



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

유해자극 감지성 척수후근신경절
세포와 피부 기능 관련 이온통로들에
대한 천연물 성분 α -Mangostin과
Echinochrome A의 효과

Effects of α -Mangostin and Echinochrome A on
the Ion Channels Associated with Nociceptive
Dorsal Root Ganglion Neuron and Skin Function

2023년 2월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

김 성 은

유해자극 감지성 척수후근신경절
세포와 피부 기능 관련 이온통로들에
대한 천연물 성분 α -Mangostin과
Echinochrome A의 효과

지도 교수 김 성 준

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2022년 10월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학전공
김 성 은

김성은의 의학박사 학위논문을 인준함

2023년 1월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

Garcinia mangostana Linn. (mangosteen)의 과피에서 분리된 크산톤 (Xanthone) 화합물인 α -mangostin은 동남아시아 지역에서 민간요법으로 사용되며, 성계의 가시에서 추출한 암적색 색소인 Echinochrome A (Ech A)는 러시아에서 항염증 효과 등을 통한 치료제로 제시되었다. 본 연구는 이 두 물질들의 다양한 이온채널에 대한 효과를 전세포 패치클램프 기법으로 분석하였다. 특히 통각을 담당하는 척수 후근 신경절 (Dorsal root ganglion, DRG) 뉴런 및 피부 각질형성세포, 그리고 면역세포에서 중요한 역할을 하는 이온채널들을 대상으로 하였다.

세포 직경이 작은 DRG 뉴런들에서 α -mangostin 처리 (0.3–3 μ M)는 안정막 전위 과분극과 막전도도 증가 및 활동전압 발생 억제를 일으켰다. 막전위 과분극 현상을 규명하기 위해 HEK293T에 과발현시킨 two-pore K^+ 채널들 (TREK-1/-2, TRAAK, TRESK)에 α -mangostin을 투여해 보면, TREK과 TRAAK은 뚜렷이 활성화되었으나 TRESK는 변화가 없었다. α -mangostin (3 μ M)은 DRG 뉴런과 ND7/23 신경세포주 세포에 있는 Na_v 의 기능을 40% 가량 억제하였다. 또한 잘 알려진 통각 수용체인 TRPV1 채널을 캡사이신으로 활성화시킨 상태에서는 α -mangostin (0.3 μ M)에 의해 뚜렷한 억제를 보였다. 흥미롭게도 산성 pH 조건으로 활성화시킨 TRPV1에 대해서는 α -mangostin에 의한 억제효과가 없었다. 분자간 결합 시뮬레이션을 통해 해당 이온채널들과 α -mangostin의 안정적 결합을 유추할 수 있었다. *In Silico* ADME 실험은 α -mangostin의 생체적합성을 시사하였다.

Ech A의 작용은 HEK293 세포에 과발현시킨 이온채널들을 대상으로 확인하였다. 각질형성세포 기능에 중요한 TRPV3와 면역세포 칼슘신호에 필수적인 Orail을 통한 전류는 수 μM 의 Ech A에 의해 억제되었다. 반면 캡사이신으로 활성화된 통각수용체인 TRPV1은 Ech A를 추가 처리할 경우 더 활성화되었다. TREK-2는 Ech A의 단독 처리로는 아무 변화가 없지만, 2-APB나 아라키돈산 및 세포의 pH 산성화 조건으로 부분 활성화시킨 상태에서 Ech A를 추가 투여 시 전류 크기가 강력하게 증강되었다. TREK-1과 TRAAK에서도 유사한 활성화 증강을 보였으나 TASK-1과 TRESK는 그렇지 않았다. 흥미롭게도 2-APB와 Ech A를 함께 처리하여 증강활성화된 TREK-2는 잘 알려진 억제제인 Norfluoxetine으로도 억제되지 않았다. 그렇지만 TREK-2에 대한 결합부위가 Norfluoxetine과 다른 것으로 알려진 Ruthenium red의 억제는 여전하였기 때문에, Ech A에 의한 TREK-2 구조 변형에 대한 흥미로운 추측을 제시하였다.

본 연구를 통하여, 이전의 *in vivo* 실험으로 알려진 α -mangostin의 진통 작용이 DRG뉴런의 여러 이온채널들을 통하여 일어날 가능성을 제시하였다. 또한 최근 주목받고 있는 해양동물 유래 성분인 Ech A의 다양한 치료작용을 이해할 수 있는 근거로, TRPV3와 Orail의 억제 및 TREK/TRAAK 이온채널의 활성화 증강 효과를 제시할 수 있었다.

주요어 : 통증, 피부 염증질환, 천연물, 진통제, 이온통로

학 번 : 2017-21575

목 차

국문초록	i
목차	iii
약어	ix
전체 서론	1
재료 및 방법	4

제 1 부

Multi-target modulation of ion channels underlying the analgesic effects of α -mangostin in dorsal root ganglion neurons

1. 1 서 론	14
1.1.1 유해자극 감지성 통증 (nociceptive pain) 및 척수 후근 신경절 (DRG).	
1.1.2 DRG 뉴런을 통한 통증 매개 이온채널.	
1.1.3 이온통로를 표적화한 천연물 기반 진통제의 필요성과 α -mangostin.	
1. 2 결 과	21
1.2.1 α -mangostin의 독성평가.	
1.2.2 DRG 뉴런에서 α -mangostin 처리에 의한 전압 및 전류 양상.	
1.2.3 α -mangostin에 의한 TREKs 과 TRAAK의 활성화.	
1.2.4 α -mangostin에 의한 TTX-sensitive Na_v 억제.	
1.2.5 캡사이신으로 활성화된 TRPV1에 대한 α -mangostin의 억제.	
1.2.6 이온통로 분자 도킹 시뮬레이션으로 제시된 α -mangostin의	

결합 위치.

1.2.7 *In silico* ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) 분석.

1.3 고찰39

1.3.1 TREK/TRAAK 활성화를 통한 막전압 안정화.

1.3.2 TTX-s Na_v 전류의 억제 및 Na_v subtype 규명의 한계성.

1.3.3 산성 pH로 활성화되는 TRPV1을 억제하지 못한 현상의 의미.

1.3.4 *In silico* ADME 분석을 통한 α -mangostin의 약 개발 가능성.

1.3.5 α -mangostin의 독성.

1.4 결론45

제 2 부

Multiple effects of Echinochrome A (Ech A) on selected ion channels implicated in skin physiology

2.1 서론47

2.1.1 피부 기능 및 각질형성세포(keratinocytes) 이온채널.

2.1.2 피부 면역세포에 발현되어 있는 이온채널.

2.1.3 Ech A와 피부 질환 연구.

2.2 결과51

2.2.1 Ech A에 의한 TRPV3 와 CRAC 활성화 억제.

2.2.2 Ech A에 의한 TRPV1 활성화.

2.2.3 Ech A에 의한 TREK/TRAAK 작용제(2-APB, AA, pH 5.5)의 효능 강화.

2.2.4 Ech A로 강화 활성화된 TREK-2에 대한 norfluoxetine (NFx)의 억제효과 소실.

2.2.5 분자결합 모델을 이용한 Ech A의 TREK-2 결합 자리 예측.

2.2.6 TASK-1과 TRESK에 대한 Ech A의 작용 없음.

2.3 고찰65

2.3.1 Ech A에 의한 TRPV3 억제 효과.

2.3.2 Ech A에 의한 CRAC 억제 효과.

2.3.3 Ech A에 의한 TREK/TRAAK의 강력한 활성화.

2.3.4 Ech A에 의한 TREK-2 구조 변화 가능성.

2.3.5 Ech A에 의한 TRPV1 활성화 효과.

2.3.6 Ech A의 독성

2.4 결론72

참고문헌73

Abstract88

감사의 글89

Figure 목차

[Figure 1] Mouse DRG neurons culture.	6
[Figure 2] Effect of α -mangostin on the viability of ND7/23 cells.	21
[Figure 3] α -mangostin hyperpolarizes the membrane potential of DRG neurons and increases the rheobase current to elicit an AP.	24
[Figure 4] Increase in TWIK-related K^+ channel (TREK)-1, TWIK-related K^+ channel (TREK)-2, and TWIK-related arachidonic acid activated K^+ channel (TRAAK), but not TWIK-related spinal cord K^+ channel (TRESK) currents by α -mangostin.	27
[Figure 5] Activation of TWIK-related K^+ channel (TREK)-1, TWIK-related K^+ channel (TREK)-2, and TWIK-related arachidonic acid activated K^+ channel (TRAAK), but not TWIK related spinal cord K^+ channel (TRESK), by α -mangostin.	28
[Figure 6] Inhibition of the TTX-sensitive (TTX-S) voltage gated Na^+ channel current (I_{NaV}) by α -mangostin in dorsal root ganglion (DRG) neurons and ND7/23 cells.	31
[Figure 7] Effect of α -mangostin on the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel current.	33
[Figure 8] Molecular docking simulation of α -mangostin to the ion channels.	35-36
[Figure 9] <i>In silico</i> ADME and drug-likeness properties of α -mangostin.	37
[Figure 10] Schematic illustration of the analgesic mechanism of α -mangostin in nociceptive dorsal root ganglion (DRG) neurons.	45
[Figure 11] Effects of Ech A on I_{TRPV3} activated by 2-APB. ...	52

[Figure 12] Effects of Ech A on I_{TRPV3} activated by drofenine. .	53
[Figure 13] Inhibitory effects of Ech A on I_{CRAC}	54
[Figure 14] Effects of Ech A on I_{TRPV1}	55
[Figure 15] Ech A alone has no effects on TREK2.	56
[Figure 16] Facilitating effects of Ech A on I_{TREK1} and I_{TREK2} with 2-APB.	57
[Figure 17] Facilitating effects of Ech A on I_{TREK2} and I_{TRAAK} with AA.	58
[Figure 18] Facilitating effects of Ech A on I_{TREK2} activated by acid pHe.	59
[Figure 19] Disappearance of the inhibitory effect of NFX on the I_{TREK2} facilitated by Ech A.	61
[Figure 20] Molecular docking simulation of Ech A to the ion channels.	62
[Figure 21] Effects of Ech A on I_{TASK1} and I_{TRESK}	64
[Figure 22] Schematic illustration of the Ech A effects on selective ion channels.	72

Table 목차

[Table 1]	9
[Table 2]	10
[Table 3]	38

약 어

AA : Arachidonic acid

ADME : Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion

AP : Action potential

BCTC:4-(3-chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazinecarboxamide

CRAC : Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channels

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DRG : Dorsal root ganglion

Ech A : Echinochrome A

ER : Endoplasmic reticulum

FBS : Fetal bovine serum

HEK293 : Human embryonic kidney 293

HEK293T : Human embryonic kidney 293T

K2P : Two-pore-domain potassium channel

K_v : Voltage-gated potassium channel

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

Nav : Voltage-gated Na⁺ channel

Orai1 : Orai calcium release activated calcium modulator 1

RMP : Resting membrane potential

STIM1 : Stromal interaction molecule 1

TRAAK : TWIK-related arachidonic acid activated K⁺ channel

TREK : TWIK-related K⁺ channel

TRESK : TWIK-related spinal cord K⁺ channel

TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid 1

TRPV3 : Transient receptor potential vanilloid 3

TTX : Tetrodotoxin

TTX-R : Tetrodotoxin-resistant

TTX-S : Tetrodotoxin-sensitive

전체 서론

통증이나 피부 염증 질환 치료를 위해 진통제 및 치료약의 개발과 지속적인 연구가 진행되고 있다. 일반적으로 통증을 완화시키기 위해 사용되는 아편이나 비스테로이드 항염증제 (NSAIDs)는 적절한 통증 관리의 어려움 및 약물 내성 문제 등이 있다 (Jayakar et al., 2021; Obeng et al., 2021). 미충족 수요 (unmet needs)인 실정에서 질병 치료를 위한 효과적이며 안정성을 지닌 치료 전략 필요성이 요구된다.

피부 질환 치료를 위한 지속적인 연구와 개발 속에서 새롭고 효과적이며 안전한 분자를 사용한 치료제의 개발 역시 중요하다. 본 연구는 통증과 피부 질환을 완화시키기 위한 방안으로 천연물 유래 성분들의 작용을 이온채널 중심으로 분석하였다. 수많은 천연물 유래 성분들 중에서, 동남아시아 및 중국에서 전통적인 민간요법으로 사용되고 있는 *Garcinia mangostana* Linn (mangosteen)의 과피에서 분리된 크산톤 화합물인 α -mangostin과 해양성 동물인 성게의 가시에서 분리된 암적색 색소인 Echinochrome A (Ech A)를 사용하여 척수 후근 신경절 (Dorsal root ganglion, DRG)에 발현되어 통증 연관 이온채널 피부질환 염증에 관여하는 이온채널 기전에 관해 연구를 수행하였다.

이온채널은 다양한 이온을 선택적으로 또는 비선택적으로 투과할 수 있는 세포막 관통 단백질이다. 생리화학적 역할에 따라 이온채널은 약물 개발의 흥미로운 표적이 되어 왔다. DRG 뉴런에는 통증을 매개하는 여러 이온채널들이 발현되어 있어 말초신경계부터 중추신경계까지 통증 신호를 전달할 수 있다 (Gold & Gebhart, 2010). 세포 안정막 전압을 유지하는 K2P (two-pore domain K^+ channel) (Lesage & Lazdunski,

2000), 통증을 전달하는 가장 큰 수용체로서 Na^+ 와 Ca^{2+} 유입 통로인 TRP (transient receptor potential) (C. Moore et al., 2018), 뉴런에서 활동전압의 개시와 전도에 지배적인 역할을 하는 전압 의존성 나트륨 이온채널 (voltage-gated sodium channels, Na_v)이 있다. 피부 질환에 관여하는 각질형성세포(keratinocyte)나 피부 면역세포에 발견되어 있는 특정 이온채널 역시 다양한 피부 질병과 말초 통증 조절의 흥미로운 타겟이 될 수 있다 (Bennett et al., 2014; Wulff et al., 2003). 각질형성세포에 발견되어 있는 TRPV3, CRAC, TREK-2와 면역 세포에 발견되어 있는 CRAC, TASK-1, TREK-2가 대표적인 이온채널이다.

α -mangostin은 mangosteen의 과피에 포함되어 있는 크산톤 (xanthone) 화합물로 (Gutierrez-Orozco et al., 2014; Jinsart et al., 1992) 항산화, 항염, pro-apoptotic, 신경 보호 등에 관한 생물학적 효능이 다수의 실험을 통해 입증되었다 (Hao et al., 2017; Ovalle-Magallanes et al., 2017; Reyes-Fermin et al., 2019). 통증 관련 실험으로는 Hot plate 실험이나 포르말린 주입을 통한 생쥐 모델에 α -mangostin 처리 시 히스타민과 프로스타글란딘 E2 (PGE2)와 같은 염증 매개체들의 수치가 통계적으로 유의하게 감소함으로써 효과적인 진통 효과를 보인다는 보고가 있었다 (Jihong Cui, 2010; Sani, 2015).

Ech A는 암적색의 색소로 바다 성계의 가시로부터 추출한 활성 약물로서 눈의 염증, 녹내장, 심장 질환이 있는 환자 혹은 동물모델에 투여하여 치료제로 사용하고 있다 (A. A. Artyukov et al., 2020; Egorov et al., 1999; H. K. Kim et al., 2021). Ech A는 섬유증이나 bleomycin에 의해 유도된 경피증 모델의 염증에 영향을 끼친다는 연구와 (Park et al., 2021) 아토피 피부염 (AD) 유사 피부 병변을 완화시키고 비만 세포 침윤 억제 및 경피 수분 손실을 감소시켰다는 연구 결과가 보고됐었다

(Yun et al., 2021).

하지만 α -mangostin 과 Ech A가 통증 및 피부 질환의 완화에 미치는 효과에 대한 정확한 기전은 아직까지 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구는 두 가지 천연물을 사용하여 진통제로서 혹은 치료제로서의 가능성 및 약리학적 기전에 대한 연구를 수행하고자 한다.

재료 및 방법

2.1. 동물 (Animals)

연구에 사용한 9-10주차 C57BL/6 생쥐는 코아텍 (대한민국)에서 전부 구매하였으며 서울대학교 실험동물운영위원회의 규정을 준수하였다 (IACUC 승인 번호: SNU 191119-1-6).

2.2. 후근신경절세포 (Dorsal root ganglion, DRG) 분리

후근신경절세포는 척추 사이 구멍 (intervertebral foramen)에 위치해 있다. DRG 뉴런 세포를 얻기 위해 먼저 생쥐를 isoflurane으로 마취시킨 후 희생시킨다. 박리에 사용한 모든 수술도구들은 멸균과정을 거친 후 70% 에탄올 (EtOH)로 소독 후 사용하였다. 실험 과정은 다음 논문을 참조하면서 진행하였다 (Sleigh et al., 2016).

1. 생쥐 등쪽 (ventral side)을 위 쪽으로 하여 박리판에 고정시킨다. 70% 에탄올로 등쪽 털을 전부 적신 후 가위로 꼬리부터 목까지 피부를 절개한다.
2. 요추 관절 (lumbosacral joint)을 가위로 잘라 요추에서 천골 (sacrum)을 분리한다. 다음으로 경추 (cervical vertebrae)와 고리중축관절 (atlantoaxial joint) 위치에서 척추를 잘라낸다.
3. 척추 주변에 붙어 있는 결합조직들을 깨끗하게 제거한다.
4. 척추 사이 공간에 위치한 DRG 뉴런을 얻기 위해, 미세 박리 가위를 꼬리 쪽 척추 안으로 집어넣어 시상면을 따라 두개골 방향으로 절개한다.
5. 척추관을 위로 하여 편으로 척추를 고정된 후 DRG 뉴런을 찾는다.
6. 척추 사이 공간 수막 (meninges) 아래에 있는 DRG 뉴런을 쉽게 발견할 수 있으므로 집게로 DRG 뉴런을 추출해낸다.
7. 추출해 낸 DRG 뉴런을 20 mM HEPES (Sigma Aldrich)를 추가한 Mg^{2+} , Ca^{2+} free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco, Grand Island, NY, USA) 용액에 세포를 모은다.
8. DRG 뉴런의 척수 뿌리나 신경 부분은 미세 가위로 잘라내고, HBSS +HEPES 20 mM을 넣은 15 ml conical tube에 세포들을 모은다.

2.3. 후근신경절세포 (Dorsal root ganglion, DRG) 배양

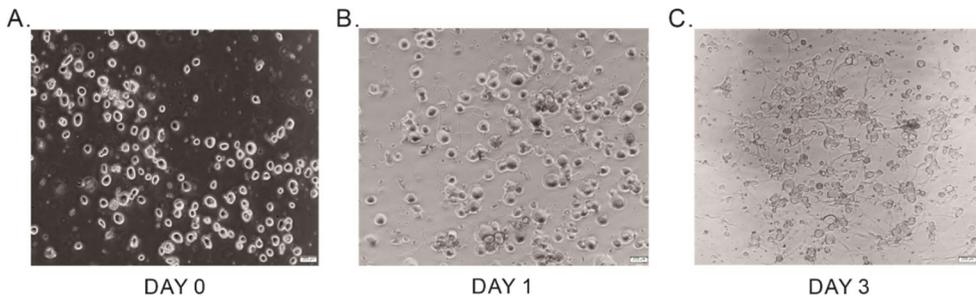
후근신경절세포 분리 3시간 전에 12 well plate에 둥근 커버슬립 (Marienfeld-Superior, Germany)을 올려놓고 0.1 mg/ml poly-D-lysine (Gibco) 처리 후, 1시간 뒤에 Laminin (Sigma Aldrich)을 전 처리한다.

세포 분리 및 배양에 사용한 용액들 중 DMEM (Welgene, Seoul, Korea)은 10 % FBS (Hyclone, Logan, UT, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 넣어 사용하였다. Neurobasal medium (Gibco)는 B-27 supplement 50X (Gibco), 1 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), Ara-c (Sigma Aldrich), NGF 2.5S (Invitrogen, USA), glial cell-derived neurotrophic factor (Sigma Aldrich), 1 % penicillin-streptomycin (Gibco)을 혼합하여 사용하였다. 아래 글상자는 척수후근절 단일세포 분리와 배양 절차이다.

1. HBSS+HEPES 20 mM 가 있는 15 ml conical tube에 모아 놓은 DRG 뉴런을 2분간 원심분리기로 3000 rpm 속도로 세포를 가라앉힌 후 상층액을 제거한다.
2. Collagenase/Dispase 3 ml을 넣어준 후 40~60분간 37°C 배양기에서 digestion을 한 후 20분 마다 conical tube를 tapping 한다.
3. 원심분리기에서 1000 rpm, 3분간 돌린 후 상층액을 제거한다.
4. 0.25 % trypsin-EDTA (Gibco) 처리 후 37°C 배양기에서 7분간 배양한다.
5. 배양기에서 꺼낸 후 DMEM (Welgene)에 10% FBS (Hyclone)가 있는 조건과 FBS가 없는 조건에서 각각 1000 rpm, 3분 간 원심분리한다.
6. 상층액을 걸어낸 후 FBS가 없는 1.5 ml DMEM을 넣어준다.
7. DRG 뉴런 세포의 원활한 분리를 위해 파스츄어 피펫 (Hilgenberg, Germany)을 사용하여 파이펫팅을 최소 20번 부드럽게 진행한다.
8. 순수한 DRG 뉴런 세포를 최대한 얻기 위해선 잔여물들을 제거해야하므로 <6번>에서 사용한 파스츄어 피펫을 이용해 Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich) 위에 파이펫팅한 DRG 뉴런 세포를 조심스럽게 떨어뜨려 층이 생기도록 한다.
9. BSA 층과 DRG 뉴런 세포층이 혼합되지 않도록 조심스럽게 conical tube를

다루어야 하고, 15분간 1000 rpm 속도로 원심분리기를 사용한다.

10. 파스츄어 피펫으로 중간층부터 시작해서 천천히 상층액을 걷어내고 이 때 conical tube 가장 아래쪽에 모인 세포가 같이 제거되지 않도록 주의한다.
11. 5 ml DMEM을 추가로 넣은 후 5 분간 1000 rpm 속도로 원심분리기를 사용한다.
12. 상층액을 걷어낸 후 준비해 둔 Neurobasal medium (Gibco)를 1.2 ml 넣은 후 200 μ l 피펫으로 파이펫팅 하여 세포를 분리한다.
13. 분리한 세포를 0.1 mg/ml poly-D-lysine (Gibco)로 코팅한 둥근 커버슬립 (Marienfeld-Superior, Germany) 위에 100 μ l씩 떨어뜨린 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 세포가 커버슬립에 안정적으로 가라앉을 때까지 최소 20분 배양한다.
14. 20분 후 12 well plate에 neuro basal media 2 ml을 추가하여 세포를 키운다.



