

척수강 내로 투여한 Epigallocatechin Gallate이 모르핀의 항침해 작용에 대한 내성 발생에 미치는 효과

전남대학교 의과대학 마취통증의학교실

김웅모 · 배홍범 · 최정일

The Effect of Intrathecal Epigallocatechin Gallate on the Development of Antinociceptive Tolerance to Morphine

Woong Mo Kim, M.D., Hong Beom Bae, M.D., Ph.D., and Jeong Il Choi, M.D., Ph.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Background: A major ingredient of green tea is epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and this is known to have many beneficial effects for cancer prevention and also on the cardiovascular system and neurodegenerative diseases through its anti-oxidant, anti-angiogenic, anti-inflammatory, lipid-lowering and neuroprotective properties. Its actions on nociception and the spinal nervous system have been examined in only a few studies, and in these studies EGCG showed an antinociceptive effect on inflammatory and neuropathic pain, and a neuroprotective effect in motor neuron disease. This study was performed to investigate the effect of EGCG on acute thermal pain and the development of morphine tolerance at the spinal level.

Methods: The experimental subjects were male Sprague-Dawley rats and the Hot-Box test was employed. A single or double-lumen intrathecal catheter was implanted at the lumbar enlargement for drug administration. An osmotic pump was used to infuse morphine for 7 days for induction of morphine tolerance. EGCG was injected repeatedly for 7 days at twice a day through the intrathecal catheter.

Results: Intrathecal EGCG increased the paw withdrawal latency (PWL) after repeated administration for 7 days at twice a day, but this did not happen with administering on single bolus injection of EGCG. In addition, the antinociceptive effect of intrathecal morphine was not affected by co-administration with EGCG. A continuous 7-day infusion of morphine caused a significant decrease of the PWL in the control group (M + S, morphine plus saline). In contrast, intrathecal EGCG injection over 7 days blocked the decrease of the PWL in the experiment group (M + E, morphine plus EGCG).

Conclusions: Intrathecal EGCG produced a weak antinociceptive effect for acute thermal pain, but it did not change the morphine's analgesic effect. However, the development of antinociceptive tolerance to morphine was attenuated by administering intrathecal EGCG. (Korean J Pain 2009; 22: 199-205)

Key Words: antinociception, epigallocatechin-3-gallate, green tea, morphine, tolerance.

접수일 : 2009년 7월 28일, 1차 수정일 : 2009년 8월 25일

승인일 : 2009년 9월 23일

책임저자 : 최정일, (501-757) 광주시 동구 학1동 5번지

전남대학교 의과대학 마취통증의학교실

Tel: 062-220-6893, Fax: 062-232-6294

E-mail: aneszzz@naver.com

이 논문은 2006년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Received July 28, 2009, Revised August 25, 2009

Accepted September 23, 2009

Correspondence to: Jeong Il Choi

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of

Medicine, Chonnam National University, 5, Hak 1-dong, Dong-gu,

Gwangju 501-757, Korea

Tel: +82-62-220-6893, Fax: +82-62-232-6294

E-mail: aneszzz@naver.com

This study was financially supported by Chonnam National University, 2006.

서 론

녹차는 *Camellia sinensis*의 잎으로 만들어지며 세계적으로 가장 많이 음용되는 차 중의 하나이며, 그 녹차 추출물(green tea extract, GTE)의 효과와 그 기전에 대한 연구가 다양한 분야에 걸쳐 이루어지고 있다. 녹차의 주요 효능으로는 피부암, 유방암, 전립선암 등의 암에 대한 예방효과, 콜레스테롤 감소나 동맥경화 억제 등의 심혈관계 작용과, 노화 및 퇴행성 뇌 질환의 예방 효과, 인슐린 저항성의 억제 등이 있다[1,2]. 이러한 녹차의 효과는 녹차의 성분 중 catechin에 의한 항산화 작용, 항암작용 및 항염증작용 등에 의해 나타난다고 알려져 있으며 그 중 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 가장 풍부하고 항산화작용이 가장 크며, 동물 실험에서 나타나는 여러 효과와 밀접한 관련이 있다[3-6].

