추위에 노출된 슬관절염 모델에서 내슬안, 외슬안 직접구가 통증행동과 TRPM8 발현에 미치는 영향

지병욱¹ · 김이꽃¹ · 이지은² · 구성태^{1,2,3}

¹부산대학교 한의학전문대학원 한의과학과, ²부산대학교 건강노화 한의과학 연구센터, ³부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부

Effects of Direct Moxibustion Applied to EX-LE4 and EX-LE5 on the Pain Behavior and Expression of TRPM8 in the Rat Model of Ambient Cold Exposed Osteoarthritis

Byeong Uk Ji¹, Yiquot Kim¹, Ji Eun Lee², Sungtae Koo^{1,2,3}

¹Department of Korean Medical Science, School of Korean Medicine, Pusan National University,

²Healthy Aging Korean Medical Research Center, Pusan National University,

³Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University

Objectives : The aim of the study is to investigate the effects of moxibustion on the pain behavior and expression of TRPM8 in the dorsal root ganglion(DRG) in the rat model of ambient cold(AC) exposed osteoarthritis(OA). **Methods :** OA was induced by the injection of 50 μ l of 2% monosodium iodoacetate(MIA) into the knee joint cavity. To examine the level of pain, weight bearing forces(WBFs) of affected limb was measured. For the AC exposure, the animals were housed in 6 h/day at 4°C for 14 days after MIA injection. Moxibustion treatment was performed at EX-LE4 and EX-LE5 with 5 cons(1, 7 or 10 mg) per day for 13 days from 5 days after MIA injection. The expressions of TRPM8 in DRG were measured by western blotting analysis. **Results :** The WBFs of MIA-AC group were decreased significantly compared to MIA group at 2, 3, 6, 7, 8 and 9 days after arthritis induction. After the first 6 h-AC exposure, expressions of TRPM8 in MIA-AC group were increased significantly compared to those of naive group. After moxibustion treatment, only the WBFs of 7 mg treated group were restored significantly. Moreover, the over-expressions of TRPM8 were attenuated by the moxibustion treatment in AC exposed rats. **Conclusions :** The data suggest that AC can increase arthritic knee pain via up-regulated TRPM8 and moxibustion treatment improve the arthritic pain via modulation of TRPM8 expression in DRG in the rat model of AC exposed MIA induced arthritis.

Key words : monosodium iodoacetate induced arthritis, ambient cold, TRPM8 channel, EX-LE4, EX-LE5, moxibustion

서 론

골관절염(osteoarthritis; OA)은 성인에게서 가장 흔하게 보이는

관절질환¹⁾으로, 허리, 무릎, 어깨 등 인체 내 모든 관절에서 나타날 수 있으며, 주로 무릎에 골관절염이 나타난다²⁾. 관절염의 원인은 명확하게 밝혀지지 않았지만 노화나 관절에 무리를 주는 과체중,

Received November 24, 2016, Revised December 11, 2016, Accepted December 13, 2016

Corresponding author: **Sungtae Koo**

Department of Korean Medical Science and Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49 Busandaehak-ro, Mulgeum, Yangsan 50612, Korea

Tel: +82-51-510-8474, Fax: +82-51-510-8439, E-mail: stkoo@pusan.ac.kr

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

© 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.

유전적인 결함, 관절의 외상 등이 주된 요인³⁾이다. 현재의 슬관절염 치료는 관절염의 통증완화와 운동성 유지와 장애의 최소화하는 것을 목적으로 한다⁴⁾. 한의학 임상에서는 골관절염을 치료하기 위해 한의사의 절반이 뜸을 사용하는 것으로 보고⁵⁾되었다.

뜸은 동아시아 전통의학의 대표적인 비 약물 치료요법으로, 말린 쑥을 연소시켜 직, 간접적으로 혈위에 자극하는 방법^{6,7)}이다. 슬관절의 관절염과 류마티스성 질환을 치료하기 위해 한의학에서는 주로 족삼리(ST36), 독비(ST35), 양구(ST34), 음릉천(SP9), 내슬안(EX-LE4), 외슬안(EX-LE5), 혈해(SP10)와 같은 혈위를 임상에서 쓰고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

