

Curcumin의 신경병증성 통증 억제효과

김채은* · 박은성** · 전영훈***†

*경북대학교 식품영양학과, **경북대학교 치과전문대학원 구강생리학과, ***경북대학교병원 마취통증의학과

Curcumin Attenuates Chronic Constriction Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain in Rats

Chae Eun Kim*, Eun Sung Park**, and Young Hoon Jeon***†

*Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

**Department of Biochemistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

***Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Kyungpook National University Hospital, Daegu 700-721, Korea.

ABSTRACT : Nerve injury can lead to neuropathic pain, which is often resistant to current analgesics and interventional therapeutic methods. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) plays important role in the induction of neuropathic pain. We explored the antinociceptive effect of curcumin and its effect on ERK in the spinal cord in the neuropathic pain model of rats induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. In injured rats, mechanical allodynia, which is one of characteristics of neuropathic pain developed and the activation of ERK in spinal cord significantly increased compared with control group. However, administration of curcumin (50 mg/kg/day p.o) for 7 days started from one day before the injury prevented the development of mechanical allodynia and increase of ERK phosphorylation. These results indicate that curcumin can be a new therapeutic agent in the treatment of neuropathic pain.

Key Words : Allodynia, Curcumin, ERK, Nerve injury, Neuropathic pain

서 언

강황 (薑黃; *Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하며 인도가 원산지이고 열대아시아지역에서 재배되는 다년생식물로서 (Choi, 2004), 천연보존제와 향산화제로 식용가능한 작물이다 (Han *et al.*, 2006). 한약 (생약)으로도 사용되는 강황은 성질이 따뜻하고 혈액순환을 촉진시키며 통증을 제거하는 효과가 탁월하다고 하였다 (Cho *et al.*, 2006). 강황의 주성분은 curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin 등 curcuminoid 색소성분과 ar-turmerone, curlone, α -turmerone, β -turmerone, bisacumol, zingberene 등 휘발성 정유성분으로 나누어진다 (An *et al.*, 2006; Choi, 2004). 약리효과는 항염, 간장보호, 소화기 및 심혈관계에 대한 작용, 항혈소판응집, 혈중지질강하, 항산화, 항돌연변이, 항종양, 항균작용 등이며 이러한 약리 효과의 주성분은 curcumin인 것으로 알려져 있다 (Sharma *et al.*, 2005; He *et al.*, 1998). 이러한 약리 작용은 curcumin이 가진 강력한 항염증작용, 활성산소 유리억제 및 항산화 작용, 그리고 항암작용에 의해 나타나는데 이는 발암 유

전자인 *c-fos*, *c-myc*과 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), lipoxygenase, xanthine dehydrogenase, 그리고 inducible nitric oxide 등을 억제함으로써 이루어진다 (Lin, 2007; Menon and Sudheer, 2007; An *et al.*, 2006). 여러 약리작용을 가진 curcumin의 가장 큰 장점으로 동물에서나 인간에게 사용 시 많은 양을 사용하더라도 이에 관계되는 독성문제나 합병증이 보고된바가 없는 매우 안전한 물질이며 (Shankar *et al.*, 1980; Lao *et al.*, 2006), 침습적인 방법이 아니라 손쉽게 환자에게 경구투여 할 수 있다는 것이다.

한편, 만성 신경병증 통증은 많은 사람들이 의료시설을 찾게 되는 흔한 원인 중에 하나이다. 신경병증성 통증은 다양한 원인에 의한 말초신경의 손상으로 발생하며 기계적 이질통 (mechanical allodynia)과 통각과민 (hyperalgesia) 등을 특징적으로 동반한다 (Ro and Chang, 2005). 그러나 현재까지 소염진통제나 아편양제제 또는 항우울제와 같은 많은 약과 신경차단법이 개발되어 치료에 사용되고 있으나 치료에 의한 부작용이나 제한된 효과에 의해 극복하지 못하고 있으며 이로 인한 많은 의료비의 지출은 경제적인 문제나 사회적인 문제를 일으

†Corresponding author: (Phone) +82-53-420-5871 (E-mail) jeon68@knu.ac.kr
Received January 25, 2008 / Revised March 26, 2008 / Accepted June 09, 2008

키는 심각한 요인이 된다 (Bowsher, 1993). 이러한 난치성의 신경병증통증을 치료하기 위해서 유전자 전달법 (Wilson *et al.*, 1999), 신경통증억제 물질을 분비하는 세포를 이식하는 방법 (Linder *et al.*, 1996) 등이 제시되고 있으나 완전히 억제하지를 못하며 쉽게 치료에 적용하기에는 많은 어려움이 있다.

