

흰 쥐의 턱관절 염증성 통증모델에서 홍삼 및 흑삼추출물의 효과

이현정 · 김윤경 · 최자형 · 이정화 · 김혜진 · 성미경¹ · 이민경[†]

동의대학교 일반대학원 보건위생학과, ¹마산대학교 치위생과

Effects of Red or Black Ginseng Extract in a Rat Model of Inflammatory Temporomandibular Joint Pain

Hyeon-Jeong Lee, Yun-Kyung Kim, Ja-Hyeong Choi, Jung-Hwa Lee, Hye-Jin Kim, Mi-Gyung Seong¹, and Min-Kyung Lee[†]

Department of Biomedical Health Science, Graduate School, Dong-Eui University, Busan 47340,

¹Department of Dental Hygiene, Masan University, Changwon 51217, Korea

Temporomandibular joint (TMJ) pain is characterized by persistent jaw pain associated with dysfunction and tenderness of the temporomandibular muscles and joints. The aim of this study was to investigate whether treatment with red or black ginseng extract helps in the modulation of inflammatory TMJ pain. Male Sprague-Dawley rats weighing 220~260 g were used. The experimental group was subdivided into 4 groups based on the treatment method (n=6, each group): formalin (5%, 30 μ l), formalin after distilled water (vehicle), formalin after red or black ginseng extract (per oral, single or repeated, respectively). To induce TMJ pain, 30 μ l of formalin was injected into the articular cavity under ether inhalation anesthesia. The number of noxious behavioral responses of scratching the facial region proximal to the injection site was recorded for 9 successive 5-min intervals following formalin injection. Repeated treatment with red or black ginseng extract reduced the nociceptive responses in the second phase (11~45 min). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is an oxidative stress-mediated transcription factor. Both ginsengs significantly down-regulated the increased Nrf2 level compared to the vehicle group. In the test for liver and kidney functions, repeated treatment with red or black ginseng was not different compared to the vehicle group. These results indicate that red and black ginseng extract might be promising analgesic agents in the treatment of inflammatory TMJ pain.

Key Words: Black ginseng extract, Red ginseng extract, Temporomandibular joint

서론

인삼(人蔘, *Panax ginseng* CA Meyer)은 오가과(두릅나무과: Araliaceae)에 속한 다년생 초본식물로 전 세계 광범위하게 사용되고 있는 한방의 천연물이며 다양한 약리적 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁾. 인삼은 가공방법에 따라 여러 종류로 분류할 수 있으며, 가장 대중적으로 잘 알려진 홍삼(紅蔘)은 수삼을 95~100°C에서 2~3시간 찌서 말린 붉은 삼이고, 흑삼(黑蔘)은 수삼을 구증구포(9번 찌고 9번 말림)한 검은빛의 삼을 말한다. 인삼의 대표적인 약리효능

으로는 뇌기능 향진효능, 항통증 효과, 암 예방과 항암활성 효능, 항피로 및 항스트레스 효능 등이 있다²⁾고 알려져 있으며, 이러한 인삼의 효능을 나타내는 주요활성물질은 사포닌이라 한다. 인삼의 사포닌인 진세노사이드는 triterpenoid계 dammarane 골격의 특수한 화학구조를 지녔으며 dammarane계 사포닌은 비당부분의 수산기(-OH)수에 따라 2개인 protopanaxadiol (PPD)계, 3개인 protopanaxatriol (PPT)계로 구분된다. PPD계 사포닌은 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, F2, Rh2가 있으며, PPT계는 Re, Rg1, Rg2, Rf, Rh1, F1으로 분류되며³⁾, in vitro 연구에서 Rh1은 활성산소를 억제하는 항

Received: December 8, 2016, Revised: January 4, 2017, Accepted: January 11, 2017

ISSN 1598-4478 (Print) / ISSN 2233-7679 (Online)

[†]Correspondence to: Min-Kyung Lee

Department of Biomedical Health Science, Dong-Eui University, 176 Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea
Tel: +82-51-890-4238, Fax: +82-0505-182-6878, E-mail: lmk849@deu.ac.kr

Copyright © 2017 by Journal of Dental Hygiene Science

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

산화작용을 한다고 보고되었고^{4,6)}, Rb2는 암독소 호르몬에 대한 길항작용이 있다고 보고되었다^{7,8)}. 인삼의 가공형태의 하나인 홍삼 또한 인삼과 마찬가지로 항암 활성 및 면역기능 조절작용, 항스트레스 및 항피로작용 등에 탁월한 것으로 알려져 있고⁹⁾, 일부 연구들은 홍삼의 약리효과는 홍삼에 비해서 더욱 우수하다고 밝혔으나^{10,11)} 현재까지는 인삼에 비해 홍삼이나 흑삼에 대한 연구는 비교적 부족한 실정이다. 최근 일부 연구에서는 흑삼은 다양한 항산화 효과를 보고한 사례가 있지만¹²⁻¹⁴⁾, 안면영역과 연관된 연구가 매우 부족한 실정이므로 본 연구를 통하여 홍삼과 흑삼이 턱관절(temporomandibular joint, TMJ)의 염증성 통증발생 및 제거 이전에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