한의학에서는 골관절염이 관절비증(關節痺症)에 속하며, 이는 풍, 한, 습의 사기(邪氣)가 인체의 영위(榮衛)가 실조되고, 주리(腠理)가 성결어져 정기(正氣)가 허약한 뜸을 타 경락(經絡)으로 침입하거나 관절에 응체(凝滯) 됨으로써 기혈의 운행을 저해하여 근골(筋骨), 기육(肌肉)이 관절이 뻣뻣하고 무겁고 아프며 붓고, 관절을 굽히고 펴기 힘든 등의 증상을 초래한다고 알려져 있으며¹¹⁾, 임상에서 관절염은 추위에 의해 통증이 악화¹²⁾되며, 슬관절염 환자는 추위가 통증과 관절 경직 등의 임상증상에 영향을 미친다고 보고^{13,14)}가 있는가 하면, 추위는 관절염에서 통증에 영향을 미치지 않는다는 연구^{15,16)}도 있다. 한의학적으로 한사는 관절비증의 주요 원인으로 알려져 있으나, 앞에서 언급한 연구와 같이 실제 관절염 환자를 대상으로 한 연구에서는 추위가 관절염 통증에 영향을 미치는지에 대해서는 논란이 남아 있는 상태이다. 관절염의 통증이 추위 온도에 따라 어떻게 영향을 미치는지 연구가 거의 이루어지지 않았다.

인체 주변의 환경과 내부 온도의 변화를 감지하는 것은 살아있는 정상적인 생리조절과 생존하기 위해서 필요한 행동 반응¹⁷⁾이다. 외부의 온도에 반응하는 생체 내 여러 인자 중에 Transient Receptor Potential (TRP) Melastatin 8 (TRPM8), TRP Ankyrin 1 (TRPA1), TRP Vanilloid 1 (TRPV1) 등과 같은 Thermo-TRP channel은 열적 위해 자극에 대한 구심성 감각 신경에서 발현¹⁸⁾되며, 주변 자극에 대한 센서로 중요한 역할¹⁹⁾을 한다. 특히, TRPM8 채널은 추위 감지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 추위와 멘톨에 활성화 되는 이온 채널²⁰⁻²³⁾이다. TRPM8은 멘톨과 비유해성 온도 범위(25~28°C) 이하의 온도에서 활성화 되는 비특이적 이온 채널²⁴⁾로서, 일차 구심성 신경에서 추위 자극을 감지하는 역할²⁰⁾을 하는 것으로 알려져 있다.

이 연구에서는 모노소듐 요오드아세테이트(Monosodium Iodoacetate, MIA)로 유도한 슬관절염 모델에 추위를 노출시켰을 때 관절염 통증이 증가하는지 조사하였으며 이때 추위가 냉 감각을 감지하는 TRPM8 채널의 발현에 영향을 미치는지 확인하였다. 아

울러, 이 동물 모델을 활용하여 직접구 처치가 TRPM8 채널의 발현을 조절함으로써 추위로 인해 증가한 통증을 완화시키는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험 동물은 6주령의 Spargue-Dawley계 수컷 쥐(Hyochang Science, Republic of Korea)를 사용하였으며, 실험 전 1주일간 실험실 환경에 적응하도록 외부환경 변화에 대한 스트레스를 최소화하였다. 동물실험은 적응기간 및 실험 기간 동안 온도 22±2°C, 습도 50±5%의 조건에서 주야 12시간 주야 주기로 유지하는 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험과정은 2008년 제정된 실험동물에 관한 법률이 정한 기준에 부합하게 수행하였으며, 실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인(PNU-2014-0603)을 받은 후 수행하였다.

2. 관절염 유발

관절염은 Isoflurane(JW Pharmaceutical, Republic of Korea)을 사용하여 가스 마취(3% 농도에서 마취 유도, 1~1.5% 농도에서 마취 유지)를 한 상태에서 실험동물의 오른쪽 무릎 주위의 털을 깎은 후 스크루니들 29 G (WJN001, feeltect, Republic of Korea)와 1 ml/cc 주사기를 이용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 2% MIA (Monosodium IodoAcetate; SIGMA I2512-25G, St. Louis, Mo, U.S.A.) 50 µl를 주입하여 유발하였다.

3. 군 분류

Weight bearing test를 위해 실험동물은 MIA로 관절염 유도한 군(MIA group; n=8)과 추위에 노출시킨 관절염 군(MIA-AC group; n=14), 추위에 노출시킨 관절염 1 mg 직접구 군(MIA-AC+MOXA 1 mg group; n=7), 추위에 노출시킨 관절염 7 mg 직접구 군(MIA-AC+MOXA 7 mg group; n=7), 추위에 노출시킨 관절염 10 mg 직접구 군(MIA-AC+MOXA 10 mg group; n=7)으로 나누었다.