최근 통증과 관련된 작용에 대한 몇몇 연구가 발표되어, 신경병증 통증과 염증성 통증에 진통효과가 있다고 보고되었다[7,8]. 또 Kim 등은[9] 쥐의 후각신경절의 일차감각 신경세포에서 농도 의존적으로 나트륨이온의 흐름을 억제한다고 보고하였다. Singal 등의[10] 연구에 의하면 GTE는 당뇨병성 신경병증에서 아산화질소의 합성 억제를 통하여 모르핀의 효과를 증강시켰다. Renno 등은[11] 쥐에서 녹차의 경구투여가 당뇨병 모형에서 나타나는 척수의 성상세포의 변화를 감소시키는 것을 발견하였다. 한편, Oh 등은[12] EGCG가 모르핀에 의해 유도되는 신체적 의존을 감소시킨다는 보고를 하였고 이것은 locus coeruleus에서 EGCG에 의한 c-AMP의 감소와 연관이 있다고 하였다. 척수 수준에서 EGCG의 신경계에 대한 효과는 척수손상이나 운동신경세포와 관련된 몇몇 보고가 있을 뿐 알려진 바가 적다[13-16].

본 연구는 녹차추출물 중 주요 성분인 EGCG의 급성 통증에 대한 진통효과에 대해 알아보고, EGCG가 모르핀의 항침해 효과와 내성 발생에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다.

대상 및 방법

모든 실험은 의과학 연구소의 동물위원회의 승인을 얻은 후 그 규정에 따라 시행하였다. 몸무게 250-275 g의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며 물과 먹이를 충분히 제공하고 3일 이상 주위환경에 적응시키며 12시간(오전 6시-오후 6시)의 광주기성을 유지시켰다.

통증 모델은 Hargreaves형 열성 시험 기구를 변형시킨 Hot-Box 시험을 이용하였다[17]. 이는 쥐의 뒷발바닥에 방사성 열성 자극을 가한 후 그 발을 회피하는데 걸리는 시간을 측정하는 것이다. 즉, 실험쥐를 섭씨 30도로 유지되는 유리판 위에 놓고 유리판을 통하여 쥐의 양쪽 발바닥에 방사성 열성 자극을 직접 가하였다. 자극과 동시에 시계가 작동하며 시계는 쥐가 발을 바닥에서 떼거나 20초(cut-off time)가 지나면 자동적으로 멈추게 하였다. 대조치는 약물 투여 전에 두 뒷발에서 측정한 평균치로 하였다.

척수강 내로 약물을 투여하기 위해서 기존의 방법을 이용하여 척수강 내에 카테터를 거치하였다[18]. 먼저 isoflurane 마취하에서 생쥐를 뇌 정위 장치에 고정하고 두개골 위에서 정중선을 따라 양귀 1 cm 하방까지 절개하여 근육과 근막을 박리하여 환추후두막을 찾았다. 환추후두부의 경막을 25게이지 바늘 끝으로 절개한 후 카테터가 요추 확장부에 위치되도록 후두부에서 요추부 방향으로 8.5 cm 삽입한다. 모르핀의 지속주입과 간헐적인 실험약물 투여가 필요한 경우에는 2개의 8.5 cm 길이 PE-5 카테터의 옆면을 붙인 형태의 이중관 카테터를 척수강내에 삽입하였고, 지속주입이 필요하지 않은 실험에서는 PE-10 카테터를 이용하였다. 이중관 카테터의 2개의 PE-5는 분리된 PE-10 카테터와 각각 연결하였다. 연결된 PE-10 카테터 중 하나는 피부를 통하여 외부로 노출시켰으며 그 끝을 30게이지 철사로 막아놓았다. 다른 PE-10 카테터는 다시 PE-60 카테터와 연결하였고 그 PE-60 카테터를 삼투압 펌프(Alzet[®] 2001)의 관에 연결하였다. 그 후 경부의 피부절개면을 통하여 흉추부의 피하조직을 박리한 후 양측 견갑골 사이의 피하에 펌프를 위치시켰다. 절개 부위를 6-0 실크로 봉합한 후 마취에서 각성시켰다.