TMJ는 측두골의 하악와, 관절 돌기 사이에 형성된 관절로서 관절낭에 둘러싸여 있는 복합적인 윤회관절이다¹⁵⁾. TMJ는 개·폐구 시, 전·후방 운동 및 측방 운동 시에 지레목의 역할을 하는 관절로 하악골, 두개골, 관절원판, 인대, 근육 등으로 이루어져 있다. 이 관절에 이상이 생기는 것을 측두하악관절장애(temporomandibular disorder, TMD)라 부른다¹⁶⁾. Dworkin 등¹⁷⁾은 TMD 환자의 동통 이환율이 12%였고, TMD의 증상을 호소하지 않는 정상군에서 TMJ 잡음을 보이는 경우가 25%에 달하였으며 75%는 최소한 하나의 기능장애 징후(관절음, 압통 등)를 가지고 있고 약 33%는 최소한 하나의 증상(관절통, 안면통 등)을 가진다고 보고하였다¹⁸⁾. TMD로 인한 통증을 치료하기 위해 염증반응의 주요 매개체를 억제하는 비스테로이드성 약물(non-steroidal anti-inflammatory drugs)이 주로 사용되고 있다. 이들 약물은 뛰어난 진통효과가 있지만 위장관 독성, 고혈압, 특히 장기간 복용 시 혈전증 등의 부작용도 일으킬 수 있어 그 사용에 주의가 필요하다¹⁹⁾. 이러한 많은 연구결과들을 바탕으로 최근에는 임상에서 통증조절을 위해 보다 효과적이고 안전한 천연물에 대한 관심이 증대되고 있는 추세이다.

염증과 통증조절인자는 매우 다양하며, 그 중 DNA에 존재하는 단백질의 하나인 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 세포의 산화 환원반응을 유지시키고 산화적 스트레스에 노출될 경우 항산화제를 유도하는 핵심적인 전사인자이다. 최근 보고된 연구결과에 따르면, 염증성 통증 발생 시 Nrf2 경로가 활성화되는 것으로 나타났다²⁰⁾. Nrf2는 다양한 조직과 세포 유형에서 발현되며^{21,22)}, Nrf2가 핵막으로 유입되고 basic leucine zipper partners와 함께 antioxidant responsive element (ARE)에 결합한다. 또한 Nrf2는 산화적 스트레스와 관련된 질병에서 장기 보호 역할을 하며²³⁾, 신경세포의 보호 및 염증의 억제와 발암물질을 해독하는 것을 도와 암의 화학적 예방에 주요한 역할을 한

다고 알려져 있다²⁴⁾. 인체의 여러 상황에서 활성화되는 Nrf2의 역할에 대한 많은 연구결과들이 있으나, 현재까지 TMJ로 인한 통증조절에 관한 연구는 미비한 실정이다. 그러므로 안면영역에서 발생하는 통증과 Nrf2 신호기전의 상호관계에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 실험동물의 TMJ 관절강 내에 포르말린을 투여하여 TMJ 염증성 통증을 유발하고, 단회 혹은 반복적으로 투여된 홍삼 및 흑삼추출물이 어떠한 영향을 미칠 수 있는지를 조사하였다. 또한 안면부 염증성 통증발생과 조절에서 Nrf2 경로활성의 연관성에 대하여 알아보려고 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 효창사이언스(Daegu, Korea)에서 공급받은 7~8주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(220~260 g)를 사용하였다. 물과 사료는 자유로이 공급하였으며, 12시간 주/야 순환주기 및 23~25 °C의 일정한 환경을 유지하였다. 행동적인 억압 등에 의한 실험 전 스트레스를 가능한 한 최소화하였다²⁵⁾. 본 연구는 의식이 있는 동물의 실험에 관한 통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하고 동의대학교 동물윤리위원회의 승인(R2016-019)을 얻은 후 수행하였다.

2. 약물주입

적외선을 이용하여 열수추출한 홍삼 추출물과 흑삼 추출물은 (주)오리엔탈바이오텍(Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 홍삼사포닌을 70 mg/g 이상 함유한 6년근 수삼 추출액(99.85%)이며, 흑삼 추출물은 홍삼 추출물을 흑삼공법을 이용하여 한 번 더 가공하였다. 실험을 위한 그룹은 5% 포르말린 주입군, 대조군(vehicle [veh.], distilled water [DW]), 홍삼 추출물 투여군, 흑삼 추출물 투여군으로 구분하였고, 각 약물의 투여는 단회와 반복(1일 1회, 3일간) 투여군으로 구분하였다. 약물은 각각 1 ml의 용량으로 경구 투여하였고, 약물 주입은 TMJ 통증 유도 30분 전에 시행하였다.