현재까지 신경병증성 통증의 발생기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. MAPKs는 세포분열이나 분화 시에 작용을 하는 효소로 알려져 있으며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), a c-Jun N-terminal kinase (JNK), 그리고 stress-activated protein kinase (SAPK) 등을 포함한다 (Rosen *et al.*, 1994). 최근, 많은 연구 결과에 의하면 MAPKs 효소는 신경병성 통증의 발생과 유지에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Obata and Noguchi, 2004; Aley *et al.*, 2001). 척수는 일차 신경세포와 이차 신경세포가 시냅스 (synapse)를 이루어 통증전달이 이루어지며 신경병증성 통증의 발생 시 중추적 감각 (central sensitization)이 일어나는 중요한 장소이다 (Balasubramanian *et al.*, 2006). 특히 MAPKs 효소 중 ERK는 척수에서 말초 신경에 염증이나 신경의 손상과 같은 통증 자극이 있을 경우 인산화 (phosphorylation of ERK, p-ERK)되어 활성화도가 증가한다고 보고된다 (Obata and Noguchi, 2004; Aley *et al.*, 2001). 흰쥐의 좌골 신경을 결찰 (chronic constriction injury, CCI)하여 만든 신경병증성 모델에서 ERK의 활성화가 유의하게 증가한다고 보고되며 (Song *et al.*, 2005), 특히 신경병증성 통증의 특징인 von Frey filaments에 의한 기계적 이질통과 척수에서 ERK의 활성화정도는 밀접한 상관관계가 있다고 알려져 있다 (Tseng *et al.*, 2007).

이에 본 연구는 난치성인 신경병증성 통증의 발생을 억제하여 기존의 치료제보다 우수하고 안전한 약제를 찾고자 하는 목적으로 curcumin을 이용하여 CCI 신경병증성 통증모델의 흰쥐에 경구 투여하여 척수에서 ERK 활성화를 억제하고 기계적 이질통의 발생을 방지할 수 있는지를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 군구성

본 실험은 경북대학교병원 동물 실험 윤리위원의 허가를 얻어 진행하였으며 실험에는 체중 260-300 g의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rats, n=30)를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였다. 모든 실험동물들은 실험 전 7일간의 적응 기간을 거쳤으며 대조군 (control, n=10), 신경결찰을 한 군 (CCI, n=10), 그리고 신경결찰 1일 전부터 curcumin을 경구 투여한 실험군 (curcumin, n=10)으로 나누었다.

2. 통증모델

먼저 ketamin (20 mg/kg, IP)으로 흰쥐를 마취하여 Bennett

and Xie (1988)에 의한 방법에 따라 왼쪽 대퇴부를 면도 후 소독하고 피부를 절개하여 좌측 좌골 신경을 노출시킨 후 좌골 신경을 4-0 chromic gut으로 1 mm 간격으로 4번 느슨하게 결찰 하였다.

3. Chemicals

Curcumin은 Sigma (St. Louis, USA), protease inhibitor cocktail은 Roche (Mannheim, Germany), protein assay kit은 Bio-Rad (Hercules, USA), p-ERK 1차 항체는 Santa Cruz biotechnology (California, USA), 그리고 ESL (electronic system level) 용액은 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)로부터 각각 구입 사용하였다.

4. Curcumin 투여

Curcumin을 신경결찰 수술 전 1일부터 수술 후 7일간 매일 (50 mg/kg/day) 경구 투여 하였다.