[Figure 1] Mouse DRG neurons cell culture.

2.4. 세포배양

인간배아신장 (HEK293T, HEK293) 세포주 (ATCC, Manassas, VA, USA) 는 10 % FBS (Hyclone, Logan, UT, USA), 1 % penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배양액을 사용하여 관리하였다. 생쥐의 신경모세포종과 백서의 신경세포 하이브리드인 ND7/23 (ECACC General Cell Collection #92090903) 세포주는 UK Health Security Agency (Porton Down Salisbury, UK)에서 구매하였다. ND7/23 세포는 10 % FBS (Hyclone), 1 % penicillin-streptomycin (Gibco), 2 mM L-glutamine을 넣은 DMEM (Welgene) 배양액을 사용하며 20 % O₂, 10%

CO₂가 공급되는 37 °C 배양기에서 세포들을 유지하였다.

2.5. 플라스미드를 이용한 발현 유도

사람의 TRPV1(hTRPV1)과 TRPV3(hTRPV3)의 전류 측정을 위해 안정적으로 과발현된 HEK293T 세포주를 이용하였다. 사람의 TRPV3 (pReceiver-M02)는 Genecopoeia (Rockville, MD, USA)에서 구매하였다. 사람의 Orai1 전류를 기록하기 위해 HEK293 세포에 Orai1 (hOrai1)과 사람의 STIM1 (hSTIM1)을 공발현시켜 실험을 진행하였다. 두개의 벡터는 동국대학교 김현중 교수한테 제공받았다. 백서의 TREK-1 (rKcnk2, NM170242), TREK-2 (rKcnk10, NM023096) 그리고 사람의 TRAAK (hKCNK4, NM033310)은 ORIGENE (Rockville, MD, USA)에서 구매하였다. 사람의 TASK-1 (hKcnk3, NM002246)은 영국 Leicester 대학교의 P. R. Stanfield 교수, 생쥐의 TRESK (mKCNK18, pcDNA 3.1)는 경상대학교 강다원 교수로부터 제공받았다. rTREK-1, rTREK-2, hTRAAK, mTRESK는 HEK293T 세포주에 일시적으로 과발현시켜 전류 측정을 하였다. hTASK-1은 HEK 293 세포주에 일시적으로 과발현시켜 전류를 기록하였다. 플라스미드를 세포에 주입하기 위해 Turbofect (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 시약을 사용하여 일시적으로 과발현을 유도했다. 유도 시 Turbofect 1.5 µl, DNA 0.5 µg 그리고 0.1 µg 녹색형광단백질 (Green fluorescent protein, GFP)을 FBS 가 없는 100 µl의 DMEM (Gibco) 안에 함께 넣어 실온에서 15분간 반응시킨 후 전 날 미리 배양해 둔 HEK293T 및 HEK293 세포의 세포 배양액에 첨가하였다.

2.6. 세포독성도 분석 (MTT assay)

MTT assay는 황색물질인 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Sigma Aldrich)를 사용하여 세포의 생존 여부를 흡광도 측정으로 정량화하는 실험 기법이다.

1. 세포 수를 세서 96 well plate의 한 well 당 $8 \times 10^3 \sim 10^4$ 개의 세포를 37 °C 배양기에서 키우고 유지한다.
2. 유지한 세포를 6시간, 12시간, 24시간에 맞춰 α -mangostin을 농도별로 처리한다.
3. 약물 처리 후 5 mg/ml의 MTT 용액을 최대한 빛의 노출을 피해 세포에 처리한 후 37 °C 배양기 내에서 3-4시간 유지한다.
4. MTT 용액을 제거한 후 DMSO 200 μ l를 세포에 처리한다. 이 과정에서 빛을 피하기 위해 알루미늄 호일로 96 well plate를 잘 감싼 후 37 °C 배양기 내에서 10-15분 유지시킨다.
5. ELISA를 사용하여 570 nm 파장에서 MTT assay 분석을 진행한다.

2.7. 전기생리학적 기록 및 분석

모든 실험은 독립현미경 (TE2000-S, Nikon, Tokyo, Japan)에 설치된 패치클램프용 레코딩 챔버에서 진행하였다. 패치클램프 증폭기 (Axopatch-200B, Axon instruments, Foster City, CA, USA)에서 나온 신호는 아날로그 디지털 변환기 (Digidata-1332A, Axon instruments), pClamp 10.3 프로그램을 이용하여 전류, 전압을 측정 및 분석하였다. 기록한 전류 및 전압은 10 kHz 속도로 기록하였으며 2kHz 저역 여파 필터 (loss-pass filter)를 사용하였다. 또한 다른 전류 측정과 다르게 전압 의존성 나트륨 전류 (I_{Nav})를 기록하기 위해서는 직렬 저항 80% 보상조건에서 측정하였다. 전세포 기록조건 (conventional whole-cell mode)에서 사용한 유리미세전극 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)의 끝은 MF-830 microfuge로 열처리하여 사용했으며 피펫 풀리를 통해 유리미세전극의 저항값을 1.2-1.8 M Ω 으로 만들었다. 모든 실험은 실험실 온도 23-

25 °C에서 수행하였다.

2.8. 실험용액

본 연구는 전압 고정 실험 조건에서 TRPV1, TRPV3, Orai1, TREK-1, TREK-2, TRAAK, TRESK, TASK-1, Na_v 채널을 기록하였고 전류 고정 실험 조건에서 AP를 측정하였다. 세포 내/외부 용액의 조성은 아래 표로 정리하였다.

[Table 1] 세포 내 용액 (Intracellular Solution)

Solute (mM)	AP	TRPV1	TRPV3	Orai1	K2P	Na _v
NaCl	2	4			6	20
KCl	7				135	
K-gluconate	130					
CsCl		140	140			117
Cs-glutamate				130		
MgATP	2	5	3	3	3	
HEPES	10	10	10	20	10	5
BAPTA				20		
EGTA	0.1	1	10		5	5
Glucose	10					
Sodium Pyruvate				0.002		
Na-GTP	0.3					
CaCl ₂			4.85			
MgCl ₂	1			1		1

Orai1을 측정하기 위해 IP₃ 20 μM을 세포 내부 용액에 추가하였다. 세포 내부 용액은 KOH, CsOH를 각각 사용하여 pH 7.2로 적정하여 실험을 수행하였다.

[Table 2] 세포 외 용액 (Extracellular Solution)

Solute (mM)	AP	TRPV1	TRPV3	Orai1	K2P	K2P (pH5.5)	Nav
NaCl	140	140	139	135	145	145	130
KCl	3.5	4	5	3.6	3.6	3.6	
CsCl							4
HEPES	10	10	10	10	10	5	10
MES						5	
EGTA		1	1				
Glucose	10	5	10	5	5	5	10
Sucrose		20					
NaH ₂ PO ₄	1.25						
BaCl ₂			3				
CaCl ₂	2			10	1.3	1.3	2
MgCl ₂	1	1	2	1	1	1	1

세포 외부 용액의 pH는 NaOH, CsOH를 각각 사용하여 pH 7.4로 적정한 후 실험을 수행하였다.

2.9. 약물

α -mangostin은 Sigma Aldrich에서 구매하였고 methanol에 용해시켜 5, 10, 50 mM stock으로 만든 후 실험을 수행하였다. Ech A는 러시아에서 임상 치료 시 사용되는 HistoChrome® 앰플로 실험을 진행하였다. HistoChrome®은 탄산 나트륨 안에 녹인 1% Ech A (37.5 mM)와 염화 나트륨 (0.9 %, 등장성)으로 혼합 (10 mg/ml) 조성을 이루고 있다 (Yun et al., 2021). HistoChrome®은 실험 직전에 냉동고에서 꺼내 세포 외부용액에 0.1% 미만으로 희석시켜 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 모든 약물은 Sigma Aldrich에서 구매하였다.

2.10. 분자 도킹 모델

TREK-1, TREK-2, TRAAK, Nav 1.7, TRPV1의 3차 구조는 Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)에서 얻었다. ML335와 결합한 TREK-1, fluoxetine과 결합한 TREK-2 구조를 통해 α -mangostin의 결합자리를 예측하였다. 한편 TRAAK 구조는 리간드에 결합하는 특정 자리를 추정할 수 없어 구조가 유사한 TREK-1 구조를 대신 사용하였다. Nav 1.7과 TRPV1 이온채널은 복어독 (TTX)과 캡사이신의 결합자리를 통해 α -mangostin의 결합자리를 추정했다. AutoDock Vina는 α -mangostin과 다른 이온채널과의 상호작용을 확인하기 위해 사용하였다. 프로그램 사용 시 비단백질 구조는 초기에 제거한 후 수소 결합을 첨가하고 Gasteiger 전하를 계산하여 PDBQT (Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)) 를 만들었다. 격자상자는 $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$ 로 특정 도킹 자리를 확정 짓기 위해 사용하였다. 정확한 결합 구조의 예측을 위해 AutoDock Vina의 exhaustiveness 24로 설정하였다. 각 이온통로에 대하여 20개의 α -mangostin 3차원 구조가 생성되었으며, 에너지적으로 가장 안정한 구조가 추후 분석에 사용되었다. Discovery Studio를 통해 α -mangostin과 상호작용하는 이온 채널의 아미노산 잔기를 분석하였다. 또한 USCF Chimera를 이용하여 이온 채널과 α -mangostin의 3차원 구조를 시각화 하였다.

2.10. *In silico* absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) analysis.

ADME는 흡수 (absorption), 분포 (distribution), 대사 (metabolism), 배설 (excretion)의 약자를 의미하며 약물 설계 시 임상

단계에서 필수적으로 분석하는 도구이다. 개발할 약물의 약물동력학적 요인을 고려하여 제외될 가능성이 있는 화합물을 제외할 수 있도록 도움을 준다(Daina et al., 2017). 본 연구는 The Swiss ADME tool (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA: ADT 1.5.6; <http://www.swissadme.ch/>, Molecular Modelling Group of the Swiss Institute of Bioinformatics)을 사용하여 α -mangostin과 TRPV1 억제제인 BCTC에 대하여 예측하였고 프로그램에 사용된 구조는 PubChem database에서 얻었다.

2.11. 통계학적 분석

모든 연구결과는 Origin pro 16 (Origin Lab) 과 Graphad prism 8.0.1 (Graphad software Inc. USA)로 데이터 수집 및 분석하였다. 평균 (mean) \pm 표준편차 (Standard Error of Mean; SEM)로 표기하였다. Student-*t*-test와 one-way ANOVA, Tukey' s post-hoc test로 통계 분석하였다. 통계 유의성은 **p* <0.05; ***p* <0.01; ****p* <0.001; *****p* <0.0001 로 표기하였다.

제 1 부

Multi-target modulation of ion channels
underlying the analgesic effects of α -
mangostin in dorsal root ganglion neurons

1.1 서 론

1.1.1 유해자극 감지성 통증 (nociceptive pain)과 척수 후근 신경절 (DRG).

통증은 신체에 가해진 강하고 해로운 자극에 의한 조직 손상과 그로 인해 발생하는 물리적, 정서적 불유쾌한 경험으로 정의된다 (International Association for the Study of Pain, 1986). 단순한 조직 손상에서부터 심리적 반응에 이르기까지 통증 유발 범위는 매우 광범위하다. 통증은 메커니즘의 차이에 따라서 열, 기계적, 화학적 조직 손상으로 야기되는 유해자극 감지성 통증 (nociceptive pain) (Kosek et al., 2016), 염증 반응에 의한 염증성 통증 (inflammatory pain) (Grichnik & Ferrante, 1991), 말초신경계 (peripheral nervous system; PNS)와 중추신경계 (central nervous system; CNS)의 손상으로 발생한 신경성 통증 (neuropathic pain)으로 구분할 수 있다 (Paice, 2002; Prescott & Ratté, 2017; Woolf, 2011; Yaksh et al., 2015; Yam et al., 2018). 본 연구는 세가지 통증들 가운데 유해자극 감지성 통증 (nociceptive pain)에 중점을 두어 연구를 수행하였다.

유해자극 감지성 통증 (nociceptive pain)은 전형적으로 조직 손상에 의해 발생하는 통증으로서 유해한 자극을 인식하는 통각수용기 (nociceptor)를 통해 통증이 감지된다 (Prescott & Ratté, 2017). 열, 압력, 화학 물질 및 조직 손상이 통각수용기를 자극하게 되면 말초 신경에서부터 중추 신경까지 통증이 전달되는데 이 때 일차 구심성 뉴런 (primary afferent neuron)의 세포체들이 모여 있는 척수 후근 신경절 (dorsal root ganglion; DRG)이 주로 관여한다 (Berta et al., 2017).

DRG는 척추의 dorsal horn과 말초 신경 말단 사이에 자리잡고 있다

(Esposito et al., 2019). DRG 뉴런 세포들 중 크기가 작은 세포들은 유해자극에 대한 높은 역치 값을 가지며 통증 신호를 말초신경계부터 중추신경계까지 전달하는 주요 매개체다 (Harper & Lawson, 1985). DRG 뉴런에는 통증 신호를 전달하는 통각신경의 세포체들이 모여 있으며 예리한 충격 손상과 같은 기계적 자극에 반응하는 A δ 섬유(A δ fibers)와 여러 자극에 반응하는 C-섬유(C fibers)의 활성화가 통각을 유발한다 (Berta et al., 2017). A δ 섬유(A δ fibers)는 1–5 μ m 직경으로 수초화 (myelinated)되어 있고, C-섬유(C fibers)는 0.2–1.5 μ m 직경으로 수초화 되어있지 않고 (unmyelinated) 느리게 전도되는 특징을 갖고 있다 (Berger et al., 2021; Berta et al., 2017; Prescott & Ratté, 2017).

1.1.2 DRG 뉴런에서의 통증 매개 이온통로.

DRG 뉴런에는 통증을 매개하는 여러 이온채널들이 발견되어 있어 말초신경계에서 중추신경계까지 통증 신호를 전달할 수 있다 (Gold & Gebhart, 2010). 따라서 통증 기전을 규명하기 위한 방안으로 유해자극 감지성 통증 활성화와 관련된 이온채널들을 타겟으로 하는 연구들이 지속적으로 보고되어 왔다 (Bagal et al., 2013; Li & Xu, 2015; Li et al., 2018; Lolignier et al., 2016; Tsantoulas, 2015; Verkest et al., 2022).

유해자극 감지성 통증의 진행 과정에서 K2P (two-pore domain K⁺ channel)는 말초 신경의 흥분성을 조절한다 (Tsantoulas & McMahon, 2014). 자극이 임계치를 넘어 전달되기 전에 세포 막전압을 과분극 상태로 유지하여 흥분성을 조절하거나, 활동전압을 형성하기 위해 필요한 자극의 크기 및 활동전압에서 발생하는 각각의 spike 모양 및 주기를 결정한다 (Plant, 2012). 특히 DRG 뉴런에는 TREK2 (TWIK-

related K^+ channel, KCNK10)와 TRESK (TWIK-related spinal cord K^+ channel, KCNK18)가 발견되어 있어 K2P의 약 80% 정도 발현율을 차지하며 세포 안정막 전압 유지에 기여한다 (Andres-Bilbe et al., 2020; Kang & Kim, 2006; Li et al., 2018; Smith, 2020).

Na^+ 과 Ca^{2+} 유입 통로인 TRP (transient receptor potential)는 DRG 뉴런에서 통증을 전달하는 가장 큰 수용체 중 하나로 (Berta et al., 2017; Levine & Alessandri-Haber, 2007; Carlene Moore et al., 2018) TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1)과 TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1)이 통각수용기에 주로 발견되어있다 (Talavera et al., 2020; Wei et al., 2016). TRPV1은 열, 캡사이신, 산성화의 자극으로 이온채널이 활성화되며 내향성 양이온 전류가 형성된다. 그 결과 통각수용기를 통해 받아들여진 통증 자극을 전기적 신호로 전도 (transduction)함으로서 활동전압을 유도하는 임계치까지 통증 신호를 전달하는 receptor potential 역할을 한다 (Levine & Alessandri-Haber, 2007; Nikolaeva-Koleva et al., 2021; Prescott & Ratté, 2017). TRPA1은 DRG 뉴런에서 주로 TRPV1과 공발현되서 존재하며 (Levine & Alessandri-Haber, 2007) 추위나 포르말린, 일반적인 마취제인 이소플루레인 (isoflurane), 리도카인 (lidocaine), 프로포폴 (propofol)에 의해 활성화되며 고추냉이, 와사비, 겨자의 매운맛을 담당하는 allyl isothiocyanate (AITC)에 의해 이온채널이 활성화된다 (Souza Monteiro de Araujo et al., 2020).

Receptor potential이 활동전압을 생성하기 위한 임계치에 도달하게 되면 전압 개폐성 이온 채널(voltage-gated ion channel)이 활성화된다. 일반적으로 전압 개폐성 나트륨 이온채널 (voltage-gated sodium channels, Na_v)은 뉴런에서 활동전압의 개시 및 전파에 크게 기여하며

세포막이 탈분극 될 때 수 초 안에 Na^+ 가 유입이 되면서 채널의 activation과 inactivation이 발생한다 (Ekberg & Adams, 2006; Yu & Catterall, 2003).

DRG 뉴런에는 나트륨 이온채널 종류 9개 중 5개의 나트륨 이온채널이 주로 발현되어 있다 (Black et al., 2004). 복어독 (tetrodotoxin, TTX)에 민감한 (TTX-S) Na_v 1.1, Na_v 1.6, Na_v 1.7과 TTX 저항성 (TTX-R) 특징을 가지고 있는 Na_v 1.8, Na_v 1.9가 DRG 뉴런에 대부분 발현되어 있다. 중추신경계 (CNS)와 말초신경계 (PNS) 전부 발현되어 있는 Na_v 1.1과 Na_v 1.6 과는 달리 PNS 에는 Na_v 1.7, Na_v 1.8, Na_v 1.9가 특징적으로 발현되어 있으며 통각수용기의 활성화를 결정짓는데 중요한 역할을 한다 (Benarroch, 2015; Dib-Hajj et al., 2010).

또한 DRG 뉴런에는 전반적으로 TTX-S 인 Na_v 1.7이 TTX-R인 Na_v 1.8, Na_v 1.9 보다 우세하게 발현 되어있다 (Hameed, 2019). Na_v 1.7은 활동전압의 upstroke 및 임계치 아래의 receptor potential을 형성하는데 도움을 준다. TTX-R 특성을 지닌 Na_v 1.8은 Na_v 1.7보다 높은 역치 값을 가지고 있고 뉴런의 활동 전압 형성에 기여한다. Na_v 1.9는 대부분 작은 크기의 DRG 뉴런에 발현되어 있으며 통각수용기의 임계치 아래에서 Na_v 가 지속적으로 유지되도록 한다 (Benarroch, 2015).

Na_v 1.7, Na_v 1.8, Na_v 1.9는 염증으로 인해 이온채널이 활성화된다는 연구 결과들이 보고된 바 있다 (Black et al., 2004; Gould et al., 2004). 전압 의존성 나트륨 이온통로 (Na_v)의 기여로 활동 전압 (+40~ +60 mV)을 형성한 후 Na_v 는 휴지 상태로 돌아가고, 전압 의존성 포타슘 이온채널 (K_v)이 활성화되면서 뉴런의 재분극을 일으켜 세포의 안정막

전압과 활동전압의 역치 값, 활동전압의 모양, firing rate이 조절된다 (Benarroch, 2015).

유해자극 감지성 통증 발생 과정에 관여하는 모든 단계의 이온 채널들 특성과 기능을 종합해보면 특정 이온채널을 표적으로 하는 약물의 연구 및 개발은 추후 진통제 연구에 적절한 후보로 사료된다.

1.1.3 이온채널을 표적화한 천연 진통제의 필요성과 α -mangostin.

이온채널은 세포막에 존재하는 막 단백질로 신경, 근육의 이완 수축, 통증 감지와 전달, 혈압 조절 및 세포 증식 등 전 측면에 걸쳐 밀접한 관계를 갖고 있다. 이런 특징들은 약물 개발 시에 이온채널이 주요 표적이 되어 왔음을 알 수 있다 (Bagal et al., 2013). 진통제의 경우 아편 혹은 비스테로이드 항염증제 (NSAIDs)가 주로 임상에서 사용되고 있지만 적절한 통증 관리에 필요한 약물 효능 및 약물 내성 측면에서는 여전히 미흡하다 (Jayakar et al., 2021; Woodbury et al., 2018). 미충족 수요 (unmet needs)를 극복하기 위한 새로운 진통제의 개발 및 보다 효과적이며 안정성을 지닌 치료 전략이 필요하다.

Garcinia mangostana Linn. (mangosteen)은 동남아시아에서 주로 재배되는 열대 과일 나무다. Mangosteen은 중국 및 동남아 지역에서 민간요법의 재료로 사용하였는데 주로 상처 치료 및 피부 감염 치료, 열을 가라앉히기 위한 목적으로 잎이나 과피를 이용하였다 (Wang et al., 2017). 현재까지 추출물과 화합물을 통한 mangosteen의 방대한 구조와 기능에 대한 연구들을 바탕으로 치료제 개발이 확장되고 있다.

α -mangostin은 mangosteen의 과피에서 분리된 크산톤 (xanthone) 화합물로 (Chen et al., 2018) 항산화, 항염, pro-apoptotic, 신경 보호 등에 관한 생물학적 효과가 있음이 다수의 연구자들을 통해

보고되어왔다 (Bullangpoti et al., 2007; Reyes-Fermín et al., 2019). 최근에는 hot plate 실험이나 포르말린 주입을 통한 생쥐 모델에서 α -mangostin이 효과적인 진통 효과를 보인다는 보고가 있었다 (Cui et al., 2010; Sani et al., 2015). Sani 그룹에서는 포르말린 실험을 시작하기 1시간 전에 α -mangostin을 생쥐의 구강으로 (3, 30, 100 mg/kg) 투여했었다. Hot plate 실험시에는 α -mangostin을 60 분에서 210 분까지 후처리 하기 전에 미리 자극을 가했다. 두 실험을 통해 통계적으로 유의하게 α -mangostin이 유해자극 감지성 통증을 억제한다는 것을 규명하였다 (Sani et al., 2015). Cui 그룹에서는 α -mangostin (25, 50 mg/kg)을 위내 투여 (i.g.)하여 실험하였고 진통 효과를 입증하였다 (Cui et al., 2010). 동 연구에서 α -mangostin 처리 시 히스타민과 프로스타글란딘 E2 (PGE2) 와 같은 염증 매개체들의 수치가 통계적으로 유의하게 감소함을 보고한 바 있다. 또한 선행 연구로서 α -mangostin이 CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel)을 억제시킴으로서, T 세포 사이토카인의 분비 및 증식을 감소시킨다는 보고를 한 바 있다 (H. J. Kim et al., 2021).