3. TMJ 염증성 통증모델

실험동물을 통증반응 평가 전에 실험용 플라스틱 통에서 30분 이상 적응시켰다. 에테르 흡입 마취 후 관절강 내로 30 µl의 포르말린을 주입하였고, 포르말린 주입 후 수 초 내에 의식을 회복하는 것을 관찰하였다. 포르말린 주입을 위한 cannula는 폴리에틸렌 튜브 한쪽 끝에 30 gauge 주사바늘을 연결하였고, 반대쪽에는 인슐린 주사기(0.25×8 mm)를 연결

하여 사용하였다. 관절공의 후하방 경계면과 하악과두 부위를 측지에 의해 관절강의 위치를 유추하였고, 해당부위에 주사바늘이 관절강을 뚫고 하악와의 닿는 부위를 관절강 내로 인지하였다. 예비실험을 통하여 포르말린과 동일양의 1% evans blue dye를 별도의 동물에 주입함으로써 악관절강의 위치를 확인하였고, 실험동물은 행위반응 관찰 종료 후 약물주입 부위를 다시 확인하였다. 포르말린 주입 후 TMJ 부위를 문지르거나 긁는 행위반응을 통증지표로 간주하여 5분 간격으로 9회 연속하여 45분간 누적 기록하고, 1차 통증행위반응(0~10분, first phase)과 2차 통증행위반응(11~45분, second phase)으로 구분하여 평가하였다²⁰⁾.

4. 단백질량분석

조직적출은 TMJ 통증 유발 30분 후에 시행되었다. 실험동물을 20% urethane (0.5 ml/kg)으로 복강마취하고 경동맥을 차단하여 뇌로 가는 혈류를 차단하였고, 두개골을 절개하여 연수를 적출하였다. 균질화 전까지 -70°C 에 급속 동결 보관하였다가 사용하였다. 적출한 연수에 RIPA lysis buffer (Biosesang, Seongnam, Korea)를 첨가하여 4°C 에서 homogenizer (T 10 basic ULTRA-TURRAX[®]; IKA, Staufen, Germany)를 이용하여 조직을 균질화하였다. 균질화 이후 centrifuge (1730MR; Gyrozen, Seoul, Korea)로 4°C , 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 세포 찌꺼기를 제거한 상층액을 spectrophotometer (Human Corp., Seoul, Korea)로 595 nm에서 단백질 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 정량된 단백질과 DW, LDS sample buffer (4 \times , Bolt[™]; ThermoFisher Scientific, Seoul, Korea), reducing agent (10 \times , ThermoFisher Scientific)를 혼합하여 10분간 70°C 에서 heating 시키고 2분간 -20°C 에서 보관, 원심 후 vortex로 다시 혼합하였다. 준비된 단백질 sample은 polyacrylamide gel (15 well, Bolt[®] 4~12% Bis-Tris Plus gels; ThermoFisher Scientific)에 18.5 μl 로 loading 후 200 V에서 22분간 running하였다. Gel에서 polyvinylidene fluoride membrane (0.45 μm)으로 단백질을 옮기기 위해 20 V로 1시간 동안 transfer하였고, 전체 단백질 패턴을 확인하기 위해 Ponceau 용액으로 확인 후 DW에 10분간 세척하였다. 교반기(CR100; FINEPCR, Gunpo, Korea) 위에서 blocking buffer (1 \times PBST, 5% skim milk, sodium azide)로 2시간 blocking하고 7분간 5회에 걸쳐 1 \times PBST (10 \times PBST, DW, 0.1% Tween 20)로 수세 후 1차 antibody (Ab)로 GAPDH mouse monoclonal Ab (1:2,000; Santa Cruz

Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA)와 Nrf2 rabbit polyclonal Ab (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 4°C 에서 overnight시켰다. 1 \times PBST로 7분간 5회 수세 후 2차 Ab를 교반기 위에서 2시간 실온 부착하였고 발현은 1:1로 희석한 enhanced chemiluminescence (ECL) prime (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 분석하였다. 1차 Ab는 blocking buffer에 희석하여 사용하였고, GAPDH와 Nrf2의 2차 Ab는 각각 rabbit anti-mouse IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA)와 goat anti-rabbit IgG (Abcam)를 1:10,000의 비율로 sodium azide를 제외한 5% skim milk에 희석시켜 사용하였다. Image J (1.50i, National Institutes of Health, USA)를 이용하여 발현 정도를 나타내었다.

5. 간기능 및 신장기능 표지자 분석

홍삼과 흑삼 추출물의 반복투여에 의한 간독성 및 신장독성을 확인하기 위하여 ADVIA 1800 analyzer series (Siemens, Berlin, Germany) 장비를 이용하여 수집된 혈청에서 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransaminase (ALT)는 간독성 표지자로, blood urea nitrogen (BUN), creatinine 및 uric acid는 신장독성 표지자로 간주하여 electro chemiluminescence immunoassay (ECLIA) 원리로 측정하였다.

6. 통계분석

실험결과의 통계 분석은 IBM SPSS statistic ver. 22.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 다중 그룹에서 반복

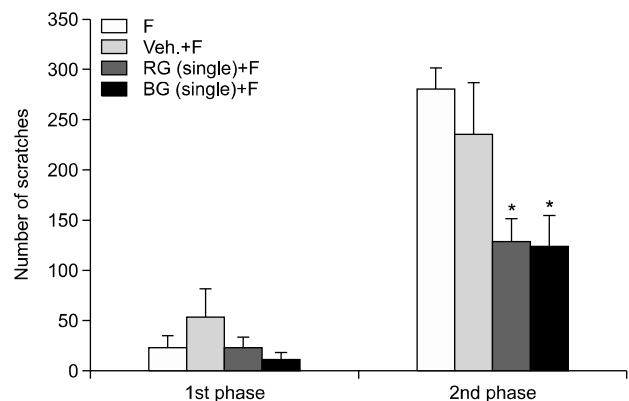


Fig. 1. Effects of red ginseng (RG), black ginseng (BG) extract (single) on nociceptive behavior. The nociceptive responses were reduced in 2nd phase (11~45 minutes), following administration of RG, BG extract 30 minutes before formalin injection (n=6 in each group). *p<0.05, vs. vehicle (veh.)+F.