5. 진통효과측정

von Frey filaments를 이용하여 기계적 이질통을 측정하였으며 매일 오전 8:00에 시행하였다. 바닥이 철조망 (metal mesh floor)으로 된 투명한 유리통에서 넣어 흰쥐 뒷 발바닥에 기계적 자극을 주어 회피 반응을 보인 경우 이를 기계적 역치로 측정하였으며 수술 전 1일 그리고 수술 후 1, 3, 5, 7 일간 측정하였다.

6. Western blot

수술 후 7일째에 흰쥐를 ketamin (20 mg/kg I.P)으로 마취하여 척추의 후궁을 절제하여 요추 척수 4번과 5번을 적출하였다. 각각의 척수를 protease inhibitor cocktail이 담긴 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 0.5 mM DTT, 10% Glycerol, 1% Nonidet P-40)에 넣어 4°C에서 20분간 원심분리 (12,000 rpm)하여 시험관 상층액의 액체를 수집하였다. 상층액의 단백질을 protein assay kit를 사용하여 양을 분석 한 후 각 샘플의 단백질 50 µg 5분간 100°C의 gel loading buffer (0.5 M Tris-HCl, glycerol, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue)로 처리 후 10% SDS-polyacrylamide gels를 통해 3시간 동안 60 V로 전기영동 시켜 얻어진 단백질 대 (band)를 polyvinylidene fluoride 막으로 운반시켰다. 상온에서 한 시간 동안 TBST (tris-buffered saline tween-20) 용액 (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM NaCl)과 blocking 용액 (3-5% non-fat dried milk in tris buffered saline)으로 막을 잘 씻고 blocking 용액을 도포한 후 4°C에서 p-ERK 1차 항체를 사용하였다. 막을 TBST용액으로 잘 씻어 내고 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG)를 1시간 동안 배양 시킨 후 ESL용액과 Ultraviolet Products

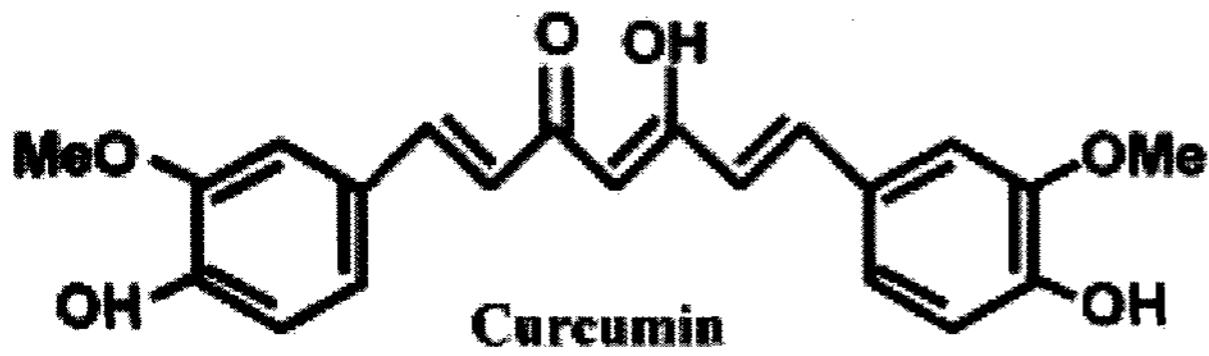


Fig. 1. The structure of curcumin.

Bio-imaging System (Upland, California, USA)을 이용하여 분석하였다.

통계처리

실험데이터는 평균 ± 표준오차로 표시 하였으며 SPSS 12.0 프로그램을 이용하여 repeated ANOVA와 student t test를 사용하였다. $P < 0.05$ 일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 간주한다.

결과 및 고찰

1. Curcumin의 진통효과

신경결찰 수술을 받은 모든 쥐에서 결찰 후 1일부터 von Frey filaments에 대한 역치가 대조군에 비하여 감소하는 기계적 이질통을 보였으며 curcumin을 투여하지 않은 CCI군에서는 이질통이 수술 후 7일간 지속되었다 ($p < 0.05$). 그러나 수술 전 1일부터 curcumin을 투여한 군에서는 수술 후 3일과 5일에 CCI군에 비해 역치가 증가하였다 ($p < 0.05$). 그리고 수술 후 7일에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 나지 않았다 (Fig. 2). 즉 기계적 이질통의 발생은 신경결찰로 인하여 신경병증성 통증이 유발되었음을 알 수 있으며 (Ro and Chang, 2005) 경구 투여된 curcumin은 이러한 기계적 이질통의 발생을 억제하였다.