4. 추위 노출 방법

추위 노출은 MIA 주입한 날부터 14일까지 총 13회로 weight bearing test 직 후 Temperature & Humidity Chamber(DS-500-CPCH, Dasol Scientific Co., LTD, Republic of Korea) 안에 사육 케이지 채로 온도 4°C, 습도 50%에서 6시간 노출시켰다.

5. 직접구 처치

직접구(DB200; QINGDAO DONGBANG MEDICAL CO., LTD, Republic of Korea)는 1 mg, 7 mg, 10 mg 무게를 재고 쌀알 모양으로 말고, 콘 모양으로 만들어 처치하였다. 직접구 처치는 MIA 주입 5일 째 처음 시작하고, 추위 노출이 끝나고 처치하였다. 직접구는 Isoflurane을 사용하여 가스 마취(3%농도에서 마취 유도, 1~1.5% 농도에서 마취 유지)를 한 상태에서 털을 깔끔히 밀고 땀을 고정할 수 있게 연고를 발라 고정시킨 다음 시행하였다. 직접구 처치의 효과를 비교하기 위해 직접구 처치 없이 마취만 유도한 군(MIA-AC)과 직접구 처치한 군(MIA-AC-MOXA)을 동시에 마취를 시행하였다. 직접구는 관절염을 유도한 동측(우측)의 내슬안(內膝眼; EX-LE4) 외슬안(外膝眼; EX-LE5)에 각각 5장씩을 처치하였다.

6. Weight bearing test

실험동물의 통증행동을 측정하기 위해 관절염 유발 전 후 발이 바닥에 딛는 힘을 측정하였다. 동물은 불투명한 아크릴로 된 좁고 긴 통로(길이 80 cm, 높이, 10 cm, 폭 10 cm)를 자유롭게 보행하는 동안 통로 중앙에 위치한 전자저울에 발이 딛는 압력을 측정하였다. 저울에서 나오는 전기신호를 AD convertor(CED 1401Cambridge Electronic Design Ltd, UK)과 Spike 2 버전 6.18 프로그램(Cambridge Electronic Design Ltd, UK)을 통해 전압의 변화를 측정하였다. 발이 딛는 하중(Weight bearing Force; WBF)은 정상 WBF와 관절염 유도 후 WBF 사이의 비율(Weight Bearing Force Ratio; WBFR)로 변환하여 측정값으로 사용하였다. 관절염 모델의 WBFR은 24간 주기로 측정하였고, 동물이 관절염 유발된 발만 온전히 밟을 때만 선택하여 3회 이상의 값을 평균하여 측정값을 얻었다.

7. Western blot

실험동물을 펜토바르비탈(pentobarbital)로 마취시킨 후 0.9% NaCl로 관류시켜 관절염 유도한 동측의 L4-L5 후근신경절(Dorsal Root Ganglion; DRG)을 적출하였다. 단백질을 추출은 한 조직당 총 부피 50 μ l의 RIPA Lysis buffer(0.5 μ l 100 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF; 1:100)에 조직을 넣어 분쇄하여 30초간 초음파 분쇄한 후 30분동안 얼음 위에서 안정시킨 후 4°C, 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상청액을 취하였다. 단백질 농도는 standard로는 bovine serum albumin을 사용하고, protein assay reagent(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 사용하여 결정하였다. 그 다음 RIPA Lysis buffer, 5X Sodium Dodecyl Sulfate loading sample buffer, 총 단백질 20 μ g을 섞어 5분간 96°C에서 Heat을 가한 후 10% polyacrylamide gel에 단백질을 로딩하여 100 mV에 1시간 30분동안 전기영동하여 분리시켰다. 그 후 nitrocellulose membrane(Hybond ECL, GE Healthcare; UK)에 전이시켰다. Transfer가 끝나고 5% skim milk로 실온에서 45분 동안 block 하였다. Nitrocellulose membrane에 각각 1차 antibody인 anti-TRPM8(1:1000; Abcam, USA), β -actin(1:200; Santa Cruz Biotechnology, USA)을 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음날 1차 antibody를 제거하고 Tris Buffered Saline with 0.1% Tween 20(TBST)로 10분씩 4회 씻어주고 1:5000과 1:2000으로 희석한 2차 antibody(anti goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, USA/ anti rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온에 2시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분씩 4회로 씻어 준 다음 TRPM8과 actin의 발현을 측정하였다. 측정값은 각 군의 TRPM8 채널 발현 값과 Actin 발현 값 사이의 비율로 얻은 측정 값을 Naive 군의 측정 값과 각각의 실험 군의 TRPM8 채널 사이의 비율 값을 사용하였다.