실험약물은 기어 장치 수동식 주사기에 카테터를 연결하여 척수강 내로 주입하고 카테터 내의 사강 용적을 고려하여 실험 약물 주입 후 생리식염수를 추가로 주입하였다. EGCG (Sigma-Aldrich, USA)는 생리식염수에 녹여서 사용하였으며, 기존의 실험에서 사용한 용량과 약물의 용해도를 고려하여 10 μ g을 하루에 2회로 나누어 투여하였다. 실험약물 투여 후에는 placing-stepping 반사, 각막 반사와 이개 반사를 확인하여 운동기능과 반사기능을 평가하였다. 카테터 삽입 후 운동기능과 반사에 이상 소견을 보이는 쥐는 즉시 희생시켰으며, 본 실험에서 이상 소견을 보이는 쥐는 10% 미만이었다. 모르핀의 지속주입을 위해서 삼투압 펌프를 이용하였고, 펌프는 삽

입 전날부터 37°C의 생리식염수에 저장하였다. 주입속도는 1 µg/µl/h로 하여 하루에 24 µg이 주입되도록 하였다.

1. 모르핀과 EGCG의 열성자극시험에 대한 효과

열성 자극에 대한 효과를 조사하기 위해 척수강 내로 모르핀이나 EGCG를 투여 후 15, 30, 60, 90, 120분에 회피 반응을 관찰하였다. 모르핀은 3, 10, 30 µg을 투여하였으며, EGCG는 매일 2회 7일간 매회 5 µg을 척수강 내로 투여하였고, 1일째의 첫 번째 투여 후와 7일째의 2번째 투여 15분 후에 열성자극시험을 시행하였다. 대조치는 열성자극시험 전의 결과치를 사용하였다.

2. 모르핀의 진통효과에 미치는 EGCG의 영향

모르핀의 열성자극시험에서의 항침해 효과에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위해 모르핀과 EGCG를 동시에 투여하였다. 두 약물은 각각 5 µl의 용량으로 제조하여 연이어 척수강 내에 투여하고 생리식염수 10 µl를 추가로 주사하였다. 7일간 매일 2회, 매회 EGCG 5 µg을 투여한 쥐를 대상으로 하였고, 7일째에 2번째 EGCG 투여 시 모르핀 3, 10, 30 µg을 동시에 투여하고 15분 후에 열성자극시험을 시작하여 120분 동안 관찰하였다.

3. 모르핀 내성 발생에 대한 EGCG의 억제효과

모든 쥐에서 모르핀에 대한 내성을 유도하기 위하여 펌프를 이용하여 모르핀을 척수강 내에 지속 주입하였

다. 실험군(M + E, morphine plus EGCG)과 대조군(M + S, morphine plus saline)으로 나누었고 두 군 모두에서 펌프를 이용하여 모르핀을 지속 주입하였으며, 실험군은 7일간 EGCG 5 µg을 척수강 내로 매일 2회 투여하였고 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 각 군에서 1, 3, 5, 7일에 두 번째 실험약물 투여 10분 후에 열성자극시험을 시행하였다.

회피반응시간(Paw withdrawal latency, sec) 또는 최대 가능효과(Maximal possible effect, %)의 결과치는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, 약물의 ED₅₀ (effective dose necessary to produce a 50% response)과 95% 신뢰구간은 Tallarida와 Murray의[19] 방법을 사용하여 구하였다. 최대가능효과(MPE)는 다음의 방법으로 구하여 백분율로 표시하였다; %MPE = [(약물투여 후 PWL - 대조군 PWL) / (Cut-off time (20 sec) - 대조군 PWL)] × 100. 통계분석은 t-test와 일원분산분석 및 Dunnet 사후검정을 이용하였고, P값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 의의 있다고 판단하였다.

