



환도(GB₃₀) 및 족삼리(ST₃₆) 건강약침이 신경병증성 통증 유발 힌쥐에 미치는 영향

황민섭^{ID}

동국대학교 한의과대학 침구과

Effects of Zingiberis Rhizoma Pharmacopuncture Injected at GB30 and ST36 on Neuropathic Pain in Rats

Min Sub Hwang

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Korean Medicine, Dongguk University

Objectives : The objective of this study was to investigate the effects of Zingiberis Rhizoma Pharmacopuncture(ZP) at GB30 and ST36 in neuropathic pain induced SD rats by the block of Transient Receptor Potential Vanilloid 1(TRPV1). **Methods :** Neuropathic pain in rats was induced by tibial and common peroneal nerve transection of right leg. The rat subjects were divided into 6 groups : normal(Nor, n=5), control(Con, n=5), neuropathic pain plus 2 mg/kg ZP injection at GB30 and ST36(ZP-A, n=5), 10 mg/kg ZP(ZP-B, n=5), 20 mg/kg ZP(ZP-C, n=5) and 0.45 mg/kg Tramadol(Tra, n=5). Three days after the surgery, injections were administered once a day for 17 days. Withdrawal response of neuropathic rats' legs were measured by stimulating the paw of Right leg with von frey filament, acetone and radiant heat on day 3, 7, 11, 15, 19 after surgery. After all treatments were completed, c-Fos in the midbrain central gray and TRPV1 & TRPA1 of DRG(L5) were analyzed. **Results :** Groups ZP-B and ZP-C showed a meaningful decrease in the withdrawal response of mechanical allodynia, thermal hyperalgesia and cold allodynia compared to the control group($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Groups ZP-B and ZP-C showed a meaningful decrease in the expression of c-fos and TRPV1 protein level compared to the control group($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). **Conclusions :** These results suggest that Zingiberis Rhizoma Pharmacopuncture at GB30 and ST36 could decrease mechanical & cold allodynia and thermal hyperalgesia by block the TRPV1 on the model of neuropathic pain.

Key words : neuropathic pain, Zingiberis Rhizoma, pharmacopuncture, TRPV1

서 론

신경병증성 통증(neuropathic pain)은 체성감각신경계(somato-sensory system)의 병변이나 질병에 의해 발생하는 통증으로 다양한 질환이나 병변에 의해 발생하는 증후군이다¹⁾. 임상적으로 다양

한 증상들이 나타날 수 있는데, 특히 자발통(spontaneous pain), 이질통(allodynia), 통각과민(hyperalgesia)이 특징적으로 관찰된다²⁾. 신경병증성 통증은 만성적으로 지속되는 난치성 통증으로 통증 자체뿐만 아니라 우울증, 수면장애 등을 야기하게 되어 환자의 삶 전반에 걸쳐 질 저하를 초래할 수가 있다³⁾.

Received November 23, 2018, Revised December 18, 2018, Accepted January 4, 2019

Corresponding author: **Min Sub Hwang**

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Korean Medicine, Dongguk University, 87 Dongdae-ro, Gyeongju 38067, Korea
Tel: +82-54-770-1266, Fax: +82-54-770-1500, E-mail: acup99@hanmail.net

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : H117C1649).

© 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.

한의학에서 비증(痺證)은 풍한습 사기가 기혈의 순행을 막아 발생하며, 동통, 마목, 중착(重着), 발열, 굴신불리, 관절종창 등의 증상을 포괄하는 증후군으로 신경병증성 통증은 비증의 범주로 볼 수 있다⁴⁾.

비증에 다용되는 경혈은 환도(GB30), 양릉천(GB034), 족삼리(ST36), 곡지(LI11), 위중(UB40), 현종(GB039) 등이고⁵⁾, 이 중 본 실험에 사용된 족삼리(ST36)는 통조경락(通調經絡), 부정배원(扶正培元), 거사방병(祛邪防病)하여 면역을 조정하고 전신을 강장시키는 효능이 있는 혈위로⁶⁾, 항염증 및 항유해수용기 효능⁷⁾과 중추신경계에 작용하여 신경세포를 증식시키는 효과도 있는 것으로 보고되고 있다⁸⁾. 환도(GB30)는 통경활락, 소산경락풍습(疏散經絡風濕)하는 효능이 있어⁹⁾, 비증을 치료하는데 다용되는 경혈로 특히 좌골 신경통 및 하지부 질환에 중요하게 사용된다.

약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종으로, 경락론과 기미론(氣味論)을 근간으로 하는 한의학의 치료 기술로 임상에서 진정, 소염, 동통질환에서 효과를 인정받고 있는 새로운 침구치료의 방법이다¹⁰⁾.

최근 통증 연구 분야에 있어서 일과성 수용체 전압(transient receptor potential, TRP) 이온채널에 대한 관심이 집중되고 있다¹¹⁾. TRP 이온채널 중 Transient receptor potential vanilloid type 1(TRPV1)은 TRPV1은 열 자극에 의해서 활성화되는 TRP 채널로서 유해감각수용기의 중요한 신호통합자로서 신경병증성 통증에서 중요한 역할을 한다. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)은 TRPV1과 함께 감각신경세포에서 공동으로 발현되며, 냉통증을 담당하는 이온채널로서 알려져 있다¹²⁾.

건강(Zingiberis Rhizoma)은 생강과(Zingiberaceae)에 속한 다년생 초본인 생강(Zingiberis Officinale Rosc.)의 근경을 건조한 것으로 성미는 신온 무독하여 '온중추한(溫中逐寒), 회양통맥(回陽通脈)'의 효능이 있어서 '심복냉통, 토사, 지랭맥미(肢冷脈微), 풍한 습비, 토혈' 등에 많이 활용되는 약재이다¹³⁾. 최근, 건강을 이용한 연구로는 혈관신생 억제 효과, 면역 억제 조절¹⁴⁾과 더불어 통증 치료 작용에 대해서도 많이 보고되고 있다¹⁵⁾.

이에 저자는 건강약침이 TRPV1과 TRPA1 조절 작용을 통한 신경병증성 통증에 미치는 영향을 연구하고자, in vitro 실험에서 건강추출물의 TRPV1, TRPA1 발현에 미치는 영향을 확인하고, in vivo 실험에서 신경병증성 통증이 유발된 흰쥐의 환도(GB₃₀) 및 족삼리(ST₃₆)에 건강약침을 시술한 후, 이질통과 통각과민에 의한 회피반응 및 뇌 중심 회백질에서 c-fos 발현, 후근신경절(Dorsal Root Ganglion, DRG)에서 TRPV1 및 TRPA1 발현 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) **약재:** 본 실험에 사용된 건강은 광명당제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입하여 추출물 제조에 사용하였다.

