

## 산청목 메탄올 추출물의 진통 효과

서현원<sup>1</sup> · 박경재<sup>1</sup> · 광귀희<sup>1</sup> · 임준상<sup>1</sup> · 김대근<sup>1</sup> · 임재윤<sup>1</sup> · 차동석<sup>1</sup> · 권진<sup>2</sup> · 오찬호<sup>3</sup> · 전훈<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>우석대학교 약학대학, <sup>2</sup>한국복지대학 의료보장학과, <sup>3</sup>우석대학교 식품생명공학과

### Anti-nociceptive Activity of *Acer tegmentosum* MeOH Extract

Hyun Won Seo<sup>1</sup>, Kyung Jae Park<sup>1</sup>, Gui Hee Guahk<sup>1</sup>, Jun Sang Im<sup>1</sup>, Dae Keun Kim<sup>1</sup>, Jae Yoon Leem<sup>1</sup>,  
Dong Seok Cha<sup>1</sup>, Jin Kwon<sup>2</sup>, Chan Ho Oh<sup>3</sup>, and Hoon Jeon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Welfare, Pyongtaek 459-070, Korea

<sup>3</sup>Department of Food & Biotechnology, Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea

**Abstract** – *Acer tegmentosum* which belongs to Aceraceae has been widely used as a traditional medicine for the treatment of lots of diseases including pain management. In this study, we evaluated the anti-nociceptive effects of methanolic extract of *A. tegmentosum* (MAT) in mice using various pain models. MAT presented strong and dose-dependent anti-nociceptive activities on thermal nociception models such as tail-immersion test and hot plate test. Moreover, acetic acid-induced chemical nociception was significantly reduced by MAT treatment. We could confirm MAT's central and peripheral analgesic properties by formalin test. We also found that the pre-treatment of opioid receptor antagonist did not alter the MAT's anti-nociception, suggesting opioid receptor is not involved in analgesic activity of MAT. Based on our results, we could conclude that MAT may be possibly used as an anti-nociceptive agent for the treatment of various nociceptive pains.

**Key words** – *Acer tegmentosum*, pain, anti-nociception

통증이란 실제적인 또는 잠재적인 조직 손상에 따라 수반되는 혹은 그러한 손상의 관점에서 표현되는 불쾌한 감각적, 정서적 경험을 의미한다.<sup>1)</sup> 우리 몸은 이러한 통증을 통해서 조직을 손상시킬 수 있는 위협을 감지하여 2차 손상을 방지하거나 그 정도를 최소화 할 수 있다.<sup>2)</sup> 그러나 통증의 정도가 지나치거나 손상된 조직의 치료가 완료되었음에도 불구하고 계속되는 경우 또는 암과 같은 질병으로 기인하거나 원인불명의 만성 통증의 경우에는 인간의 삶의 질을 심각하게 떨어뜨릴 수 있으며, 이러한 경우에는 통증이 효과적으로 조절될 필요가 있다.

현재까지 진통제로서 널리 사용되고 있는 아스피린을 포함한 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)는 진통작용이 그다지 강하지 않고, 부작용으로 상부 위장관의 점막 염증과 출혈 등이 알려져 있다. 한편, opioid계 진통제인 morphine은 강한 진통효능에도 불구하고 중독성과 의존성을 비롯한 여러 가지 중추신경계통의

이상 상태의 야기가 가능하므로 제한적으로 사용되고 있다.<sup>3,4)</sup> 따라서 높은 통증억제 효과와 더불어 상대적으로 부작용이 낮은 진통제의 개발이 요구되고 있으며, 최근에 이르러 많은 과학자들이 천연물로부터 진통제 개발 가능성에 주목하고 그에 따라 활발한 연구가 진행 중에 있다.<sup>5)</sup>