Fig. 1. Effects of ambient cold on the pain behavior in the rat model of osteoarthritis.

Measurements were taken preoperatively and at 1~14 Days post-injection(MIA group; n=8, MIA-AC group; n=8). Mean values and S.E.M. were calculated and the results obtained were subjected to Two-Way repeated measures analysis of variance(Two-Way RM ANOVA) with subsequent Bonferroni test post hoc comparison of effects by the treatments(* p <0.05, MIA vs. MIA-AC Group).

8. 통계

값은 평균±표준오차(S.E.M.)로 표시하였고, 통계분석으로 Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., USA)를 사용하였다. 행동검사 측정 결과는 Two-way repeated measures analysis of variance (Two-Way RM ANOVA)를 시행하고 사후검정은 Tukey method를 시행하였다. TRPM8 발현량 측정 결과는 kruskal-wallis One way ANOVA, One Way ANOVA 또는 t-test를 시행하고 사후검정은 Bonferroni와 Dunn's와 Dunnett Method를 시행하였다. 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 추위가 관절염 모델의 통증행동에 미치는 영향

실험 동물에 MIA를 주입하여 관절염을 유발시키면 1일 후부터 WBFR가 점점 감소하였다. 관절염 유발로 인해 통증이 발생하여 무릎에 가해지는 압력을 줄이기 위해 WBFR이 감소한 것으로 보고 WBFR를 통증행동 지표로 조사하였다. 실온(22°C)에서는 MIA 주입 후 WBFR가 감소하기 시작하여 2일째 $57.71 \pm 5.02\%$ 로 최대 감소하였다. 관절염 유발 전과 비교하여 2일부터 14일까지 통계적으로 유의하게 감소한 상태를 유지하였다. 반면에 MIA를 주입한 후 하루에 6시간씩 14일 동안 4°C 추위에 노출시켰을 때에는 실온에서 사육한 동물과 같이 1일째부터 WBFR이 관절염 유발 전과 비교해서 유의하게 감소하기 시작하여 14일까지 유의하게 감소한 상태를 유지하였으며, 2일째 WBFR은 $38.74 \pm 6.12\%$ 로 최대 감소하여 실온에 두었을 때와 비교해서 유의하게 감소하였다. 이러한 WBFR의 감소는 MIA 주입 9일까지 지속되었으며, 10일 후부터는 추위 노출에 의한 WBFR 감소가 발견되지 않았다(Fig. 1).

2. 추위가 관절염 모델의 DRG에서 TRPM8 채널의 발현에 미치는 영향

추위에 노출된 관절염 유발 모델에서 노출 기간에 따른 TRPM8 채널의 발현 변화를 3시간, 6시간, 1일, 2일로 나누어 측정하였다. TRPM8의 발현은 정상 동물(Naive)과 비교하여 3시간째부터 유의하게 증가($182.68 \pm 16.83\%$)하여 6시간째 발현이 최대로 증가($266.30 \pm 20.63\%$) 하였다(Fig. 2).

3. 내외슬관 직접구가 추위에 노출된 관절염 모델의 통증행동에 미치는 영향

내외슬관 직접구가 추위에 노출된 관절염 동물의 통증행동에

미치는 영향을 알아보기 위하여, 관절염 유발 후 5일째부터 9일 동안 매일 내외슬관에 7 mg 직접구를 처치하였다. 7 mg 직접구 군(MIA-AC-MOXA 7 mg)은 관절염 유발 후 6일 ($66.30 \pm 4.42\%$) 8일 ($80.54 \pm 3.47\%$)과 10일 ($82.59 \pm 3.37\%$)에서 WBFR이 대조군(MIA-AC)보다 유의하게 증가하였으며, 직접구 처치를 한 5일 후부터 MIA군(MIA)과 비교해서 측정 기간 동안 WBFR 유의한 차이는 없었다(Fig. 3A). 또한, 직접구의 용량 의존적인 효과를 비교하기 위해 1 mg, 7 mg, 10 mg으로 직접구의 무게를 구분하여 통증행동에 미치는 효과를 비교하였다. 그러나 1 mg 직접구 군(MIA-AC-MOXA 1 mg)과 10 mg 직접구 군(MIA-AC-MOXA 10 mg)에서는 7 mg 직접구 군(MIA-AC)과 비교해서 전 측정 기간 동안 WBFR의 유의한 차이는 없었다(Fig. 3B).