결 과

척수강 내로 투여한 EGCG는 첫 번째 투여 시에는 회피반응시간을 증가시키지 않았고, 7일간 투여한 경우에만 투여 후 15분과 30분에 대조치와 비교하여 유의하게 회피반응시간을 연장시켰으나(Fig. 1), MPE는 17.2 ± 3.2%로 약한 항침해효과를 보였다. 척수강 내 모르핀은

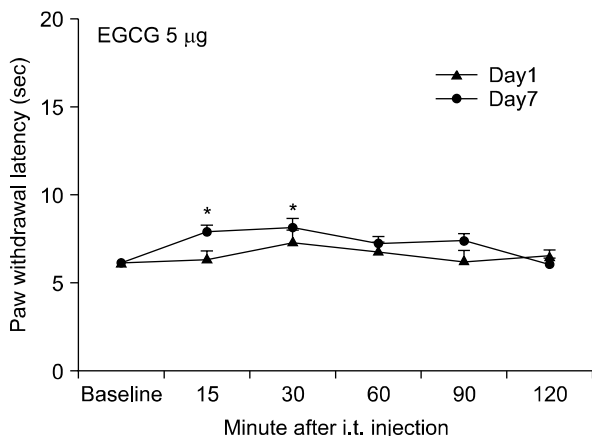


Fig. 1. Intrathecal EGCG shows a weak antinociceptive effect in Hot-Box test. On day 1, paw withdrawal latency does not change after a single bolus injection. On day 7 after repeated, twice-a-day injections of EGCG, paw withdrawal latency is increased at 15, 30 minute. *P < 0.05 compared to its baseline.

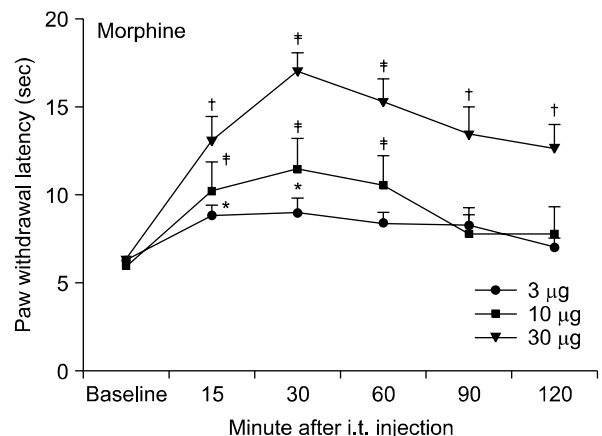


Fig. 2. Intrathecal morphine produces a dose-dependent, antinociceptive effect in Hot-Box test. It peaks at 30 minute after intrathecal injection. *P < 0.05, † < 0.01, compared to its baseline, ‡ < 0.001.

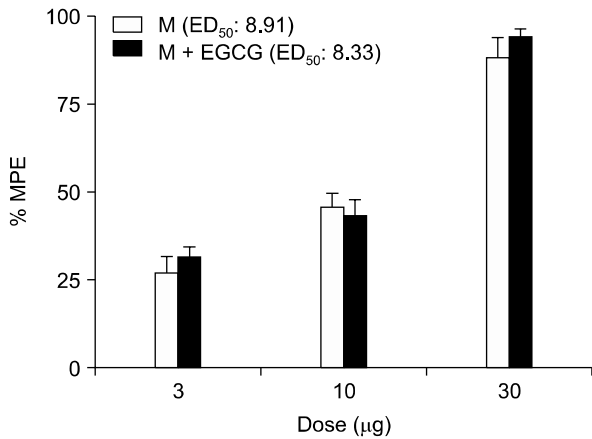


Fig. 3. Antinociceptive potency of intrathecal morphine is not changed by intrathecal EGCG. Rats of group M + EGCG were administered with 5 µg of EGCG and 3, 10, or 30 µg of morphine after administrations of EGCG twice a day for 7 days. Either ED₅₀ or %MPE was not significantly different from the other group. M: morphine, M + EGCG: morphine plus EGCG.