산청목은 단풍나무과(Aceraceae)에 속하는 산겨릅나무이며 가지, 줄기, 또는 뿌리를 약용으로 하여 전통적으로 해독, 간암, 간경변증 등의 각종 간질환 및 통증의 완화 등에 사용되어온 생약이다. 현재까지 산청목에 대한 약리연구로는 간보호,<sup>6,7)</sup> 항산화<sup>8)</sup> 및 항염증<sup>9)</sup> 활성 등이 보고되고 있으며, 주성분으로는 quercetin, catechin과 같은 phenol계 화합물을 포함하고 있다고 알려져 있다.<sup>10)</sup> 전통적으로 산청목이 다양한 통증의 개선에 효과적으로 사용되어 왔음에도 불구하고 진통 효과에 대한 연구는 미비한 실정이며, 이에 본 연구에서는 생쥐를 이용하여 산청목이 중추성 통증 및 말초성 통증에 어떠한 영향을 미치는지 다양한 통증모델을 통하여 확인하였다. 또한, opioid 수용체의 비선택적 길항제인 naloxone의 전처리를 통해 산청목의 진통효능이 opioid 수용체와 관련이 있는지 여부를 조사하였다.

\*교신저자(E-mail): hoonj6343@hanmail.net  
(Tel): +82-63-290-1577

## 재료 및 방법

**시료의 준비** - 실험에 사용된 약제는 2012년 10월 강원 원주 소재의 강원약초에서 구입하였다. 건조과정을 통한 약재 시료(WH 074)는 우석대학교 약학대학 한약학과에 보관되었다. 건조된 샘플 600 g은 4500 mL의 100% methanol을 사용해 50°C의 초음파추출기를 통해 추출하였고 이 과정을 세 번 반복하였다. 추출물은 회전식 농축기를 이용하여 15.2 g(수율: 2.51%)으로 농축한 다음 동결 건조하여 실험에 사용될 때까지 -20°C에서 보관하였다.

**기기 및 시약** - Indomethacin과 naloxone은 Sigma-Aldrich(CA, USA)에서 구입하였다. Acetic acid, formalin은 Samchun Chemical(Korea)에서 구입하였다. Hot-plate apparatus(JD-A-10A, Jungdo BNP, Korea)와 항온수조는 열성 자극에 의한 통증 억제 실험을 위해 사용되었다.

**실험 동물** - ICR mice(5주령, 수컷)는 한국 대전 소재의 다물 사이언스에서 구입하였다. 모든 실험동물은 22±1°C의 온도와 12시간 주기의 또한 일정한 양의 사료와 식수를 주기적으로 공급하였다. 본 연구에서 수행된 진통 실험은 International association for the study of pain 및 우석대학교에서 규정하는 동물실험 윤리규정을 준수하였다. 실험 동물은 진통 실험을 위해 8마리에서 10마리가 무작위로 선택되어 구획되었다. 각각의 실험에서 산청목은 증류수를 용매로 하여 구강을 통해 투여되었고 음성대조군에서는 같은 양의 증류수를 투여하였다. 양성대조군으로 사용된 약물 중 tramadol(15 mg/kg)은 복강 주사하였고, indomethacin(5 mg/kg)은 경구투여 하였다.

**Tail Immersion Test** - ICR mouse의 꼬리 절반을 50±0.2°C의 온도가 유지되는 water bath 안에 담근 후 꼬리를 다시 들어 올리는 시간을 측정하였다. 시간 측정은 산청목(250, 500 mg/kg)와 tramadol(15 mg/kg) 투여 후 0, 30, 60, 90, 120 분이 지난 뒤에 시행되었다. 또한 조직 손상을 피하기 위해 측정시간은 20초를 최대로 하였다.

**Hot-plate Test** - Hot-plate test 에서 ICR mouse를 각 군으로 구획한 후, hot-plate를 55±1°C에서 유지시킨 상태에서 실험 동물을 그 위에 올려놓은 뒤 통증 반응(앞발 물기, 뒤로 가기, 제자리 뛰기)을 보일 때까지의 시간을 측정하였다. 시간 측정은 산청목(250, 500 mg/kg)와 tramadol(15 mg/kg) 투여 후 0, 30, 60, 90, 120 분이 지난 뒤에 시행되었다. 또한 조직 손상을 피하기 위해 측정시간은 30초를 최대로 하였다.