그러나 현재까지 진통 효능이 있는 α -mangostin의 활성화 기전 및 진통 효과의 영향을 미치는 이온 채널에 대한 명확한 기전에 대해 밝혀진 바가 없다. 유해자극 감지성 통증 (nociceptive pain) 신호를 매개하는 DRG 뉴런 이온채널에 대한 α -mangostin의 역할에 대한 포괄적인 약리학적 조사는 새로운 진통제 개발을 위한 전략 수립에 기여할 것이다.

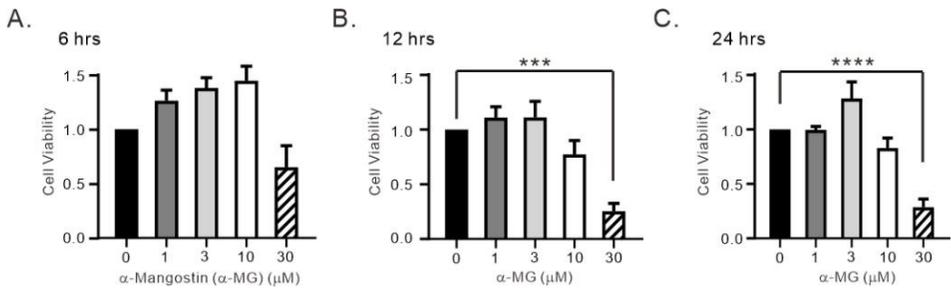
이에 나아가 α -mangostin에 의한 이온채널 조절 및 효과를 규명하고자 본 연구에서는 전세포 패치클램프 조건에서 작은 크기의 DRG 뉴런 세포를 재료로 사용하여 실험을 수행하였다. 본 연구는

이전의 in vivo 실험으로 알려진 α -mangostin의 진통 작용이 DRG뉴런의 여러 이온채널들의 조절을 통해 유해자극 감지성 통증 기전을 밝히고자 한다.

1.2 결 과

1.2.1 ND7/23 세포에서 α -mangostin의 독성 평가.

α -mangostin의 세포독성을 평가하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 6, 12, 24 시간에 걸쳐 실험을 수행하였다. 생쥐의 신경모세포종과 백서의 신경세포 하이브리드인 ND7/23 (ECACC General Cell Collection #92090903) 세포주에 α -mangostin을 각각 1, 3, 10, 30 μ M 농도별로 처리하여 세포 생존율을 확인했다. 12 시간, 24 시간이 경과했을 때 α -mangostin 30 μ M에서 세포 독성이 통계적으로 유의하게 나타났다. 따라서 α -mangostin을 이용한 전세포 팻취클램프 실험은 안전하게 10 μ M 이하 농도에서 실험을 진행하였다.



[Figure 2] Effect of α -mangostin on the viability of ND7/23 cells.

(A) MTT assay of ND7/23 cells treated with various concentrations of α -mangostin for 6 h, (B) 12 h, and (C) 24 h. As shown, only 30 μ M α -mangostin was found to decrease the cell viability to below 50% after 12–24 h. Data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using one-way analysis of variance (*** p < 0.001, **** p < 0.0001).

1.2.2 DRG neuron에서 α -mangostin 처리에 의한 전압 및 전류 양상.

전세포 패치클램프 조건에서 작은 DRG 뉴런세포의 안정막 전압 (resting membrane potential; RMP)과 활동 전압 (action potential; AP)을 전류 고정 조건 (current clamp)에서 측정하였다. 세포의 안정막 전압은 -64 mV로 기록되었고 활동전압을 측정하기 위해 3초 마다 70 pA의 탈분극 전류를 주입하였다. 활동전압 기록 후 전압 고정 조건 (voltage clamp)으로 전환하여 세포막 전압을 -80 mV로 고정 (holding potential)하였고 ramp pulse를 -90 mV부터 $+40$ mV까지 10 초마다 기록하였다 (Figure 3 A).

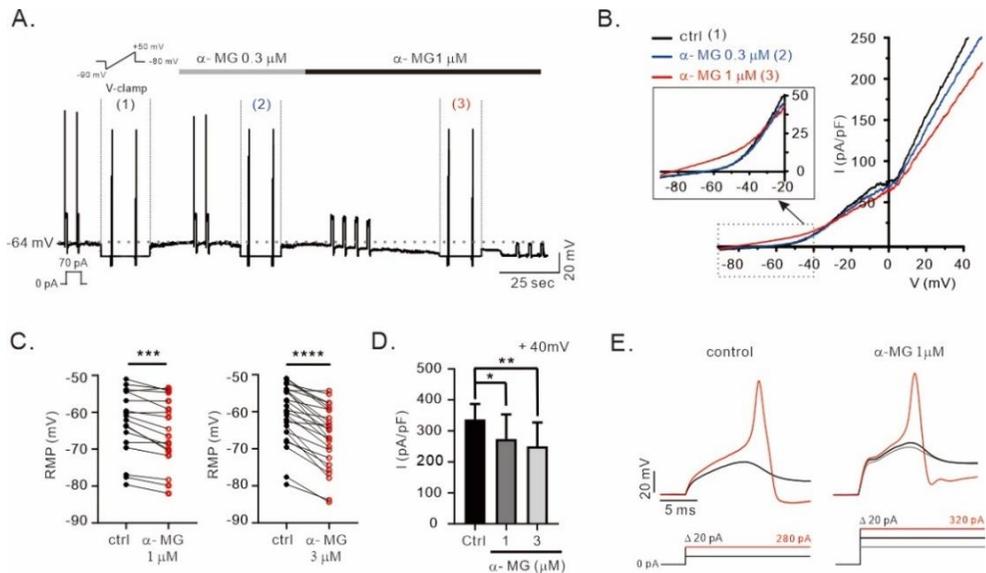
DRG 뉴런에 α -mangostin의 농도를 점차 높이면서 처리했을 때 세포의 안정막 전압은 점진적으로 과분극이 발생했으며 세포의 활동전압은 농도가 높아지면서 억제되었다 (Figure 3 A). 세포 막전압은 α -mangostin 1 μ M 처리 시 -62.92 ± 2.075 mV에서 -65.21 ± 2.166 mV로 과분극 되고, 3 μ M α -mangostin 처리 시 -60.56 ± 1.558 에서 -66.85 ± 1.683 mV으로 과분극이 발생했다 (Figure 3 C).

관찰된 과분극에 관여하는 이온채널을 찾기 위해 전류 고정 조건에서 전압 고정 조건으로 잠시 전환하여 전류/전압 관계 곡선 (I/V curves)을 얻었다 (Figure 3 B). 대조군 기록 시에 약 -60 mV 내외의 역전전위 (reversal potential)를 가지는 외향 전류가 나타났다. α -mangostin 1 μ M을 처리하게 되면 대조군에 비해 background 채널이 활성화되었고 역전전위는 왼쪽으로 편향되어 -80 mV 내외의 값이 측정되었다.

또한 -30 mV 이상의 전압 구간에서는 α -mangostin에 의한 외향 전류의 크기가 다소 감소하였다. 따라서 DRG 뉴런 세포에 α -mangostin 농도를 높이면서 처리하게 되면 전압 비의존성 background

채널의 전류 크기가 증가하고 동시에 K_v 전류의 부분적인 감소 현상이 관찰되었다. 40 mV에서 측정된 외향 전류의 크기는 대조군에 대비해서 1 μM α-mangostin 처리 시 23.96 ± 10.89% 감소하며, 3 μM α-mangostin 처리 시에는 31.45 ± 10.49 % 감소한다 (Figure 3 D).

α-mangostin 농도를 높이면서 활동전압을 측정하게 되면 점차 사라지는 활동전압을 계속해서 발생시키기 위해 더 많은 전류를 가해주어야 한다. 대조군에서 280 pA를 가했을 때 발생했던 활동전압은 1 μM α-mangostin 처리 시 rheobase 전류가 증가함에 따라 320 pA를 가해야지만 비로소 활동전압이 형성된다. 또한 α-mangostin을 처리하면 전류가 주입되는 동안에 재분극의 변화폭 크기가 대조군의 재분극 크기의 변화 폭보다 더 작게 측정이 되었는데 이는 전압 의존성 포타슘 (K_v) 채널의 감소를 의미한다.



[Figure 3] α -mangostin hyperpolarizes the membrane potential of DRG neurons and increases the rheobase current to elicit an AP.

(A) Representative chart trace of whole-cell currents (I_K), demonstrating the generation of AP from DRG neurons with 0.3 and 1 μM α -mangostin. APs were recorded with a depolarizing current of 70 pA injected every 3 s, and then, I_K was induced by switching the voltage-clamp mode. Induced by applying a ramp-like pulse (holding voltage -80 mV) from -90 mV to 40 mV at intervals of 10 s. (B) Current-voltage (I/V) relationship curves obtained from the left panel. Black curves indicate the control (1), blue (2) and red (3) curves indicate after treatment with 0.3 μM and 1 μM α -mangostin. The upper left square shows a magnification of the currents from -80 mV to -20 mV. (C) Summary of the RMP of DRG neurons before and after 1 μM α -mangostin ($n=18$) and 3 μM α -mangostin ($n=25$) treatment. (D) Summary of current density at 40 mV in the control, 1 μM α -mangostin ($n=4$), and 3 μM α -mangostin ($n=4$) groups. (E) APs were evoked by current injection at 280 pA in the control and at 320 pA in the 1 μM α -mangostin treatment group. (mean \pm SEM; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ paired Student's t -test).

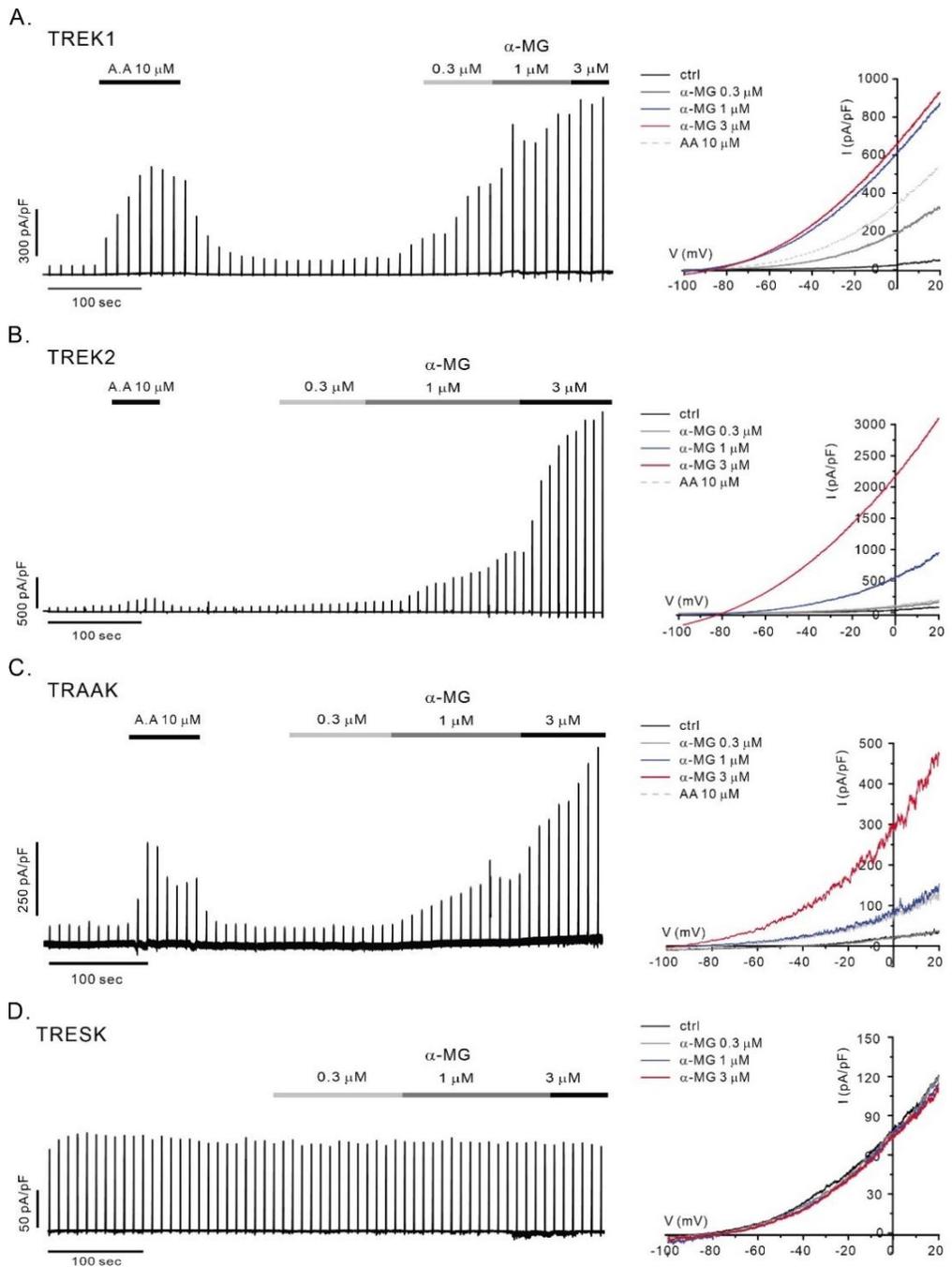
1.2.3 α -mangostin에 의한 TREKs 과 TRAAK의 활성화.

Two-pore domain K^+ channel (K2P)은 다양한 흥분성 세포들이 임계치 아래에서 세포의 안정막 전압 값을 안정적으로 유지할 수 있도록 기여한다. TREKs, TRAAK, TRESK와 같은 다수의 K2P는 DRG 뉴런의 background K^+ conductance 형성에 주요 기여한다고 알려져 있다 (Benarroch, 2015; Talley et al., 2001; Yamamoto et al., 2009). 앞서 나온 결과를 통해 DRG 뉴런에 α -mangostin 농도를 점차 높여 처리하면 background 채널이 활성화되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 DRG 뉴런에 발현되었다고 알려진 TREKs, TRAAK, TRESK의 변화를 관찰하기 위해 다음의 실험을 수행하였다.

HEK293T 세포에 rTREK-1, rTREK-2, hTRAAK 그리고 mTRESK를 일시적으로 과발현시켜 전세포 패치클램프 조건하에서 전압 고정 조건으로 실험을 수행하였다. Holding potential을 -80 mV로 고정하여 ramp pulse로 -100 mV부터 $+20$ mV 까지 500ms 동안 전압을 10초 간격으로 가했다. 약물을 처리하기 전에 기록된 기본적인 전류의 크기는 TRESK가 TREK-1, TREK-2, TRAAK보다 비교적 컸다. TREK-1, TREK-2, TRAAK에 대한 α -mangostin의 활성화효과를 비교하기 위해 각 이온채널에 대해 잘 알려진 작용제인 아라키돈산 (arachidonic acid, AA) $10 \mu\text{M}$ 을 세포 외 용액에 1-2분간 관류한 후 $0.3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ α -mangostin을 순서대로 추가하여 관류시킨다 (Figure 4).

α -mangostin을 농도별로 연속 처리한 결과 mTRESK는 약물을 처리하기 전 전류의 크기와 비교했을 때 차이가 없었다. 하지만 rTREK-1, rTREK-2, hTRAAK 전류의 크기는 작용제인 $10 \mu\text{M}$ AA로 활성화된 전류의 크기보다 훨씬 우세하게 전류의 크기가 증강

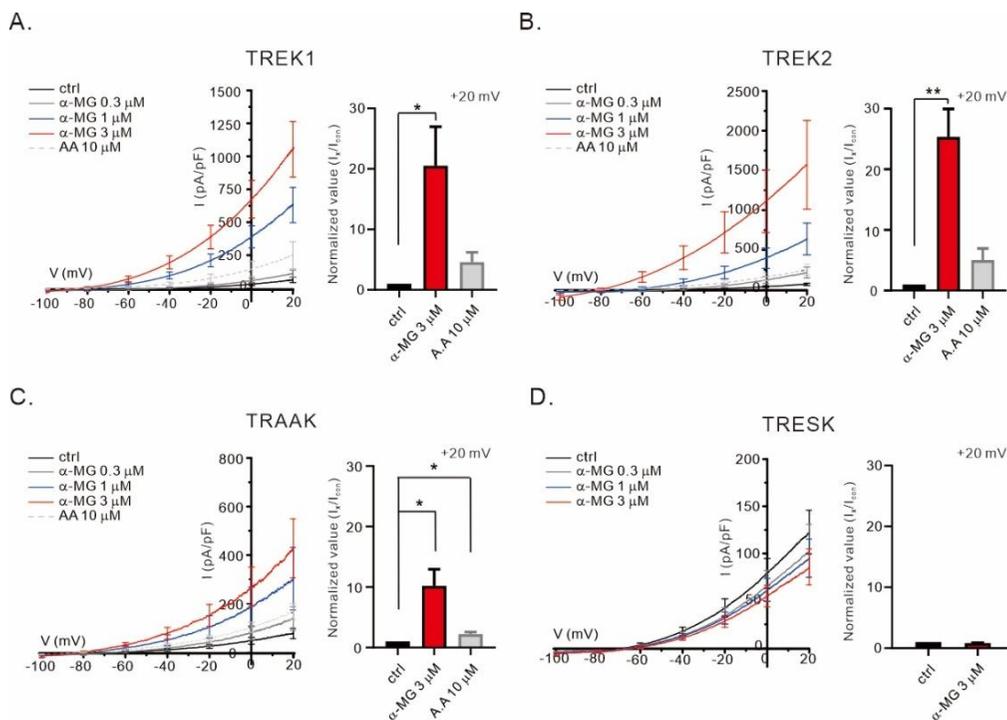
활성되었다 (Figure 4). Figure 4의 결과들을 수집하여 대조군의 20 mV에서 기록된 전류의 크기를 기준으로 실험군과 비교하였다 (Figure 5). TREK-1, TREK-2, TRAAK 모두 3 μ M α -mangostin에 의해 전류 크기가 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 다만 TREK-1, TREK-2가 TRAAK보다 전류의 크기가 더 우세하게 활성화되었다.



[Figure 4] Increase in TWIK-related K^+ channel (TREK)-1, TWIK-related K^+ channel (TREK)-2, and TWIK-related arachidonic acid activated K^+ channel (TRAAK), but not TWIK-related spinal cord K^+ channel (TRESK) currents by α -mangostin.

(A-D) Representative full current traces of rTREK1, rTREK2, hTRAAK and mTRESK overexpressed in human embryonic kidney 293T (HEK 293T) cells and relative I/V curves obtained by ramp-like depolarizing pulses of

the whole-cell voltage clamp from -100 to 20 mV (pulse duration, 500 ms; holding voltage, -80 mV) at intervals of 10 s. After confirming the basal current, 10 μM arachidonic acid (AA) was applied to induce further activation of I_{TREK1} ($n = 6$), I_{TREK2} ($n = 5$), and I_{TRAAK} ($n = 6$), but not I_{TRESK} ($n = 7$). After confirming the activation current of AA, it was washed away and then 0.3 , 1 , or 3 μM of α -mangostin was added to the bath solution to confirm the effect of current activation.



[Figure 5] Activation of TWIK-related K^+ channel (TREK)-1, TWIK-related K^+ channel (TREK)-2, and TWIK-related arachidonic acid activated K^+ channel (TRAAK), but not TWIK-related spinal cord K^+ channel (TRESK), by α -mangostin.

α -mangostin activates rTREK-1, rTREK-2, and hTRAAK at physiologically relevant concentrations; the effect of α -mangostin was compared with that of arachidonic acid (AA). (A-C) Left panels: average I/V curves recorded from voltage ramps showing the concentration-dependent activation of TREK-1 ($n = 6$), TREK-2 ($n = 5$), and TRAAK ($n = 6$), but (D) no effect on TRESK ($n = 7$). Right panels: amplitudes of peak currents obtained at 20 mV normalized by the peak current of the control (mean \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, paired Student's t -test).

1.2.4 α -mangostin에 의한 TTX-sensitive Na_v 억제.

말초신경계의 통각수용기가 자극을 받아 중추신경계까지 유해자극 감지성 통증을 전기적 신호로 전달하려면 세포 막전압의 탈분극이 유도되어 Na_v 활성화로 인한 활동전압의 firing이 발생해야만 한다.

앞서 관찰된 결과들을 보게 되면 α -mangostin의 농도를 높여 세포에 처리하게 되면 K2P가 활성화되고 세포막전압의 과분극과 함께 점점 활동전압이 감소하면서 사라지는 현상을 관찰하였다. 이 현상을 통해 α -mangostin을 세포에 처리하게 되면 통증 신호 전달을 저해하는 것으로 추측할 수 있었다.

따라서 활동전압을 형성하고 활동전압의 최고점인 overshoot을 발생시키는데 크게 기여하는 Na_v 역시 α -mangostin을 처리하게 되면 채널 활성화가 억제되어 활동전압 형성에 방해받을 것으로 가정하였다.

α -mangostin에 의한 Na_v 의 억제 효과를 관찰하기 위해, 전세포 패치 클램프로 전압 고정 조건에서 실험을 수행하였다. K^+ conductance를 배제하기 위해 CsCl로 세포 내 용액을 만들어 생쥐의 DRG 뉴런에서 전류를 기록하였고, 고정 전압 -80 mV에서 탈분극 전압을 단계적으로 가하면서 Na_v 전류를 기록하였다. 탈분극 전압을 가하기 바로 전, Na_v 의 부분적인 inactivation을 배제하고자 -120 mV로 30 ms간 과분극 조건을 순간적으로 가한 후 100 ms 길이의 -80 mV부터 $+60$ mV까지 20 mV 간격으로 탈분극을 가하여 전압을 측정하였다.