2) **시약 및 기기:** 본 실험에 사용된 시약으로는 Fetal bovine Serum(FBS; Gibco, Maryland, USA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Gibco, Massachusetts, USA), QIAfilter Plasmid Midi Kit(Qiagen, Hilden, Germany), Penicillin-streptomycin, Transfection reagent, Capsaicin, Capsazepine Allyl isothiocyanate(AITC) and HC-030031(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), RIPA buffer and Bradford's protein assay(Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA), Tissue protein lysis buffer(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), Protein assay dye reagent, Precision plus dual color standards, Acrylamide/Bis solution 30% 29:1, Ammonium persulfate, Temed, Tris/Glycine buffer, Tris/Glycine/SDS buffer, Goat-anti-mouse, Goat-anti-rabbit and Clarity western ECL substrate(Bio-Rad Laboratories, California, USA), anti-TRPV1 antibody and anti-TRPA1 antibody(Novus Biologicals, Colorado, USA) anti-β-actin antibody(sigma aldrich, Missouri, USA), anti-c-Fos antibody(Cell signaling Technology, Massachusetts, USA) 등이며, 실험에 사용된 기기로는 추출기(Daihan scientific, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd, Japan), 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea), Protein 전기영동장치, Transfer장치, ChemiDoc™MP imaging system (Bio-Rad Laboratories, California, USA), Precise Tactile Sensory Evaluator (Ugo basile, Varese, Italy) 등을 사용하였다.

3) **실험동물:** 본 실험에 사용한 실험동물은 6주령 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 Rat(170~190 g)을 (주)코아텍(경기도, 한국)으로부터 공급받아 1주일 동안 순화시킨 후 동물모델 제작에 사용하였다. 실험기간동안 일정량의 고형사료(200 g)와 정수된 물(500 ml)을 섭취시켰으며, 명암은 12시간(Day light 08:00~20:00) 주기로, 23±2°C의 실내온도와 50±10%의 습도를 유지하여 실험종료까지 일정한 사육조건을 유지시켰다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 심의(IACUC-2018-04)에 따라 관리하였다.

2. 방법

1) **건강 추출물 및 약침 제조:** 건강추출물은 한국산 건강

(Zingiberis Rhizoma) 200 g을 물로 95°C에서 3시간 추출하였으며, 3겹 거어즈 및 와트만 거름종이(Whatman No. 1)로 거른 후 회전식 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 이를 냉동시킨 후 동결 건조기로 건조하였으며 이때 수율은 20.32%였다. 건조된 건강추출물은 미세하게 마쇄한 후 일정 용기에 담아 냉동 보관하였으며, 실험직전 생리식염수에 일정 농도로 완전 용해시켜 시험약물로 사용하였다.

건강약침은 건조된 건강추출물을 소분하여 생리식염수로 희석하였으며, pH meter(ORION, U.S.A)로 각각 pH 7 산도를 조절하여 약침액으로 조제한 후 냉장 보관하였다가 시술에 사용하였다.

2) TRPV1, TRPA1의 발현 및 약물처리: Human embryonic kidney(HEK) 293T cells(American Type Culture Collection, Manassas, VA, 미국)에 TRPV1 발현을 위해서 HEK293T 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM을 기본 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기를 이용하여 배양하였다.

약물 처리를 위하여 HEK293T 세포를 4.0×10⁵/well의 농도로 6-well cell culture plate에 분주하여 24시간 배양한 후, Bacterial colony에서 증폭해낸 TRPV1, TRPA1 complementary DNA를 lipofectamine 2000 transfection reagent(Invitrogen, 미국)와 배합하여 4 ug/ml의 농도로 24시간 동안 배양하였다.

TRPV1을 처리한 세포에 건강추출물(0.1, 0.5 mg/ml)과 TRPV1 agonist인 capsaicin 10 μM을 각각 처리하고, TRPA1을 처리한 세포에 건강추출물(0.1, 0.5 mg/ml)과 TRPA1 agonist인 AITC 10 μM을 각각 처리한 후 24시간 동안 배양시켰다.

3) 신경병증성 통증 동물모델제작(spared nerve injury(SNI) model): 흰쥐를 isoflurane 2.5%로 도입, 전신마취 후 우측 고관절 후측의 피부를 면도하고 절개한 후 biceps femoris muscle 사이의 sciatic nerve을 찾아 tibial nerve와 common peroneal nerve 및 sural nerve를 확인한 후 microforcep으로 주변조직 및 혈관으로부터 분리시켰다. 이후 sural nerve는 남겨두고, tibial nerve 와 common peroneal nerve는 5.0 silk thread로 결찰한 후 그 말단

부를 2 mm 가량 절단하여 제거하였다. 절개된 부위는 kanamycin을 점적하고 피부를 봉합하였다.

4) 군 분리: 모두 30마리의 흰쥐는 정상군(Nor, n=5), SNI 모델 방식으로 신경병증성 통증을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(Con, n=5), 시술측 환도(GB₃₀), 족삼리(ST36)에 건강약침을 농도 별로 2 mg/kg을 시행한 건강약침A군(ZP-A, n=5), 10 mg/kg을 시행한 건강약침B군(ZP-B, n=5), 20 mg/kg을 시행한 건강약침C군(ZP-C, n=5), Tramadol 0.45 mg/kg을 주입한 Tramadol 시술군(Tra, n=5), 으로 나누었다.

5) 取穴 및 약침 시술: 환도(GB₃₀)의 취혈은 hind limb에서 femur의 greater trochanter와 superior anterior iliac spine 사이 중간으로 취하였으며, 족삼리(ST36)의 취혈은 슬관절 아래 tibialis anterior muscle과 extensor digitorum longus muscle 사이에 모두 인체에 상응하는 부위로 취하였다. 약침 시술은 insulin syringe (31 G×8 mm, BD, U.S.A)를 사용하여 신경병증성 통증 유발 3일 후부터 19일째까지 매일 1회씩 총 17회를 환도(GB₃₀)와 족삼리(ST36)에 각각 0.05 ml의 약침을 5 mm 깊이로 자입하여 시행되었다.

6) Von frey filament와 radiant heat 및 Acetone 자극으로 유발된 이질통 측정: 기계적 이질통(Mechanical allodynia)는 Von frey filament를, 열 통각 과민반응(Thermal hyperalgesia)은 radiant heat를, 냉 이질통(Cold allodynia)은 Acetone을 이용하여, 신경병증성 통증 모델 제작 전 자극에 대한 회피반응(withdrawal response)을 측정하고 후 수술하였으며, 수술 후 3일째부터 4일마다 1회씩 19일째까지 총 5회 회피반응을 관찰하였다.

① 기계적 이질통 검사는 Von frey filament(Touch test 4.93, north coast medical Inc, 영국)를 이용하여 발바닥에 물리적인 자극을 가한 뒤 발바닥에서 유발된 회피반응 역치를 측정하였다. 발의 회피반응 역치를 측정하기 위해서 흰쥐를 격자가 3 mm 철망 위에 올려진 투명한 아크릴통(28×28×10 cm)에 넣고 환경에 적응 할 수 있는 시간을 주었다. 약 15분 정도의 시간이 경과 후,

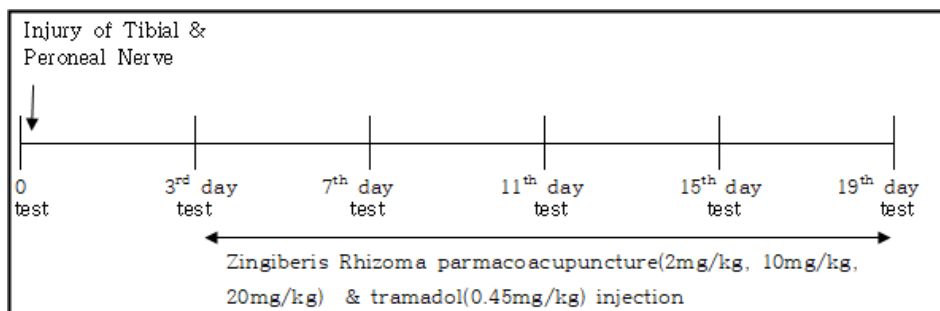


Fig. 1. Preparation of neuropathic pain induced rats.