Fig. 2. Effect of ambient cold on the expression of TRPM8 channel in DRG of arthritic rats.

Expressions of TRPM8 channel were analyzed by western blot at 0 h (naive; n=3), 3 h (n=3), 6 h (n=3), 1 d (n=3) and 2 d (n=3) MIA injection. Tissues sampling were obtained immediately after exposure of ambient cold. Mean values and S.E.M. were calculated and the results obtained were subjected to Kruskal-Wallis One-Way analysis of variance (One-Way ANOVA) with subsequent Dunn's Method post hoc comparison of effects by the treatments ($*p < 0.05$, One way ANOVA, vs Naive).

A

B

Fig. 3. Effects of moxibustion on pain behavior in the rat model of ambient cold exposed osteoarthritis. Measurements were taken pre-operatively and at 1~14 Days post-injection by weight bearing tester at (A) MIA group; n=8, MIA-AC group; n=6, MIA-AC-MOXHA(7 mg) group; n=7, (B) MIA-AC-MOXHA(1 mg) group; n=7, MIA-AC-MOXHA(7 mg) group; n=7, MIA-AC-MOXHA(10 mg) group; n=7. Mean values and S.E.M. were calculated and the results obtained were subjected to Two-Way repeated measures analysis of variance (Two-Way RM ANOVA) with subsequent Tukey method post hoc comparison of effects by the treatments(* $p < 0.05$, MIA-AC vs MIA-AC-MOXHA (7 mg), # $p < 0.05$, MIA vs MIA-AC, & $p < 0.05$, MIA vs MIA-AC-MOXHA (7 mg)).

4. 내외슬관 직접구가 추위에 노출된 관절염 모델의 DRG에서 TRPM8 채널의 발현에 미치는 영향

내외슬관 직접구가 추위에 노출된 관절염 모델의 DRG에서 TRPM8 채널의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 정상 동물과 관절염 실험동물에 내외슬관 직접구 처치를 한 후에 DRG에서 TRPM8 채널의 발현을 비교하였다.

TRPM8은 정상 상태에서 추위에 노출(Naive-AC) 시켰더니 정상 상태보다 TRPM8의 발현이 유의하게 증가하였다. 반면 정상 동물에 직접구를 먼저 처치한 뒤에 추위에 노출(Naive-AC-MOXHA) 시켰을 때에는 TRPM8의 발현이 유의하게 감소하였다. 또한 관절염 동물을 추위에 노출(MIA-AC) 시켰을 때에는 TRPM8의 발현이 3배 정도 증가하였으며, 관절염 동물에 직접구를 먼저 처치한 뒤에 추위에 노출(MIA-AC-MOXHA) 시켰을 때에는 TRPM8의 발현이 감소하였다(Fig. 4).

고찰

관절염은 한의학에서 풍, 한, 습의 사기가 관절에 들어 병의 원인으로, 통증이 심해지고 관절의 변형으로 관절굴신의 장애를 초래¹¹⁾ 되기에, 우리는 관절염이 저온에 노출시켜 통증의 정도를 확인하였다. 아울러 선행연구에서 관절염이 온도에 따라 통증에 악화¹²⁾되며, 임상에서 관절염 환자는 온도에 따라 통증과 관절 경직으로 증상에 영향을 미친다고 선행연구^{13,14)}가 보고되었는가 하면, 미치지 않는다는 선행연구^{15,16)}도 보고되었다. 따라서, 온도에 따른 관절염 통증의 변화와 온도에 민감한 일부 TRPM8 채널의 발현량을 측정하기로 하였다. 우리는 흰쥐를 4°C에 매일 6시간씩 14일동안 추위에 노출시켜 관절염의 통증이 증가하는 한사 실험동물 모델을 구축하였다. 이에 따라, 이 연구에서는 흰쥐의 우측 관절강 내에 MIA를 주입하여 관절염을 유도하고 실험동물을 추위에 노출시켜 통증행

Fig. 4. Effects of moxibustion on the expression of TRPM8 channel in DRG of ambient cold exposed rats.