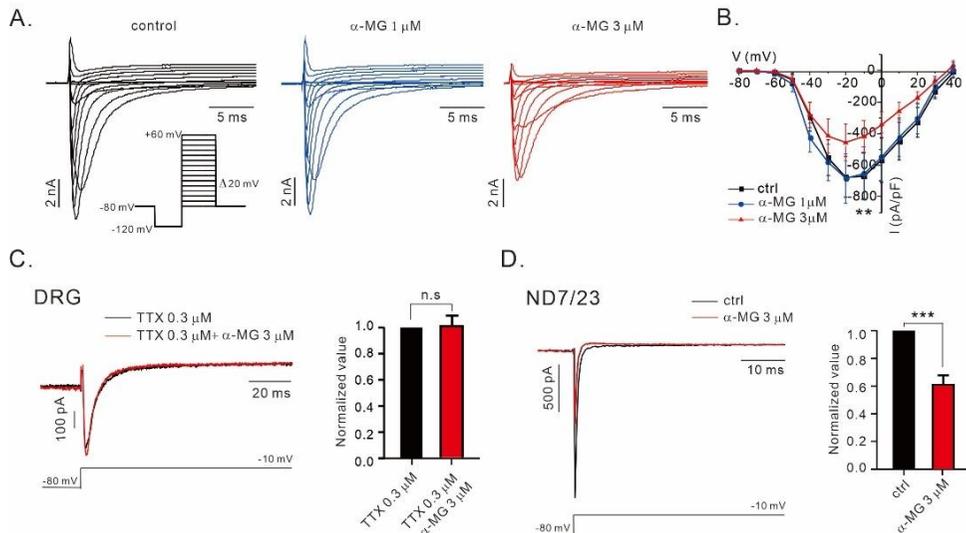
기록된 모든 전압 구간에서 $3 \mu\text{M}$ α -mangostin을 처리했을 시 대조군보다 전류 크기가 감소하였다. 반면, $1 \mu\text{M}$ α -mangostin 처리 시에는 전류 크기의 변화가 없었다 (Figure 6 B). 전류의 크기를 대조군을 기준으로 표준화했을 때 -10 mV에서 각각 0.91 ± 0.061 , 0.60 ± 0.053 값을 나타냈다.

DRG 뉴런에는 TTX-S와 TTX-R 특성을 지닌 Na_v 가 모두 발견되어 있다 (Dib-Hajj et al., 2010).

α -mangostin에 의한 전류 크기 감소 원인에 해당하는 특정 Na_v 종류를 확인해 보고자 -10 mV 단일 펄스만 가하고 300 nM TTX를 세포 외부 용액에 첨가하였다. DRG 뉴런에서 TTX-R Na_v 전류는 α -mangostin을 3 μM 이나 처리했지만 억제에 전혀 관찰되지 않았다 (Figure 6 C). 따라서 α -mangostin에 의해 감소된 Na_v 는 TTX-S Na_v 라는 가정하에 추가 실험을 진행하였다.

DRG 뉴런에서 주로 발견되어 있는 TTX-S Na_v 종류 중 $\text{Na}_v 1.6$ 과 $\text{Na}_v 1.7$ 이 다른 종류에 비해 우세하게 발견되어 있는 세포주인 ND7/23 세포에 α -mangostin을 처리하였다. 1 μM α -mangostin 처리 시 대조군과 전류 크기의 차이는 없었으나, 3 μM α -mangostin을 세포에 처리하게 되면 Na_v 전류의 크기가 유의하게 감소하였다 (Figure 6 D).

따라서 특정한 아형을 확정 지을 수는 없었지만 DRG 뉴런에서 α -mangostin에 의해 감소되는 Na_v 의 특정 종류는 TTX-S Na_v 임을 확인할 수 있었다.



[Figure 6] Inhibition of the TTX-sensitive (TTX-S) voltage-gated Na^+ channel current (I_{NaV}) by α -mangostin in dorsal root ganglion (DRG) neurons and ND7/23 cells.

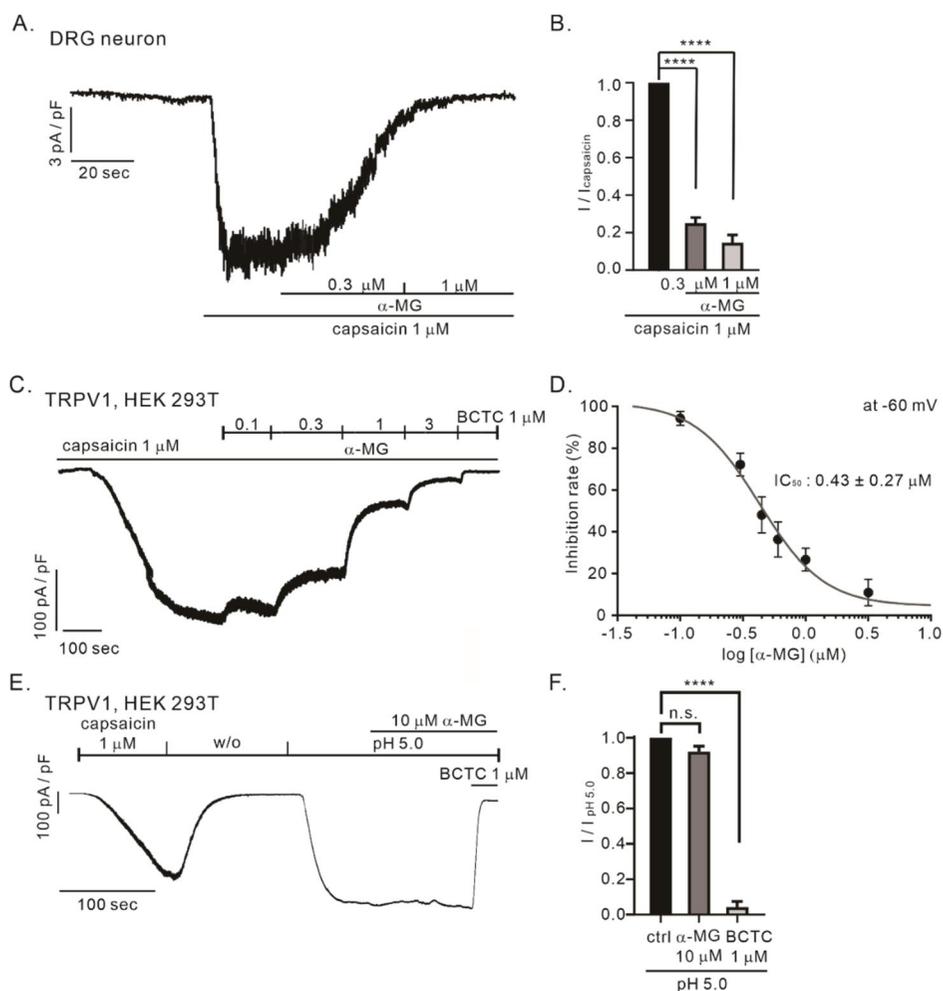
Whole-cell patch clamp recordings were performed on DRG neurons and ND7/23 cells. (A) The I_{NaV} was activated by applying a multi-step depolarization pulse protocol from -80 to 60 mV for 100 ms . (B) I/V relationship of I_{NaV} for the control, and $1 \mu\text{M}$ and $3 \mu\text{M}$ α -mangostin groups ($n = 7$). (C) Left panel: To verify the effect of α -mangostin on the TTX-resistance (TTX-R) current in DRG neurons, the TTX-R I_{NaV} was recorded in the presence of $0.3 \mu\text{M}$ TTX ($n = 4$). Right panel: Summary of the effect of α -mangostin on the TTX-R current in DRG neurons. (D) Left panel: Modulations of I_{NaV} by α -mangostin evaluated in ND7/23 cells mainly expressing TTX-S NaV channel ($n = 9$). Right panel: Summary of the effect of α -mangostin on I_{NaV} in ND7/23 cells. Data are presented as mean \pm SEM. Analysis was performed by the paired Student's t -test ($***p < 0.001$; *ns*, not statistically significant).

1.2.5 캡사이신으로 활성화된 TRPV1에 대한 α -mangostin의 억제.

TRPV1은 해로운 자극을 감지하고 통증을 전달하는 비선택적 양이온 채널 (non-selective cation channel)로 대표적인 통각 수용체이다. 작은 크기의 DRG 뉴런에 1 μ M 캡사이신을 처리하게 되면 즉시 내향성 전류가 생기면서 TRPV1 채널이 활성화된다.

활성화 상태에서 α -mangostin을 0.3 μ M, 1 μ M 연속으로 처리하게 되면 캡사이신에 의한 최대 활성화 전류 크기에 대비해 각각 $75 \pm 0.3\%$, $85 \pm 0.4\%$ 확률로 전류가 억제된 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 7 A, B).

TRPV1이 안정하게 HEK293T에 발현되어 있는 세포에서도 캡사이신에 의한 내향성 전류 활성화와 각각 0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M α -mangostin 농도를 높이면서 처리했을 시 전류의 억제 현상을 nM부터 관찰되었다. IC₅₀ 값은 $0.43 \pm 0.27 \mu$ M이다 (Figure 7 C, D).



[Figure 7] Effect of α -mangostin on the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel current.

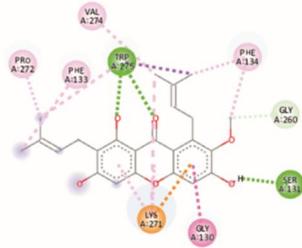
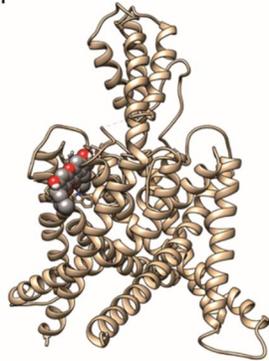
(A) Representative full trace of TRPV1 currents in dorsal root ganglion (DRG) neurons induced by capsaicin. Application of 1 μ M capsaicin in DRG neurons induced the TRPV1 current, and then sequentially superimposed with 0.3 and 1 μ M α -mangostin confirmed the inhibitory response of TRPV1 currents. (B) Summary of the inhibitory effect of α -mangostin on TRPV1 currents in DRG neurons. The amplitudes of the TRPV1 currents were normalized by the capsaicin-induced current of the control ($n = 5$, mean \pm SEM; **** $p < 0.0001$, paired Student's t -test). (C) Treatments of 0.1, 0.3, 1, and 3 μ M α -mangostin to hTRPV1-overexpressing HEK293T cells to confirm the gradual suppression of current. Finally, BCTC was treated to completely suppress the current. (D) Dose-response curve of the effect of α -mangostin on the TRPV1 current recorded in hTRPV1-overexpressing HEK293T cells ($n = 11$). (E) No response to the acid-activated TRPV1 current of HEK293T cells overexpressing hTRPV1 after treatment with 10 μ M α -mangostin. (F) Summary of the effect of α -mangostin on acid-induced TRPV1 currents in HEK293T cells ($n = 4$).

1.2.6 이온통로 분자 도킹 시뮬레이션으로 제시된 α -mangostin의 결합 위치.

α -mangostin과 이온채널에 결합 자리 및 결합 에너지를 AutoDock Vina를 사용하여 추정하였다. 이 과정은 연세대학교 의과학과 박사과정 재학생 노재원 선생이 수행하였다.

TREK-1, TREK-2, TRAAK은 기존에 알려져 있던 활성화 결합자리에 α -mangostin을 결합하였다. 시뮬레이션 결과 각각 안정된 결합자리의 에너지 값은 TREK-1은 -7.9 kcal/mol, TREK-2는 -6.4 kcal/mol, TRAAK은 -6.0 kcal/mol이었다. TREK-1은 분석한 이온 채널들 중 가장 안정적인 에너지 값을 나타냈다. 이는 TREK-1이 α -mangostin과 Ser131, Trp 725 잔기들 간의 수소결합으로 인해 더 안정적인 에너지 준위를 갖기 때문이다. Na_v 와 TRPV1 역시 수소결합의 안정화로 인해 -7.7 kcal/mol로 TREK-1과 결합에너지 값이 유사하였다. 분자 시뮬레이션 모델에 따르면 캡사이신에 결합하는 TRPV1 잔기들 중 Tyr 511이 수소결합을 통해 가장 핵심적인 역할을 해서 안정적인 에너지 준위를 형성한다.

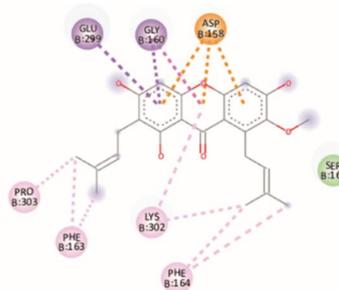
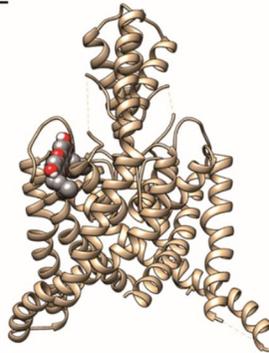
A. TREK-1



Interactions

Conventional Hydrogen Bond	Amide-PI Stacked
Carbon Hydrogen Bond	Alkyl
PI-Cation	PI-Alkyl
PI-Sigma	

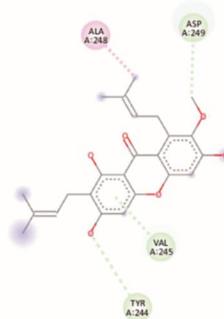
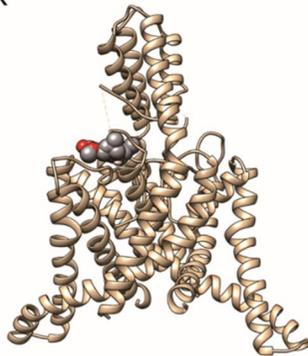
B. TREK-2



Interactions

van der Waals	Amide-PI Stacked
PI-Anion	Alkyl
PI-Sigma	PI-Alkyl

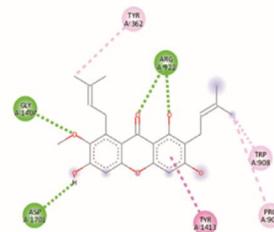
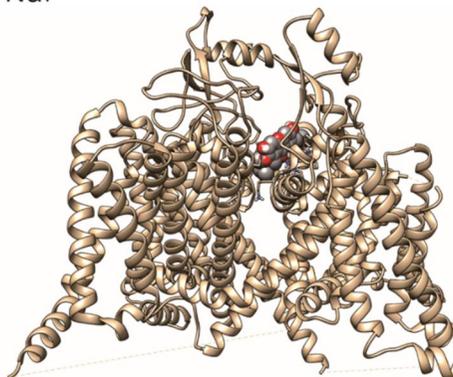
C. TRAAK



Interactions

Carbon Hydrogen Bond	Alkyl
PI-Donor Hydrogen Bond	PI-Alkyl

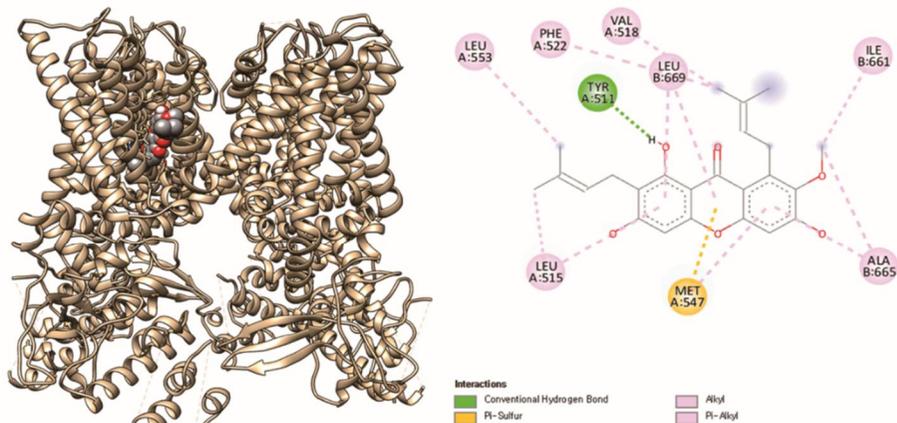
D. Na_v



Interactions

Conventional Hydrogen Bond	Alkyl
PI-PI T-shaped	PI-Alkyl

E. TRPV1



F.

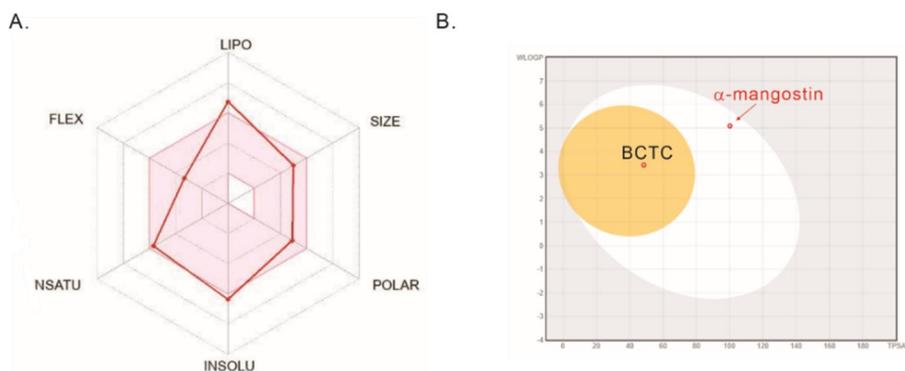
Ion Channel	Binding energy (kcal/mol)
TREK-1	-7.9
TREK-2	-6.4
TRAAK	-6.0
Na _v	-7.7
TRPV1	-7.7

[Figure 8] Molecular docking simulation of α -mangostin to the ion channels. (A-E) Predicted binding poses and interacting residues of α -mangostin to TWIK-related K⁺ channel (TREK)-1, TWIK-related K⁺ channel (TREK)-2, TWIK-related arachidonic acid activated K⁺ channel (TRAAK), voltage-gated Na⁺ channel (Na_v), and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), respectively. (F) Calculated binding energy of α -mangostin to each ion channel.

1.2.7 *In silico* ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) 분석.

α -mangostin이 생체 내에서 처리되는 과정을 ADME를 통해 물리화학적 특성과 약동학을 기반으로 분석하였다. *In silico* ADME 분석에 의하면 α -mangostin은 적합한 약물 개발 대상으로 제안할 수 있다. Figure 9A를 보면 빨간색 부분은 경구투여시 적합한 물리화학적인 부위를 나타낸다. α -mangostin은 지질 친수성을 제외한 나머지 전 부위에서 약물 개발을 할 수 있는 범주를 만족한다. 다만 높은 지질 친수성을 지닌 α -mangostin은 Bayer 기준을 충족시킬 수는 없지만 다른 제약회사의 약물 개발 기준은 맞출 수 있다.

또한 α -mangostin은 BOILED-Egg 모델에 의하면 위장내 흡수 (하얀 부분)를 할 수 있는 범주에 들어가며 노란색 부분으로 나타난 혈뇌장벽 (blood-brain barrier, BBB)은 투과할 수 없기 때문에 중추신경계의 부작용과 관련한 문제에서는 안전할 수 있을 것으로 추정된다 (Figure 9 B).



[Figure 9] *In silico* ADME and drug-likeness properties of α -mangostin.

(A) Bioavailability radar of α -mangostin, where the red zone indicates suitable lipophilicity, molecular size, flexibility, and solubility for drug development. (B) Boiled-egg plot of α -mangostin and the potent TRPV1 inhibitor BCTC. Yellow, white, and gray areas on the plot represent the blood-brain barrier, human intestinal absorption, and a lack of both, respectively.

[Table 3] *In silico* ADME and toxicity prediction of α -mangostin.

Physicochemical Properties	Formula	C ₂₄ H ₂₆ O ₆
	Molecular weight	410.46 g/mol
	Num. heavy atoms	30
	Num. atom. heavy atoms	14
	Fraction Csp ³	0.29
	Num. rotatable bonds	5
	Num. H-bond acceptors	6
	Num. H-bond donors	3
	Molar Refractivity	119.99
	TPSA	100.13 Å ²
Lipophilicity	Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	4.14
	Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	6.27
	Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	5.09
	Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.19
	Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	5.52
	Consensus Log $P_{o/w}$	4.64
Water Solubility	Log S (ESOL)	-6.35
	Solubility	1.83*10 ⁻⁴ mg/ml; 4.46*10 ⁻⁷ mol/l
	Class	Poorly soluble
Pharmacokinetics	GI absorption	High
	BBB permeant	No
	P-gp substrate	No
	CYP1A2 inhibitor	No
	CYP2C19 inhibitor	No
	CYP2C9 inhibitor	Yes
	CYP2D6 inhibitor	No
	CYP3A4 inhibitor	No
	Log K_p (skin permeation)	-4.35 cm/s
Druglikeness	Lipinski (Pfizer) Rules	Fulfilled
	Ghose	Fulfilled
	Veber (GSK)	Fulfilled
	Egan (Pharmacia)	Fulfilled
	Muegge (Bayer)	No; 1 violation: XLOGP3>5
	Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	Brenk Prediction	2 alerts: isolated alkene and polycyclic aromatic hydrocarbon
	Synthetic accessibility	3.91

Num, Number; BBB, blood–brain barrier; GI, Gastrointestinal.

Log $P_{o/w}$, partition coefficient of a compound between water and 1–octanol.

1.3 고찰

본 연구는 처음으로 유해자극 감지성 통증을 매개하는 주요 이온 채널들을 통해 α -mangostin이 통증을 완화시키는 천연물 진통제로서 다중 효과를 보여줄 수 있음을 밝혀냈다.

작은 크기의 DRG 뉴런을 재료로 TRPV1 채널은 억제 (nM에서 μ M까지), TREK, TRAAK은 활성화, Na_v 는 μ M 농도 범위에 거쳐 억제되었다. 선행 연구에서 α -mangostin에 의한 면역세포의 Orai1 억제를 통해 α -mangostin이 항 염증 작용에 관여함을 밝힌 바 있다 (H. J. Kim et al., 2021). 본 연구는 유해자극 감지성 통증을 완화하는 천연 추출물로 α -mangostin을 사용해 다양한 이온 채널들의 변화를 통한 이전의 in vivo 실험으로 알려진 α -mangostin의 진통 작용이 DRG 뉴런의 여러 이온채널들을 통하여 일어날 가능성을 제시하였다.

α -mangostin을 처리하면 TRPV1 채널 억제로 인한 receptor potential의 활성 감소, TREKs과 TRAAK의 활성화와 TTX-S Na_v 의 억제 현상은 세포막의 안정화 및 활동전압 형성을 방해함으로써 유해자극 감지성 통증을 완화하는 기전임을 제안한다. 따라서 α -mangostin은 통증 신호를 전달 및 전도시키는 과정을 여러 이온채널을 통해 조절함으로써 통증 완화 효과 가능성을 입증하였다.

