferent processing. In: *Anesthesia: biologic foundations*. Edited by Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ: Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1998, pp 557-76.
  16. Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A: Chemico-pharmacological studies on saponins of Panax ginseng C. A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneimittelforschung* 1975; 25: 539-47.
  17. Nemmani KV, Ramarao P: Ginsenoside Rf potentiates U-50,488H-induced analgesia and inhibits tolerance to its analgesia in mice. *Life Sci* 2003; 72: 759-68.
  18. Nah SY, McCleskey EW: Ginseng root extract inhibits calcium channels in rat sensory neurons through a similar path, but different receptor, as mu-type opioids. *J Ethnopharmacol* 1994; 42: 45-51.
  19. Nah SY, Park HJ, McCleskey EW: A trace component of ginseng that inhibits Ca<sup>2+</sup> channels through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8739-43.
  20. Rhim H, Kim H, Lee DY, Oh TH, Nah SY: Ginseng and ginsenoside Rg3, a newly identified active ingredient of ginseng, modulate Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol* 2002; 436: 151-8.
  21. Shin DJ, Yoon MH, Lee HG, Kim WM, Park BY, Kim YO, et al: The effect of treatment with intrathecal ginsenosides in a rat model of postoperative pain. *Korean J Pain* 2007; 20: 100-5.
-