쥐의 순응 여부를 확인하고 철망 격자 사이로 정량화된 Von Frey filament로 발바닥을 자극하였다. Von Frey filaments가 약간 구부러질 정도로 각 뒷발바닥에 총 5회 자극(2초에 1회의 빈도)에서 3회 이상 회피반응이 나오는 경우 양성 반응으로 간주하였다. 사용된 hair는 0.02 g에서 60 g까지였으며 60 g을 넘어도 회피 반응을 나타내지 않거나 0.02 g에서 회피 반응을 나타내면 더 이상의 자극을 가하지 않고 이를 한계치로 하였다.

② 열 통각 과민반응 검사는 Hargraves' test IITC analgesimeter(IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA, USA)를 사용하여 시술 측 발바닥 부위에 radiant heat을 노출시킨 후 회피반응 지연시간을 측정하여 이를 회피반응으로 하였다. 측정 시에 약 15분 정도의 쥐의 순응 시간 뒤에, 5분 간격으로 총 3회 측정하여 회피반응 지연시간의 평균을 구하였으며, 손상을 방지하기 위하여 최대 노출 시간을 30초 이내로 하였다.

③ 냉 이질통 검사는 시술 측 발 내측 부위에 5분 간격으로 Acetone을 2 ml씩 3회 자극하였으며, 바닥에서 발을 들거나 핏는 회피반응을 양성 반응으로 간주하였다. 회피반응 시 바닥에서 발을 들거나 핏고 있는 시간을 측정하였으며, 3회의 회피반응 시간의 평균치를 얻어 표시하였다.

7) Western blot analysis

(1) TRPV1 & TRPA1-transfected HEK 293T cells: 실험종료 후 세포를 수거하고 RIPA buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후, 단백질의 양을 Bradford's protein assay 용액으로 측정하고 30 μ g의 단백질을 SDS-PAGE separation 시킨 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk in Tris- buffered saline with 0.1% Tween 20(TBST)에 3시간동안 blocking한 후 anti-TRPV1, anti-TRPA1, anti- β -actin에 incubation 시킨 뒤 4°C에서 overnight 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody용액에 상온에서 3시간동안 incubation 한 후 Chemi Doc을 이용하여 X-ray 감광시켜 단백질 밴드의 발현도를 확인하였다. 각 밴드는 Image J program을 이용하여 density를 측정하고 β -actin발현에 대한 비율로 계산하여 결과를 Graph Pad Prism을 이용하여 Histogram과 mean \pm SD로 나타내었다.

(2) Dorsal Root Ganglia(DRG): 실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 시술 측(우측) 척수후근신경절(dorsal root ganglia, DRG)을 적출하여 말초조직의 온도감수성일시적전위통로(transient receptor protein, TRP)인 TRPV1과 TRPA1의 발현 변화를 확인하기 위해 Western blotting analysis를 하였다.

즉, 각 조직에 Tissue protein lysis buffer를 넣고 마쇄기(ho-

mogenazer)를 이용하여 조직액을 분리한 후 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 단백질의 양을 Protein assay dye reagent 용액으로 측정하고, 총 30 μ g 단백질을 SDS-PAGE 방법으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% Skim milk 용액을 이용하여 실온에서 1시간 비특이반응을 제거하기 위한 blocking을 실시하였고, TRPV1과 TRPA1에 대한 1차 항체를(TRPV1, 1:500, Novus; TRPA1, 1:500, Novus) 넣고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 TBST buffer(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체(Goat-anti- mouse, 1:2000; Goat-anti-rabbit, 1:2000)와 상온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer로 3회 세척한 후 ChemiDocTMMP imaging system을 이용하여 밴드 유무를 관찰하였다.

(3) Brain(central gray matter): 실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 뇌조직을 적출 후, 혈액 등 이물질을 제거하기 위하여 phosphate buffered saline을 이용하여 1회 세척 후 Tissue protein lysis buffer를 넣고 마쇄기를 이용하여 조직을 분쇄하여 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 단백질의 양을 측정하고, 총 20 μ g 단백질을 SDS-PAGE 방법으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% Skim milk 용액을 이용하여 실온에서 1시간 비특이반응을 제거하기 위한 blocking을 실시하였고, 1차 항체를(c-FOS, 1:500, Cell signaling) 넣고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 TBST buffer(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체 (Goat-anti-mouse, 1:2000; Goat-anti-rabbit, 1:2000)와 상온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer로 3회 세척한 후 ChemiDocTMMP imaging system을 이용하여 밴드 유무를 관찰하였다.

각 밴드는 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 density를 측정하여 β -actin 발현에 대한 상대적 비율로 계산하여 3회 반복 실험에 대한 결과를 그래프(Histogram)로 나타내었다.

8) 통계학적 검정: 모든 실험결과는 최소 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, CA, USA)을 이용하여 two-way ANOVA(Bonferroni post hoc multiple comparison test) and one-way ANOVA(Tukey's test)를 이용하여 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. TRPV1과 TRPA1이 발현된 HEK 293T cell에서 건강 추출물(Zingiberis Rhizoma Extract, ZRE)의 억제 작용

(1) TRPV1을 발현시킨 HEK 293T cell에 ZRE(0.1 mg/ml), ZRE(0.5 mg/ml), Capsaicin(10 μM)을 각각 처리한 후 24시간 배양뒤에 Western blot을 통해 발현 정도를 관찰한 결과 TRPV1 대조군에 비해 ZRE(0.1 mg/ml)과 ZRE(0.5 mg/ml)을 처리한 세포에서 유의미한 발현 억제를 나타내었으나, 농도별 차이는 나타나지

않았다. 이에 반하여 TRPV1 agonist인 Capsaicin(10 μM)을 처리한 세포에서는 유의미한 발현 상승을 나타내었다(Fig. 2).

(2) TRPA1을 발현시킨 HEK 293T cell에 ZRE(0.1 mg/ml), ZRE(0.5 mg/ml), AITC(10 μM)을 각각 처리한 후 24시간 배양뒤에 Western blot을 통해 발현 정도를 관찰한 결과 TRPA1 대조군에 비해 ZRE(0.1 mg/ml)과 ZRE(0.5 mg/ml)을 처리한 세포에서 발현 억제를 나타내었으나 통계적으로 유의미한 수준은 아니었다. 이에 반하여 TRPA1 agonist인 AITC(10 μM)을 처리한 세포에서는 유의미한 발현 상승을 나타내었다(Fig. 3).