1.3.1 TREK/TRAAK 활성화를 통한 막전압 안정화.

신경세포 활성을 조절하는 채널들 중에 K2P는 활동전압 생성 전 임계값 아래에서 세포의 RMP 유지에 기여한다 (Benarroch, 2015; Plant, 2012).

α -mangostin 농도를 μ M 단위에서 점차 높여주면 TREK-1, TREK-

2, TRAAK의 전류 증가를 확인하였다. 이때 TREKs이 TRAAK 보다 두드러지게 활성화 하는데 (Figure 4, 5) 이는 분자 도킹 시뮬레이션에서 확인했던 에너지 준위 값과 상응하는 결과다 (Figure 8). 1 μ M, 3 μ M α -mangostin을 DRG 뉴런에 처리하게 되면 RMP는 점차 과분극이 일어나고, rheobase 전류 크기를 증가시키면서 활동전압을 유도하지만 더 이상의 활동전압이 발생하지 않는다. 하지만 실험을 진행했던 모든 DRG 뉴런에서 위와 같은 현상이 나타난 것은 아니었다. 크기가 작은 DRG 뉴런 중에서도 20% 미만은 α -mangostin에 의한 RMP 과분극을 관찰할 수 없었다. 세포마다의 편차는 각 K2P 발현 차이를 반영하는 것으로 추정할 수 있다.

다수의 논문에서 보고했듯이 DRG와 trigeminal neuron(TG)에 발현되어 있는 K2P에는 TREKs, TASKs, TRAAK, TRESK가 있다. 크기가 작거나 중간 크기의 DRG 뉴런은 TREK-2와 TRESK의 발현이 큰 비중을 차지하고 TREK-1과 TRAAK은 상대적으로 작은 비중을 차지한다 (Kang & Kim, 2006; Mathie & Veale, 2015).

또한 본 연구에서 확인한 바 HEK293T에 일시적으로 TRESK를 과발현한 세포에서 α -mangostin 농도를 높여도 TRESK의 활성화는 관찰할 수 없었다. 이는 간혹 DRG neuron에서 α -mangostin에 의한 막전압 과분극 현상을 볼 수 없었던 까닭이 TRESK가 TREK-1/-2, TRAAK 보다 우세하게 발현되어 있기 때문이라고 추측할 수 있다.

1.3.2 TTX-s Na_v 전류의 억제 및 Na_v subtype 규명의 한계성.

3 μ M α -mangostin에 의한 Na_v 전류 크기 감소와 활동전압의 억제 현상은 유의하게 나타났다. 활동전압 형성이 점차 억제되기 때문에 rheobase 전류 주입을 점진적으로 높여도 활동전압은 재생성 되지 않았

다. 3 μM α -mangostin에 의해 활동전압이 강하게 억제되는 것은 TREK/TRAAK 과 Na_v 간의 이중효과 때문으로 사료된다.

DRG 뉴런에는 TTX-S (Na_v 1.6, Na_v 1.7)와 TTX-R (Na_v 1.8) Na_v 채널의 발현 비율이 다른 Na_v 종류에 비해 높게 발현되어 있다 (Benarroch, 2015). 본 연구에서는 α -mangostin에 의해 억제되는 Na_v 의 특징이 TTX-S로 밝혔지만 구체적으로 어떤 TTX-S의 종류가 α -mangostin에 의해 억제되는지 규명 하진 못하였다. 하지만 TTX-S 특징을 가진 Na_v 1.6, Na_v 1.7이 DRG 뉴런과 ND7/23 세포에 일반적으로 발현되어 있기 때문에 분자 도킹 모델을 활용하여 α -mangostin이 Na_v 1.7 특정 도메인과 안정적으로 결합하는지 확인했다. 그 결과 Na_v 가 TTX와 결합되는 자리에 α -mangostin이 높은 친화도로 결합하는 것을 확인하였다 (Figure 8 D).

전압 고정 조건에서 DRG 뉴런에 ramp pulse를 가했을 때 -40 mV 이상의 전압 범위에서 외향성 전류가 1 μM , 3 μM α -mangostin에 의해 점차 전류 크기가 감소하였다 (Figure 3 B, D). 또한 1 μM α -mangostin 처리 시 활동전압의 재분극 현상을 대조군과 비교했을 때 재분극이 완전하게 일어나지 않는 것으로 보아 K_v 전류가 α -mangostin에 의해 부분 억제되는 것을 추측할 수 있었다 (Figure 3 E). 불완전한 재분극은 Na_v inactivation로부터 완전하게 전류가 회복되지 못하여 다음 단계 활동전압의 형성을 방해하게 된다. 또한 정확한 K_v 종류를 밝히고자 추가 실험은 진행하지 않았다.

1.3.3 산성 pH로 활성화되는 TRPV1을 억제하지 못한 현상의 의미.

본 연구는 캡사이신에 의해 활성화된 TRPV1 전류가 α -mangostin을

nM 농도만 처리하여도 DRG 뉴런이나 HEK293T에 발현되어 있는 세포 전부에서 전류가 두드러지게 억제되는 것을 관찰하였다. 그러나 캡사이신에 의해 활성화된 TRPV1 전류는 상당히 작은 농도에서도 두드러진 억제현상을 보였으나 산성 pH에 의해 활성화되는 TRPV1은 α -mangostin을 10 μ M이나 높은 농도에서 처리를 해도 강한 저항성을 보이는 흥미로운 결과가 관찰되었다 (Figure 7).

결과를 통해 특정 활성 조건에서만 α -mangostin에 의해 영향을 받은 TRPV1 효과는 진통제 개발에 있어 유용할 것으로 암시된다. 오랜 시간 동안 TRPV1은 진통제 개발 연구 주제로 주요 표적이 되었지만 임상적으로 TRPV1만 표적화 시킨 진통제를 사용하게 되면 고열을 통제하는 점에서 한계성이 드러난다 (Garami et al., 2010; Ramsay et al., 2018; Romanovsky et al., 2009).

TRPV1 길항제 사용시 복잡하고 다양한 이유로 이상 고열 (hyperthermia)을 유발하는 부작용이 다양한 종들에 대해 보고되었고 TRPV1 활성화인자 (열, 양성자, 캡사이신)에 따라 상이한 반응을 보였다. 생쥐의 경우 양성자에 의해 활성화되는 TRPV1을 저해하는 길항제를 사용했을 때 이상 고열의 민감도가 높게 나타났다. 반면 사람은 모든 TRPV1 활성화인자의 정도에 따라 고열이 발생했는데 캡사이신에 의해 활성화되는 TRPV1을 차단하는 길항제가 열이나 양성자에 의해 활성화된 TRPV1 길항제보다 고열에 덜 민감하게 반응하였다 (Garami et al., 2010; Garami et al., 2020).

생쥐는 복부 내장에 있는 구심성 뉴런의 양성자로 활성화된 TRPV1을 길항제로 약간 억제시켰는데 이 과정에서 온도조절 장애가 보고되었다 (Garami et al., 2010). 양성자나 열에 의한 고열 부작용 또는 온도 항상성의 중요한 영역인 (Romanovsky et al., 2009) 시상 전 영역과 시상 하

부 전방에서 TRPV1의 억제제는 드물지만 저체온증 역시 유발되었다.

사람은 다양한 길항제를 투여하였고 후보군 약물도 투여하였을 때 양성이나 열에 의해 활성화된 TRPV1 길항제에 대한 부작용이 다수 보고되었다. 다만 캡사이신에 의해 활성화된 TRPV1을 타겟으로 하면 온도 부작용은 다른 요인들에 비해 발생 확률이 낮다는 메타분석을 기반으로 추후 진통제를 개발하기 위해선 캡사이신에 의해서만 활성화된 TRPV1만 목표로 하여 고열 부작용을 최소화하는 것이 안전한 진통제 후보군이 될 가능성이 있다 (Garami et al., 2020).

더욱이 약물 개발 시에 고려할 점은 약물의 혈뇌장벽 투과도는 낮거나 없어야한다. *In silico* ADME 분석을 통해서 α -mangostin이 혈뇌장벽을 통과하지 않는 것을 확인했다. 따라서 α -mangostin이나 α -mangostin의 부산물 등으로 캡사이신에 의해 활성화된 TRPV1만 표적으로 하는 진통제를 개발하는 것은 안정적이고 상당히 유망하다고 간주된다.

1.3.4 *In silico* ADME 분석을 통한 α -mangostin의 약 개발 가능성.

실질적으로 약물을 인체에 적용하기 위해선 생체 활성 화합물의 약물 유사성 및 약물 개발 가능성을 확인할 수 있는 ADME 분석 검증이 필요하다.

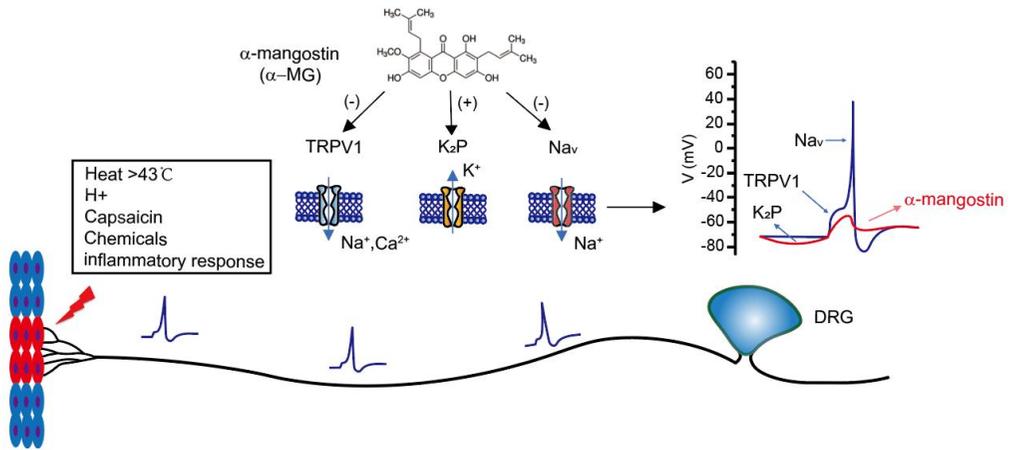
In silico ADME를 활용해 약물 후보의 물리화학적 특성 및 약동학을 가상 추정하였다 (Daina et al., 2017). *In silico* ADME 시뮬레이션은 Lipinski(Pfizer), Veber(GSK), Muegge(Bayer), Egan(Pharmacia) 및 Ghose의 기준에 따라 α -mangostin의 약물 유사 특성을 입증하였다. 주요 제약회사에서 제시하는 기준 및 값은 주로 경구 투여가 가능한 생체 적합성에 필요한 물리화학적 특성을 반영한다.

가상 분석에 따르면 α -mangostin은 Muegge(Bayer)의 기준을 제외한 다른 제약회사들의 약 개발 허용 범위에 도달 하였는데 친유성의 지표인 n-octanol/물 분배 계수(log Po/w) 가 Muegge 표준 수치($-2 \leq XLOGP3 \leq 5$)보다 더 높았다 (Muegge et al., 2001). 물 용해도가 낮음에도 α -mangostin의 높은 지질 친화성 (-4.35 cm/s)은 피부를 투과해 효과적으로 적용될 수 있다 (Table 3). 대표적인 국소 비스테로이드 항염증제 (NSAIDs)인 디클로페낙 (diclofenac)은 Kp 값이 -4.96 cm/s 로 예측되는데 (Daina et al., 2017) α -mangostin과 근사한 값을 가지고 있다. 약물 개발 가능성을 분석한 결과 α -mangostin이 국소 진통제로서의 효능 가능성 및 실용성을 제안한다.

1.3.5 α -mangostin의 독성.

MTT 분석을 통해 α -mangostin이 $10 \mu\text{M}$ 이상에서는 독성을 보였지만 $3 \mu\text{M}$ 이하에서는 세포 증식이 활성을 띠었다. 기존 *in vitro* 연구에 따르면 상대적으로 낮은 농도의 α -mangostin은 신경을 보호하는 특징을 가지고 있는 것으로 보고되었다 (Ruankham et al., 2021; Tiwari et al., 2021; Yang et al., 2021). 백서나 생쥐에서 α -mangostin의 독성 평가를 진행하였을 때는 특이점이 없었으나 (Bullangpoti et al., 2007; Nelli et al., 2013) 제브라피쉬는 기형유발에 대한 경향성이 보고되었기 때문에 (Kittipasallop et al., 2018) 향후 독성 연구 진행을 할 때는 이 점을 고려해야한다.

1.4 결 론



[Figure 10] Schematic illustration of the analgesic mechanism of α -mangostin in nociceptive dorsal root ganglion (DRG) neurons.

본 연구는 α -mangostin에 의해 TREK/TRAAK 채널을 활성화하고, TTX-S Na_v 억제제를 통하여 신경세포의 막전압을 안정시킴과 동시에 활동전압의 형성의 저해를 관찰하였다. 또한 α -mangostin은 가장 잘 알려진 통각 수용체중 하나인 TRPV1을 nM 농도에서부터 강력하게 억제함으로서 중추신경계까지의 통증 신호 전달을 차단할 수 있다. 위와 같은 연구 결과를 기반으로 본 연구는 α -mangostin이 통증을 매개하는 여러 이온 채널을 조절하는 효과적인 천연물 진통제 후보임을 제안한다.

제 2 부

Multiple effects of Echinochrome A (Ech
A) on selected ion channels implicated in
skin physiology

2.1 서 론

2.1.1 피부기능 및 각질형성세포(Keratinocytes) 이온채널.

피부는 신체의 가장 큰 기관으로 과도한 수분 손실 및 신체의 온도 유지에 도움을 준다. 게다가 외부의 물리적, 화학적 생물학적 공격에 대해 보호하는 필수적 기능 역시 수행한다. 피부의 표피는 다층의 각질형성세포로 구성되어 있으며 각질형성세포는 신체 보호와 피부 장벽 형성에 중요하다 (Kanitakis, 2002).

각질형성세포에는 transient receptor potential vanilloid (TRPV)계열 이온채널과 CRAC, K2P 등이 발견되어 있으며 피부의 분화, 감각활동, 염증 반응에 관여한다 (Kang et al., 2007; Peier et al., 2002; M. Vandenberghe et al., 2013). TRPV 계열 중에서 TRPV3는 특히 피부 각질형성세포에 풍부하게 발현이 되어 있어 피부 장벽 형성 및 기능, 피부 질환에 큰 비중을 차지한다 TRPV3 기능획득 돌연변이에 의한 Olmsted syndrome 은 가려움증과 면역 체계의 기능 장애가 발생하는데 이에 TRPV3가 가려움증 신호 전달에 핵심적인 역할을 하는 것으로 드러났다 (He et al., 2015; Wang & Wang, 2017).

각질형성세포에서 TRPV3의 활성화 또는 자극은 세포 내 ATP 방출을 일으키는데 ATP는 각질형성세포에서 유래한 통증 신호 전달 매개체로 고려되어진다 (Mandadi et al., 2009). 또한 각질형성세포에서 유래한 TRPV3에 의해 방출된 일산화질소(NO)는 상처 치료를 촉진시키거나 통증을 유도하기도 한다 (Yoshida et al., 2006).세포 내에서 TRPV3를 조절하는 인자들이 통증을 감소시키는 역할을 한다는 연구 결과들은 각질형성세포에서 TRPV3가 통각 수용성을 조절한다는 것 역시 시사한다 (Wang and Wang., 2017).

Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channels (CRAC)은 각질형성세포로 구성되어

있는 피부 표피 중 기저면에 분포해 있으면서 칼슘을 조절하고 세포의 항상성 유지에 기여한다. CRAC은 Orai1/STIM1 복합체로 활성화하는 채널로서 ER에 있는 Ca^{2+} 저장소의 고갈로 다시 Ca^{2+} 유입을 유도하는 SOCE (store operated Ca^{2+} entry)에 의해 드러나게 된다. CRAC은 ER의 세포막에 있는 STIM1과 세포막에 존재하는 Orai1의 상호 작용에 의해 작동한다 (Prakriya et al., 2006).

Orai1/STIM1 복합체는 칼슘을 공급하면서 각질형성세포를 계속해서 증식시키고 세포 이동에 주로 영향을 미친다 (Matthieu Vandenberghe et al., 2013). Orai1/STIM1 복합체가 손상될 경우 상처 치유를 지연시키고 생체 내에서 각질형성세포의 비정상적인 분화를 유도한다. 따라서 피부 표피 각질형성세포에 있는 Orai1/STIM1 복합체는 피부 장벽에 관한 피부 질환이나 염증, 아토피성 피부염을 치료의 주요 타겟이 될 수 있다 (Takei et al., 2016).

2.1.2 면역세포에 발현되어 있는 이온채널.

감각 뉴런 말단에 분포한 이온채널과 면역세포에 발현되어 있는 특정 이온채널의 경우 다양한 피부 질환 및 말초 통증 조절의 흥미로운 타겟이 된다 (Bennett & Woods, 2014; Wulff et al., 2003).

K2P 중 TREK, TRAAK 그리고 TRESK는 유해자극 감지성 감각 뉴런에서 세포의 막전압을 안정화하고 유지시키는데 기여하는 것으로 알려져 있다 (Gada & Plant, 2019; Mathie et al., 2021). TREK-2는 특히 피부 각질형성세포에 주로 발현되어 있고 면역세포에도 발현되어 있다 (Choi et al., 2021; Zheng et al., 2009). 그러나 TREK-2보다 면역세포의 활성화에 주로 관여하고 조절하는 건 Orai1/STIM1 복합체로 알려져 있다 (Vaeth et al., 2020; Yan et al., 2019).

Orai1/STIM1은 칼슘 신호를 조절함으로써 비만세포나 T 세포의 기능

활성화에 핵심 역할을 한다. 칼슘 신호는 T 세포의 활성화에 있어 결정적인 역할을 하는 NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell)을 조절하며 사이토카인 생산이나 면역 세포 증식에 도움을 준다. 만약 Orai1/STIM1의 돌연변이가 생기거나 결손이 되면 심각한 면역결핍증이 유발될 수 있는데 Orai1에 영향을 미치는 유전적 결함을 가진 환자는 심각한 복합 면역 결핍 증후군으로 인해 SOCE 및 CRAC 기능의 장애를 보인다 (Feske, 2007).

또한 Orai1의 유전적 결실은 T세포와 비만세포의 기능을 손상시키기도 하지만 다양한 동물 모델에서 염증을 악화시키는 연구 결과들도 보고되었다 (Baba et al., 2008; Feske, 2007; McCarl et al., 2010). 따라서 Orai1/STIM1 복합체의 저해제는 염증성 질환을 완화하기 위한 치료제로 고려할 수 있다.

2.1.3 Echinochrome A (Ech A)와 피부 질환 연구.

최근 피부 질환 치료나 화장품을 만들기 위한 새롭고 효과적이며 안전한 분자를 사용하는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 천연물이나 특정 화학물질들은 피부 질병 치료에 있어 인기있는 요소로 항 염증, 항 박테리아, 색소침착방지, 주름 형성 방지를 위해 개발 및 사용되고 있다. 이런 효과는 주로 항산화 활동을 포함한 생화학적 신호에 의해 설명될 수 있다 (Kim & Lee, 2018; Majtan et al., 2021).

Echinochrome A (6-ethyl-2,3,5,7,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone, Ech A)는 해양성 동물에서 추출한 색소로 생물학적활성 요소가 풍부하게 잠재되어 있는 원료다. Ech A는 암적색의 색소로 바다 성게의 가시로부터 추출한 활성 약물 물질로서 러시아에서 HistoChrome® 로 실제 치료제로 상용화되고 있다.

HistoChrome® 은 눈의 염증, 녹내장, 심장 질환이 있는 환자 혹은 동물모델에 투여하여 치료제로 사용하고 있고 (Aleksandr A. Artyukov

et al., 2020; Egorov et al., 1999; Mishchenko et al., 2003), 여러 질병들에 대항하여 황산화 활동과 ROS에 의해 매개되는 신호 조절을 통해 긍정적인 효과를 가져온다는 보고들이 있었다 (Ahn et al., 2022; Jeong et al., 2014; Lennikov et al., 2014). 또한 Ech A는 위궤양 모델에도 약리학적 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으며 대장염 동물 모델에서 면역 세포의 극성을 변화시키는 것으로 알려져 있다 (Oh et al., 2019; Sayed et al., 2018).

Ech A는 피부와 관련된 증상으로 피부 섬유증이나 bleomycin에 의해 유도된 피부 경피증 모델의 염증에도 영향을 끼친다는 보고가 있었다 (Park et al., 2021). UVB로 유도된 피부 광 노화 생쥐한테 Ech A를 주입해주면 경피의 수분 손실을 낮춰주고 조직 염증 변화와 콜라겐 퇴화를 약화시키는 연구 역시 보고됐었다 (Seol et al., 2021). 또한 Ech A는 아토피 피부염 (AD) 유사 피부 병변을 완화시키고 비만 세포 침윤 억제 및 경피 수분 손실을 감소시키는데 기여한다 (Yun et al., 2021).

