

Participation of Opioid Pathway in the Central Antinociceptive Effects of Eugenol

Song-hee Kang^{1†}, Sa-won Kang^{1†}, Jae-ho Kim¹, Hee-young Kim¹, Hyeon-seo Ryu¹, So-yeon Bae¹,
Ju-ae Oh¹, Jun-hyuk Lee¹, Ji-hee Hyun¹ and Dong Kuk Ahn^{1*}

¹Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 41940, Republic of Korea

(received August 31, 2018; revised September 14, 2018; accepted September 18, 2018)

The aim of the present study was to evaluate the central antinociceptive effects of eugenol after intraperitoneal administration. Experiments were carried out using male Sprague-Dawley rats. Subcutaneous injection of 5% formalin-induced nociceptive behavioral responses was used as the pain model. Subcutaneous injection of 5% formalin significantly produced nociceptive responses by increasing the licking time during nociceptive behavior. Subsequent intraperitoneal injection of 100 mg/kg of eugenol led to a significant decrease in the licking time. However, low dose of eugenol (50 mg/kg) did not affect the nociceptive behavioral responses produced by subcutaneous injection of formalin. Intrathecal injection of 30 µg of naloxone, an opioid receptor antagonist, significantly blocked antinociceptive effects produced by intraperitoneal injection of eugenol. Neither intrathecal injection of methysergide (30 µg), a serotonin receptor antagonist nor phentolamine (30 µg), an α -adrenergic receptor antagonist influenced antinociceptive effects of eugenol, as compared to the vehicle treatment. These results suggest that central opioid pathway participates in mediating the antinociceptive effects of eugenol.

[†]These authors contributed equally to this study

*Correspondence to: Dong-Kuk, Ahn, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1 Sam Deok 2ga, Chung-gu, Daegu 41940, Republic of Korea
Tel: 82-53-660-6840, Fax: 82-53-421-4077
E-mail: dkahn@knu.ac.kr
ORCID : 0000-0002-5570-2371

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Key words: eugenol, antinociception, formalin, pain, opioid

서론

유지놀(eugenol)은 페놀계 물질로서 특유한 강한 향을 내기 때문에 식품의 향신료뿐만 아니라 의약품에도 널리 사용되어져 왔으며, 항 염증작용 뿐만 아니라 항산화 작용, 항세균 작용이 있는 것으로 알려져 있다[1,2]. 또한 유지놀은 치과영역에서 발생하는 질환을 치료하는데 많이 사용되어져 왔는데, 대표적으로는 치수가 노출되었을 때 임시가봉재나 임시보철물 등의 합착제로 사용되어 왔다 [3,4]. 또한 유지놀의 항염증 작용을 이용하여 치과진료 시 발생하는 치아나 주위조직의 염증을 완화시켜 가역성 치수염의 증상이나 상아질 과민성반응을 완화시킨다고 알려져 있다[4-7]. 그러나 유지놀이 치수조직에 독성작용을 야기한다는 보고[8,9]가 있어 현재는 치과진료에 제한적으로 사용되고 있다.

유지놀은 신경계에도 작용하는 것으로 알려져 있다. 피질 신경세포를 배양한 조직에 유지놀을 투여하면 신경세포의 산화성 독성 작용을 차단하였으며[10], 해마 신경세포에서 나타나는 허혈성 신경손상을 차단하거나 β -amyloid 발생을 억제하여 신경손상을 차단하였다[11,12]. 또한 당뇨병에서 발생하는 신경손상이나 혈관손상을 억제한다고도 알려져 있다[13]. 나아가 강제수영 후 실험동물에서 발생하는 부동성 현상(immobility)을 감소시켜서 불안과 우울 등이 발생하는 것을 감소시키는 항우울 작용을 나타낸다는 보고[14]는 유지놀이 중추신경계에서 다양하게 작용을 나타낸다는 것을 보여준다.