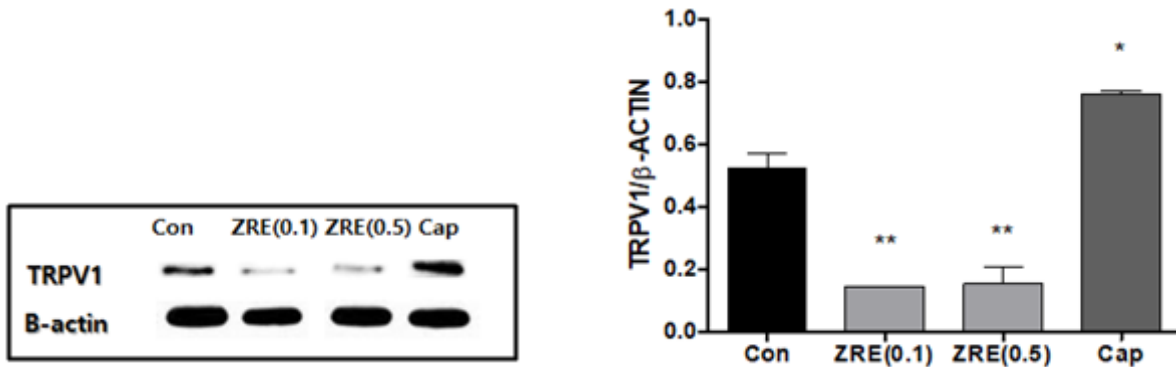


Fig. 2. Effects of Zingiberis Rhizoma Extract on the expressoin of TRPV1 levels in TRPV1-transfected HEK 293T cells. TRPV1-transfected HEK 293T cells were treated with ZRE(0.1 mg/ml), ZRE(0.1 mg/ml) and Capsaicin(10 μM) for 24 h, and Western blots were performed. Con : TRPV1 expressing HEK239T cells, ZRE(0.1) : Zingiberis Rhizoma Extract(0.1 mg/ml), ZRE(0.5) : Zingiberis Rhizoma Extract(0.5 mg/ml), Cap : Capsaicin(10 μM). **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with control group(one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

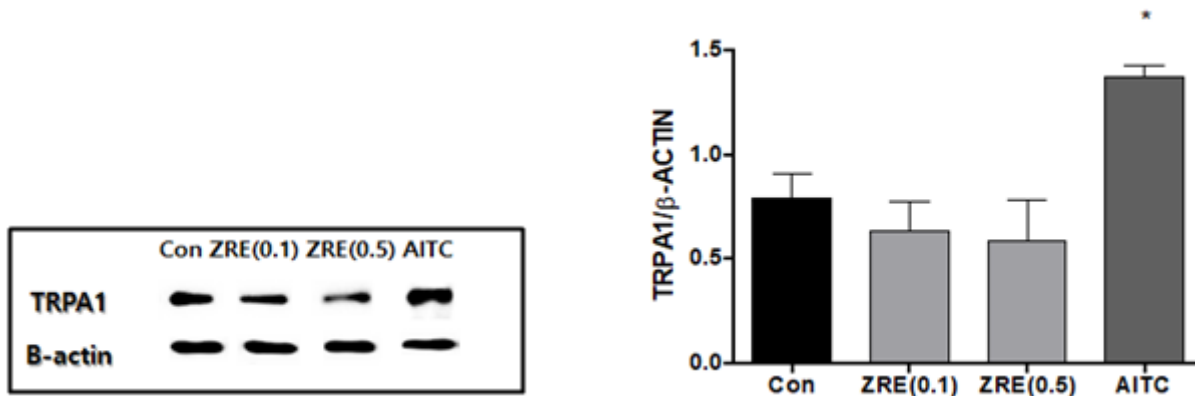


Fig. 3. Effects of Zingiberis Rhizoma Extract on the expressoin of TRPA1 levels in TRPA1-transfected HEK 293T cells. TRPA1-transfected HEK 293T cells were treated with with ZRE(0.1 mg/ml), ZRE(0.1 mg/ml) and AITC(10 μM) for 24 h, and Western blots were performed. Con : TRPA1 expressing HEK239T cells, ZRE(0.1) : Zingiberis Rhizoma Extract(0.1 mg/ml), ZRE(0.5) : Zingiberis Rhizoma Extract(0.5 mg/ml), AITC : AITC(10 μM). **p*<0.05 compared with control group(one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

2. Von frey filament 자극에 의한 Mechanical allodynia에 미치는 효과

환도(GB30)와 족삼리(ST36)에 시술된 건강약침이 tibial & common peroneal nerve의 말단부를 제거하여 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 Von frey filament 자극으로 유발된 기계적 이질통에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, 대조군을 비롯한 건강약침군, Tramadol군 모두 정상군에 비해 회피반응 역치가 유의미하게 낮아진 것으로 나타났다.

건강약침군과 대조군과의 비교에서는 ZP-B군은 7일째 21.60±6.02, 11일째 21.60±6.02로 회피반응 역치의 유의미한 상승을 보였고, ZP-C군은 11일째 39.6±18.62, 15일째 29.20±18.9, 19일째 30.6±17.11로 유의미하게 증가하였다. 따라서, 기계적 이질통을 감소시키는 효과는 저농도인 ZP-A군에서는 나타나지 않았으며, 대체로 고농도에서 더 큰 효과를 나타내는 경향을 보였다. Tramadol군도 15일째 19.40±9.84, 19일째 20일째 28.8±19.4로 대조군에 비해 유의미하게 증가하였다(Table 1).

3. Radiant heat 자극에 의한 Thermal hyperalgesia에 미치는 효과

건강약침이 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 radiant heat 자극에 의한 회피반응 지연시간에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 3일째 5.08±0.95, 11일째 6.02±0.84, 15일째 5.60±0.63, 19일째 6.19±0.77을 나타내어 정상군에 비해 회피반응 지연시간이 유의미하게 감소하였다. 이에 비하여 ZP-A군은 11일째 8.52±1.18으로 단 한 번의 유의미한 지연시간 증가를 보였고, ZP-B군은 15일째 8.11±0.76, 19일째 9.13±1.56을, ZP-C군은 11일째 8.82±0.49, 15일째 9.12±0.58, 19일째 9.92±0.78으로 회피반응 지연시간이 대조군에 비해 유의미한 수준으로 증가하여 열 통각 과민반응의 개선효과를 확인할 수 있었으며, 이 효과 역시 용량의 존적(dose-dependent) 경향이 있음을 알 수 있었다. Tramadol군은 15일째 8.13±2.89, 19일째 8.89±1.07로 대조군에 비해 유의미한 증가를 보였다(Table 2).