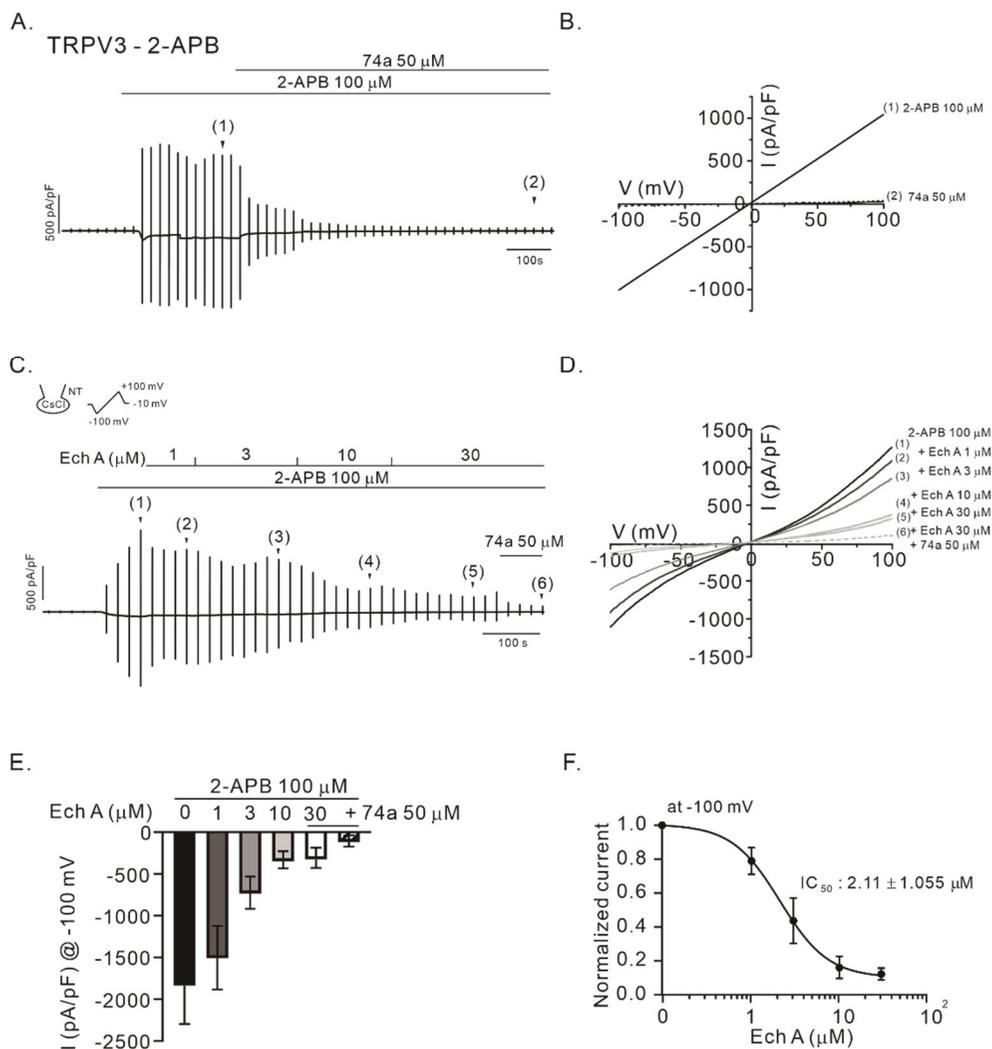
하지만 이전에 보고된 피부 질환에서 Ech A의 활성화 기전은 화학적 신호 전달 경로만 보고되었고 피부조직을 구성하는 세포에서 발견되는 이온 채널에 대한 Ech A의 약리학적 효과에 대한 연구는 보고된 바 없었다. 그러므로 본 연구는 전세포 패치클램프를 이용하여 피부 각질형성세포에 발견되어 있는 TRPV3, CRAC, TREK-2와 면역 세포에 발견되어 있는 CRAC, TASK-1, TREK-2 그리고 DRG 신경 말단에 발견되어 있는 TREK/TRAAK, TRESK, TRPV3에 대한 이온채널 연구를 수행하였다. 본 연구 결과는 처음으로 각 기능에 대해 알려진 이온 채널에 대해 Ech A의 흥미로운 작용 입증 및 이전에 보고된 항 염증 효과에 대하여 추가적인 약리 기전을 제안한다.

2.2 결 과

2.2.1 Ech A에 의한 TRPV3 와 CRAC 활성화 억제.

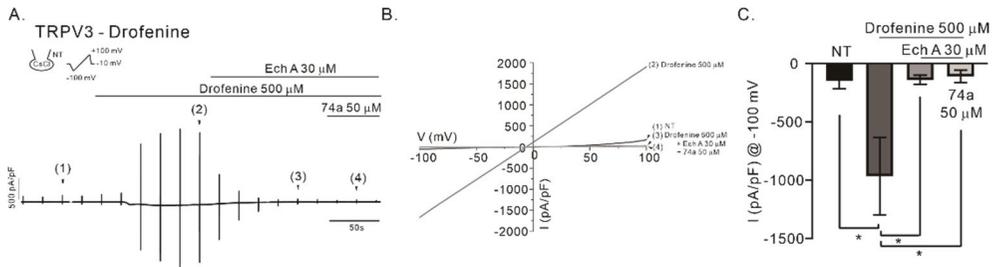
TRPV3 전류를 측정하기 위해 CsCl로 세포 내부 용액을 만들고 2-APB 100 μM 을 처리하여 TRPV3 전류를 활성화시켰다 (Wang et al., 2017). 전세포 패치클램프로 -100 mV 부터 $+100\text{ mV}$ 까지 20 초 간격으로 ramp pulse를 가했다. 먼저 대조군의 경우 2-APB로 TRPV3를 활성화시킨 후 TRPV3 억제제로 알려진 74a를 50 μM 추가하여 TRPV3 전류가 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 11 A, B). Ech A의 효과를 알아보기 위해 TRPV3 전류의 최대 활성 크기가 안정하게 유지되면 Ech A를 1 μM 부터 30 μM 까지 순차적으로 농도를 높이면서 세포 외부 용액에 첨가하여 관류했다. 그 결과 Ech A 농도가 증가하면서 TRPV3 전류의 크기는 점차 감소하였다. 각각의 실험을 수행할 때에는 마지막에 74a를 50 μM 처리하여 TRPV3 전류를 완전하게 억제했다 (Figure 11 C-E). 위 실험에 대해 -100 mV 에서 기록한 전류 크기의 최대값을 기준으로 전류의 절대값을 막대 그래프로 나타냈다(I/I_{max}). 로지스틱 함수를 이용하여 측정된 최대 활성 전류에서 74a 50 μM 에 의해 억제된 전류 값을 배제한 전류 값을 표준화해서 IC_{50} 값 $2.11 \pm 1.055\ \mu\text{M}$ ($n=6$)을 도출했다 (Figure 11 E, F).

TRPV3의 또다른 작용제인 drofenine 500 μM 을 처리하였을 때도 Ech A에 의해 전류 크기가 억제되는 현상을 관찰하였다 (Figure 12).



[Figure 11] Effects of Ech A on I_{TRPV3} activated by 2-APB.

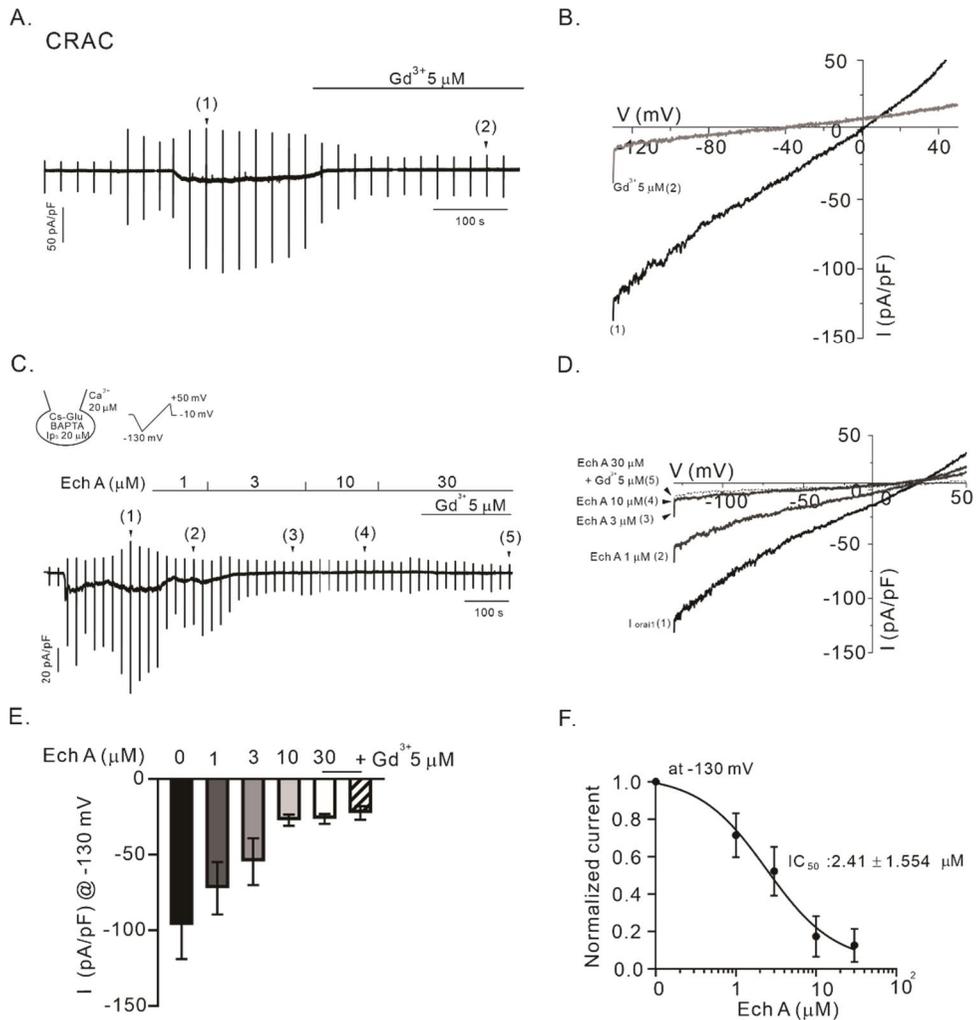
(A, C) An original trace of membrane current density (pA/pF) demonstrating the activation of TRPV3 by 100 μ M 2-APB and its inhibition by 74a (A) or by Ech A (C). Vertical lines indicate current density obtained by ramp-like pulses from -100 to 100 mV (holding voltage, -10 mV) applied with an interval of 20 s. I/V curves are recorded at the points indicated by the numbers in parentheses (B, D). (E) Summary of the inward current densities (pA/pF, at -100 mV) activated by 2-APB and with Ech A or 74a (n=6). (F) Semi-logarithmic plot of the normalized current according to the incremental concentrations of Ech A, and fitting with a logistic function (IC₅₀, 2.11 \pm 1.055 μ M, n=6). The inward current at -100 mV was normalized to the maximum I_{TRPV3} (peak inward current with 2-APB subtracted with the residual inward current with 74a) in each cell.



[Figure 12] Effects of Ech A on I_{TRPV3} activated by drofenine.

(A) Representative trace of membrane current demonstrating the activation of TRPV3 by 500 μM drofenine and its inhibition by Ech A or by 74a. (B) I/V curves were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 100 mV. (C) Summary of the inward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at -100 mV activated by 500 μM drofenine and with 30 μM Ech A or 50 μM 74a ($n=4$). Data were analyzed using one-way analysis of variance. Data represent the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$.

CRAC을 기록하기 위해 세포 내부 용액은 CsCl, 20 μM IP₃, 20 mM BAPTA를 사용했고 Orai1과 STIM1은 HEK 293 세포에 동일한 양으로 공발현시켰다. 전세포 패치클램프 조건이 형성되면 CRAC의 내향전류는 자발적으로 활성화된다. 먼저 CRAC 전류가 안정적으로 유지된 후 실험 마지막에는 칼슘채널의 억제제로 잘 알려진 GdCl₃를 5 μM 처리하여 전류를 억제하였다. 전류의 활성 상태가 안정하게 유지되면 Ech A 농도를 1 μM 부터 30 μM 까지 순차적으로 농도를 증가시키면서 세포 외부 용액에 첨가하여 관류했다 (Figure 13 C, D). -130 mV 기준으로 측정된 전류의 절대값을 막대그래프로 만들었고 (Figure 13 E) 측정된 최대 활성 전류에서 Gd³⁺에 의해 억제된 전류 값을 배제한 후 전류 값을 표준화하여 IC₅₀ 값 2.41 \pm 1.554 μM 을 도출했다 (Figure 13 F).

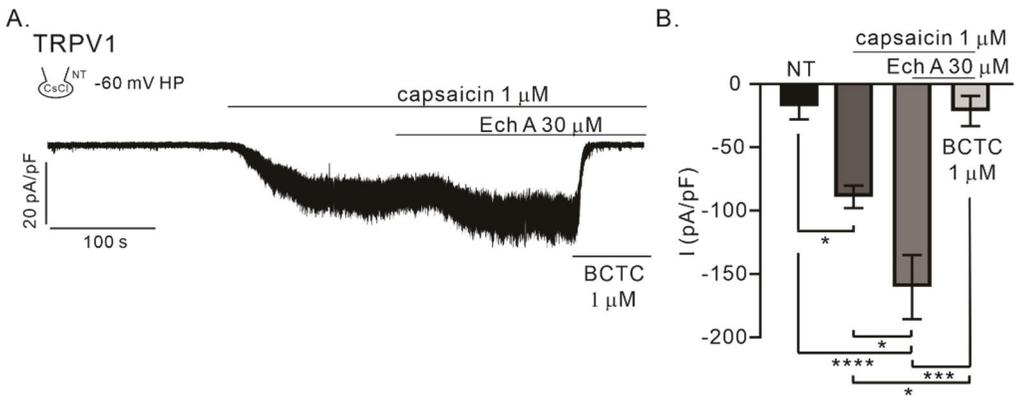


[Figure 13] Inhibitory effects of Ech A on I_{CRAC} .

(A, C) Representative traces of membrane current density (pA/pF) with responses to repetitive ramp-like voltage clamp pulses from -130 to 50 mV, 0.2 V/s (vertical lines) with CsCl pipette solution containing 20 μ M InsP_3 and 20 mM BAPTA. After making a whole-cell configuration, spontaneous activation of I_{CRAC} was observed, and the concentration-dependent inhibition of I_{CRAC} by Ech A (C) or by 5 μ M of GdCl_3 (A, C) was confirmed. (B, D) I/V curves recorded at the points indicated by the numbers in parentheses. (E) Summary of the inward current densities (pA/pF) measured at -130 mV in control, and with incremental concentrations of Ech A ($n=6$). (F) Semi-logarithmic plot of the normalized current according to the concentrations of Ech A, and fitting with a logistic function (IC_{50} , 2.41 ± 1.554 μ M, $n=6$). The inward current at -130 mV was normalized to the maximum I_{CRAC} (the peak inward current subtracted with the residual inward current with GdCl_3) in each cell.

2.2.2 Ech A에 의한 TRPV1 활성화.

TRPV1은 캡사이신에 의해 채널이 활성화된다. -60 mV로 전압을 고정시킨 후, 캡사이신 $1 \mu\text{M}$ 을 처리하여 TRPV1의 내향성 전류를 활성화하였다. 앞선 TRPV3와 CRAC의 실험 결과와 달리, $30 \mu\text{M}$ Ech A을 활성화된 상태에서 첨가하였을 때 내향성 전류의 크기가 캡사이신에 의해 활성화된 전류크기 보다 다소 커졌고 TRPV1의 억제제인 $1 \mu\text{M}$ BCTC를 처리하게 되면 전류가 억제되었다.



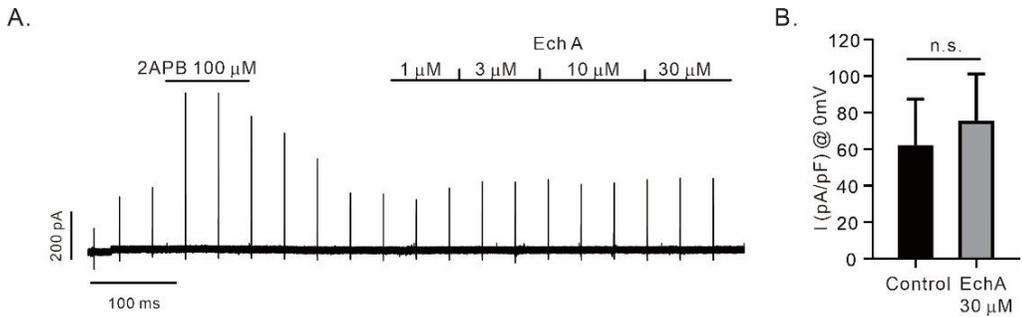
[Figure 14] Effects of Ech A on I_{TRPV1} .

(A) An original trace of the membrane current density (pA/pF) recorded at the holding voltage of -60 mV, demonstrating the activation by capsaicin ($1 \mu\text{M}$) and the additional increase by the combined application of Ech A ($30 \mu\text{M}$). The total inhibition by BCTC ($1 \mu\text{M}$) was confirmed at the end of experiment. (B) A summary of the inward current density of the control (NT), I_{TRPV1} activated by capsaicin, further increased by Ech A, and inhibition by BCTC ($n = 5$). Data were analyzed using one-way analysis of variance. Data represent the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

2.2.3 Ech A에 의한 TREK/TRAAK 작용제 (2-APB, AA, pH 5.5)의 효능 강화.

K2P를 기록하기 위해 KCl로 세포 내부 용액을 채우고 HEK293 세포에 TREK-1 (KCNK2)와 TREK-2 (KCNK10)를 과발현시켰다.

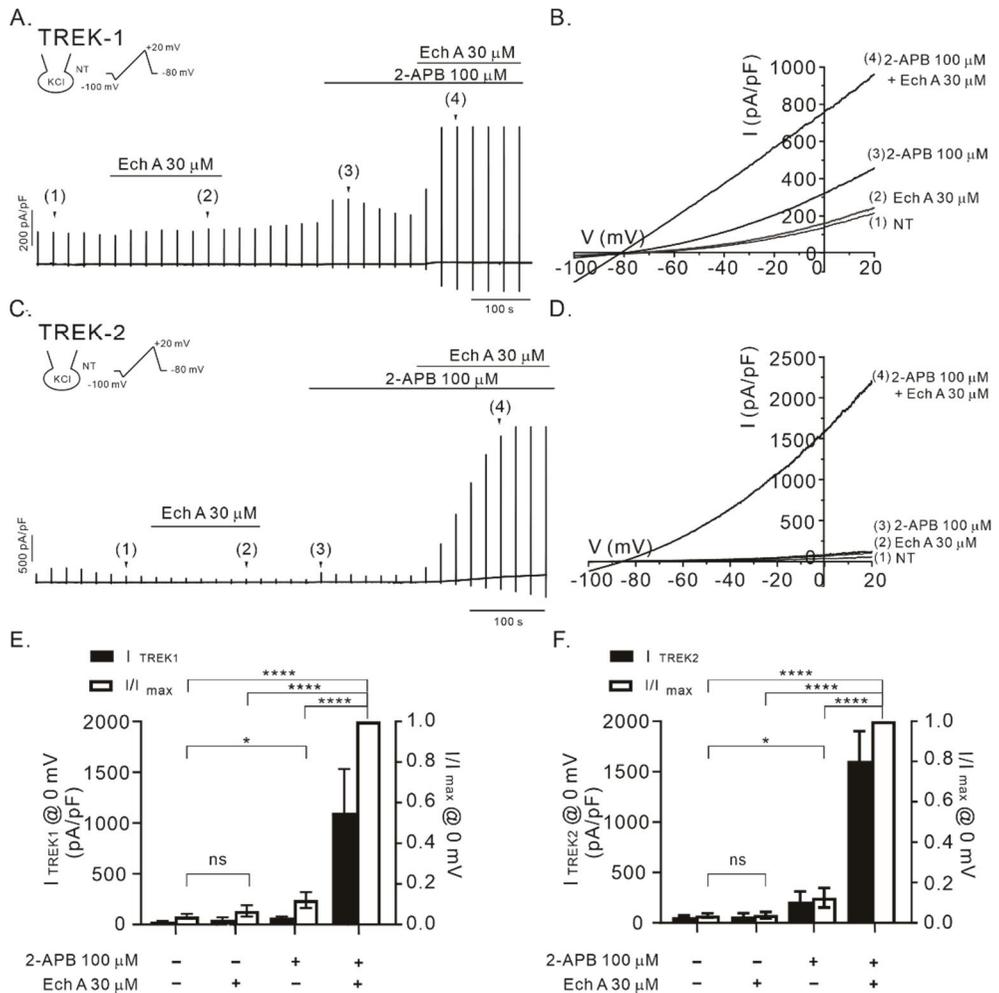
-80 mV 전압고정 조건에서 ramp pulse로 -100 mV부터 +20 mV 까지 20 초간 전압을 가했다. Ech A의 농도를 점차 올리면서 30 μ M까지 세포 외부 용액에 처리했지만 전류 양상에는 변화가 없었다 (Figure 15).



[Figure 15] Ech A alone has no effects on I_{TREK2} .

(A) Representative current traces of TREK-2 treated alone with the concentration dependence of Ech A. (B) Summary of the outward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at 0 mV in control, Ech A (30 μ M). $n=7$. Data represent the *ns*, statistically not significant.

2-APB는 TRPV3의 작용제일 뿐만 아니라 TREK/TRAAK에도 작용제로서 효과를 보인다. 따라서 TREK-1과 TREK-2에 100 μ M 2-APB를 처리하면 전류의 활성을 볼 수 있다. 놀랍게도 2-APB 작용제를 처리한 상태에서 30 μ M Ech A을 동시에 처리하게 되면 TREKs이 급격하게 활성화되면서 전류가 두드러지게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 16). 또한 실험을 수행하면서 상대적으로 낮은 농도인 3 μ M Ech A에서도 TREKs 작용제와 함께 처리하면 30 μ M Ech A 처리에서 보인 전류의 활성증강 효과가 관찰되었다.