용량의존적으로 실험 동물의 회피반응 시간을 증가시켰고(Fig. 2), ED₅₀은 8.91 µg (95% 신뢰구간; 7.2–11.0) 이었다(Fig. 3).

척수강 내 EGCG는 모르핀의 열성자극시험에 대한 항침해 효과에 변화를 주지 않았고, 모르핀 3, 10, 30 µg을 EGCG 5 µg과 같이 투여한 후의 모르핀의 ED₅₀은 8.33 µg (95%신뢰구간; 6.8–10.2)으로 모르핀 단독투여 시의 ED₅₀과 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

모르핀 내성 발생에 대한 실험에서 대조군(M + S)의 경우 척수강 내로 지속 주입한 모르핀에 의한 항침해효과는 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 5일째부터 모르핀 주입 전과 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 모르핀 지속주입과 EGCG 척수강 내 투여를 같이 시행한 실험군(M + E)에서는 실험 7일째에도 투여 전과 비교하여 유의하게 회피반응시간의 증가 상태가 유지되었다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 척수강 내로 투여한 EGCG는 급성열성 자극 모델에서 약한 항침해효과를 나타냈으며, 모르핀의 항침해효과에는 변화를 주지 못했다. 그러나 모르핀을 척수강 내로 7일간 지속 주입에 의한 모르핀 내성의 발생은 EGCG의 동시 투여로 억제되었다.

EGCG는 녹차의 주요 성분인 catechin 중의 하나로 녹

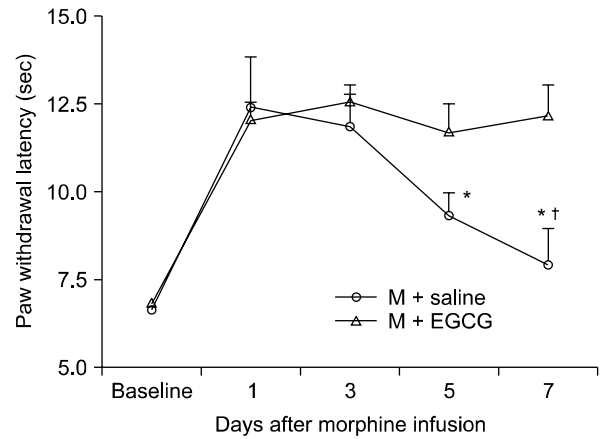


Fig. 4. Intrathecal EGCG inhibits the development of antinociceptive tolerance to morphine. Intrathecal morphine is infused continuously using osmotic pump for 7 days, during which EGCG (group M + E) or saline (group M + S) is injected intrathecally twice a day. In group M + E, paw withdrawal latency is increased and does not decline for 7 days compared to baseline. In contrast, the paw withdrawal latency of group M + S is gradually decreased and is not significantly different from its baseline on day 5 and 7. **P* < 0.01, compared to its baseline; † < 0.05, compared to the value of day 1.

차의 여러 이로운 효과를 내는 가장 중요한 성분이다. EGCG 외에도 epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin 등이 함유되어 있지만, EGCG가 가장 풍부하게 함유되어 있어서 전체 catechin 함량의 65%를 차지한다 [5,6]. 잘 알려진 암과 심혈관질환의 예방 효과 외에도 신경퇴행성 질환이나 당뇨 등에도 예방과 치료적 효과를 나타낸다. 이러한 효과들은 녹차의 항산화 효과, 혈관 생성 억제, 돌연변이 생성 억제, 지질감소 효과, 항염증 작용 등에 기인한 것으로 알려져 있다[3,4,20-22].