측정자료의 일원분산분석하였고 사후분석은 LSD post-hoc test를 이용하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 평균±표준오차(standard error of mean)로 표시하였다.

결 과

1. 홍삼 추출물의 단회 혹은 반복 투여에 따른 TMJ 통증 조절효과

실험동물의 TMJ 내로 주입한 포르말린으로 유도된 TMJ 통증모델에서 홍삼 추출물의 단회 혹은 반복 투여에 따른

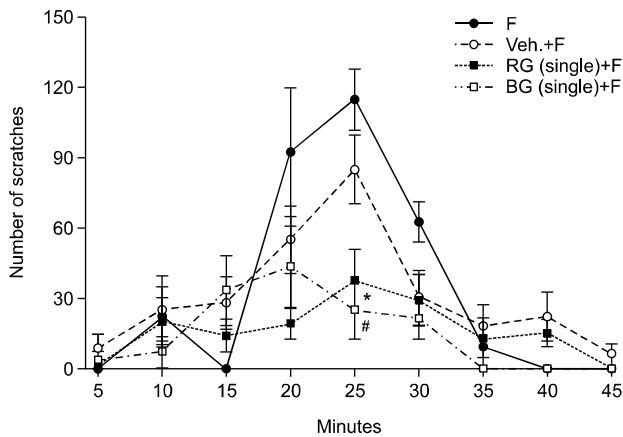


Fig. 2. Changes in nociceptive responses following administration of red ginseng (RG), black ginseng (BG) extract (single). Administration of RG, BG extract significantly reduced the nociceptive responses 20~30 minutes after induction of pain (n=6 in each group). * $p < 0.05$, vehicle (veh.)+F vs. BG (single)+F; # $p < 0.05$, veh.+F vs. BG (single)+F.

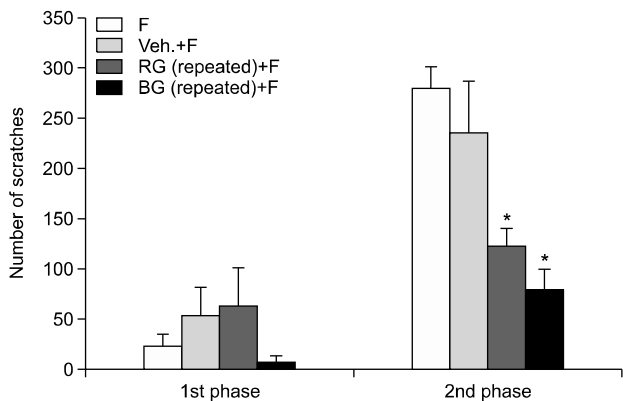


Fig. 3. Effects of red ginseng (RG), black ginseng (BG) extract (repeated) on nociceptive behavior. The nociceptive responses were reduced in 2nd phase (11~45 minutes), following administration of RG, BG extract 30 minutes before formalin injection (n=6 in each group). * $p < 0.05$, vs. vehicle (veh.)+F.

통증행위반응의 변화를 Fig. 1~4에 나타내었다. 홍삼 추출물의 단회 투여 시 1차 통증행위반응은 포르말린 주입군, 대조군(veh.+포르말린 주입군) 그리고 약물주입군 간의 유의한 차이가 없었으나, 2차 통증행위반응에서는 대조군(veh.+포르말린 주입군)에 비해 약물 주입군의 통증행위반응이 현저히 감소되었다(Fig. 1; * $p < 0.05$). 마찬가지로 홍삼 추출물의 반복 투여 시에도 포르말린 주입군에 비해 약물 주입군의 2차 통증행위반응이 유의하게 경감되었다(Fig. 3). 이러한 통증행위반응을 시간의 경과에 따른 변화로 확인하였을 때, 단회 투여 시에는 약물 주입 25분 경과시점에서 가장 효과적으로 통증행위반응이 감소되었고(Fig. 2) 이와 유사하게 반복투여 시에도 2차 통증행위반응에 해당하는 25~40분 경과시점에서 통증 조절에 효과적이었다(Fig. 4). 이러한 결과를 통해 TMJ 통증조절에 홍삼 추출물의 단회투여보다는 반복투여가 통증조절에 더 효과적임을 알 수 있었다.