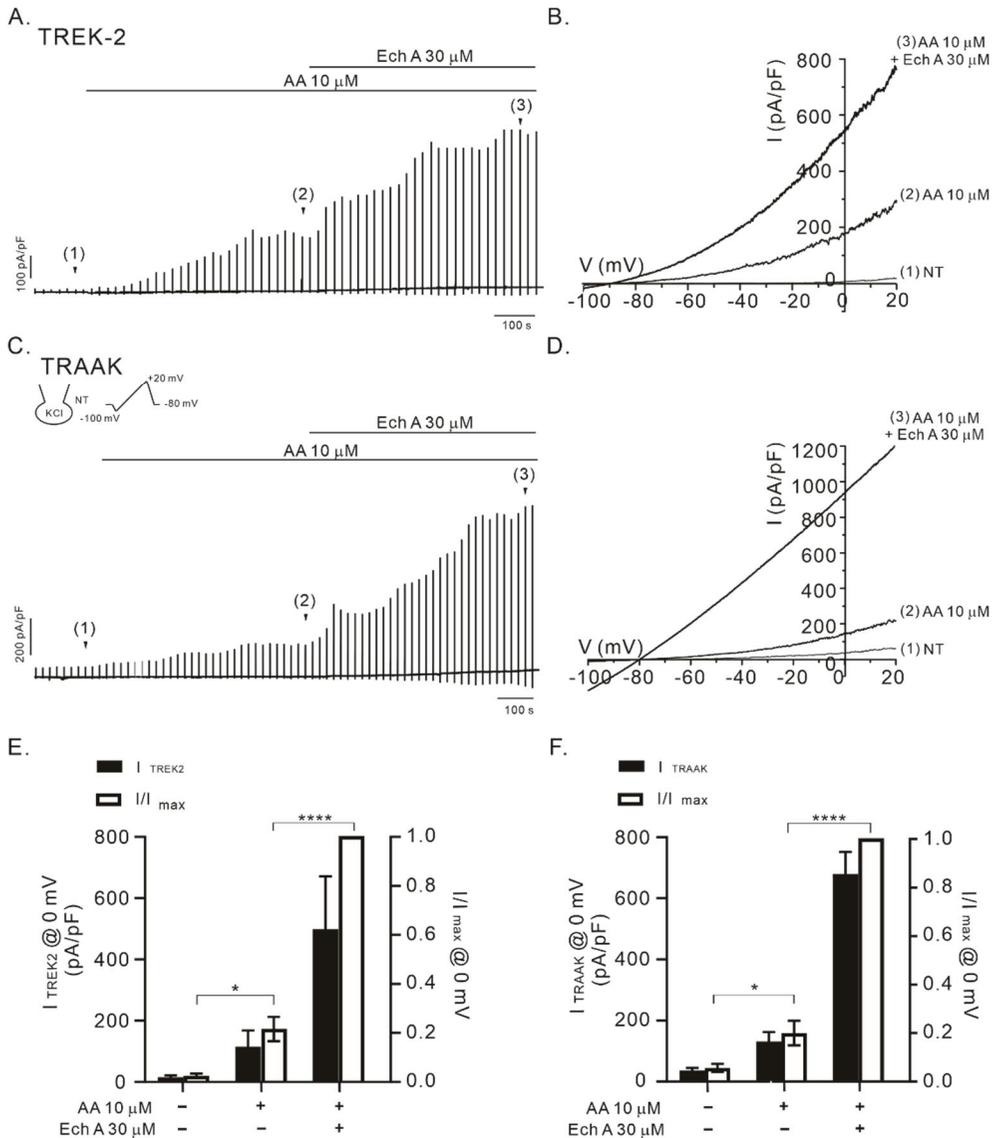


[Figure 16] Facilitating effects of Ech A on I_{TREK1} and I_{TREK2} with 2-APB.

(A, C) Representative traces of membrane current density (pA/pF) recorded with KCl pipette solution in TREK-1 (A) and TREK-2 (C) overexpressed HEK 293 cells. I/V curves were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 20 mV (B, D). (E, F) Summary of the outward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at 0 mV in control, 2-APB (100 μM), Ech A (30 μM), and 2-APB+Ech A (closed bars). The normalized current (I/I_{max} at 0 mV, right axis) against the peak amplitude induced by the combined application of 2-APB and Ech A is also shown (open bars). $n=6$ for TREK-1 (E), and $n=7$ for TREK-2 (F). Data were analyzed using one-way analysis of variance. Data represent the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; ns, statistically not significant.

TREK-1, TREK-2 와 TRAAK은 다불포화지방산인 아라키돈산 (AA)에 의해 채널 활성화가 일어난다 (Gada & Plant, 2019; Maingret et al.,

1999). 앞선 결과와 마찬가지로 2-APB에 Ech A를 추가했을 때 크게 촉진된 채널의 활성화는 AA 10 μM 처리시에도 관찰되었다. HEK 293 세포에 과발현된 TREK-2와 TRAAK 채널은 AA에 의해 외향성 전류가 활성화되고, 30 μM Ech A를 함께 처리하게 되면 전류의 크기가 두드러지게 활성화되는 것을 관찰하였다 (Figure 17).

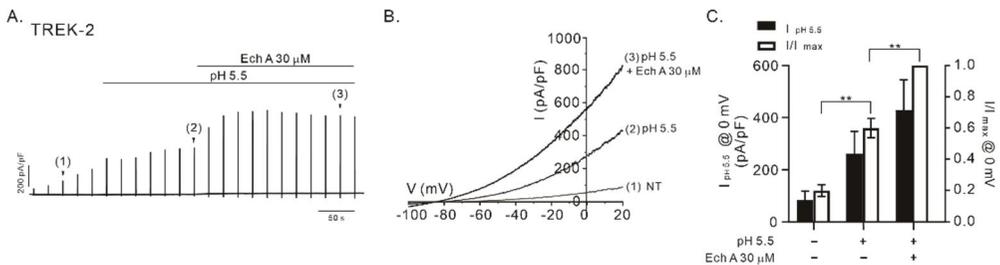


[Figure 17] Facilitating effects of Ech A on I_{TREK2} and I_{TRAAK} with AA.

(A, C) Representative traces of membrane current density (pA/pF) in TREK-2 (A) and TRAAK (C) overexpressed HEK 293 cells. I/V curves were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 20 mV (B,

D). (E, F) Summary of the outward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at 0 mV in control, AA (10 μ M), Ech A (30 μ M), and AA + Ech A (closed bars). The normalized current (I/I_{max} at 0 mV, right axis) against the peak amplitude induced by the combined application of 2-APB and Ech A is also shown (open bars) $n=5$ for TREK-2 (E), and $n=5$ for TRAAK (F). Data were analyzed using one-way analysis of variance. Data represent the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; ns, statistically not significant.

TREK-2는 세포외부의 산성화 조건에서 채널이 활성화되는 특성을 지니고 있다. 세포 외부 pH를 7.4에서 pH 5.5로 낮추게 되면 외향성 전류가 활성화된다 (Figure 18). pH 산성화 조건에서 30 μ M Ech A를 추가하면 다른 작용제들과 마찬가지로 전류의 크기가 증강 활성화된다. 하지만 2-APB나 AA에 의해 촉진 활성화된 전류 크기와 비교했을 시 pH 5.5에 의한 전류의 크기 증가는 다소 작았다.



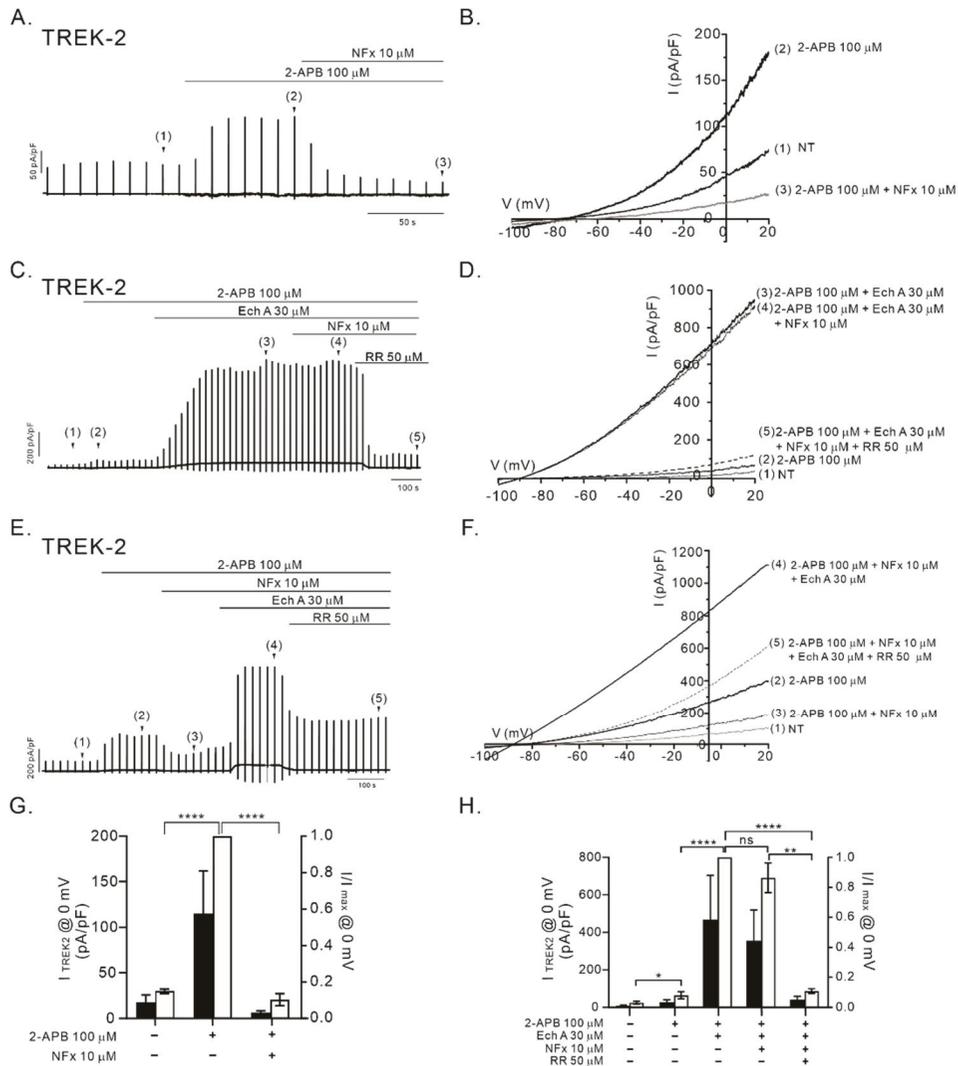
[Figure 18] Facilitating effects of Ech A on I_{TREK2} activated by acidic pHe.

(A) Representative trace of membrane current in TREK-2 overexpressed HEK 293 cells. (B) I/V curves were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 20 mV. (C) Summary of the outward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at 0 mV in control, pHe 5.5, and Ech A (30 μ M) combined with pHe 5.5 (closed bars). The normalized current (I/I_{max} at 0 mV, right axis) against the peak amplitude induced by the combined application of pHe 5.5 and Ech A are also shown (open bars, $n=4$). Data represent the mean \pm SEM. **, $p < 0.01$.

2.2.4 Ech A로 강화 활성화된 TREK-2에 대한 norfluoxetine의 억제효과 소실.

TREK에 작용하는 여러 약리학적 요소들 중 항우울제로 널리 쓰이는 fluoxetine의 활성 대사물질인 norfluoxetine (NFx)는 TREK-1과 TREK-2의 효과적인 억제제로 알려져있다 (Kennard et al., 2005; Proks et al., 2021). NFx에 의한 TREK 억제는 항우울제의 주요 표적으로 삼기에는 부족한 부분이 있지만, NFx는 TREK의 개폐 활성화 기전 및 구조 형태 변화에 대해서는 중요한 관점을 제시한다 (Pope & Minor, 2021; Proks et al., 2021). 본 연구는 2-APB 와 Ech A에 의해 채널이 활성증강된 상태에서 NFx에 의해 전류가 효과적으로 억제되는지 확인하였다.

먼저 NFx의 억제제 효과가 있는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. HEK293 세포에 과발현시킨 TREK-2는 100 μ M 2-APB에 의해 전류 활성 이후 10 μ M NFx에 의해 완전히 전류가 억제되었다 (Figure 17 A, B, E). 흥미롭게도 100 μ M 2-APB 과 30 μ M Ech A을 동시에 처리해 TREK-2 전류가 촉진 활성화된 후에는 10 μ M NFx를 처리해도 전류가 억제되지 않았다. 반면, Ruthenium Red (RR, 50 μ M) 처리시에는 NFx에 의해 억제되지 않았던 전류가 완전히 억제되었다 (Figure 19 C, D, F).

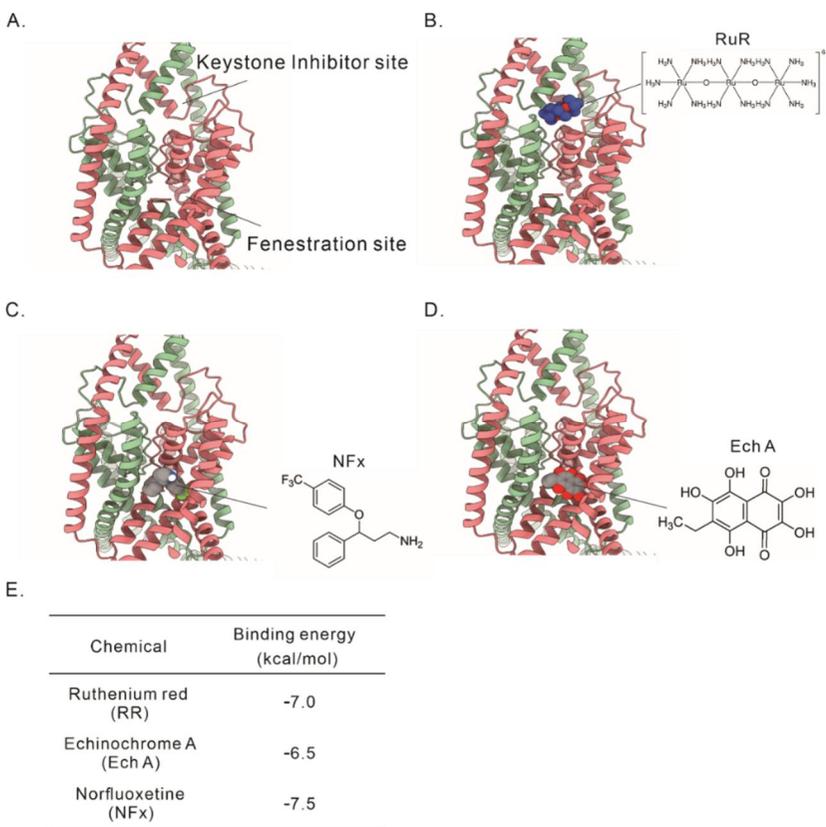


[Figure 19] Disappearance of the inhibitory effect of NFx on the I_{TREK2} facilitated by Ech A.

(A, B) Representative current trace and I/V curve of I_{TREK2} activated by 100 μM 2-APB alone, which was almost completely inhibited by 10 μM NFx. (C, D) Representative current trace and I/V curve of I_{TREK2} activated by 2-APB and 30 μM Ech A, which was not inhibited by 10 μM NFx. The I/V curves were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -100 to 20 mV. (E, F) Representative trace after adding 30 μM Ech A following treatment with 10 μM NFx. (G, H) Summary of the outward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at 0 mV in control, 2-APB, and NFx (closed bars). Summary of the normalized current (I/I_{max} at 0 mV, right axis) against the peak amplitude is also shown (open bars). The inhibition by 50 μM RR is also shown in the panel (F), n=5 for (E), and n=4 for (F). Data represent the mean ± SEM. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ****, p < 0.0001; ns, not statistically significant.

2.2.5 분자결합 모델을 이용한 Ech A의 TREK-2 결합 자리 예측.

AutoDock Vina를 사용하여 이미 알려져 있는 TREK-2 구조에 각 억제제의 결합 자리 및 Ech A의 결합 위치를 추정하여 시뮬레이션을 수행했다. Ruthenium red (RR)는 Keystone inhibitor site에 -7.0 kcal/mol, Norfluoxetine (NFx)은 Fenestration site에 -7.5 kcal/mol의 에너지 값으로 결합하였고 Ech A는 -6.5 kcal/mol로 결합하였다 (Figure 20).^①



[Figure 20] Molecular docking simulation of Ech A to the ion channels. (A-D) Predicted binding poses TWIK-related K⁺ channel (TREK)-2 with inhibitors and Ech A, respectively. (E) Calculated binding energy of Ech A and inhibitors to TREK-2.

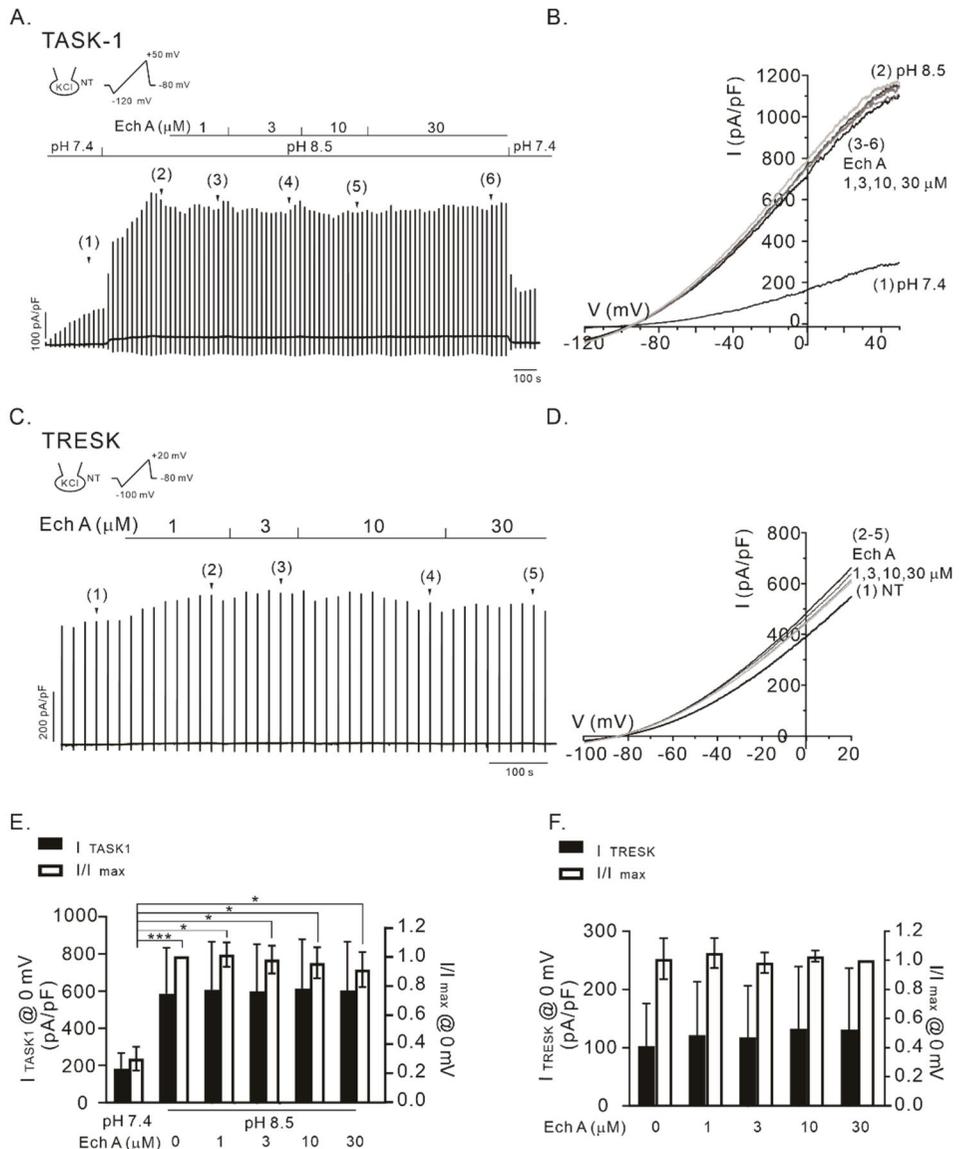
^① 연세대학교 의과학과 박사과정 재학생 노재원 선생이 수행함.

2.2.6 TASK-1과 TRESK에 대한 Ech A의 작용 없음.

K2P 계열의 채널들 중에 TASK-1, TASK-3는 HaCaT 각질형성세포의 RT-PCR 분석을 통해 이온채널이 발현됨이 보고됐었다 (Kang et al., 2007). 따라서 Ech A에 의해 TASK-1 (KCNK5)이 활성화될 것이라는 가정 하에 실험을 수행하였다. TASK-1 (KCNK5)은 세포 외부 알칼리성에 의해 활성화되는 특징을 가지고 있다.

TASK-1 전류 크기는 세포 외부 pH 조건을 7.4 에서 8.5로 올렸을 때 전류 크기가 증가했지만 TREK, TRAAK과는 다르게 TASK-1은 pH 8.5 로 전류의 크기가 증가한 상태에서 30 μ M Ech A을 추가 처리하여도 전류 크기가 증가하지 않았다(Figure 21 A, B, E).

일차구심성 신경세포이고 통각수용체인 DRG 뉴런에는 다양한 K2P가 발현되어 있고 주로 TREK-2와 TRESK (KCNK18, TWIK-related spinal cord K⁺ channel)가 발현되어 있다 (Kang & Kim, 2006). HEK293 세포에 과발현시킨 TRESK는 다른 K2P에 비해 기본적으로 큰 외향 전류가 관찰되었으나 Ech A를 농도별로 처리했을 때에는 전류 크기 변화가 없었다 (Figure 21 C, D, F).



[Figure 21] Effects of Ech A on I_{TASK1} and I_{TRESK} .

(A, B) Representative current trace and I/V curve of I_{TASK1} activated by alkaline pHe 8.5 and the partial inhibitory effect of Ech A. (C, D) Representative current trace and I/V curve of I_{TRESK} . Application of Ech A had no significant effect up to 30 μM . The I/V curves were obtained by ramp-like depolarizing pulses from -120 to 20 mV (vertical lines in (A)) and from -100 to 20 mV (vertical lines in (C)). (E, F) Summary of the outward current densities (pA/pF, left vertical axis) measured at 0 mV (closed bars). Summary of the normalized current (I/I_{max} at 0 mV, right axis) against the peak amplitude is also shown (open bars). $n=3$ for TASK-1 (E), and $n=4$ for TRESK (F). Data represent the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

2.3 고찰

본 연구는 처음으로 Ech A의 다양한 효과를 피부 각질세포, 통각 관련 신경세포, 면역세포에 발현되어 있는 대표적인 이온통로들을 바탕으로 연구를 수행하였다. Ech A를 처리하면 Orai1과 TRPV3는 억제되지만 K2P의 하위그룹인 TREK/TRAAK는 각각의 작용제와 Ech A를 함께 처리하게 되면 전류의 크기가 강력하게 활성 증강된다는 점이 주목할 만하다.

2.3.1 Ech A에 의한 TRPV3 억제 효과.

TRPV3는 열에 민감한 비선택적 양이온 이온채널로 주로 각질세포, 구강 편평 상피, 뉴런에 발현되어 있다 (Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). TRPV3의 활성화는 피부의 구조와 기능 유지에 중요하다 (Cheng et al., 2010; Moqrich et al., 2005). TRPV3의 기능 획득 돌연변이나 기능상실 돌연변이는 Olmsted syndrome, palmoplantar keratoderma 와 같은 질병 요인이 된다 (He et al., 2015; Lin et al., 2012). 또한 동아시아인에서 높은 발현율로 발현되어 있는 TRPV3 p.A628T 돌연변이는 화학 작용제에 반응하면 민감도가 빨라지는 것을 최근 본 연구실에서 보고한 바 있다 (Choi et al., 2019). TRPV3는 피부 염증이나 피부 가려움증과도 연관이 있기에 피부 감각 관련 질병을 치료하는 방안으로 TRPV3 억제제를 찾는 것에 관심이 집중되어있다. 이런 관점에서, 식물에서 유래한 acridone alkaloid TRPV3 억제제 (Han et al., 2021) 및 본 연구에서 수행한 해양성동물에서 유래한 Ech A에 의한 강력한 TRPV3 억제효과는 피부 질환이나 가려움증을 해결하는데 있어 흥미로운 치료 방안이 될 수 있는 가능성을 제시했다.