**Acetic Acid-induced Writhing Test** - ICR mouse의 복강에 생리 식염수를 용매로 acetic acid(0.8%)를 주사한 후 나타나는 writhing motion의 횟수를 투여 후 5분 뒤부터 20분간 측정하였다. 산청목(250, 500 mg/kg)은 증류수를 용매로 하여 구강을 통해 투여되었고 음성대조군에서는 같은 양

의 증류수를 투여하였다. 양성대조군으로 사용된 indomethacin(5 mg/kg) 또한 구강을 통해 투여되었다. 또한 이들은 모두 acetic acid를 복강 주사하기 60분 전에 투여되었다.

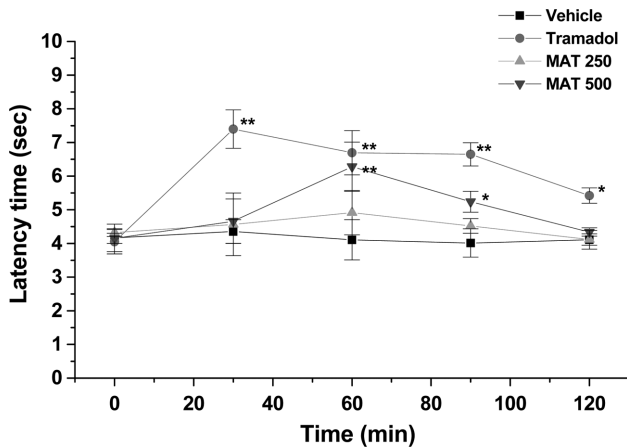
**Formalin Test** - 생리 식염수를 용매로 한 formalin(1.5%, 20 µl)을 ICR mouse의 족부에 투여하였을 때 실험 동물은 주사부위를 핥는 행동을 보인다. 이러한 통증 반응을 formalin 주사 직후 5분간 및 주사 후 25부터 15분 간 각각 2회 측정하였다. 산청목(250, 500 mg/kg)은 증류수를 용매로 하여 formalin 투여 60분 전에 구강을 통해 투여되었고 음성대조군에서는 같은 양의 증류수를 투여하였다. 양성대조군으로 사용된 약물 중 tramadol(15 mg/kg)은 formalin 투여 30분 전에 복강주사 하였고, indomethacin(5 mg/kg)은 formalin 투여 60분 전 구강 투여하였다. 또한 opioid 수용체와의 연관성을 알아보기 위해 병용 투여한 naloxone(5 mg/kg)은 각각의 약물 처리 15분 전에 복강 주사로 투여되었다.

**통계 분석** - 모든 자료는 mean±S.E.M. Data 로 표시되었으며 두 군 간의 비교는 Student's *t*-test 를 이용하여 *p*-values 값을 구하였다. *p*-values 값이 0.05 미만인 경우 신뢰할 수 있는 데이터로 간주하였다.

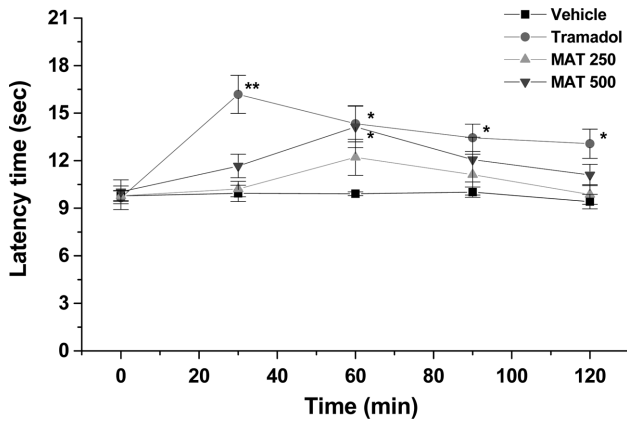
## 결과 및 고찰

통증은 그 경로와 방향에 따라 중추성 통증과 말초성 통증으로 구분할 수 있다. 중추성 통증은 대뇌 피질과 척수가 직접 통증 자극의 주체가 되는 기계적, 열자극에 의한 통증으로서 중추신경계에는 opioid 수용체가 분포하여 자극의 전달에 큰 영향을 미치는 반면, 말초성 통증은 특정 신경 섬유에 인접해 있는 조직에 부분적 손상이 원인이 되어 발생하며 염증성, 화학적 자극 등으로 인한 통증이다.<sup>11)</sup>