흥미로운 사실은 유지놀을 투여하면 실험동물에서 전신마취의 효과를 나타낸다는 보고이다. 복강으로 유지놀을 투여하면 실험동물 흰쥐에서 직립보행이 어려워지며, 통증자극에 대한 반응이 감소하였고[15], 실험동물 토끼에서 각막반사가 소실되는 등 전신마취의 효과를 나타내었다[16]. 또한 실험동물 흰쥐에서 정맥으로 유지놀을 투여하면 가역적이고도 농도 의존적인 전신 마취효과를 유도하였다[17]. 이러한 실험 결과는 유지놀이 중추신경계에 작용하여 전신마취 효과를 나타낼 수 있다는 증명한다. 나아가 유지놀 투여는 실험동물에서 좌골 신경의 신경활동을 억제하였으며[18], 포르말린이나 척수강으로 NMDA를 투여하여 나타나는 통증 반응을 유의하게 억제하였다는 보고[19]는 유지놀이 통증을 억제하는 진통제로서의 작용도 나타낸다는 것을 보여준다. 이때 나타나는 진통작용은 말초신경에서 통증신호를 감지할 때 활성화되는 나트륨통로를 차단[20]하거나, TRPA1와 TRPV1 통로를 활성화하여 나타난다고 보고[21,22]되었다. 그러나 유지놀이 중추신경에서 어떠한 작용을 통하여 진통작용을 나타내는지는 아직 밝혀진 바가 많지 않다.

따라서 본 연구에서 복강으로 투여한 유지놀의 진통작용이 중추신경계에서 어떠한 신경통로를 이용하여 나타나는지를 평가하고자 하였다. 통증 평가는 포르말린을 투여하여 나타나는 통증 행위반응을 이용하였다. 실험동물에 아편계 수용기 차단제인 naloxone, 세로토닌 수용기 차단제인 methysergide, 알파-아드레날린 수용기 차단제인 phentolamine을 각각 척수강 내로 투여한 다음 유지놀의 진통작용을 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 흰쥐(230-260 g) 수컷을 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 12시간 주/야 빛 순환주기와 일정한 온도를 갖는 환경에서 실험동물용 사료와 물을 자유롭게 공급하여 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 실험동물위원회의 승인(2015-0053)을 얻었으며, 국제통증연구학회의 의식 있는 실험동물에서의 통증 평가 규정을 준수하였다. 모든 행동반응의 측정은 블라인드 테스트로 수행하였다.

포르말린 테스트

실험용 흰 쥐를 관찰통에 두고 최소한 15분 이상 적응시키며 관찰하였다. 실험통에서 관찰한 다음 적응이 잘된 흰 쥐만을 사용하였으며, 통증 행위반응을 유발하기 위하

여 뒷발의 피하조직으로 5% 포르말린 용액을 50 μ L용량으로 주입하였다. 포르말린을 피하조직으로 주입한 다음 실험동물에서 나타나는 통증행위 반응을 관찰하였다. 포르말린을 주입한 다음 실험동물은 주입한 부위를 긁거나 핥는 행위반응(scratching or grooming)을 나타내는데 이때 소요되는 시간을 측정하여 통증행위를 나타내는 반응으로 판단하였다. 이러한 통증평가는 선행연구에서 수행한 방법[23-28]을 따라 실시하였으며, 포르말린 주입 후 5분 단위로 나누어 60분간 통증행위 반응의 빈도를 기록하고 평가하여 정량화하였다. 일반적으로 포르말린을 주입하여 나타나는 염증성 통증은 포르말린 주입 직후 통증행위 반응이 나타났다가 시간이 지남에 따라 서서히 감소하여 반응을 거의 보이지 않는 상태가 일시 나타나게 되고, 주입 10분 후부터 통증행위 반응이 다시 나타나는 이상성(bisphasic) 형태를 보인다[23-26,29,30]. 이러한 반응은 포르말린 주입 직후부터 10분까지 나타나는 1차 반응(first phase)과 10분에서 실험이 종결되는 60분까지 나타나는 2차 반응(second phase)로 구분할 수 있으며, 일차반응은 포르말린의 자체에 의해 나타나는 반응이며 이차 반응은 염증에 의해 나타나는 통증 반응으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 통증평가는 포르말린 투여 후 나타나는 2차 반응의 변화를 이용하였으며 유의성 검증은 포르말린 주입 10분 후 부터 60분까지의 긁거나 핥는 행위반응을 나타내는데 소요되는 시간을 합산하여 평가하였다.