Table 1. Effects of zingiberis rhizoma pharmacopuncture on the withdrawal threshold to mechanical allodynia on the neuropathic pain in rats

Days group	0	3	7	11	15	19
Nor	60.00±0.00	53.2±15.21	46.4±18.62	53.2±15.21	53.2±15.21	53.2±15.21
Con	60.00±0.00	1.4±0.55 ^{###}	2.96±1.42 ^{###}	3.48±1.16 ^{###}	0.84±0.36 ^{###}	4.4±1.67 ^{###}
ZP-A	60.00±0.00	6.88±5.53 ^{###}	15.4±7.09 ^{###}	11.20±3.83 ^{###}	5.60±3.29 ^{###}	18.2±23.84 ^{###}
ZP-B	60.00±0.00	7.00±4.58 ^{###}	21.60±6.02 ^{###,*}	21.60±6.02 ^{###,*}	7.80±4.49 ^{###}	13.80±7.29 ^{###}
ZP-C	60.00±0.00	9.60±5.13 ^{###}	12.20±3.83 ^{###}	21.6±6.02 ^{###,*}	20.20±8.32 ^{###,*}	23.8±4.92 ^{###,*}
Tra	60.00±0.00	1.32±0.58 ^{###}	14.0±25.76 ^{###}	9.60±9.53 ^{###}	19.40±9.84 ^{###,*}	28.8±19.4 ^{###,***}

Nor : no treatment without spared nerve injury(SNI), Con : no treatment with SNI, Tra : SNI and Tramadol 0.45 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-A : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 2 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-B : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 10 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-C : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30 & ST36. Values are expressed mean±SE. ^{###}*p*<0.001 compared with normal group. **p*<0.05, ^{###}*p*<0.001 compared with control group(two-way ANOVA with Bonferroni post hoc multiple comparison test).

Table 2. Effects of zingiberis rhizoma pharmacopuncture on the withdrawal latency to thermal hyperalgesia at all groups in neuropathic pain induced rats

Days group	0	3	7	11	15	19
Normal	8.15±1.83	10.74±2.43	8.10±1.41	12.34±1.36	10780±1.79	10.92±0.42
Control	9.36±2.48	5.08±0.95 ^{###}	6.23±1.01	6.02±0.84 ^{###}	5.60±0.63 ^{###}	6.19±0.77 ^{###}
ZP-A	9.11±1.13	6.14±1.50 ^{###}	8.60±0.66	8.52±1.18 ^{###,*}	7.94±1.40 [#]	8.16±1.42 [#]
ZP-B	10.24±1.84	7.03±1.52 ^{###}	7.8±0.53	7.93±1.46 ^{###}	8.11±0.76 ^{#,*}	9.13±1.56 ^{**}
ZP-C	10.42±2.13	7.10±1.53 ^{###}	7.82±1.34	8.82±0.49 ^{###,*}	9.12±0.58 ^{**}	9.92±0.78 ^{***}
Tra	8.55±0.80	4.28±1.27 ^{###}	8.63±2.18	7.79±1.63 ^{###}	8.13±2.89 ^{#,*}	8.89±1.07 [*]

Nor : no treatment without spared nerve injury(SNI), Con : no treatment with SNI, Tra : SNI and Tramadol 0.45 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-A : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 2 mg/kg at GB30 & ST36, GP-B : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 10 mg/kg at GB30 & ST36, GP-C : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30 & ST36. Values are expressed mean±SE. [#]*p*<0.05, ^{###}*p*<0.001 compared with normal group. **p*<0.05, ^{**}*p*<0.01, ^{***}*p*<0.001 compared with control group(two-way ANOVA with Bonferroni post hoc multiple comparison test).

4. Acetone에 의한 Cold allodynia에 미치는 효과

건강약침이 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 Acetone 자극으로 유발된 Cold allodynia에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, 대조군은 11일째 16.93±7.30, 15일째 18.47±7.19, 19일째 23.73±8.21를 나타내어 정상군에 비해 회피반응시간이 유의하게 증가하였다. 이에 비하여 ZP-A군은 19일째 10.07±7.53을, ZP-B군은 9.60±12.77을, ZP-C군은 8.60±6.63으로, 회피반응시간이 대조군에 비해 의미있는 수준으로 감소하여 냉 이질통 개선 효과를 확인할 수 있었으나, 용량의존적 경향은 나타나지 않았다. Tramadol군은 대조군에 비해 감소하였으나 유의미한 수준은 아니었다($p < 0.01$)(Table 3).

5. c-fos 단백질 수준에 미치는 효과

건강약침의 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 뇌 중심 회백질 부위에서의 c-fos 단백질 수준에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 유의미한 증가가 나타났으며, ZP-B, ZP-C, Tramadol군에서 대조군에 비하여 유의미한 감소가 관찰되었다. 건강약침군간의 비교에서 ZP-C군의 c-fos 단백질 발현 감소가 가장 많이 나타나 건강약침의 신경병증성 통증 감소 효과가 용량의존적인 경향성을 보였다(Fig. 4).

6. TRPV1, TRPA1 단백질 수준 결과

건강약침의 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐의 TRPV1과 TRPA1 단백질 수준에 미치는 영향을 확인하기 위해 수술측(우측) L5 DRG의

Table 3. Effects of zingiberis rhizoma pharmacopuncture on the withdrawal duration to cold allodynia at all groups in neuropathic pain induced rats

Days group	0	3	7	11	15	19
Nor	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Con	0.00±0.00	1.00±1.31	5.27±4.73	16.93±7.30 ^{###}	18.47±7.19 ^{###}	23.73±8.21 ^{###}
ZP-A	0.00±0.00	8.60±8.27	9.60±9.76	7.53±2.23	11.47±7.57 [#]	10.07±7.53 ^{**}
ZP-B	0.00±0.00	8.40±3.61	10.93±4.94 [#]	7.27±3.77	10.40±6.05	9.60±12.77 ^{**}
ZP-C	0.00±0.00	3.93±4.68	2.60±4.21	9.80±11.15	10.40±10.81	8.60±6.63 ^{**}
Tra	0.00±0.00	1.93±2.05	6.27±4.43	12.13±12.02 [#]	11.87±10.64 [#]	17.33±11.09 ^{###}

Nor : no treatment without spared nerve injury(SNI), Con : no treatment with SNI, Tra : SNI and Tramadol 0.45 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-A : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 2 mg/kg at GB30 & ST36, GP-B : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 10 mg/kg at GB30 & ST36, GP-C : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30 & ST36. Values are expressed mean±SE. [#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.001$ compared with normal group. ^{**} $p < 0.01$ compared with control group(two-way ANOVA with Bonferroni post hoc multiple comparison test).

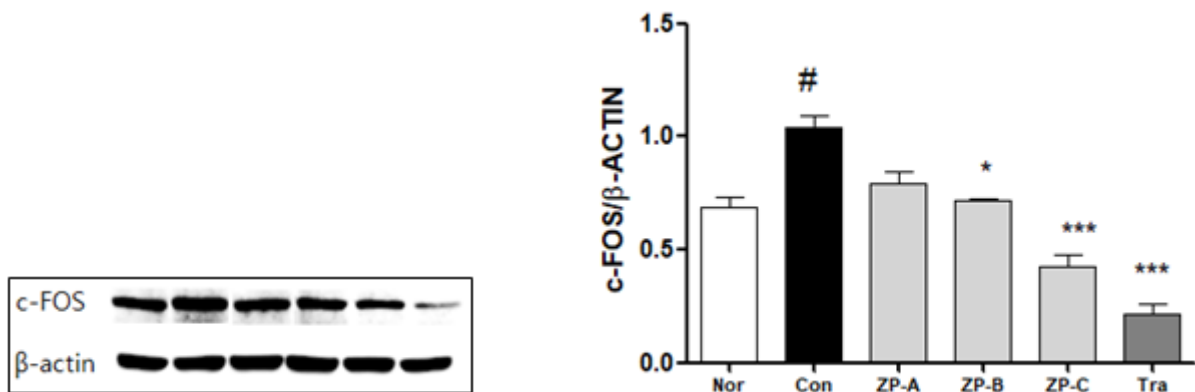


Fig. 4. Effects of Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture on the activity of c-fos protein in the central gray of brain on the neuropathic pain induced by spared nerve injury in rats.