본 연구에서는 산청목이 중추성 통증에 미치는 영향을 알아보기 위해서 tail immersion test와 hot-plate test 같은 열 자극으로 유도된 통증모델을 사용하였다. Tail immersion test 결과, 산청목은 농도 의존적으로 열자극에 견디는 시간을 증가시켰으며, 비교 대조군으로 사용된 tramadol 역시 유의적인 진통효능을 나타내었다(Fig. 1). 흥미롭게도 tramadol은 opioid계 약물과 유사하게 약물 투여 30분 후에 가장 뛰어난 진통효과를 나타낸 반면에, 산청목은 저농도와 고농도 모두 약물 투여 60분 뒤에 가장 뛰어난 효과를 보였다. 이러한 차이는 약물 투여의 방법이 복강투여와 경구 투여로 다른 점에서 기인하였거나 상이한 약물의 대사 과정에서 비롯된 것으로 추측된다. 또 다른 중추성 통증모델인 hot-plate test에서도 산청목은 저농도와 고농도의 실험군 모두에서 약물 투여 후 60분이 지났을 때 가장 좋은 진통효과를 나타낸 후 서서히 감소했으며, 양성 대조군으로 사용된 tramadol은 투여 후 30분에 가장 강력한 진통효과를 나타내었다(Fig. 2).

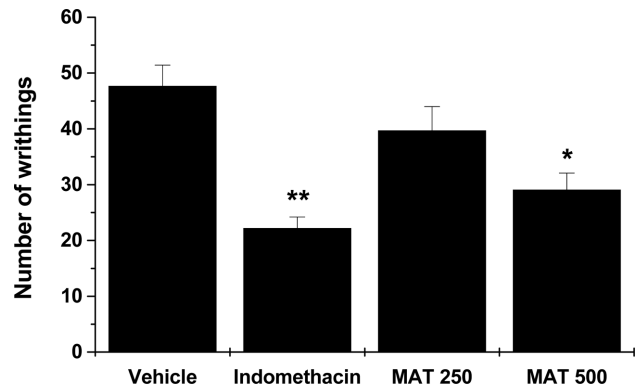


**Fig. 1.** Anti-nociceptive effect of MAT in the tail immersion test. The mice were treated with tramadol (15 mg/kg; i.p.), MAT (250, 500 mg/kg; p.o.). Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and units are in seconds (n=10-12). Differences between groups were statistically analysed by Student's test. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 compared to vehicle-treated group.



**Fig. 2.** Anti-nociceptive effect of MAT in the hot-plate test. The mice were treated with tramadol (15 mg/kg; i.p.), MAT (250, 500 mg/kg; p.o.), or distilled water. Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=10-12). Differences between groups were statistically analysed by Student's test. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 compared to vehicle-treated group.

말초성 통증에서의 산청목의 진통 효과는 acetic acid-induced writhing test를 통해 검정하였다. Acetic acid-induced writhing test는 prostaglandins(PGs), 그 중에서도 복막 유동체 내의 PGE<sub>2</sub>의 증가와 밀접한 관련이 있으며<sup>12)</sup> 염증성 통증에 주로 연관되어 있다고 알려져 있다.<sup>13)</sup> 따라서, NSAID계 약물은 이러한 PG synthesis를 효과적으로 저해시켜 말초성 통증을 억제시킬 수 있으며, 본 실험에서 비교대조군으로 사용된 indomethacin 역시 ICR mouse의 writhing motion을 뚜렷하게 감소시켰다. 또한 산청목도 고농도에서 유의적인 진통효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig.



**Fig. 3.** Anti-nociceptive effect of MAT in the acetic acid-induced writhing test. The mice were treated with indomethacin (5 mg/kg; i.p.), MAT (250, 500 mg/kg; p.o.), or distilled water. Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=10-12). Differences between groups were statistically analysed by Student's test. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 compared to vehicle-treated group.

3). 특히, 산청목은 NO, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 등을 포함하여 다양한 염증성 매개물질의 합성을 억제한다고 알려져 있으며<sup>8)</sup> 이러한 산청목의 항염증 활성을 통해서 말초성 통증이 억제되는 것으로 생각된다.