척수강으로 약물주입 (Intrathecal catheterization)

척수강으로 약물을 투여하기 위하여 실험동물에 카테터(catheter)를 삽관하는 수술을 실시하였다. 실험동물은 ketamine(40 mg/kg)과 xylazine(4 mg/kg) 혼합액을 근육으로 주사하여 마취시켰으며, 마취된 쥐는 stereotaxic frame (David Kopf instruments, Tujunga, CA, USA)으로 머리를 고정시켰다. 약물을 주입하기 위해 atlantooccipital membrane과 경막을 노출시킨 다음 폴리에틸렌관(PE10, Clay Adams, Parsippany, NJ)을 삽관한 다음 흉수부위에 존재하는 팽만부위까지 부드럽게 밀어 넣었다. 폴리에틸렌관의 반대쪽 끝은 두개골 부위로 빼내어 금속 나사못과 치과용 레진(Dentsply Caulk, Milford, USA)을 사용하여 머리에 고정하였다. 선행실험과 같이 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다[31,32].

실험에 사용한 약물들

유지놀의 통증 억제작용을 관찰하기 위하여 실험동물의 뒷다리 피하조직으로 포르말린을 투여하기 30분 전에 유지놀 50, 100 mg/kg의 농도로 실험동물의 복강으로 투여한 후 통증 행위반응에 미치는 영향을 관찰하였다. 척

수강으로 약물주입은 아편계 수용기 차단제인 naloxone, 세로토닌 수용기 차단제인 methysergide 그리고 알파-아드레날린 수용기 차단제인 phentolamine을 각각 30 µg의 농도로 유지놀 투여 10분 전에 주입하였다. 유지놀과 naloxone, methysergide, phentolamine은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO) 회사에서 구입하였고, 유지놀은 1.0% tween 80에 녹여서 사용하였으며 naloxone, methysergide, phentolamine은 생리 식염수에 녹여서 사용하였다.

통계분석

행위반응의 통계 분석은 일원배치 분산분석법을 사용하여 검증하였으며 사후 분석은 LSD 사후 분석법을 이용하여 검증하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준 값은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

실험 결과

유지놀을 50, 100 mg/kg의 용량으로 실험동물 흰 쥐의 복강에 주입하여 포르말린에 의해 유도되는 통증행위반응에 미치는 영향을 평가하여 그림 1에 나타내었다. 포르말린을 실험동물의 뒷발 피하에 주사하면 강한 통증 반응이 나타났으며 통증은 초기 나타나는 일차반응과 이어서 나타나는 이차반응의 형태로 나타났다. 이때 염증반응에 의해 유도되는 이차반응의 전체 시간을 합산하여 평가하였으며 대조군으로 vehicle을 주입하면 포르말린에 의해 나타나는 통증행위반응에 유의한 차이를 나타내지 못하였다. 유지놀을 저농도인 50 mg/kg의 용량으로 실험동물

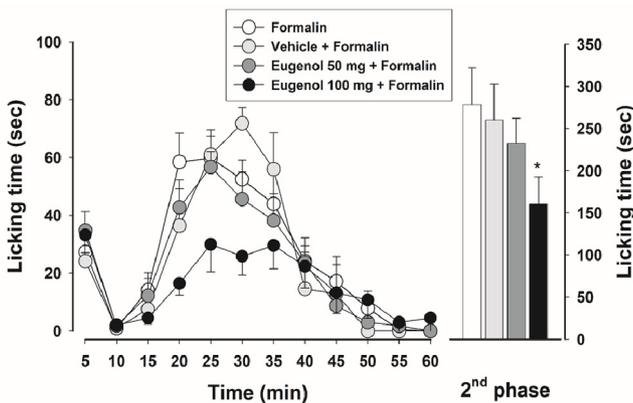


Fig. 1. Effects of eugenol on formalin-induced licking time. Subcutaneous injection of 5% formalin significantly produced increases in licking time during nociceptive behavior. Intraperitoneal administration of eugenol (100 mg/kg) significantly attenuated licking time. * $p < 0.05$, vehicle-treated vs. eugenol-treated group. There were seven animals in each group.