최근에는 이러한 EGCG의 작용에 대한 세포나 분자학적 수준에서의 연구가 활발히 이루어졌다. 많은 분자 생물학적 작용점이 밝혀졌는데, 세포주기와 관련된 단백질, protein kinase, 성장 인자, 전사인자 등이 주요한 작용점이며, 이들을 억제 또는 조절함으로써 항암 효과 등의 효과를 내는 것으로 알려져 있다[23-25]. 그러나 이러한 효과들이 모든 실험 연구에서 일정하게 나타나는 것이 아니고 세포의 종류와 약동학적인 차이에 따라 그 작용이 다르게 나타나는데, 암세포에서와 신경세포에서의 anti-apoptotic/pro-apoptotic 활성의 균형 상태에 대한 효과가 다르게 나타난다[24,26,27]. 즉, EGCG의 여러 작용이 암세포, 혈관내피 세포, 신경세포 등에 따라 다를 수 있으며 그로 인해 인체에 나타나는 이로운 효과들의 기전

도 다르다고 할 수 있다.

EGCG의 신경계에 대한 효과는 주로 파킨슨병, 알츠하이머병 등의 퇴행성 변화에 미치는 EGCG의 항산화 효과 대한 연구에서 주로 이루어졌다[28,29]. 또한 척수 수준에서는 운동신경세포와 관련된 질환 모형과 척수 손상 모형에서 신경보호 효과를 나타낸다는 몇몇 연구 결과가 발표되었다[13-16]. 그러나 본 실험과 관련된 척수 수준에서의 감각신경세포나[9] 모르핀에 대한 내성 발생에 주요 역할을 하는 교세포의 역할 등에[11] 대한 EGCG의 효과에 대한 연구는 상대적으로 매우 부족하여 기존의 연구 결과만으로 본 실험의 결과에 대한 해석과 그 기전을 추측하기는 매우 어렵다. 그러나 Mandel 등의 [27] 연구에 의하면 EGCG의 신경보호 효과는 항암효과보다 훨씬 적은 농도에서 그 효과를 나타냈고, 이는 EGCG의 신경계에 미치는 영향이 더 클 수 있음을 보여 준다.

Singal 등의[10] 당뇨병성 통증 모델을 이용한 연구에서 복강내로 투여한 GTE의 급성열성자극(tail emersion test)에 대한 항침해작용을 나타냈고, GTE의 급성열성자극에 대한 항침해효과는 당뇨병성 쥐보다 대조군 쥐에서 더 크게 나타났다. 또한 모르핀의 당뇨병성 통증 모델에 대한 항침해작용이 GTE에 의해 증강됨을 관찰하였으며, 아산화질소의 생성 억제를 그 기전으로 보고하였다. 한편, Kim 등은[9] 척수후각신경절의 일차감각신경세포를 이용한 체외 실험에서도 EGCG에 의해 나트륨 이온의 흐름이 억제되는 것을 증명하였다. 본 실험에서 보여준 항침해효과와 비교하여 이와 같은 차이를 보이는 이유는 분명하지 않으며, 통증모델의 차이, 약물투약 경로의 차이, 통증의 종류의 차이가 원인일 수 있다.

EGCG는 다른 통증 모형을 이용한 실험에서도 항침해 효과를 나타내어, lipopolysaccharide를 이용한 염증성 통증에서는 열성 통각과민이 GTE에 의해 억제되었으며, cyclooxygenase-2 억제제의 진통효과를 증강시켰다[7]. 또 신경병증 통증모델인 chronic constriction injury 모델에서도 항이질통 효과가 있다고 보고되었다[8].

모르핀의 장기 투여에 의해 발생하는 내성발생이나 신체적 의존, 금단증상 등의 원인 기전은 수많은 연구에도 불구하고 아직 분명하지 않다. 뮤(mu) 수용체의 탈감작화, 내재화, G-단백과의 분리, 및 내인성 항오피오이드 체계의 활성화 등과 같은 모르핀의 장기 투여에 대한 적응성 변화가 주요 기전으로 알려져 있다[30,31]. 또한, NMDA/NO (N-methyl D-aspartate/Nitric oxide), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), cyclooxy-

genase, substance P 등을 포함하는 여러 세포 신호 전달 체계의 변화와 신경세포외의 교세포의 변화 등도 모르핀에 대한 내성과 신체적 의존의 주요 기전으로 설명되고 있다[32,33].