2. 흑삼 추출물의 단회 혹은 반복 투여에 따른 TMJ 통증 조절효과

흑삼 추출물의 단회 혹은 반복 투여에 따른 영향을 Fig. 1~4에 나타내었다. 흑삼 추출물은 홍삼 추출물의 결과와 마찬가지로 대조군(veh.+포르말린 주입군)에 비해 약물 주입군의 2차 통증행위반응이 현저히 감소됨을 확인하였고(Fig. 1), 반복 투여 시에도 2차 통증행위반응이 유의하게 감소되었다(Fig. 3). 흑삼 추출물의 통증완화효과를 시간별로 확인했을 때 단회 투여 시 약물주입 25분 경과시점에 통증행위반

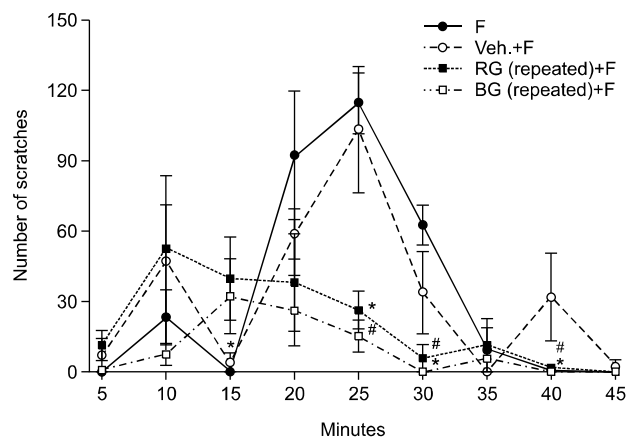


Fig. 4. Changes in nociceptive responses following administration of red ginseng (RG), black ginseng (BG) extract (repeated). Administration of RG, BG extract significantly reduced the nociceptive responses 20~30 minutes after induction of pain (n=6 in each group). * $p < 0.05$ vehicle (veh.)+F vs. RG (repeated)+F, # $p < 0.05$ veh.+F vs. BG (repeated)+F.

응이 가장 효과적으로 감소되었고(Fig. 2), 반복 투여한 그룹에서는 25~40분 경과시점에 통증행위반응이 감소되었다(Fig. 4). 이상의 결과를 통해 홍삼 추출물의 투여와 마찬가지로 단회 혹은 반복 투여된 흑삼 추출물이 TMJ 통증행

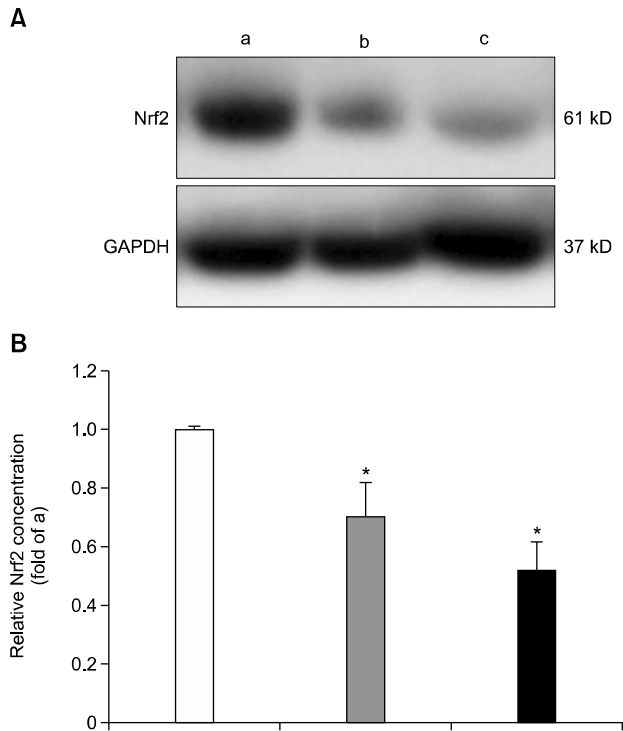


Fig. 5. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) protein expression in the medulla oblongata. Both ginseng extract significantly down-regulated the increased Nrf2 level in vehicle (veh.)+F group. a: Veh.+F, b: red ginseng (repeated)+F, c: black ginseng (repeated)+F, * $p < 0.05$ vs. veh.+F (n=3 in each group).

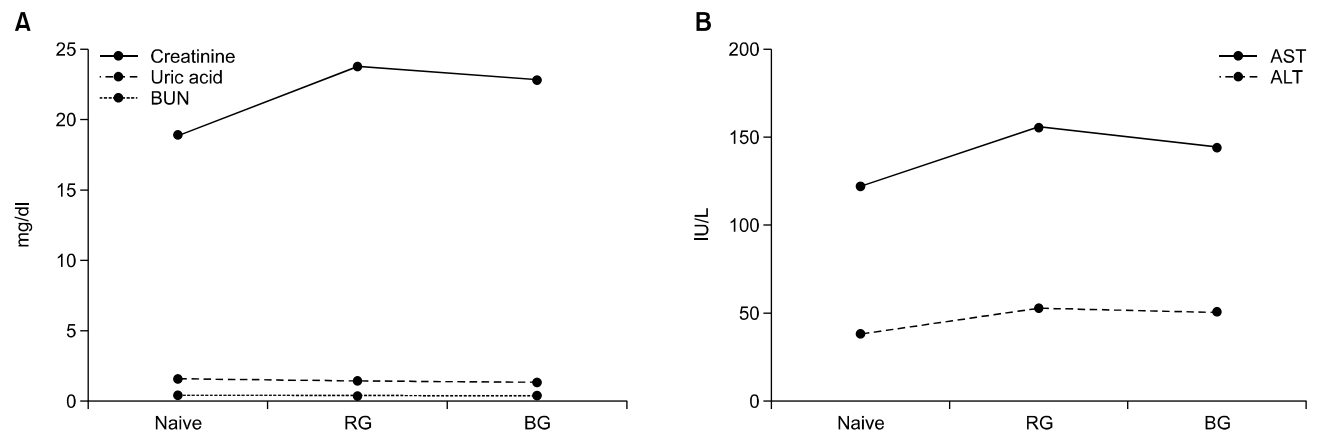


Fig. 6. Nephrotoxicity (A) and hepatotoxicity (B) on single and repeated administration of red ginseng (RG), black ginseng (BG) extract. Repeated treatment of red or black ginseng is not different compared to vehicle group in the test of liver and kidney function (n=3 in each group). BUN: blood urea nitrogen, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransaminase.