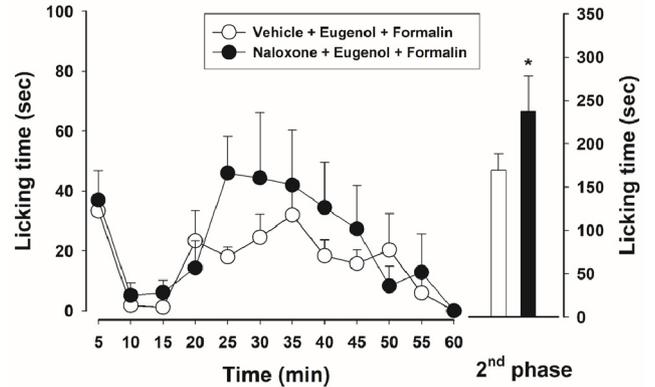


Fig. 2. Effects of naloxone, a opioid receptor antagonist, on antinociception of eugenol. Intrathecal administration of naloxone (30 µg) significantly blocked antinociceptive effects of eugenol injected intraperitoneally compare to the vehicle trament. * $p < 0.05$, vehicle-treated vs. eugenol-treated group. There were seven animals in each group.

복강에 주입한 실험에서도 포르말린에 의해 유도되는 통증 행위를 억제하지 못하였다. 그러나 100 mg/kg의 농도로 유지놀을 실험동물의 복강으로 주입한 실험 군에서는 vehicle을 투여한 대조군과 비교하며 볼 때 유의하게 포르말린에 의해 유도되는 통증 행위반응을 억제하였다($p < 0.05$). 또한 포르말린으로 유도되는 통증 행위반응 중 염증에 의해 야기하는 통증반응을 나타내는 이차반응만을 분석한 결과, 포르말린 투여 군에서는 통증행위를 나타내는 반응 시간이 278 ± 43 sec로 나타났으나 유지놀을 100 mg/kg의 농도로 주입한 군에서는 160 ± 32 sec로 유의하게 억제되었다($p < 0.05$).

아편계 수용기 차단제인 naloxone을 실험동물의 척수강으로 전처치한 다음 유지놀을 투여하여 유지놀에 의해 유도되는 진통작용을 평가한 결과를 그림 2에 나타내었다. 유

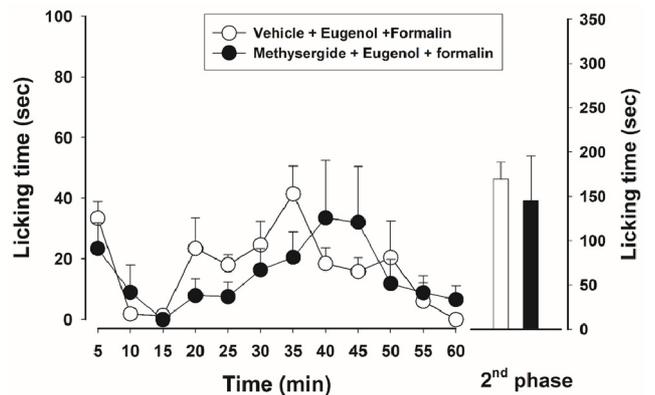


Fig. 3. Effects of methysergide, a serotonin receptor antagonist, on antinociception of eugenol. Intrathecal administration of methysergide (30 µg) did not affect antinociceptive effects of eugenol injected intraperitoneally compare to the vehicle trament. There were seven animals in each group.

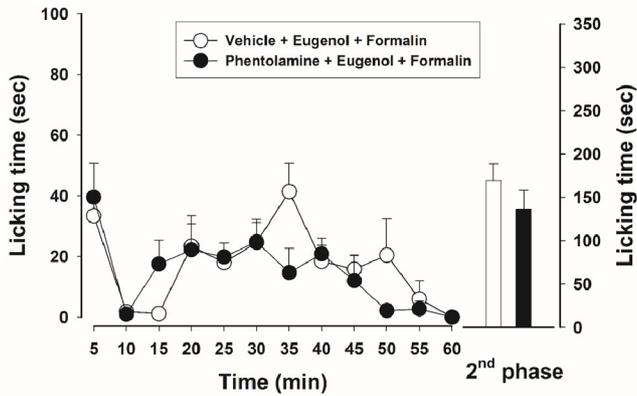


Fig. 4. Effects of phentolamine, an α -adrenergic receptor antagonist, on antinociception of eugenol. Intrathecal administration of phentolamine (30 μ g) did not affect antinociceptive effects of eugenol injected intraperitoneally compare to the vehicle treatment. There were seven animals in each group.