Oh 등은[12] EGCG의 전처치로 naloxone 투여에 의한 금단증상이 용량의존적으로 억제되었음을 증명하였고, locus coeruleus에서 모르핀에 의한 c-AMP의 증가의 억제를 관찰하였으며, 이를 금단증상 감소의 원인으로 생각하였다. Adenylyl cyclase의 활성화와 c-AMP의 증가는 모르핀 내성 발생에 중요한 기전으로, 몰핀과 같은 아편 유사제는 단기간에는 adenylyl cyclase의 활성을 억제하여 신경세포의 흥분성을 억제하는 효과를 나타내지만, 장기간의 사용시에는 adenylyl cyclase의 활성을 증가시킨다[31]. 그러므로 본 실험의 결과에 c-AMP/Adenylyl cyclase의 활성도가 영향을 미쳤을 것으로 가정할 수도 있으나, 신경세포에서 EGCG의 adenylyl cyclase의 활성에 대해서는 알려진 바가 없다.

한편, 모르핀의 내성 기전과 EGCG의 효과 기전에 대한 기존의 연구 결과에 비추어, Singal 등의[10] 연구에서 나타난 EGCG에 의한 아산화질소의 생성 억제가 EGCG에 의한 모르핀의 내성 발생 억제 효과의 기전으로 가정해 볼 수 있을 것이다. 기존의 연구를 통해서 EGCG의 신경보호 효과는 EGCG의 항산화 작용과 항염증 작용과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 아산화질소의 합성의 억제도 그 효과와 관련이 된다는 것이 증명되었다 [34,35]. 또한 NMDA 수용체 길항제, 아산화질소 합성효소 억제제는 아산화질소 생성을 억제하여 모르핀에 대한 내성 발생을 억제하므로[32,36,37], 본 실험에서 나타난 모르핀에 대한 내성 발생의 억제는 아산화질소의 생성 감소와 연관이 있을 것으로 추측할 수 있다. 그러나 Dunbar와 Yaksh는[38] 척수강 내로 아산화질소 합성효소 억제제와 모르핀을 투여한 결과 모르핀에 대한 내성 발생이 억제되지 못하였고, 이는 척수 수준의 내성 발생에는 아산화질소의 영향이 적다는 것을 반영한다고 하였다. 또한 척수 수준에서 nitric oxide synthase 활성의 영향은 cyclooxygenase의 그것보다 더 적다는 보고도 있다 [39].

한편, Renno 등은[11] streptozotocin에 의해 유도된 당뇨병에서 나타나는 정상세포의 변화가 EGCG 경구투여를 통해 억제됨을 증명하였는데, 이는 모르핀에 대한 내성의 발생에 신경세포 뿐만 아니라 신경교세포가 중요한 역할을 한다는 것과[33] 관련하여 본 실험에서 나타난 EGCG의 모르핀내성 발생억제 효과의 기전에 대한

향후 연구 대상이 될 수 있을 것으로 생각한다.

결론적으로, 척수강 내로 투여한 EGCG는 급성열성자극에 대한 약한 항침해효과를 나타냈으나 모르핀의 진통작용에 변화를 주지는 않았으며, 모르핀의 척수강 내 투여에 의한 내성 발생을 억제하는 효과가 있음을 관찰하였다.