위반응을 효과적으로 조절할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

3. 홍삼 및 흑삼 추출물의 투여가 Nrf2 경로 활성화에 미치는 영향

TMJ 통증발생과 조절에 Nrf2 경로활성이 관여하는지, 홍삼 또는 흑삼 추출물을 투여한 후 염증성 통증반응 경감 시에 Nrf2 단백 발현양상이 변화하는지를 관찰하였다(Fig. 5). Nrf2 단백 발현은 뇌의 연수부위에서 확인하였다. 예비실험 시에 포르말린 주입 후 Nrf2 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였고, 이를 통해 Nrf2 경로가 TMJ 통증발생에 관여함을 알 수 있었다. 대조군(veh.+포르말린)과 비교하였을 때 반복적으로 투여된 홍삼 또는 흑삼 약물주입군 모두 Nrf2 단백 발현량이 현저히 감소하는 것을 관찰하였고, TMJ 통증조절에 Nrf2 경로의 연관성을 입증하였다. 그룹 간의 차이는 없었으나, 흑삼 추출물 주입군이 홍삼 추출물 주입군에 비해 Nrf2 발현이 더욱 감소하는 경향을 보였다.

4. 홍삼과 흑삼의 반복투여에 의한 간독성 및 신장독성 평가

홍삼과 흑삼 추출물의 간독성과 신장독성을 확인하기 위해 AST와 ALT는 간독성 표지자로, BUN, creatinine 및 uric acid는 신장독성 표지자로 간주하여 ECLIA 원리로 측정하였으나 naive에 비해 수치가 크게 증가하지 않아 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

고찰

현대사회는 과도한 스트레스로 인해 TMJ 장애 및 통증을

호소하는 환자가 증가되고 있고, 최근 한 보고에 따르면 TMJ 장애를 주 상병으로 진단 또는 치료받는 평균 환자 수는 전체 인구의 0.15%였으며, 3년간 매년 증가하는 추세를 보인다고 하였다¹⁷⁾. TMJ 장애 환자에게 나타나는 증상은 일부 전신질환까지 영향을 미칠 수 있으며, 삶의 질과 매우 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 또한 TMJ 장애 환자에서 어깨, 목 등의 근육통, 두통과 같은 통증이 동반¹⁵⁾ 되는 경우가 빈번하며, 이러한 결과들은 TMJ와 두경부의 연관성에 대한 근거자료가 된다. 이처럼 TMJ 통증은 원인이 되는 TMJ와 유관되는 대부분 인체기관에 통증을 유발하는 기점이 될 수 있으므로 통증 발생예방과 치료가 필수적으로 요구된다. 그러나 현재까지 TMJ 통증조절에 관한 연구는 매우 부족하다고 생각되어, 본 연구에서는 실험동물의 TMJ에 포르말린을 주입하여 유발한 염증성 통증모델을 통해 TMJ 통증의 발생과 조절에 관한 연구를 수행하였다. 더불어 대표적으로 사용되는 한방 천연약재인 홍삼 및 흑삼 추출물의 주입에 의해 TMJ 통증 발생 및 조절에 미치는 영향을 확인하였다.

홍삼은 가장 대표적인 천연물 유래 약물로써, 일반인들에게도 건강보조식품으로 흔히 섭취되고 있고, 다양한 연구결과를 통해 질병예방 및 치료에 있어서 약리적 가치가 높다고 보고되고 있다. 홍삼의항염증 효과 및 통증조절과 관련된 연구로, Kim 등²⁶⁾의 연구에서는 척수강 내로 홍삼을 투여한 실험군에서 포르말린 주입으로 유발된 통증이 유의하게 억제되었다고 보고하였다. 또한 Jin 등²⁷⁾의 연구에서도 홍삼 추출액의 경구 투여는 안면부에 주입한 포르말린으로 유도된 통증행위반응을 유의하게 감소시키는 결과를 보여주었고, 이와 유사하게 cisplatin으로 유발된 쥐의 신장 손상에 대하여 발효 홍삼은 항산화작용, 항염증작용에 유의한 효과가 있는 것으로 나타났다¹⁴⁾. 이러한 결과와 일치하여 본 연구에서도 포르말린으로 유발된 안면부 통증행위반응이 홍삼과 흑삼의 단회 혹은 반복 투여에 의해 유의하게 경감된다는 것을 확인함으로써 안면부 통증발생과 조절에 홍삼과 흑삼 추출물이 효과적으로 적용된다는 것을 입증하였다.