지놀을 투여하면 포르말린에 의해 나타나는 통증 행위반응 시간이 169±19 sec로 나타났으며 척수강으로 naloxone을 30 μ g 처치하면 통증 행위반응 시간이 237±40으로 통증 억제 효과가 차단되어 나타났다(p<0.05).

그림 3에는 세로토닌 수용기 차단제인 methysergide를 30 μ g의 농도로 척수강으로 투여한 다음 유지놀의 진통 작용에 미치는 영향을 평가하였다. 척수강으로 30 μ g의 농도로 methysergide를 척수강으로 전처치 하면 유지놀에 의해 나타나는 진통효과에 어떠한 영향도 미치지 못하였다. 또한 알파-아드레날린 수용기 차단제인 phentolamine을 전처치한 다음 유지놀의 진통작용을 평가한 결과 포르말린에 의해 유도되는 통증행위 반응시간에는 아무런 영향을 미치지 못하였다 (그림 4).

고 찰

본 연구에서 포르말린 투여로 발생하는 염증성 통증 모델을 이용하여 복강으로 투여한 유지놀이 진통작용을 야기한다는 것을 보여주었다. 또한 척수강으로 naloxone, methysergide, phentolamine을 투여한 다음 유지놀의 진통 작용에 미치는 영향을 평가한 결과 methysergide과 phentolamine 투여는 통증반응에 아무런 영향을 미치지 못하였지만 아편계 수용기 차단제인 naloxone은 유지놀에 의해 나타나는 진통작용을 유의하게 억제하였다. 이러한 실험 결과는 전신으로 투여한 유지놀이 진통작용을 야기할 수 있으며 이때 나타나는 진통작용은 중추성 opioid pathway를 거쳐 나타난다는 것을 알 수 있다.

유지놀은 진통작용을 나타내기 때문에 오랜 전부터 통증을 완화시키기 위하여 사용되어 왔다. 특히 치과에서

치주조직의 수술 후 통증 완화 작용을 유도하기 위하여 사용되었으며[33]치수손상 시에도 발생하는 통증을 완화시키기 위하여 사용되었다[34]. 본 연구 결과에서도 유지놀을 복강으로 투여하면 포르말린으로 유도되는 통증 행위반응을 유의하게 억제하였다. 이러한 실험 결과는 선행 동물에서 유지놀의 작용을 검증한 실험과 일치한다. 유지놀을 경구 투여하면 비스테로이드계 항염증 약물 중 하나인 diclofenac을 처치하였을 때와 거의 유사하게 포르말린 투여 후 나타나는 통증행위의 이차반응을 유의하게 억제하였다[10,19]는 보고는 본 연구 결과와 더불어 유지놀의 진통작용을 증명하였다. 나아가 유지놀이 직접 신경 섬유에서 활동전위 발생을 억제하여 진통작용을 야기한다[35]는 결과는 유지놀의 진통작용 발생이 일차구심신경을 조절하여 나타날 수 있다는 것을 말해주고 있다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 유지놀이 일차구심신경에 직접 작용하여 진통작용을 구명하는 많은 연구가 이루어졌다. 이러한 실험 결과 유지놀은 삼차신경절 신경에서 ATP에 민감한 P₂X₁통로나 나트륨 통로를 이용한 전류를 차단하여 통증을 억제할 나타낸다는 보고 [36,37]도 있으며 TRPV1 통로 차단하여 진통작용을 나타낸다고 알려져 있다[22].