Nor : no treatment without spared nerve injury(SNI), Con : no treatment with SNI, Tra : SNI and Tramadol 0.45 mg/kg at GB30 & ST36. ZP-A : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 2 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-B : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 10 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-C : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30 & ST36. [#] $p < 0.05$ compared with normal group. ^{*} $p < 0.05$, ^{***} $p < 0.001$ compared with control group(one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

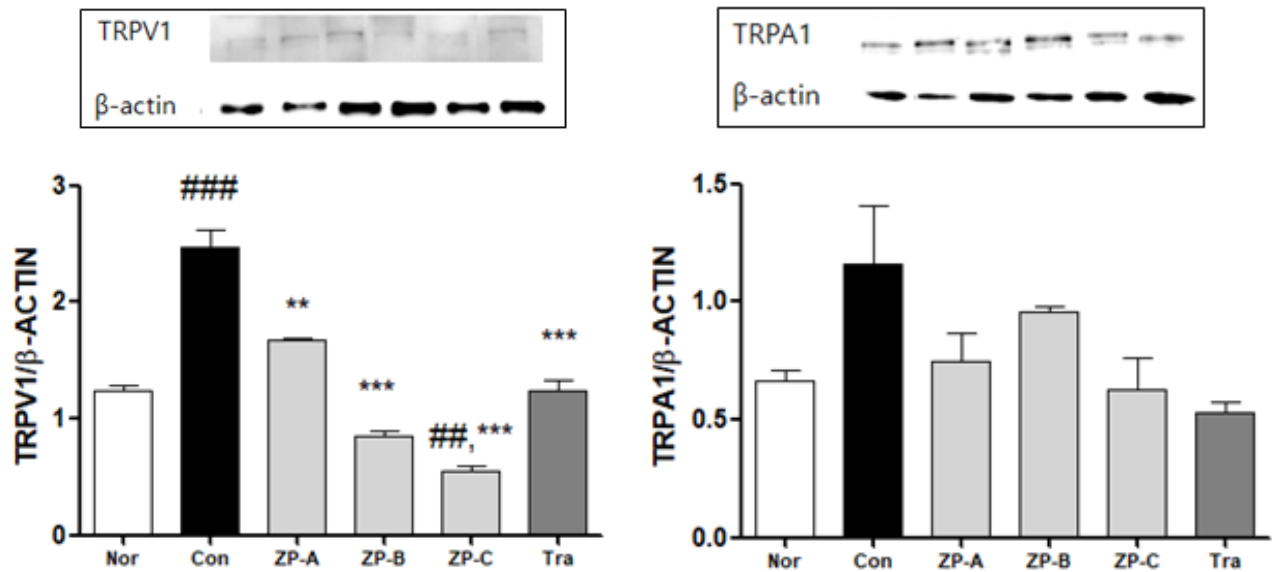


Fig. 5. Western blotting analysis of TRPV1 and TRPA1 levels in ipsilateral L5 DRG in nor, con, ZP-A, ZP-B, ZP-C and Tra groups. Nor : no treatment without spared nerve injury(SNI), Con : no treatment with SNI, Tra : SNI and Tramadol 0.45 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-A : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 2 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-B : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 10 mg/kg at GB30 & ST36, ZP-C : SNI and Zingiberis Rhizoma pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30 & ST36. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with normal group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control group(one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test).

TRPV1과 TRPA1에 대한 Western blot 분석을 실시하였다. L5 DRG에서 TRPV1 단백질 수준은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가되어, 신경병증성 통증에서 TRPV1의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, ZP-A군, ZP-B군, ZP-C군 및 Tramadol군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었으며, ZP-A군에 비해 ZP-B군과 ZP-C군에서 TRPV1 발현 억제 효과가 더 큰 것을 볼 때, 건강약침이 용량의존적으로 TRPV1 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). TRPA1 단백질 수준 또한 대조군이 정상군에 비해 증가되어 있었으나, 통계적인 유의성이 있는 수준은 아니었으며, ZP-A군, ZP-B군, ZP-C군 및 Tra군 모두 대조군에 비해 감소되어 있었으나, 이 또한 통계적인 유의성이 있는 수준은 아니었다(Fig. 5).

고찰

이번 연구의 목적은 건강추출물의 TRPV1과 TRPA1이 발현된 HEK 293T cell에서 TRPV1, TRPA1 발현에 미치는 영향을 확인하고, 신경병증성 통증이 유발된 흰쥐에서 통증반응에 대한 건강약침의 작용을 재검증함으로써 건강추출물의 진통제로서의 개발 가능성을 제시하고자 하는 것이다. 실험결과를 정리하면 다음과 같다.

1) 건강추출물은 TRPV1이 발현된 HEK 293T cell에서 0.1.

mg/ml과 0.5 mg/ml 두 농도에서 모두 유의미한 TRPV1 발현 억제를 나타내었다.

2) 환도(GB30)와 족삼리(ST36)에 시술한 건강약침은 용량의존적으로 신경병증성 통증 흰쥐 모델에서 유발된 이질통과 열 통각과민 및 뇌 중심회백질에서 증가된 c-fos 발현을 감소시키는 효과가 있었다.

3) 신경병증성 통증 흰쥐 모델에서 L5 DRG의 TRPV1 단백질 수준은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가되어 신경병증성 통증에서 TRPV1 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 또한 건강약침이 용량의존적으로 TRPV1 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다.

4) 건강약침의 신경병증성 통증 모델 흰쥐의 이질통 및 열 통각과민성 개선 효과는 용량의존적인 이질통 감소 및 TRPV1 차단효과를 고려할 때 환도(GB30)와 족삼리(ST36)의 자극에 의한 것이라기 보단 TRPV1 차단과 관련이 있다.

침해성 통증(nociceptive pain)은 조직 손상의 위협이나 실질적인 조직 손상에 대한 경고성 감각으로 우리 몸을 보호하는 말초신경계와 중추신경계의 기본적인 생리 기능이다. 진통제 치료에 잘 반응하며 유해 자극이 제거되거나 조직 손상이 치유되면 자연스럽게 감소하게 된다^{16,17}. 그러나 신경계의 손상은 손상 부위가 치유되긴 한 후에도 수개월에서 수년 까지도 지속적인 통증을 일으키기도 한다. 이때 통증은 외상이나 질환에 의해 말초신경, 척수 후근, 척

수, 뇌 부분에서 손상이 발생하며 이러한 신경계 손상의 결과 발생하는 통증을 신경병증성 통증이라고 한다¹⁸).