참 고 문 헌

1. Wolfram S: Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr* 2007; 26(Suppl): 373-88.
2. Shankar S, Ganapathy S, Srivastava RK: Green tea polyphenols: Biology and therapeutic implications in cancer. *Front Biosci* 2007; 12: 4881-99.
3. Yang CS, Maliakal P, Meng X: Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 25-54.
4. Donà M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, et al: Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2003; 170: 4335-41.
5. Graham HN: Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 1992; 21: 334-50.
6. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC: The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 693-704.
7. 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.
8. Renno WM, Saleh F, Klepacek I, Al-Khaledi G, Ismael H, Asfar S: Green tea pain modulating effect in sciatic nerve chronic constriction injury rat model. *Nutr Neurosci* 2006; 9: 41-7.
9. Kim TH, Lim JM, Kim SS, Kim J, Park M, Song JH: Effects of (-) epigallocatechin-3-gallate on Na (+) currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol* 2009; 604: 20-6.
10. 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.
11. Renno WM, Alkhalaf M, Afsari Z, Abd-El-Basset E, Mousa A: Consumption of green tea alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the spinal cord astrocytes of STZ-diabetic rats. *Nutr Neurosci* 2008; 11: 32-40.
12. Oh KW, Eun JS, Kwon HN, Cho EY, Kim KM: Effects of (-)epigallocatechin gallate on the development of morphine-induced physical dependence. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1111-5.
13. Sakla MS, Lorson CL: Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. *Hum Genet* 2008; 122: 635-43.
14. Xu Z, Chen S, Li X, Luo G, Li L, Le W: Neuroprotective effects of (-)epigallocatechin-3-gallate in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res* 2006; 31: 1263-9.
15. Koh SH, Lee SM, Kim HY, Lee KY, Lee YJ, Kim HT, et al: The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neurosci Lett* 2006; 395: 103-7.
16. Paterniti I, Genovese T, Crisafulli C, Mazzon E, Di Paola R, Galuppo M, et al: Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 380: 179-92.
17. Dirig DM, Salami A, Rathbun ML, Ozaki GT, Yaksh TL: Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods* 1997; 76: 183-91.
18. Kim SY, Yoon MH, Lee HG, Kim WM, Lee JD, Kim YO, et al: The role of adrenergic and cholinergic receptors on the antinociception of Korean red ginseng in the spinal cord of rats. *Korean J Pain* 2006; 19: 131-6.
19. Tallarida RJ, Murray RB: Manual of pharmacologic calculations with computer programs. 2nd ed. New York, Springer-Verlag. 1987, pp 1-95.
20. Pfeffer U, Ferrari N, Morini M, Benelli R, Noonan DM, Albini A: Antiangiogenic activity of chemopreventive drugs. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 70-4.
21. Han C: Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. *Cancer Lett* 1997; 114: 153-8.
22. Yang TT, Koo MW: Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci* 2000; 66: 411-23.
23. Chen D, Milacic V, Chen MS, Wan SB, Lam WH, Huo C, et al: Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol* 2008; 23: 487-96.
24. Gouni-Berthold I, Sachinidis A: Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1261-71.
25. Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H: Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 2003; 133(Suppl): 2417-24.
26. Nam S, Smith DM, Dou QP: Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276: 13322-30.
27. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB: Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 2004; 88: 1555-69.
28. Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Baek WK, Suh MH, et al: The green tea polyphenol (-)epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci* 2001; 70: 603-14.

29. Choi JY, Park CS, Kim DJ, Cho MH, Jin BK, Pie JE, et al: Prevention of nitric oxide-mediated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate. *Neurotoxicology* 2002; 23: 367-74.
30. Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE: Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* 1998; 19: 1603-30.
31. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O: Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001; 81: 299-343.
32. King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J: Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals* 2005; 14: 194-205.
33. Watkins LR, Hutchinson MR, Johnston IN, Maier SF: Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci* 2005; 28: 661-9.
34. Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, et al: Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals* 2005; 14: 46-60.
35. Kim CY, Lee C, Park GH, Jang JH: Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against beta-amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 869-81.
36. Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE: The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 1994; 56: 69-75.
37. Majeed NH, Przewlocka B, Machelska H, Przewlocki R: Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology* 1994; 33: 189-92.
38. Dunbar S, Yaksh TL: Effect of spinal infusion of L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, on spinal tolerance and dependence induced by chronic intrathecal morphine in the rat. *Neurosci Lett* 1996; 207: 33-6.
39. Powell KJ, Hosokawa A, Bell A, Sutak M, Milne B, Quirion R, et al: Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 631-44.