우리 몸에 존재하는 내재성 통증조절 시스템(endogenous pain control system)은 우리 몸에 유해자극인 통증이 가해지면 중추신경에서 통증을 차단하기 위하여 활성화되는 신경회로를 말한다[38,39]. 이러한 진통작용에 첫 보고는 실험동물에 전신마취를 하지 않고 뇌간에 존재하는 periaqueductal gray matter(PAG)부위에 전기자극을 하여 개 복수술을 실시한 결과 실험동물이 통증을 느끼지 않고 수술을 성공하였다는 실험[40,41]을 시작으로 내재성 통증조절 시스템에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 현재까지 뇌간에서 진통작용을 나타내는 대표적인 신경핵으로는 PAG, nucleus raphe magnus (NRM), locus ceruleus (LC)등이 있다[39]. 이들 신경핵들이 나타내는 진통 작용기전을 살펴보면 PAG의 경우 신경세포가 활성화되면 아래에 존재하는 NRM의 신경세포를 활성화시키게 되고, 특히 NRM의 신경세포 중 세로토닌을 함유한 신경세포를 활성화시키고 이어서 척수로 전도되어 신경세포의 신경말단에서 세로토닌을 분비하게 된다. 분비된 세로토닌은 척수에서 통증 전도를 차단하게 된다[42]. LC의 경우는 신경핵을 자극하여 진통작용이 유발되었을 때 clonidine을 척수강으로 투여하면 진통작용이 차단되는 것으로 보아 α -아드레날린 수용기를 통하여 진통작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[43,44]. 또한 통증을 억제하는 것으로 알려진 대표적인 아편계 약물은 다양한 신경핵이 존재하는 뇌간이나 척수에 존재하는 아편계 수용체를 통하여 작용함으로써 진통작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[45].

본 연구에서는 중추성 통증 조절 작용에 관여하는 대표적인 신경전달 물질을 차단하기 위하여 아편계 수용기 차단제인 naloxone, 세로토닌 수용기 차단제인 methysergide, α -아드레날린 수용기 차단제인 phentolamine을 전처치한 다음 유지놀의 진통작용을 평가하였다. 실험 결과 methysergide나 phentolamine을 전처치한 군에서는 유지놀이 포르말린에 의해 나타나는 통증 행위반응을 억제하는 현상을 차단하지 못하였으나, 아편계 수용기 약물인 naloxone의 전처치는 유지놀의 진통작용을 유의하게 억제하였다. 이러한 실험결과는 내재성 진통작용계에 속하는 PAG나 NRM 등이 유지놀의 진통작용에 관여하지 않는다는 것을 보여주며, opioid pathway가 유지놀의 진통작용이 중요하게 작용한다는 것을 보여준다. 이와 같이 유지놀이 중추신경계에서 진통작용을 나타낼 수 있다는 사실은 선행 연구에서도 보여주고 있다. 척수강으로 NMDA를 투여하여 통증 반응을 유도하면 중추신경계에서 통증이 유발되는데 이때 유지놀 투여하면 유의하게 통증 발생이 억제되거나[19], 척수강으로 직접 투여한 유지놀이 강력한 진통작용을 나타낸다[46]는 보고는 유지놀이 본 연구에서와 같이 중추신경계에서 직접 작용하여 통증억제 효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여준다. 그러나 유지놀의 진통작용이 GABA 수용기를 활성화하거나 NMDA 수용기를 억제하여 진통작용을 나타낸다[10]는 보고도 있어, 추가적으로 다양한 경로를 통하여 진통작용을 나타낼 수 있을 것으로 판단되며 이를 밝히기 위한 지속적인 기전연구가 필요해 보인다.

본 연구에서는 복강으로 투여한 유지놀이 강력한 진통작용을 나타내는 것을 보여 주었으며 이러한 진통작용은 척수강으로 아편계 수용기 차단제인 naloxone을 투여하면 유의하게 억제되었다. 이러한 실험 결과는 유지놀의 진통작용이 중추성 opioid pathway를 거쳐 나타난다는 것을 알 수 있으며 이러한 작용은 항 후 임상에서 통증완화를 위한 유지놀 사용에 대한 근거를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (NRF-2018R1D1A1B07049025).