현재 서양의학에서는 약물치료 위주로 마약성진통제(opioids), 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants), 항경련제(anticonvulsants), 비스테로이드 항염증약(NSAIDs) 등이 사용되고 있으나, 그 효과는 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있다¹⁷. 비스테로이드 항염증약 등의 비마약성 진통제의 경우 대부분 내성이나 신체적 의존성은 없으나 한계효과(ceiling effect)에 의해 진통 효능이 한계가 있으며, 마약성 진통제들의 경우 한계효과는 없으나 내성 및 신체적 의존성(physical dependence) 그리고 호흡억제 작용, 신장 장애 등의 많은 부작용이 문제가 되고 있다. 이러한 통증문제를 해결하기 위해서는 강력하고 부작용이 없는 진통제의 개발이 절실히 요구되며 이를 위해서는 새로운 통증 억제 기전을 가진 신물질의 개발이 필요한 상황이다.

일과성 수용체 전압(transient receptor potential, TRP) 이온채널은 1997년 Caterina 등이 바닐로이드(vanilloid) 수용체를 보고한 이후 통증 연구 분야에 있어서 TRP 이온채널에 대한 관심이 집중되고 있다¹¹. 특히 TRPV1은 유해감각수용기의 중요한 신호통합자로서 신경병증성 통증에서 중요한 역할을 하는데¹⁹, 활성화된 TRPV1은 다양한 신경 손상의 원인으로 유발되는 기계적 이질통과 열적 통각과민에 직접적인 연관이 있으며, 이에 따라 TRPV1 길항제는 이질통과 통각과민을 억제하는 작용을 나타낼 수 있다²⁰. 이러한 사실은 TRPV1의 유전자가 제거된 knock-out mouse에서도 확인할 수 있는데, 일반 행동에 있어서는 정상 마우스와 차이가 없고 열자극, 열성 통각 과민에 대해선 그 반응이 현저히 감소된 것으로 나타나 유해감각 전달에서의 TRPV1의 중요성을 재확인시켜 주었다²¹. 현재까지 신경병증성 통증 분야에 효과적인 약물 개발이 거의 이루어지지 않고 있는 실정에서, TRPV1 이온채널의 조절물질을 통한 진통제 발굴은 새로운 분야로 각광받고 있다.

TRPV1과 함께 감각신경세포에서 공동으로 발현되는 TRPA1은 냉통증을 담당하는 이온채널로서 한냉자극에 의해 발현된다. TRPV1과 함께, TRPA1 또한 포유류에서 유해 자극의 전달에 관여하고 있다. 사실, 어느 정도 두 채널사이의 상호작용이 보고되고 있어서, 약 30%의 TRPV1 발현 감각 뉴런에서 TRPA1의 발현 또한 나타난다^{12,22}.

신경병증성 동통의 발생 기전을 연구하기 위한 동통모델의 필요성 때문에 여러 가지 신경병증성 통증 모델이 개발되어왔는데, 기계적인 말초신경 손상을 이용한 동물 모델로는 Bennett 등²³의 chronic constriction injury(CCI) 모델, Seltzer 등²⁴의 Partial sciatic nerve ligation(PSL) 모델, Kim 등²⁵의 Spinal nerve ligation

(SNL) 모델, Decosterd 등²⁶의 spared nerve injury(SNI)모델이 있다. 본 실험에서는 신경손상의 정도와 증상발현을 비교적 일정하게 할 수 있는 장점이 있는 SNI 모델을 이용하여 실험하였다²⁷.

Tramadol은 신경병증성 통증치료에 일차 혹은 이차 약제로 사용될 수 있는 약물로²⁸ 아편제로서 약한 μ -opioid 수용체의 작용제이며, serotonin과 noradrenaline의 재흡수를 억제하는 작용이 있어, 진통제이면서 또한 항우울제로서 고려되기도 한다²⁹. 본 실험에서는 양성 대조약물군으로 tramadol(0.45 mg/kg)을 시술한 Tramadol군을 추가로 관찰하였다.

조기발현유전자인 c-fos는 신경전달물질에 의해 수 분 내에 다양한 형태의 세포에서 활성화되는데, 최근 들어 통증 등의 스트레스인자들과 관련된 신경로와 뇌활동의 양상을 추적하는 신경해부학적 표지자로 각광을 받고 있다³⁰. 통증자극 후 척수 후각의 신경원에서 c-fos가 발현되므로 Hunt³¹ 등이 척수 후각의 통각로의 활성을 측정하기 위해 c-fos mRNA의 산물인 c-fos 단백을 항원으로 하는 면역조직 화학방법을 최초로 이용한 이래, 여러 가지 체성 및 내장서 유해통증자극을 가했을 경우 척수 및 뇌에서 c-fos 단백질 발현에 대한 많은 연구가 보도되었으며, 통증 효과를 검정하는 최상의 형태학적 방법으로 평가되고 있다³². 척수 후각뿐만 아니라 뇌 중심 회백질, 치상핵, 뇌실강주위시상핵 등 많은 뇌부위에서도 내장 유해 자극 또는 포르말린 근육주사로 인한 통증에서 c-fos가 유의성 있게 증가됨이 알려져 있어³³, 이번 연구에서 뇌 중심 회백질 부위에서의 c-fos 발현을 비교 관찰하였다.

건강(Zingiberis Rhizoma)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 초본인 생강(Zingiberis officinale Rosc.)의 뿌리줄기를 건조한 것으로 한국을 비롯한 인도, 중국 등 아시아 지역에 분포되어 있다. 성분으로는 zingiberol, zingiberon, zingiberene 등의 정유 성분과 심미성분인 gingerol, shogaol 등을 함유하고 있으며 성분의 생리활성연구로는 gingerol 의항산화효과, 6-gingerol과 6-shogaol의 자발성 운동활성의 저해, 해열진통효과 등 다양한 활성이 연구 되었다³⁴. 최근에는 통증 치료 작용에 대해서도 많이 보고되고 있다³⁵. 건강의 해열진통효과를 바탕으로, 온도를 조절하는 핵심 채널이며 통합적 통증 신호 조절자인 TRPV1과 TRPA1의 조절 작용을 통한 건강의 진통효과를 확인하기 위한 이번 연구에서 건강추출물의 TRPV1 차단효과 및 건강약침의 신경병증성 통증 모델 흰쥐의 이질통 및 열 통각 과민성 개선 효과를 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 건강추출물은 TRPV1에 대한 차단 효과를 통한 진통제로서의 개발 가능성이 있다고 생각되며, 향후 건강약침의 농도와 투여횟수 및 기간에 따른 효과 차이, 부작용 등에 대한 연구가 필요하며, 임상적인 적용을 위해 실험적 모델에 대한 임상