Expressions of TRPM8 channel were analyzed by western blot at Naive, Naive-AC, Naive-AC-MOXA, MIA, MIA-AC and MIA-AC-MOXA DRG that were obtained immediately after exposure of ambient cold and after injection of MIA. The expressions of TRPM8 were decreased significantly at the 1st-6h exposure of ambient cold after moxibustion treatment in arthritic rats. The expressions of TRPM8 were increased significantly at the 1st-6h exposure of ambient cold in naive rats. The expressions of TRPM8 were decreased significantly at the 1st-6h exposure of ambient cold after moxibustion treatment in naive rats. The expressions of TRPM8 were decreased significantly at arthritis rats. Data shown are means±SEM(* p <0.05, One-way ANOVA, MIA vs MIA-AC; # p <0.05, One-way ANOVA, MIA-AC vs MIA-AC-MOXA; @ p <0.05, One-way ANOVA Naive vs Naive-AC; \$ p <0.05, One-way ANOVA Naive-AC vs Naive-AC-MOXA; % p <0.05, t-test, Naive vs MIA).

통의 변화와 TRPM8채널의 발현량을 측정하였다.

한사 실험동물 모델을 구축하기 위해 MIA로 유도한 관절염 모델에서 추위 노출로 인해 통증 행동이 변하는지를 확인하였다. 실험 결과, 관절염 유발 후 초기에 해당하는 2일, 3일, 6일, 7일, 8일, 9일에 실온에서 사육한 군에 비해 추위에 노출된 군에서 뒷발로 딛는 압력인 WBFR이 유의하게 감소하였다. 하지만, 10일 이후에는 실온에서 사육한 군과 추위에 노출된 군간의 차이는 없었다. 따라서, 관절염이 유발되었을 때 추위에 노출되는 초기에는 통증 행동이 더 심해지지만 만성적으로 노출되었을 때에는 생체가 추위에 적응을 하기 때문에 추위 노출에 대한 영향이 적어지는 것으로 생

각된다. 매일 4°C에 6시간씩 노출 시켰을 때 관절염 통증이 유의하게 증가하는 것을 확인하고 이 모델을 한사 실험동물로 사용하였다.

그 다음으로 한사로 인한 통증 행동 변화가 TRPM8 채널과 관련되는지를 알아 보았다. 냉 자극에 의해 TRPM8 채널이 발현하는 것으로 알려져 있어²⁰⁻²⁴⁾, 추위에 노출시킨 MIA 관절염 모델에서 줄어든 WBFR이 TRPM8 채널의 발현과 관련이 있는지 확인하였다. 추위에 노출시켰을 때 통증 행동평가에서 WBFR이 관절염 유발 초기에 유의하게 감소함에 따라 TRPM8 채널의 발현도 추위에 노출되면 초기에 발현할 수 있기 때문에 구심성 신경의 핵이 있는 부위인 DRG에서 추위 노출 3시간, 6시간 1일, 2일로 나누어 TRPM8 채널의 발현을 측정하였다. 2일 이후의 14일동안의 TRPM8의 발현량을 확인하는 실험을 통해 확인할 것이다. 추위에 노출시켰을 때 TRPM8의 발현량은 3시간, 6시간에 정상군에 비해 발현이 유의하게 증가하였지만, 1일과 2일에는 발현이 유의하게 변화하지 않았다. 이는 TRPM8 채널이 낮은 온도가 반복 노출되면 적응이라는 과정²⁵⁾을 통해 이해된다. 낮은 온도에서, TRPM8 채널은 DRG 뉴런에서 활성화되어 Ca^{2+} 가 들어오면 PIP2의 감소와 채널탈감작을 포함하는 Ca^{2+} 의존성 Protein Kinase C(PKC)의 활성이 유도^{26,27)}되고, 이 증가된 PKC 활성으로 protein phosphatase 1(PP1)의 탈인산화에 의해 TRPM8 채널의 발현이 억제된다고 보고²⁸⁾되었다. 이와 같은 결과를 통해 반복적인 추위 노출이 TRPM8 채널의 발현을 조절하는데 Ca^{2+} influx가 중요하게 관여하는 것으로 사료된다.

한사에 의한 슬관절염 치료를 위해 이 연구에서는 추위에 노출된 슬관절염 모델의 통증 행동에 미치는 내외슬안 직접구의 효과를 알아보았다. 직접구는 1, 7, 10 mg 그룹으로 나누어 내슬안과 외슬안에 각각 5장을 MIA 주입 5일 후에 처치하였다. MIA-AC-MOXA 1 mg 그룹은 MIA-AC 그룹과 유사한 패턴 양상을 보였으며, MIA-AC-MOXA 7 mg 그룹은 관절염 유발시키고 직접구 처치 시작한 날로부터 1일, 3일, 5일에 MIA-AC 그룹보다 유의하게 WBFR이 증가하였다. 하지만 MIA-AC-MOXA 10 mg 그룹에서는 MIA-AC-MOXA 7 mg 그룹보다 낮고 MIA-AC 그룹보다 높은 양상을 보였다. 결과적으로, 직접구의 효과는 뜸 용량 의존적인 효과는 없는 것으로 보이며, 각각의 경우에 최적의 효과를 내는 조건이 있는 것으로 보인다. 한편, 직접구의 용량의존적인 효과를 알아보기 위해 같은 중량의 직접구로 뜸 개수에 따라 효과에 차이가 있는지에 대한 연구와 특정혈위에 대한 효과를 알아보기 위해 내외슬안 혈위에 대한 negative control group이 포함된 연구가 필요할 것이라고 사료된다.