References

- Li W, Tsubouchi R, Qiao S, Haneda M, Murakami K, Yoshino M. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomed Res.* 2006;27:69-74. doi: <https://doi.org/10.2220/biomedres.27.69>.
- Kim SS, Oh OJ, Min HY, Park EJ, Kim Y, Park HJ, Nam Han Y, Lee SK. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW 264.7 cells. *Life Sci.* 2003;73:337-348. doi: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00288-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00288-1).
- Briseno BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. 1. Zinc oxide-eugenol-based sealers. *J Endod.* 1990;16:383-386. doi: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81910-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81910-2).
- Goerig AC, Payne TF, del Rio CE. The pulpal response to ZOE with stock eugenol versus ZOE with purified eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980 ;50:557-562.
- Hørsted P, El Attar K, Langeland K. Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;52:531-553.
- Koh T, Murakami Y, Tanaka S, Machino M, Sakagami H. Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 β -stimulated gingival fibroblast and pulp cells. *In Vivo.* 2013;27:269-273. doi: <http://iv.iarjournals.org/content/27/2/269.long>.
- Hansen EK, Asmussen E. Influence of temporary filling materials on effect of dentin-bonding agents. *Scand J Dent Res.* 1987;95:516-520.
- Anpo M, Shirayama K, Tsutsui T. Cytotoxic effect of eugenol on the expression of molecular markers related to the osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *Odontology.* 2011;99:188-192. doi: [10.1007/s10266-011-0009-2](https://doi.org/10.1007/s10266-011-0009-2).
- Fujisawa S, Atsumi T, Satoh K, Sakagami H. Interaction between 2-ethoxybenzoic acid (EBA) and eugenol, and related changes in cytotoxicity. *J Dent Res.* 2003;82:43-47.
- Wie MB, Won MH, Lee KH, Shin JH, Lee JC, Suh HW, Song DK, Kim YH. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci Lett.* 1997;225:93-96. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00195-X).
- Irie Y, Keung WM. *Rhizoma acori graminei* and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid- β peptide. *Brain Res.* 2003;963:282-289. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04050-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04050-7).
- Won MH, Lee JC, Kim YH, Song DK, Suh HW, Oh YS, Kim JH, Shin TK, Lee YJ, Wie MB. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 1998;254:101-104. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00664-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00664-8).
- Nangle MR, Gibson TM, Cotter MA, Cameron NE. Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Planta Med.* 2006;72:494-500. doi: [10.1055/s-2005-916262](https://doi.org/10.1055/s-2005-916262).