염증통증조절인자의 하나인 Nrf2는 다양한 항산화 전자들의 전사를 일으켜 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. Nrf2는 산화적 스트레스 하에 세포 내 활성 산소종과 친전자체에 대한 방어 효소 또는 phase II에 관련된 해독과 효소의 발현조절에 관여한다²⁹⁾고 알려져 있으며, 진 등의 연구에 의하면 Nrf2는 염증반응이나 산화적 스트레스와 같은 병리적 상황에 대한 대응으로 증가한다고 보고하였다²⁷⁾. 여러 연구결과를 통해 천연물이 Nrf2 발현을 조절을 통하여 여러 병리적인 상황을 중재하는 것으로

보고되었으나, 현재 안면부 통증조절에 Nrf2의 연관성에 대한 보고가 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 TMJ 내로 포르말린 주입 후 30분이 경과하였을 때 연수부위에서 Nrf2 발현의 증가를 확인하였고, 홍삼과 흑삼추출물의 투여에 의해 유의하게 감소된다는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 안면부 통증의 발생과 조절에 Nrf2 경로가 관여함을 알 수 있었고, 홍삼과 흑삼 추출물이 Nrf2 발현 조절에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인하였다.

한약재 등을 포함한 약리적 천연물은 합성약물처럼 세포의 신호기전의 과정에서 직접 관여하지 않고 상호보완적으로 작용하여 약리적 효능이 나타내므로 비교적 장기간 복용이 효과적이라고 보고된다^{30,31)}. 그러나 장기간 복용된 천연물은 간과 신장을 비롯한 여러 장기의 생리적인 기능에 영향을 미친다고 알려져 있으며, 각각의 천연물은 다양한 약리학적 유효성분이 존재하고 있으나 각 성분이 명확하지 않아서 복용 시 인체의 안정성 검증이 요구된다. 하지만 많은 연구들은 천연물의 장기복용이 인체에 위해하지 않음을 보여 주고 있고^{32,33)}, 오히려 간과 신장의 기능을 개선시킨다는 연구결과도 있다³⁴⁾. 마찬가지로 본 연구에서도 동물에게 반복적으로 투여된 홍삼과 흑삼 추출물의 간독성과 신장독성 검사를 하였으나 간과 신장독성 검사 시 대조군과 비교하였을 때 유의한 차이가 없는 것으로 나타났고, 이러한 결과는 장기복용이 특정 장기에 위해하지 않음을 제시하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 홍삼 및 흑삼 추출물은 TMJ 통증의 발생과 조절에 관여한다는 것을 알 수 있고, 통증과 염증조절인자인 Nrf2 발현에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 또한 홍삼 및 흑삼 추출물의 반복투여가 간이나 신장에 유해한 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 안면부 통증 발생과 조절에 천연물 유래 약물들의 치료효과를 입증하는 기초자료가 될 수 있으며, 향후 임상적으로 활용 가능한 다양한 천연물 후보를 지속적으로 발굴할 필요가 있다고 생각된다.

요 약

실험동물의 TMJ 내에 포르말린으로 유도한 염증성 통증 모델에서 홍삼 및 흑삼 추출물이 통증 발생과 조절에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 홍삼 혹은 흑삼 추출물을 TMJ 내에 투여한 후 통증 행위반응의 변화를 관찰하였고, 또한 실험동물의 연수를 적출하여 Nrf2 경로의 활성 변화를 단백질량분석법을 활용해서 분석한 결과 먼저, 포르말린을 TMJ에 주입한 결과 안면부 통증행위반응이 유의하게 증가되었다. 이것을 토대로 홍삼 및 흑삼 추출물의 경구 투여한 결과

포르말린에 의해 유도된 실험동물에서 통증행위 반응이 효과적으로 감소되었고, 단회투여보다 반복투여가 포르말린 2차 통증행위반응 경감에 더 효과적으로 나타났다. 또한 홍삼 및 흑삼 추출물의 반복 투여 시 포르말린에 주입에 의해 증가된 연수에서의 Nrf2 단백질 발현량을 감소시켰고, 간과 신장의 독성검사에서도 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 홍삼 및 흑삼 추출물은 간과 신장을 부작용을 나타내지 않으면서 포르말린으로 유도된 안면부 통증과 Nrf2의 발현의 조절에 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교과부)의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2012M3A9B6055414).