2. Curcumin의 ERK활성화 억제효과

신경결찰 수술 후 7일에 curcumin을 투여하지 않은 CCI군에서는 척수에서 ERK의 활성화가 대조군에 비해 유의하게 증가되었다 ($P < 0.05$). 그러나 curcumin을 투여한 군에서는 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). ERK는 여러 자극에 의한 기억, 학습 등에 관여하는 신경세포의 가소성 (plasticity)시에 활성화 된다 (Martin *et al.*, 1997; Sweatt, 2001). 최근 연구에 의하며 carrageenan에 의한 염증으로 인한 통증 (Ji *et al.*, 2002), 내장성 (visceral) 통증 (Galan *et al.*, 2003), 그리고 신경손상에 의한 신경병증성 통증 (Tseng *et al.*, 2007)에서 ERK는 척수에서 활성화되어 지속적인 이질통이나 통각과민에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 척수에서의 ERK의 활성화는 만성통증 시 척수의 중추감

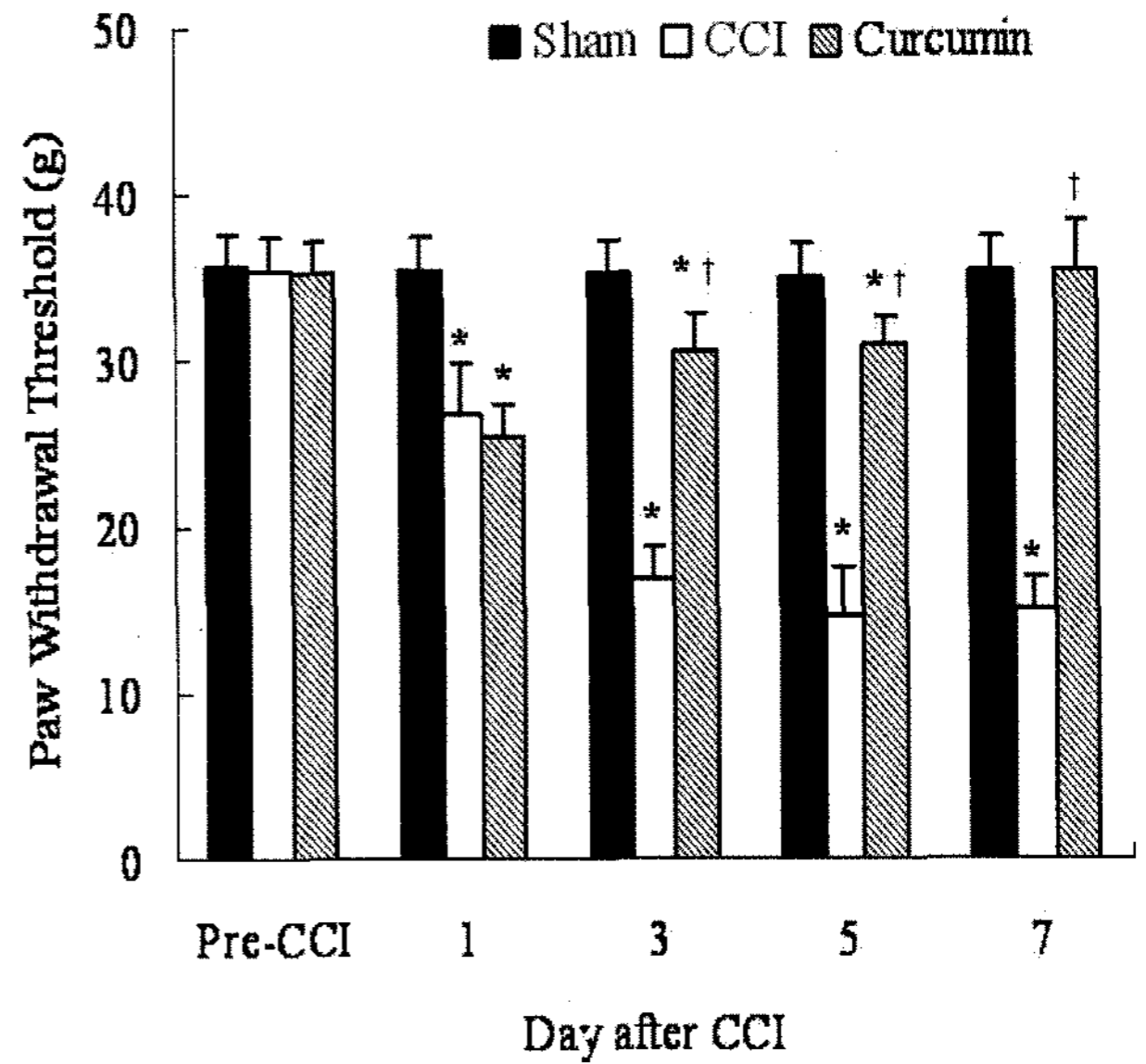


Fig. 2. Mechanical allodynia after chronic nerve ligation (CCI) of sciatic nerve. The data are presented as mean ± SE. * $p < 0.05$ vs control. † $p < 0.05$ CCI vs Curcumin.