적 연관성에 대한 상세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

1. 건강추출물은 TRPV1이 발현된 HEK 293T cell에서 TRPV1 발현 억제 작용을 나타내었다.
 2. 건강추출물은 TRPA1이 발현된 HEK293T cell에서 TRPA1 발현 억제 작용은 나타나지 않았다.
 3. Von frey filament 자극을 통한 기계적 이질통 검사에서 건강약침 B군과 건강약침 C군에서 대조군에 비해 회피반응 역치의 유의미한 증가를 나타내었다.
 4. Radiant heat 자극에 의한 열 통각 과민성 검사에서 건강약침 B군과 건강약침 C군에서 대조군에 비해 회피반응 지연시간의 유의미한 증가를 나타내었다.
 5. Acetone 자극을 통한 냉 이질통 검사에서 건강약침 A군, 건강약침 B군, 건강약침 C군 모두 대조군에 비해 회피반응 시간의 유의미한 감소를 나타내었다.
 6. c-fos 단백질 발현 변화에서는 건강약침 B군과 건강약침 C군에서 대조군에 비하여 유의미한 감소가 나타났다.
 7. TRPV1 단백질 발현은 건강약침 A군, 건강약침 B군, 건강약침 C군 모두 대조군에 비해 모두에서 유의미한 감소를 나타냈다.
 8. TRPA1 단백질 발현은 건강약침 A군, 건강약침 B군, 건강약침 C군 모두 대조군에 비해 유의미한 변화를 보이지 않았다.
- 이상의 실험결과를 종합해 봤을 때 건강약침이 신경병리성 통증이 유발된 흰쥐 모델에 대한 통증 억제 효과가 있다고 생각되며, 이러한 작용은 TRPV1 차단과 관련이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number: HI17C1649).

References

1. Jensen TS, Baron R, Haanpaa M et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011 ; 152 : 2204-5. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.017.
2. Maag R, Baron R. Neuropathic pain: translational research and impact for patient care. *Curr Pain Headache Rep*. 2006 ; 10(3) : 191-8. doi: 10.1007/s11916-006-0045-8.
3. Minn YK, Kim SM. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. *J Korean Med Assoc*. 2008 ; 51(12) : 1139-48.
4. Kim SS, Ko SG, Cho KH et al. East-West Medical Study on Bi-syn-drome-Focusing on Causes and Symptoms. *Korean J. Orient. Int. Med* 1994 ; 15(1) : 116-27.
5. Kim moo-jin, yoon jong-hwa, kim kyung-ho, lee seung-deok, kim kap- sung. Acupuncture therapy literature study on the knee Rheumatoid Arthritis. *The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2005 ; 22(1) : 191-201.
6. Korean Medicine Univ. Acupuncture & Moxibustion and Acupoint Department. *The Acupuncture and Moxibustion* 1. Seoul: Jipmoondang. 382-4, 643-5.
7. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK et al. Bee Venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*. 2001 ; 90(3) : 271-80. doi: 10.1016/s0304-3959(00)00412-7.
8. Young Joo Sohn, Yong Suk Kim, Young Bae Park, Ja Seung Ku, Ran Won, Nak Won Sohn, Hyuk Sang Jung. Alterations of Cerebral Metabolic Activation Following Electro-Acupuncture Stimulation on ST36 and LR3 Acu-Points in Rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2002 ; 19(1) : 159-174.
9. Je BS, Lim IC, Oh MS. The Literatural Study on Acupuncture and Moxibustion Therapy of Arthralgia Syndrome. *Research Institute of Korean Medicine Thesis Collection*. 2004 ; 13(1) : 61-9.
10. Korean Phamcopuncture Institute science committee. *Pharmacopunctureology*. Seoul: Elsevier Korea. 2008; 3, 6-8.
11. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 ; 389 : 816-24.
12. Vellani V, Kinsey AM, Prandini M et al. Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Mol*

- Pain. 2010 ; 6 : 61. doi: 10.1186/1744-8069-6-61.
13. Jeonguk hanuigwadahak bonchohak gongdong gyojaebyeon-chanwiwonhoe. Herbology. Seoul: Younglimsa publishing company. 2016 : 375-7.
 14. Nam SC, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, Ahn KS. Angiogenic inhibitory effect of Zingiberis Rhizoma. J Korean Orient Oncology. 2006 ; 11(1) : 55-63.
 15. Sharma, J.N., Srivastava, K.C., Gan, E.K. Suppressive effects of eugenol and ginger oil on arthritic rats. Pharmacology. 1994 ; 49 : 314-8. doi: 10.1159/000139248.
 16. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihofner C. Mechanisms of neuropathic pain. Eur Neuropsychopharmacology. 2012 ; 22 : 81-91.
 17. Butera JA. Current and emerging targets to treat neuropathic pain. J Med Chem. 2007 ; 50(11) : 2543-6. doi: 10.1002/chin.200731182.
 18. Yun DM. Neuropathic pain. The Korean Journal of Pain. 1995 ; 8(2) : 219-24.
 19. E. Palazzo, L. Luongo, V. de Novellis, L. Berrino, F. Rossi, S. Maione. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. Molecular Pain. 2010 ; 6 : 66. doi: 10.1186/1744-8069-6-66.
 20. K. M. Walker, L. Urban, S. J. Medhurst et al. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2003 ; 304(1) : 56-62. doi: 10.1124/jpet.102.042010.
 21. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature. 1997 ; 389 : 816-824. doi: 10.2142/biophys.39.159.
 22. Story GM, Peier AM, Reeve AJ et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell. 2003 ; 112 : 819-29. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00158-2.
 23. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 1988 ; 33 : 87-107. doi: 10.1016/0304-3959(88)90209-6.
 24. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain. 1990 ; 43 : 205-18. doi: 10.1016/0304-3959(90)91074-s.
 25. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain. 1992 ; 50 : 355-63. doi: 10.1016/0304-3959(92)90041-9.
 26. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. Pain. 2000 ; 87 : 149-58. doi: 10.1016/s0304-3959(00)00276-1.
 27. Dowdall T, Robinson I, Meert TF. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. Pharmacol Biochem Behav. 2005 ; 80(1) : 93-108. doi: 10.1016/j.pbb.2004.10.016.
 28. Jongen JL, Hans G, Benzon HT, Huygen F, Hartrick CT. Neuropathic pain and pharmacological treatment. Pain Pract. 2014 ; 14(3) : 283-95.
 29. Barber J. Examining the use of tramadol hydrochloride as an antidepressant. Exp Clin Psychopharmacol. 2011 ; 19(2) : 123-30. doi: 10.1037/a0022721.
 30. Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient change on pro-to-oncogene transcription in PC12 cells. J Biol Chem. 1985 ; 260(26) : 14101-10.
 31. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature. 1987 ; 328(6131) : 632-4. doi: 10.1038/328632a0.
 32. Munglani R, Hunt SP. Molecular biology of pain. Br J Anaesth. 1995 ; 75(2) : 186-92.
 33. Luigi Rodella, Rita Rezzani, Cristina Agostini and Rossela Bianchi. Expression of NADP-diaphorase and colocalization with Fos in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. Brain Research. 1999 ; 834 : 173-7.
 34. Suekawa, M., Ishige, A., Sudo, K., Aburada, M. and Hosoya, E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. J Pharmacobiodyn. 1984 ; 7 : 836-48. doi: 10.1248/bpb1978.7.836.
 35. Sharma, J.N., Srivastava, K.C., Gan, E.K., Suppressive effects of eugenol and ginger oil on arthritic rats. Pharmacology. 1994 ; 49 : 314-8. doi: 10.1159/000139248.