References

- Ko SR, Choi KJ, Kim YH: Comparative study on the essential oil components of panax species. *J Ginseng Res* 20: 42-48, 1996.
- Choi KT: Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean panax ginseng C A Meyer. *Acta Pharmacol Sin* 29: 1109-1118, 2008.
- Lee JM, Ko MJ, Chung MS: Physicochemical properties and composition of ginsenosides in red ginseng extract as revealed by subcritical water extraction. *Korean J Food Sci Tech* 47: 757-764, 2015.
- Siddiqi MH, Siddiqi MZ, Ahn S, Kim YJ, Yang DC: Ginsenoside Rh1 induces mouse osteoblast growth and differentiation through the bone morphogenetic protein 2/runt-related gene 2 signalling pathway. *J Pharm Pharmacol* 66: 1763-1773, 2014.
- Bak MJ, Jeong WS, Kim KB: Detoxifying effect of fermented black ginseng on H2O2-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Int J Mol Med* 34: 1516-1522, 2014.
- Kim HJ, Kim P, Shin CY: A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system. *J Ginseng Res* 37: 8-29, 2013.
- Lee SD, Hwang WI: Effect of ginsenosides of red ginseng on lipolytic action of toxohormone-L from cancerous ascites fluid. *Korean J Ginseng Sci* 15: 106-111, 1991.
- Jeong HS, Lim CS, Cha BC, Choi SH, Kwon KR: Component analysis of cultivated ginseng, cultivated wild ginseng, and wild ginseng and the change of ginsenoside components in the process of red ginseng. *J Pharmacopunct* 13: 63-77, 2010.
- Quan LH, Cheng LQ, Na JR, et al.: Transformation of ginsenoside Rd to ginsenoside F2 by enzymes of *Leuconostoc fallax* LH3. *Korean Soc Med Crop Sci* 16: 155-160, 2008.
- Kim HJ, Lee JY, You BR, et al.: Antioxidant activities of ethanol extracts from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 156-162, 2011.
- Kim EK, Lee JH, Cho SH, et al.: Preparation of black panax ginseng by new methods and its antitumor activity. *Korea J Herbol* 23: 85-92, 2008.
- Lee SY, Kim DH, Woo WH: Antioxidant activity of black panax ginseng. *Korean J Ori Med Physiol Pathol* 25: 115-121, 2011.
- Park HJ, Kim AJ, Cheon YP, Lee MS: Anti-obesity effects of water and ethanol extracts of black ginseng. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 314-323, 2015.
- Jung KW, An JM, Eom DW, Kang KS, Kim SN: Preventive effect of fermented black ginseng against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ginseng Res* 2016. doi: 10.1016/j.jgr.2016.03.001.
- Kim JS, Kim DE, Jung DH, Yu SA, Cho SW: A review of recent studies for treatment of TMD using CNKI database. *J Korean Med Rehab* 26: 61-74, 2016.
- Kim HW, Shin SS, Kim JS, et al.: Evaluation of clinical methods in the diagnosis of temporomandibular joint disorders: a comparison study with magnetic resonance imaging. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 33: 367-374, 2007.
- Dworkin SF, Huggins KH, LeResche L, et al.: Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J Am Dent Assoc* 120: 273-281, 1990.
- Yang HY, Kim ME: Prevalence and treatment pattern of Korean patients with temporomandibular disorders. *J Oral Med Pain* 34: 63-79, 2009.
- Kim YK, Lee MK: Analgesic effects of triptolide and N-nitro-L-arginine methyl ester in rat's temporomandibular joint pain model. *J Dent Hyg Sci* 15: 800-806, 2015.

20. Lee JS, Lee MK, Kim YK, Kim KE, Hyun KY: Attenuant effects of hovenia dulcis extract on inflammatory orofacial pain in rats. *J Korea Acad Industr Coop Soc* 15: 5088-5094, 2014.
21. Lee JM, Li J, Johnson DA, et al.: Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 19: 1061-1066, 2005.
22. Shin BY, Jin SH, Cho IJ, Ki SH: Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression. *Free Radic Biol Med* 53: 834-841, 2012.
23. Shin HJ, Jin JH, Lee KG, et al.: Nrf-2 mediated antioxidative effect of Korean and Chinese safflower seeds. *Korean J Ori Med Physiol Pathol* 27: 745-751, 2013.
24. Satoh T, Lipton SA: Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci* 30: 37-45, 2007.
25. Kim YK, Choi JH, Lee HJ, et al.: Analgesic effects of triptolide via peripheral and central administration in rat model of inflammatory orofacial pain. *J Korean Soc Dent Hyg* 15: 424-429, 2015.
26. Kim SY, Yoon MH, Lee HG, 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* 21: 27-32, 2008.
27. Jin BM, Lee MK, Lee JS, Hyun KY: Anti-inflammatory effects of Korean red ginseng extract in formalin-induced orofacial pain in rats. *J Korea Acad Industr Coop Soc* 15: 5708-5715, 2014.
28. Choi HY, Lee JH, Jegal KH, Cho IJ, Kim YW, Kim SC: Oxyresveratrol abrogates oxidative stress by activating ERK-Nrf2 pathway in the liver. *Chem Biol Interact* 245: 110-121, 2016.
29. Lim JS, Ahn KY: Potassium depletion upregulates expression of Nrf2 transcription factor in rat kidney. *Korean J Nephrol* 30: 239-245, 2011.
30. Jung JK, Park YK: Dose range finding study of KOB03, a new polyherbal medicine for the treatment of allergic rhinitis, by oral administration for four weeks in Sprague-Dawley rats. *Korea J Herbol* 27: 101-106, 2012.
31. Kim YK, Hyun KY, Lee MK: Anti-inflammatory and antioxidative effects of acaiberry in formalin-induced orofacial pain in rats. *J Dent Hyg Sci* 14: 240-247, 2014.
32. Kim DW, Kim KS: The clinical study of long term herb medication in the B viral hepatitis health carrier. *Korean J Ori Med Physiol Pathol* 13: 128-133, 1999.
33. Kim YS, Roh JH, Moon SK, Cho KH, Bae HS, Lee KS: The relations between constant use of herbal medicine and liver injury. *J Kyung Hee Univ Med Cent* 15: 71-77, 1999.
34. Yun YJ, Shin BC, Shin WJ, Jang IS: Suggestion of herbal medicine-induced liver injury investigation forms for improving the research quality of herbal safety. *Korean J Orient Int Med* 30: 181-190, 2009.