산청목의 중추성 및 말초성 통증에 대한 진통효과를 최종적으로 검정하기 위해서 두 가지 통증을 모두 확인할 수 있는 formalin test를 수행하였다. 말초성 유해 자극원인 formalin을 피하주사하게 되면 두 가지 통증 매커니즘을 통해 통증반응을 유도하게 된다. 먼저 C 섬유를 통한 직접적인 자극으로 인한 first phase의 반응은 신경성 통증 반응으로서 morphine과 같은 opioid, 혹은 그 유사체에 의해 저해될 수 있다. Second phase는 염증성 통증 반응으로서 말초조직 내에서 PGs, serotonin, histamine 등과 같은 염증 매개체의 영향을 받게 된다.<sup>14,15)</sup> 실험결과 비교대조군으로 사용된 중추성 진통제인 tramadol은 first phase와 second phase 모두 뛰어난 진통효과를 보인 반면에, NSAIDs 계열 약물인 indomethacin은 second phase에서만 진통 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 이미 보고된 다수의 논문과 일치하는 것으로서 주로 중추신경계에 작용하는 약물은 formalin test의 두 phase에 모두 작용하는 반면, 말초신경계에 작용하는 스테로이드나 NSAIDs 계열 약물은 first phase에서 거의 효과가 나타나지 않는다.<sup>16)</sup> 한편, 산청목은 first phase와 second phase에서 모두 실험동물의 반응을 효과적으로 저해했으며 이는 산청목이 중추성 통증과 말초성 통증 모두를 억제한다는 것을 보여주며, 이러한 결과를 통해 앞선 연구에서 나타난 중추성 및 말초성 통증 억제효과를 재확인할 수 있었다(Table I).

다음으로 산청목의 진통 효능이 opioid 수용체와 관련이 있는지 알아보기 위하여 opioid 수용체의 선택적 길항제인

**Table I.** Anti-nociceptive effect of MAT in the formalin test

Treatment	Dose (mg/kg)	Naloxone (5 mg/kg)	Early Phase (0-5 min)		Late Phase (20-35 min)	
			Licking time (s)	Inhibition (%)	Licking time (s)	Inhibition (%)
Vehicle	-	-	129.77±13.21	-	155.82±13.98	-
Tramadol	15	-	73.17±9.35**	43.61	82.26±6.27**	47.20
Tramadol	15	+	99.67±8.20 <sup>#</sup>	23.20	124.92±13.97 <sup>##</sup>	19.83
Indomethacin	5	-	122.63±7.83	5.50	96.22±5.41*	38.28
Indomethacin	5	+	121.36±8.79	6.48	94.33±10.95*	39.47
MAT	250	-	107.34±6.81	17.29	124.99±12.00*	19.78
MAT	500	-	92.88±6.52**	28.42	104.37±9.37*	33.02
MAT	500	+	94.07±6.35**	27.50	106.70±10.95*	31.52

Values expressed as mean±S.E.M. (n=10-12)

Differences between groups were statistically analysed by Student's test.

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to vehicle-treated group, while <sup>#</sup> $p < 0.05$  and <sup>##</sup> $p < 0.01$  compared to naloxone-untreated group.

naloxone을 전 처리한 다음 진통효과의 변화를 관찰하였다. 양성대조군인 tramadol의 경우 naloxone의 전 처리 후 그 정도의 감소가 있으나 여전히 약간의 효과가 유지됨을 확인하였다. 이는 tramadol이 부분적으로 opioid 수용체에 영향을 줌과 동시에 다른 기전으로도 진통효능을 나타냄을 의미한다.<sup>17)</sup> 그러나 산청목이나 indomethacin은 naloxone의 전 처리에 의해 유의적인 진통효능의 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 통해서 산청목이 opioid 수용체와는 다른 기전으로 중추성 및 말초성 통증을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 산청목이 중추성 통증과 말초성 통증 모두를 억제하는데 좋은 효과가 있으며 이러한 진통효능은 opioid 수용체와는 다른 경로를 통해 나타난다는 것을 알 수 있었다. 그러나 산청목의 보다 정확한 약리기전을 알아보기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

산청목 메탄올 추출물의 진통효능을 알아보기 위해 여러 가지 실험을 수행한 결과는 다음과 같다. Tail immersion test와 hot-plate test의 결과 산청목은 효과적인 중추성 통증 억제능을 나타내었다. 또한 acetic acid-induced writhing test의 결과, 산청목은 효과적인 말초성 통증 억제능을 나타내었다. 마지막으로 formalin test를 통해 산청목의 중추성, 말초성 통증 억제능을 재확인 하였으며 naloxone의 전처리를 통해 opioid 수용체와 상이한 경로를 통해 진통 효능을 보임이 확인되었다.