추위에 노출된 슬관절염 모델에서 6시간에 TRPM8의 발현이 유의하게 증가하였으며, 내외슬안 직접구가 추위에 노출된 슬관절염

모델의 통증행동을 완화시키는 것을 확인하였다. 이에 내외슬안 직접구가 TRPM8 채널의 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. 직접구를 처치하는 시간이 통증 행동 실험과 다른 이유는 TRPM8 채널이 일시적으로 생성되기 때문에 직접구를 추위에 노출 전에 처치한 후 TRPM8 채널의 발현을 측정하였다. 측정결과 MIA관절염 군과 정상 동물을 추위에 노출한 군에서 TRPM8은 정상 상태와 MIA 유도된 관절염인 상태일 때 모두 발현이 유의하게 증가하였다. 이러한 TRPM8 발현의 증가가 TRPM8 억제제를 투여함으로써 관절염 통증과 TRPM8의 발현이 직접적으로 억제되는지를 알아보기 위한 실험을 진행할 계획이다. 또한, 향후 실험을 통해 온도 감각 통증과 관련이 있는 것으로 알려져 있는 TRPA(Ankyrin) 1 또는 TRPV(Vanilloid) 1 채널의 발현을 확인해 보고자 한다. TRPA1 채널은 TRPM8과 같은 낮은 온도에서 발현되는 채널로 알려져 있으며²⁹⁾, Ca^{2+} 에 의해 직접적으로 발현³⁰⁾된다고 보고되어 TRPM8의 유사한 기전을 가지고 있다. TRPV1은 캡사이신 수용체로 알려져 있으며¹⁷⁾, 관절염 모델과 같은 염증성 통증모델에서 발현이 증가하고 pH 5.4의 산성 환경에 의해 활성화된다고 보고^{31,32)}가 되었다.

결과적으로, 직접구가 병리적인 상태에서 추위로 인한 감소된 통증 행동을 완화시키고, 추위 노출에 의해 증가한 TRPM8 채널의 발현을 감소하였다. 이상의 결과를 종합하면, 한사는 관절염 초기에 TRPM8 채널의 발현이 증가함으로써 통증을 악화시키는데 관여하며, 내외슬안 직접구는 한사가 관절염에 미치는 영향을 감소시키는 효과가 있어 추위 노출에 의해 증가한 TRPM8의 발현을 조절함으로써 무릎 통증을 개선시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

결 론

슬관절염 모델에 추위를 노출시켰을 때 통증과 냉 감각을 감지하는 TRPM8 채널의 발현에 영향과 직접구 처치가 TRPM8 채널들의 발현을 조절함으로써 추위로 인해 증가한 통증을 완화시키는지 알아본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 첫째, 관절염 모델에서 추위에 반복적으로 노출시켰을 때 통증 행동은 관절염 유발 초기인 2일, 3일, 6일, 7일, 8일, 9일에 유의하게 감소하였다. 둘째, 슬관절염 모델에서 TRPM8의 채널 발현은 첫번째 추위 노출 3시간, 6시간에 유의하게 증가하였다. 셋째, 추위에 반복 노출시킨 후 내외슬안 직접구는 직접구 처치 후 1일, 3일, 5일에 통증 행동을 유의하게 증가시켰다. 넷째, 내외슬안 직접구 처치는 TRPM8의 발현을 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과를 통해, 내외슬안 직접구 처치가 추위에 노출시킨 슬관절염 모델에서 TRPM8 채널의 발현을 감소시킴으로써 통증 행동을 개선시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