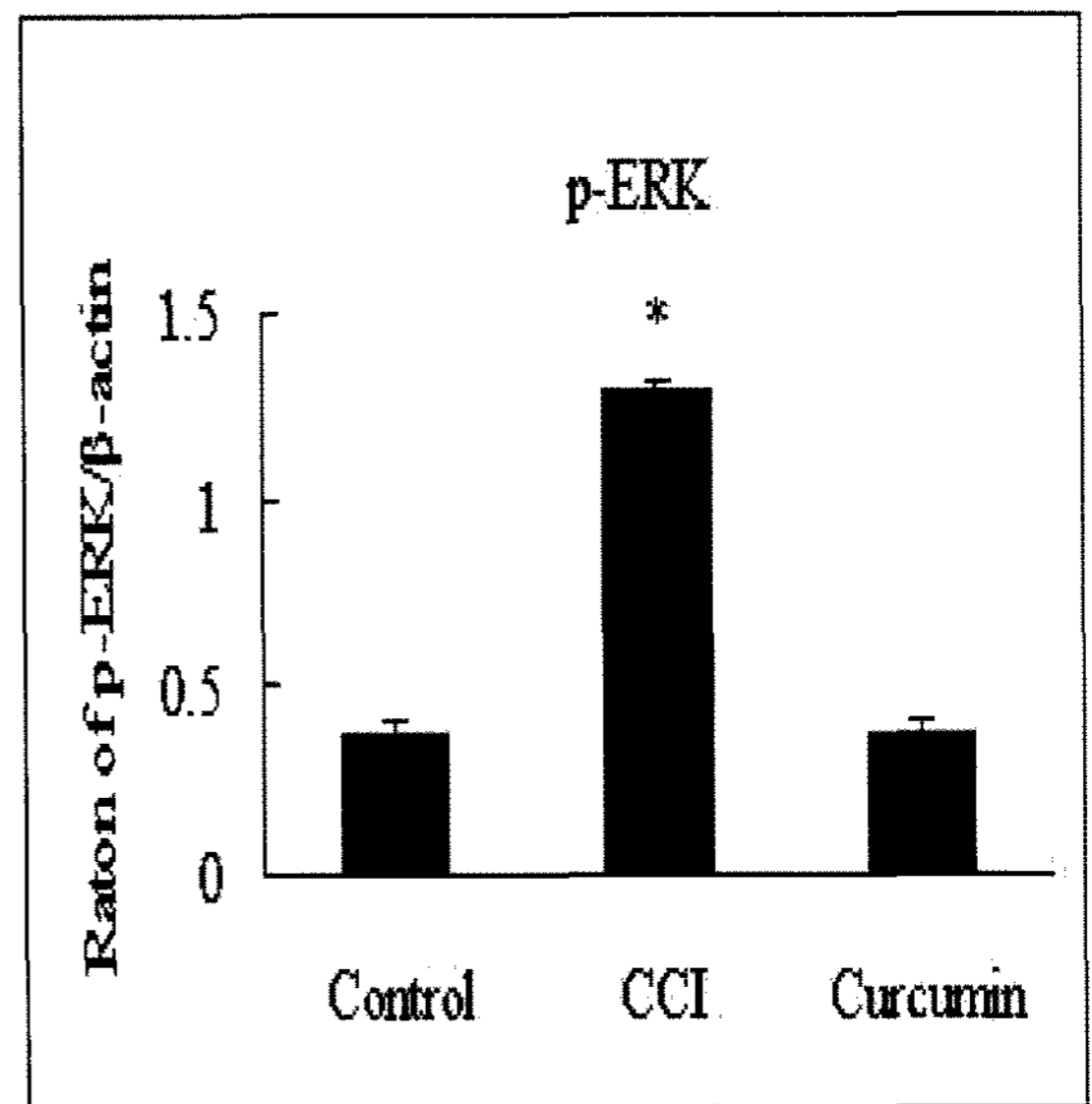
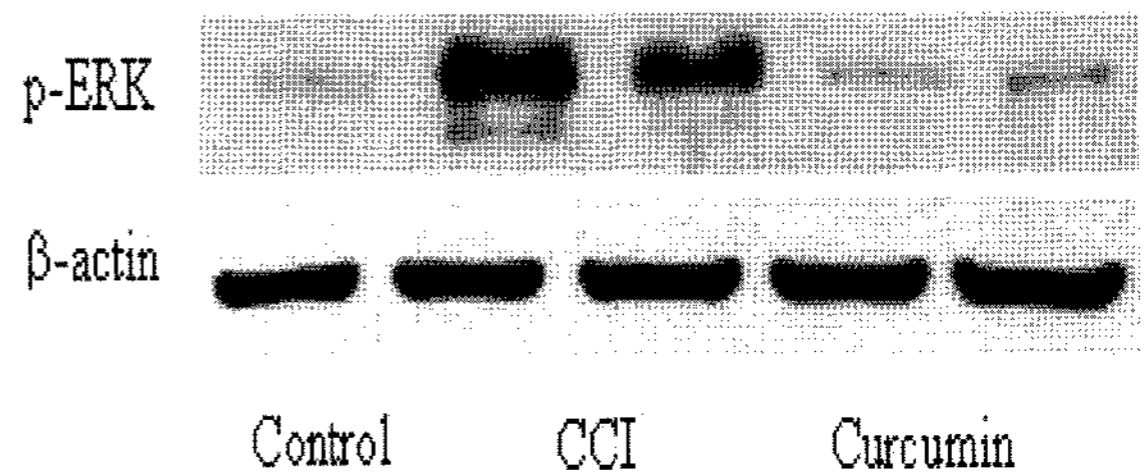


Fig. 3. The expression of p-ERK in spinal cord after chronic nerve ligation (CCI) of sciatic nerve. The data are presented as mean ± SE.

* $p < 0.05$ vs control.

작으로 인한 지속되는 통증발생에 관여한다 (Song *et al.*, 2005). Von Frey filaments에 의한 기계적 이질통 그리고 ERK의 길항제를 사용하여 ERK의 활성화를 억제함으로써 중추신경의 감각을 감소시켜 통증이 감소되며 (Obata and Noguchi, 2004), 좌골신경 결찰을 해제 한 흰쥐에서 이질통과 ERK의 활성화가 동시에 감소되어 이질통과 같은 신경병증성 통증반응과 밀접한 상관관계를 가짐을 보여주며 (Tseng *et al.*, 2007), 본 실험에서도 CCI군에서는 기계적 이질통의 발생과 ERK의 활성화를 관찰되었다. 그러나 curcumin은 ERK의 활성화를 억제 한다고 알려져 있으며 (Lin, 2007) 경구 투여한 군에서 ERK의 활성화와 이질통의 발생을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 그리고 신경병증성 통증은 *c-fos*나 cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) 등의 증가도 동반하는데 (Song *et al.*, 2005) curcumin은 이러한 *c-fos*나 CREB의 단백질증가를 억제하여 (Lin, 2007) 통증억제작용에 영향을 미칠 것으로도 생각되며 앞으로 이에 대한 연구가 필요하리라 본다.