## 사 사

이 논문은 우석대학교 산학협력선도대학(LINC) 사업단의

지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. IASP (1979) The need of a taxonomy. *Pain*, **6**: 247-252.
2. Lynn, B., Winlow, W. and Holden, A. V. (1984) The neurobiology of pain: Symposium of the northern neurobiology group.
3. Kim, H. J., Chung, W. C., Lee, K. M., Paik, C. N., Jung, S. H., Kim, J. D., Jung, S. H. and Kwak, J. W. (2009) Multiple gastrointestinal drug induced ulcers associated with aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs: A case report and review of the literature. *The Korean Journal of Gastrointestinal Endoscopy* **39**: 379-383.
4. Soledad, M. C., Hernando, A., Olga, M. and Daniel, B. C. (2004) Addition of ultralow dose naloxone to postoperative morphine PCA : unchanged analgesia and opioid requirement but decreased incidence of opioid side effects. *Pain* **107**: 41-46.
5. Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Sntos, A. R., Filho, V. C. and Yunes, R. A. (2000) Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* **14**: 401-418.
6. 이선아, 문구 (2010) 枳椇子山靑木配合이 D-galactosamine 유발 백서의 간손상에 미치는 影響. *대한한방내과학회지* **31**: 11-24.
7. 이승보, 우홍정 (2010) 山靑木이 간섬유화 진행 억제에 미치는 효과에 대한 연구. *대한한방내과학회지* **31**: 346-355.
8. Yu, T., Lee, J., Lee, Y. G., Byeon, S. E., Kim, M. H., Sohn, E. H., Lee, Y. J., Lee, S. G., Cho, J. Y. (2010) *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. *J. Ethnopharmacol.* **128**: 139-147.
9. Tung, N. H., Ding, Y., Kim, S. K., Bae, K. and Kim, Y. H. (2008) Total peroxy radical-scavenging capacity of the chemical components from the stems of *Acer tegmentosum maxim.* *J. Agric. Food Chem.* **56**: 10510-10514.

10. Park, K. M., Yang, M. C., Lee, K. H., Kim, K. R., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2006) Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum maxim.* *Arch. Pharm. Res.* **29**: 1086-1090.
  11. Li, S. and Tator, C. H. (2000) Action of locally administered NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists in spinal cord injury. *Neurological Research* **22**: 171-180.
  12. Derardt, R., Jougney, S., Delevalcee, F. and Falhout, M. (1980) Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology* **51**: 17-24.
  13. Bley, K. R., Hunter, J. C., Eglen, R. M. and Smith, J. A. (1998) The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**: 141-147.
  14. Hunskar, S., Fasmer, O. B. and Hole, K. (1985) Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods* **14**: 69-76.
  15. Amaral, J. F., Silva, M. I. G., Neto, M. R. A., Neto, P. F. T., Moura, B. A., Melo, C. T. V., Araujo, F. L. O., DeSousa, D. P., Vasconcelos, P. F., Vasconcelos, S. M. and Sousa, F. C. F. (2007) Antinociceptive effect of the monoterpene R(-)-limonene in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1217-1220.
  16. Vontagu, H., Abbah, J., Nagazal, I. E., Kunle, O. F., Chindo, B. A., Otsapa, P. B. and Gamaniel, K.S. (2004) Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Parinari polyandra* stem bark in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* **90**: 115-121.
  17. Yalcin, I. and Aksu, F. (2005) Involvement of potassium channels and nitric oxide in tramadol antinociception. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **80**: 69-75.
- (2013. 5. 3 접수; 2013. 6. 3 심사; 2013. 6. 10 게재확정)