References

1. Felson DT. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiologic reviews*. 1988 ; 10 : 1-28.
2. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, Aslanidis SI, Georgountzos AI, Kaziolas GO, et al. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *The Journal of rheumatology*. 2006 ; 33 : 2507-13.
3. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2004 ; 12 Suppl A : S31-3.
4. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and cartilage*. 2008 ; 16 : 137-62.
5. Kim HA, Seo YI. Use of complementary and alternative medicine by arthritis patients in a university hospital clinic serving rheumatology patients in Korea. *Rheumatology international*. 2003 ; 23 : 277-81.
6. Lee SH, Kim KH, Kim TH, Kim JE, Kim JH, Kang KW. Moxibustion for Knee Osteoarthritis A Protocol for a Pilot Randomized Controlled Trial. *Korean Journal of Acupuncture*. 2011 ; 28 : 1-15.
7. Lee S, Kim KH, Kim TH, Kim JE, Kim JH, Kang JW, et al. Moxibustion for treating knee osteoarthritis: study protocol of a multicentre randomised controlled trial. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013 ; 13 : 59.
8. Choi TY, Choi J, Kim KH, Lee MS. Moxibustion for the treatment

- of osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology international*. 2012 ; 32 : 2969-78.
9. Shen LL, Huang GF, Tian W, Yu LL, Yuan XC, Zhang ZQ, et al. Electroacupuncture inhibits chronification of the acute pain of knee osteoarthritis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2015 ; 16 : 131.
10. Kim TH, Kim KH, Kang JW, Lee M, Kang KW, Kim JE, et al. Moxibustion treatment for knee osteoarthritis: a multi-centre, non-blinded, randomised controlled trial on the effectiveness and safety of the moxibustion treatment versus usual care in knee osteoarthritis patients. *PloS one*. 2014 ; 9 : e101973.
11. An S-s, Heo D-s. Effects of Kyejiinsam-tang in MIA-Induced Osteoarthritis Rats. *Journal of Korean Medicine*. 2013 ; 34 : 69-85.
12. Dorleijn DM, Luijsterburg PA, Bay-Jensen AC, Siebuhr AS, Karsdal MA, Rozendaal RM, et al. Association between biochemical cartilage markers and clinical symptoms in patients with hip osteoarthritis: cohort study with 2-year follow-up. *Osteoarthritis and cartilage*. 2015 ; 23 : 57-62.
13. McAlindon T, Formica M, Schmid CH, Fletcher J. Changes in barometric pressure and ambient temperature influence osteoarthritis pain. *The American journal of medicine*. 2007 ; 120 : 429-34.
14. Brennan SA, Harney T, Queally JM, O'Connor McGoon J, Gormley IC, Shannon FJ. Influence of weather variables on pain severity in end-stage osteoarthritis. *International orthopaedics*. 2012 ; 36 : 643-6.
15. Verges J, Montell E, Tomas E, Cumelles G, Castaneda G, Marti N, et al. Weather conditions can influence rheumatic diseases. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 2004 ; 47 : 134-6.
16. Wilder FV, Hall BJ, Barrett JP. Osteoarthritis pain and weather. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 ; 42 : 955-8.
17. Caterina MJ. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007 ; 292 : R64-76.
18. Morenilla-Palao C, Luis E, Fernandez-Pena C, Quintero E, Weaver JL, Bayliss DA, et al. Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell reports*. 2014 ; 8 : 1571-82.
19. Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A. From chills to chills: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Current opinion in neurobiology*. 2007 ; 17 : 490-7.
20. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 2007 ; 448 : 204-8.
21. Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, et al. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*. 2007 ; 54 : 379-86.
22. Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*. 2007 ; 54 : 371-8.
23. Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. The cellular code for mammalian thermosensation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013 ; 33 : 5533-41.
24. Nealen ML, Gold MS, Thut PD, Caterina MJ. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *Journal of neurophysiology*. 2003 ; 90 : 515-20.
25. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002 ; 416 : 52-8.
26. Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nature neuroscience*. 2005 ; 8 : 626-34.
27. Reid G, Babes A, Pluteanu F. A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *The Journal of physiology*. 2002 ; 545 : 595-614.
28. Premkumar LS, Raisinghani M, Pingle SC, Long C, Pimentel F. Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005 ; 25 : 11322-9.
29. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et

- al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003 ; 112 : 819-29.
30. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca^{2+} . *Nature neuroscience*. 2007 ; 10 : 277-9.
31. Malek N, Mrugala M, Makuch W, Kolosowska N, Przewlocka B, Binkowski M, et al. A multi-target approach for pain treatment: dual inhibition of fatty acid amide hydrolase and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Pain*. 2015 ; 156 : 890-903.
32. Valdes AM, De Wilde G, Doherty SA, Lories RJ, Vaughn FL, Laslett LL, et al. The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011 ; 70 : 1556-61.