적 요

본 연구에서는 신경병증성 통증이 신경 결찰 군에서는 지속되었고 ERK의 활성화가 증가됨이 관찰되었지만, curcumin을 투여 군에서는 통증이 결찰 3일부터 감소되어 7일째에는 완전히 사라짐과 동시에 척수에서 ERK의 활성화가 대조군에 비교하여 차이가 없는 것으로 보아 curcumin이 ERK활성화를 억제함으로써 통증의 발생을 방지할 수 있는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 curcumin이 기존의 약제나 방법을 대체하여 보다 안전하게 그리고 효과적으로 신경병증성 통증을 억제할 수 있는 물질이라고 사료된다.

사 사

이 연구는 2007년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Aley KO, Martin A, McMahon T, Mok J, Levine JD, Messing RO (2001) Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J. Neurosci.* 21:6933-6939.
- An BJ, Lee JY, Park TS, Pyeon JR, Bae HJ, Song MA, Baek EJ, Park JM, Son JH, Lee CE, Choi KI (2006) Antioxidant Activity and Whitening Effect of Extraction Conditions in *Curcuma long* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14(3):168-172.
- Balasubramanyan S, Stemkowski PI, Stebbing MJ, Smith PA (2006) Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J. Neurophysiol.* 96:579-590.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 33:87-107.
- Bowsher (1993) Pain syndromes and their treatment. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6:257-263.
- Cho SI, Jung S, Kim HW, Park JE, Kim YG (2006) Inhibition of cellular proliferation by curcuma longae rhizoma extracts on MCF-7. *Korean. J. Herbology.* 21(1):71-77.
- Choi SK (2004) Growth characteristics of *Curcuma longa* L. in southern part of Korea. *Korean J. Crop Sci.* 12(1):85-88.
- Galan A, Cervero F, Laird AM (2003) Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 116:126-134.
- Han SH, Woo NRY, Lee SD, Kang MH (2006) Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14(1):49-55.
- He XG, Lin LZ, Lian LZ, Lindenmaier M (1998) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.). *J. Chromatography A.* 818:127-132.
- Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ (2002) ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci.* 22:478-485.
- Lao D, Ruffin MT 4th, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DE (2006) Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern. Med.* 17:6-10.
- Lin JK (2007) Molecular targets of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595:227-43.
- Linder MD, Kearns CE, Winn SR, Frydel B, Emreich DF (1996) Effects of intraventricular encapsulated hNGF-secreting fibroblasts in aged rats. *Cell Transpl.* 5:205-223.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER (1997) MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in aplysia. *Neuron.* 18:899-912.
- Menon VP, Sudheer AR (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595:105-125.
- Obata K, Noguchi K (2004) MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.* 74:2643-2653.
- Ro LS, Chang KH (2005) Neuropathic pain: mechanisms and treatments. *Chang Chung Med. J.* 28(9):597-605.
- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron.* 12:1207-1221.
- Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS (1980) Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J. Exp. Biol.* 18:73-75.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP (2005) Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer.* 41:1955-1968.
- Song XS, Cao JL, Xu YB, He JH, Zhang LC, Zeng YM (2005)

Inhibitory effect of curcumin on neuropathic pain

- Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. *Acta. Pharmacol Sin.* Jul. 26(7):789-98
- Sweatt JD** (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76:1-10.
- Tseng TJ, Hsieh YL, Hsieh ST** (2007) Reversal of ERK activation in the dorsal horn after decompression in chronic constriction injury. *Exp. Neurol.* 206:17-23.
- Wilson SP, Yeomans DC, Bender MA, Lu T, Goins WF, Glorioso JC** (1999) Antihyperalgesic effects of infection with preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 16:3211-3216.