14. Norte MC, Cosentino RM, Lazarini CA. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. *Phytomedicine*. 2005;12: 294-298. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.007>.
15. Carlini EA, Dallmeier K, Zelger JL. Methyleugenol as a surgical anesthetic in rodents. *Experientia*. 1981;37:588-589
16. Sell AB, Carlini EA. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. *Pharmacology*. 1976;14:367-377. doi:<https://doi.org/10.1159/000136617>.
17. Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J Vet Pharmacol Ther*. 2007;30:91-92. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00814.x>.
18. Kozam G. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977;44:799-805.
19. Yano S, Suzuki Y, Yuzurihara M, Kase Y, Takeda S, Watanabe S, Aburada M, Miyamoto K. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;553:99-103. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.09.020>.
20. Wang ZJ, Tabakoff B, Levinson SR, Heinbockel T. Inhibition of Nav1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36:791-799. doi:10.1038/aps.2015.26.
21. Chung G, Im ST, Kim YH, Jung SJ, Rhyu MR, Oh SB. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by eugenol. *Neuroscience*. 2014;261:153-160. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.047>
22. Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD, Kim JS, Oh SB. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain*. 2009;144:84-94. doi:10.1016/j.pain.2009.03.016. Epub 2009 Apr 18.
23. Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*. 1995;60:91-102.
24. Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Jung CY, Kim BC, Park JS, Ahn DK. Effects of TNF-alpha injected intracisternally on the nociceptive jaw-opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:613-618. doi:[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00049-6).
25. Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Kim BC, Park JS, Ahn DK. Effects of intracisternal injection of interleukin-6 on nociceptive jaw opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Brain Res Bull*. 2003;59:365-370. doi:[https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(02\)00931-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(02)00931-0).
26. Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28:219-226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.12.003>.
27. Ahn DK, Lee KR, Lee HJ, Kim SK, Choi HS, Lim EJ, Park JS. Intracisternal administration of chemokines facilitated formalin-induced behavioral responses in the orofacial area of freely moving rats. *Brain Res Bull*. 2005;66:50-58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.03.015>.
28. Yang GY, Woo YW, Park MK, Bae YC, Ahn DK, Bonfa E. Intracisternal administration of NR2 antagonists attenuates facial formalin-induced nociceptive behavior in rats. *J Orofac Pain*. 2010;24:203-211.
29. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51:5-17. doi:10.1016/0304-3959(92)90003-T.
30. Raboisson P, Dallel R, Clavelou P, Sessle BJ, Woda A. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. *J Neurophysiol*. 1995;73:496-505. doi:10.1152/jn.1995.73.2.496.
31. Jeon HJ, Han SR, Lim KH, Won KA, Bae YC, Ahn DK. Intracisternal administration of NR2 subunit antagonists attenuates the nociceptive behavior and p-p38 MAPK expression produced by compression of the trigeminal nerve root. *Mol Pain*. 2011;7:46. doi: 10.1186/1744-8069-7-46.
32. Won KA, Kim MJ, Yang KY, Park JS, Lee MK, Park MK, Bae YC, Ahn DK. The glial-neuronal GRK2 pathway participates in the development of trigeminal neuropathic pain in rats. *J Pain*. 2014;15:250-261. doi: 10.1016/j.jpain.2013.10.013.
33. Jorkjend L, Skoglund LA. Effect of non-eugenol- and eugenol-containing periodontal dressings on the incidence and severity of pain after periodontal soft tissue surgery. *J Clin Periodontol*. 1990;17:341-344. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1990.tb00028.x>.
34. Hodosh AJ, Hodosh S, Hodosh M. Potassium nitrate-zinc oxide eugenol temporary cement for provisional crowns to diminish postpreparation tooth pain. *J Prosthet Dent*. 1993; 70:493-495. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-3913\(93\)90260-U](https://doi.org/10.1016/0022-3913(93)90260-U).
35. Brodin P. Differential inhibition of A, B and C fibres in the rat vagus nerve by lidocaine, eugenol and formaldehyde. *Arch Oral Biol*. 1985;30:477-480.
36. Li HY, Lee BK, Kim JS, Jung SJ, Oh SB. Eugenol Inhibits ATP-induced P2X Currents in Trigeminal Ganglion Neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2008 ;12:315-321. doi:10.4196/kjpp.2008.12.6.315.
37. Cho JS, Kim TH, Lim JM, Song JH. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*. 2008;1243:53-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.030>.
38. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol*. 1978;4:451-462. doi: <https://doi.org/10.1002/ana.410040511>.
39. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 1984;7:309-338. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001521>.
40. Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*. 1969;164:444-445. doi: 10.1126/science.164.3878.444.
41. Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science*. 1971 ;174:1351-1354. doi:10.1126/science.174.4016.1351
42. Llewellyn MB, Azami J, Roberts MH. The effect of modification of 5-hydroxytryptamine function in nucleus raphe magnus on nociceptive threshold. *Brain Res*. 1984;306: 165-170. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90365-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90365-2).

43. Ossipov MH, Chatterjee TK, Gebhart GF. Locus coeruleus lesions in the rat enhance the antinociceptive potency of centrally administered clonidine but not morphine. *Brain Res.* 1985;341:320-330. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91071-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91071-6).
44. Simson PE, Weiss JM. Alpha-2 receptor blockade increases responsiveness of locus coeruleus neurons to excitatory stimulation. *J Neurosci.* 1987;7:1732-1740. doi:<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-06-01732.1987>.
45. Watkins LR, Mayer DJ. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science.* 1982;216:1185-1192. doi:[10.1126/science.6281891](https://doi.org/10.1126/science.6281891).
46. Ohkubo T, Shibata M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res.* 1997;76:848-851. doi:<https://doi.org/10.1177/00220345970760040501>.