2.3.2 Ech A에 의한 CRAC 억제 효과.

피부 면역세포에 발현되어 있는 CRAC이 Ech A에 의해 억제되는 현상은 피부 질환을 완화시키는 또 하나의 약리학적 가능성을 확인할 수 있었다. 다양한 세포 종류에서 Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)라 칭하는 ER의 지속되는 Ca^{2+} store의 고갈은 Ca^{2+} 의 유입을 일으키게 되고 Orai1/STIM1에 의해 CRAC이 활성화된다 (McCarl et al., 2010; Prakriya et al., 2006). I_{CRAC} 은 비만세포나 T 세포의 전류-전압 곡선 관계에서 두드러지게 내향성 전류로 나타난다. I_{CRAC} 의 분자적 특성으로선, Orai1은 ER의 세포막에서 Ca^{2+} 을 감지하는 STIM1과 함께 결합하여 세포막에서 Ca^{2+} 을 전도하는 pore unit이다. Orai1을 통한 Ca^{2+} 유입은 Calcineurin 활성화와 NFAT의 연속적인 dephosphorylation 과 밀접하다. Ech A에 의한 CRAC의 억제 현상은 항 염증 작용과 면역세포의 Ca^{2+} 신호를 억제함으로써 아토피 피부질환의 치료 효과에 대해서 부분적인 가능성을 암시한다. 반면, 동물성 유래가 아니어도 curcumin은 T 림프구에서 CRAC을 억제한다 (Shin et al., 2011). 구아바 식물에서 유래한 분자 역시 CRAC을 억제함으로써 멜라닌 생성을 저해한다 (Lee et al., 2016).

2.3.3 Ech A에 의한 TREK/TRAAK의 강력한 활성화.

KCNK의 구조는 4개의 transmembrane domain 과 2개의 pore-forming loop를 공통적으로 가지고 있고 Homodimer 이거나 Heterodimer의 구성으로 K2P를 형성한다. K2P는 다양한 세포에서 전압 비의존성이며 세포의 RMP 유지에 기여한다. 포유류 K2P계열은 6개의 그룹 (TWIK, TASK, TREK/TRAAK, TRESK, THIK, TALK)으로 구성되어 있고 하위 15 개의 이온채널이 있다 (Gada & Plant, 2019;

Mathie et al., 2021; Şterbuleac, 2019).

Ca^{2+} 이 투과되는 TRPV3나 CRAC의 억제 효과와 다르게 Ech A는 TREK-1 (KCNK2), TREK-2 (KCNK10)와 TRAAK (KCNK4) 이온 채널이 각각 작용제 (2-APB, AA)와 결합하게 되면 강력한 활성화를 보였다. 흥미롭게도 Ech A를 단독으로 처리하게 되면 TREK-1, TREK-2, TRAAK의 외향 전류 크기 변화는 관찰되지 않았다 (Figure 15-18). TASK-1과 TRESK 역시 Ech A에 의한 전류 크기는 영향을 받지 않았다 (Figure 21). 따라서 본 연구는 K2P 중 TREK/TRAAK에만 국한하여 Ech A에 의한 이온채널 활성화가 관찰되었음을 보고한다.

TREK-1과 TREK-2는 다양한 물리화학적 요소 (AA, pH, PIP_2 , 온도, 기계적 장력, 2-APB)에 의해 채널 활성이 증가한다. TREK의 여러 자극제들에 대한 각기 다른 민감도는 다양한 세포 신호를 통합하는 역할을 한다 (Mathie et al., 2021; Woo et al., 2019).

특히 기능상실 돌연변이에 의한 TREK의 돌연변이는 질병 단계의 한 범주로 간주할 수 있다. TREK-1 녹아웃 생쥐는 열과 기계적 자극을 받으면 대조군 보다 훨씬 더 민감하게 반응하며 피부 염증 조건에선 TREK-2 siRNA 녹다운이 되면 통증 연관 행위는 증가하게 된다 (Acosta et al., 2014). 또한 TRAAK 녹아웃 생쥐는 기계적 자극과 열 자극에 의한 민감도 증가와 수술 후 신경병성 통증이 증가한다는 보고가 있었다 (McCoull et al., 2021; Noël et al., 2009). In vivo 조건에서는 TREK-1의 작용제가 통증을 완화하는 기질을 지녔다는 연구결과가 보고되었었다 (Djillani et al., 2019). 이 연구는 TREK이 새로운 치료제 개발을 위한 매력적인 표적이 될 수 있다고 시사했다.

하지만 최근 TREK을 표적으로 하는 작용제 및 억제제의 개발에도 불구하고 더 효과적이면서 안정적인 새로운 약리학적 도구가 필요한 실정

이다 (Mathie & Veale, 2015). 이런 관점에서, 본 연구는 그 자체로 직접적인 작용제는 아니지만 Ech A에 의한 강한 전류의 활성화 증강 효과는 TREK 채널을 조절하는 새로운 약리학적 도구임을 제안한다.

2.3.4 Ech A에 의한 TREK-2 구조 변화 가능성.

TREK/TRAAK 계열 중 Ech A에 의한 약리학적 효과를 DRG 뉴런과 피부 각질형성세포 모두 발현되어 있는 TREK-2 (Kang & Kim, 2006; Kang et al., 2007)에 집중해서 분석하였다. 2-APB, AA, 외부 산성 조건과 같이 각기 다른 활성화 조건에서 Ech A에 의해 공통적으로 이온채널의 활성화가 촉진된 것이 관찰되었고 본 연구는 이런 현상이 이온채널의 열린 상태와 복합적으로 관련된 기전이라고 제안한다. 즉, Ech A의 결합자리는 TREK-2 채널이 닫힌 상태에서 열린 상태로 변환될 때만 접근 가능할 수 있다고 추측한다.

TREK의 주요 개폐 기전은 “C-type” 으로 선택적 필터의 조절에 의한 K^+ 통로로 이온이 투과된다 (Proks et al., 2021). 분자 구조 연구와 전기생리학 분석을 통해 TREK의 M4 helix는 움직이면서 “up” 상태와 “down” 상태 사이에서 형태를 정할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 직접적인 증거는 본 연구를 통해 제시할 수 없지만, Ech A의 작용제에 의존한 강력한 TREK-2의 활성화는 TREK-2 가 “up” 상태일 때 결합한 것으로 추정된다.

최근 TREK 채널의 분자 구조 연구에서는 작은 분자와의 결합에 대한 흥미로운 약리학적 기능을 밝혀냈다. TREK의 외부에서 내부 방향으로 먼저 1) Keystone 억제자리와 (Pope & Minor, 2021) 2) K2P 조절 pocket (Lolicato et al., 2017) 3) Fenestration site (Dong et al., 2015; Schewe et al., 2019) 그리고 4) modulatory lipid site (Lolicato et al.,

2017; Proks et al., 2021)가 보고되었다. TREK의 가장 바깥쪽 중심에는 CAP 도메인이라는 고유한 구조가 있다. 통로의 구멍 바로 위의 아치는 이온이 선택성 필터를 통과한 후 통로를 빠져나가는 세포 외 이온 경로 (EIP)를 형성한다.

TREK-2의 여러 자리에 대한 약리학적 특징을 고려했을 때, 본 연구는 TREK-2의 화학적 억제제인 NFx에 의해 TREK-2의 민감도가 변형되는 것으로 추정되는데 이는 본 연구의 흥미로운 결과이다. TREK-2 전류가 작용제인 2-APB, AA에 의해서만 전류가 커졌을 때에는 억제제로 NFx를 처리하면 TREK-2 전류가 완전하게 억제되었다. 하지만 Ech A와 각 이온채널의 작용제와 함께 처리하여 전류가 활성화증강 되었을 때에는 NFx에 의한 전류 억제는 관찰되지 않았으며 Ruthenium Red (RuR)에 의해서만 완전하게 전류가 억제되었다. 순서를 바꾸어 NFx를 먼저 처리하여 TREK-2 채널을 억제시킨 후 Ech A를 첨가하였을 때에도 억제되었던 채널은 다시 활성화되었다 (Figure 19).

RuR는 다가양이온 전하를 갖는 trinuclear oxo-bridged ruthenium 아민이다. RuR는 CAP 도메인의 기저 부분에 위치한 Keystone의 억제 자리에 있는 음(-)전하를 띤 잔기들과 상호 작용을 한다. 대조적으로, NFx는 fenestration 자리에 결합한다. 분자 도킹 모델을 통해 Ech A가 TREK-2의 결합되는 에너지 크기는 -6.5 kcal/mol이고, NFx는 -7.5 kcal/mol로 유사 부위의 결합 가능성이 추정된다. NFx가 다소 안정적으로 결합 에너지를 가지고 있지만 Figure 19를 기반으로 가정하였을 때 NFx에 의한 TREK-2의 억제 결합자리는 Ech A에 의해 비가역적으로 변형될 것이라고 조심스럽게 제안한다 (Figure 20).

앞서 언급했듯이 TREK-2는 M4 helix로 인해 “up”, “down” 상태로 되어 있다 (Dong et al., 2015). “down” 상태는 세포막의 중심부를 열어

주는 두 번째 pore helix (P2) 자리 아래에 있는 fenestration 자리를 형성한다 (Pope & Minor, 2021). TREK 억제제인 NFx는 P2 pore helix의 낮은 부분인 fenestration 자리 및 M4의 “down” 상태에서 결합한다 (Dong et al., 2015). TREK의 알려진 구조적 특성에 기반하면 본 연구에서 NFx의 민감도가 떨어진 것은 TREK-2 구조가 “down”, “up” 상태일 때 Ech A의 영향을 받아 변형된 것이라 추정할 수 있었다.

또한 Ech A가 세포막 자체의 특성을 변형할 수 있는 가능성은 더 고려해 봐야한다. 최근 연구에 따르면 페놀 구조를 가진 phytochemical은 인지질 이중층에 침투하여 그 구조를 변형시켜 막 단백질 기능에 영향을 끼칠 수 있다는 보고가 있었다 (Ingólfsson et al., 2014). 이온채널이 물리적 압력 또는 AA 처리 등으로 세포막의 구조적 불균형을 일으키면서 활성화가 되는 것처럼 Ech A 역시 구조를 변형시킬 가능성에 대해 추측해볼 수 있다. 그러나 Ech A 만으로는 TREKs의 어떠한 반응도 유도할 수 없었으며 AA 및 2-APB 와 같은 작용제가 있는 경우 상당히 강력한 증강활성 효과를 볼 수 있었다.

위 결과들을 토대로 TREK-1 과 TREK-2에 대한 Ech A의 약리학적 효과에는 단순한 구조적 변화뿐만 아니라 복잡한 기전이 관련되어 있는 것으로 여겨진다.

2.3.5 Ech A에 의한 TRPV1 활성화 효과.

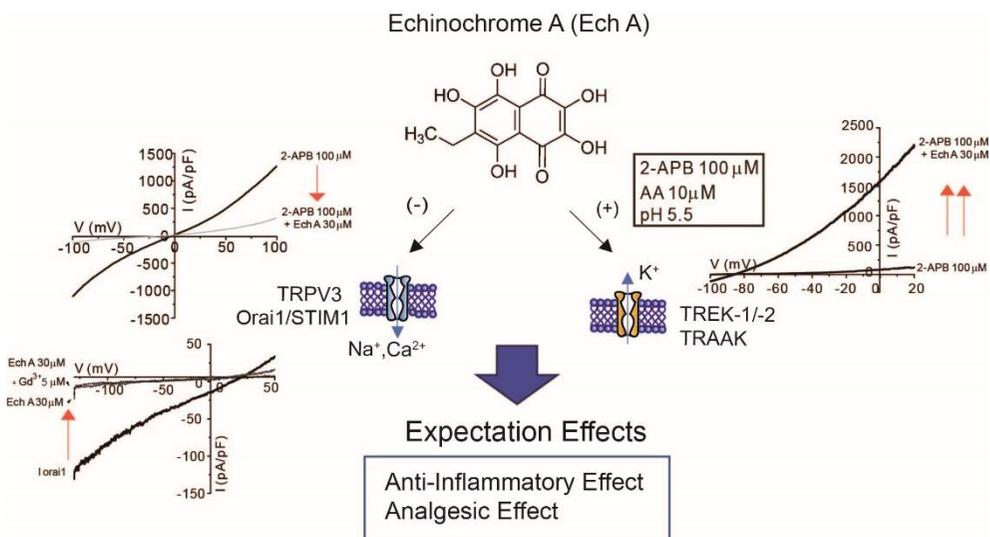
TREK, TRAAK의 증강활성 효과와 더불어 캡사이신에 의해 활성화된 TRPV1 채널 역시 Ech A를 첨가하면서 채널이 더 활성화되었다 (Figure 14). TRPV1은 대표적인 유해자극 감지 채널이기 때문에 (Benarroch, 2015). 캡사이신의 효과를 강화시키는 Ech A의 작용은 예상 밖의 현상이었다. 그러나 Ech A만 투여하였을 때는 TRPV1이 활성화

화되지 않았기 때문에, 이러한 작용이 TRPV1에 대한 캡사이신의 작용만 좀 더 강화시키는 것이었을 가능성이 있다. 향후, 온도 및 산성 pH 등에 의한 TRPV1 활성화를 포함하여 더 다양한 조건에 대한 Ech A의 추가 투여 시 작용을 더 연구할 필요가 있다.

2.3.6 Ech A의 독성.

Ech A는 다양한 생물학적 분자와 활발하게 반응을 하는 quinoid 화합물이다. 본 연구는 직접적으로 피부에 Ech A를 처리하지 않았지만, Ech A를 HistoChrome® 약제로 임상에 적용한 다수의 연구들을 통해 독성이 없음을 간접적으로 파악하였다 (A. A. Artyukov et al., 2020; Egorov et al., 1999; Mishchenko et al., 2003). 또한 Mishchenko 그룹에서는 Ech A의 독성 평가에 대한 결과가 통계적으로 유의하지 않음을 보고했다 (Mishchenko et al., 2020).

2.4 결론



[Figure 22] Schematic illustration of the Ech A effects on selective ion channels.

본 연구는 Ech A의 약리학적 효과를 이온통로 연구를 통하여 처음으로 보고한다. Ech A에 의해 TRPV3와 CRAC은 전류의 억제 현상을 보였지만, TREK/TRAAK의 경우 각 이온통로들의 작용제에 의한 자극과 동시에 Ech A를 함께 처리하면 전류 활성화가 강력하게 증강 활성화되었다. 또한 TREKs의 억제제에 대한 민감도가 변화한 것으로 보아 구조적 측면의 변화에도 영향을 미칠 것으로 추정하였다. Ech A에 의한 이온채널들의 흥미로운 반응은 피부 질병과 함께 이전에 보고된 적 있었던 항염증 효과의 약리학적 기전을 밝힐 수 있었다. Ech A 관련한 피부 질병과 유해자극 감지성 통증에 대한 다양한 치료 효과에 대한 보고를 종합해 봤을 때 Ech A와 이온 채널 그리고 칼슘 신호에 대한 기전 연구는 향후 천연물 기반으로 한 피부질환 치료제를 발굴할 수 있는 좋은 발판이라 사료된다.

참 고 문 헌

- Acosta, C., Djouhri, L., Watkins, R., Berry, C., Bromage, K., & Lawson, S. N. (2014). TREK2 Expressed Selectively in IB4-Binding C-Fiber Nociceptors Hyperpolarizes Their Membrane Potentials and Limits Spontaneous Pain. *The Journal of Neuroscience*, *34*(4), 1494-1509. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4528-13.2014>
- Ahn, J.-S., Shin, Y. Y., Oh, S.-J., Song, M.-H., Kang, M.-J., Park, S. Y., Nguyen, P. T., Nguyen, D. K., Kim, H. K., Han, J., Vasileva, E. A., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., Stonik, V. A., Seo, Y., Lee, B.-C., & Kim, H.-S. (2022). Implication of Echinochrome A in the Plasticity and Damage of Intestinal Epithelium. *Marine Drugs*, *20*(11), 715. Retrieved 2022/11//, from <http://europepmc.org/abstract/MED/36421992>
- Andres-Bilbe, A., Castellanos, A., Pujol-Coma, A., Callejo, G., Comes, N., & Gasull, X. (2020). The Background K(+) Channel TRESK in Sensory Physiology and Pain. *IntJMolSci*, *21*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155206>
- Artyukov, A. A., Zelepuga, E. A., Bogdanovich, L. N., Lupach, N. M., Novikov, V. L., Rutckova, T. A., & Kozlovskaya, E. P. (2020). Marine Polyhydroxynaphthoquinone, Echinochrome A: Prevention of Atherosclerotic Inflammation and Probable Molecular Targets. *J Clin Med*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/jcm9051494>
- Artyukov, A. A., Zelepuga, E. A., Bogdanovich, L. N., Lupach, N. M., Novikov, V. L., Rutckova, T. A., & Kozlovskaya, E. P. (2020). Marine Polyhydroxynaphthoquinone, Echinochrome A: Prevention of Atherosclerotic Inflammation and Probable Molecular Targets. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(5), 1494. <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/5/1494>
- Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat Immunol*, *9*(1), 81-88. <https://doi.org/10.1038/ni1546>
- Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., Sidders, B., Skerratt, S. E., Stevens, E. B., Storer, R. I., & Swain, N. A. (2013). Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(3), 593-624. <https://doi.org/10.1021/jm3011433>
- Benarroch, E. E. (2015). Ion channels in nociceptors. *Recent developments*, *84*(11), 1153-1164. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001382>
- Bennett, D. L., & Woods, C. G. (2014). Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol*, *13*(6), 587-599. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70024-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70024-9)
- Bennett, T. M., Mackay, D. S., Siegfried, C. J., & Shiels, A. (2014). Mutation of the melastatin-related cation channel, TRPM3, underlies inherited

- cataract and glaucoma. *PLoS One*, *9*(8), e104000.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104000>
- Berger, A. A., Liu, Y., Possoit, H., Rogers, A. C., Moore, W., Gress, K., Cornett, E. M., Kaye, A. D., Imani, F., Sadegi, K., Varrassi, G., Viswanath, O., & Urits, I. (2021). Dorsal Root Ganglion (DRG) and Chronic Pain. *Anesth Pain Med*, *11*(2), e113020.
<https://doi.org/10.5812/aapm.113020>
- Berta, T., Qadri, Y., Tan, P. H., & Ji, R. R. (2017). Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opin Ther Targets*, *21*(7), 695–703.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1328057>
- Black, J. A., Liu, S., Tanaka, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2004). Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, *108*(3), 237–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pain.2003.12.035>
- Bullangpoti, V., Visetson, S., Milne, J., Milne, M., Sudthongkong, C., & Pronbanlualap, S. (2007). Effects of alpha-mangostin from mangosteen pericarp extract and imidacloprid on *Nilaparvata lugens* (Stal.) and non-target organisms: toxicity and detoxification mechanism. *Commun Agric Appl Biol Sci*, *72*(3), 431–441.
- Chen, G., Li, Y., Wang, W., & Deng, L. (2018). Bioactivity and pharmacological properties of α -mangostin from the mangosteen fruit: a review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *28*(5), 415–427.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1455829>
- Cheng, X., Jin, J., Hu, L., Shen, D., Dong, X.-p., Samie, M. A., Knoff, J., Eisinger, B., Liu, M.-l., Huang, S. M., Caterina, M. J., Dempsey, P., Michael, L. E., Dlugosz, A. A., Andrews, N. C., Clapham, D. E., & Xu, H. (2010). TRP Channel Regulates EGFR Signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation. *Cell*, *141*(2), 331–343.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.013>
- Choi, S. W., Choi, S. W., Chae, J., Yoo, H. Y., Kim, J. I., & Kim, S. J. (2019). The novel high-frequency variant of TRPV3 p.A628T in East Asians showing faster sensitization in response to chemical agonists. *Pflugers Arch*, *471*(10), 1273–1289. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02309-9>
- Choi, S. W., Woo, J., Park, K. S., Ko, J., Jeon, Y. K., Choi, S. W., Yoo, H. Y., Kho, I., Kim, T. J., & Kim, S. J. (2021). Higher expression of KCNK10 (TREK-2) K(+) channels and their functional upregulation by lipopolysaccharide treatment in mouse peritoneal B1a cells. *Pflugers Arch*, *473*(4), 659–671. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02526-1>
- Cui, J., Hu, W., Cai, Z., Liu, Y., Li, S., Tao, W., & Xiang, H. (2010). New medicinal properties of mangostins: analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. *Pharmacol Biochem Behav*, *95*(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.021>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to

- evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 7, 42717.
<https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dib-Hajj, S. D., Cummins, T. R., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci*, 33, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153234>
- Djillani, A., Mazella, J., Heurteaux, C., & Borsotto, M. (2019). Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol*, 10, 379. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00379>
- Dong, Y. Y., Pike, A. C., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., Ruda, G. F., Clausen, M. V., Cao, L., Brennan, P. E., Burgess-Brown, N. A., Sansom, M. S., Tucker, S. J., & Carpenter, E. P. (2015). K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*, 347(6227), 1256–1259.
<https://doi.org/10.1126/science.1261512>
- Egorov, E. A., Alekhina, V. A., Volobueva, T. M., Fedoreev, S. A., Mishchenko, N. P., & Kol'tsova, E. A. (1999). [Histochrome, a new antioxidant, in the treatment of ocular diseases]. *Vestn Oftalmol*, 115(2), 34–35. (Novyĭ bioantioksidant "Gistokhrom" v klinike glaznykh boleznei.)
- Ekberg, J., & Adams, D. J. (2006). Neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: key roles in inflammatory and neuropathic pain. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(12), 2005–2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.06.008>
- Esposito, M. F., Malayil, R., Hanes, M., & Deer, T. (2019). Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med*, 20(Suppl 1), S23–s30.
<https://doi.org/10.1093/pm/pnz012>
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 690–702.
<https://doi.org/10.1038/nri2152>
- Gada, K., & Plant, L. D. (2019). Two-pore domain potassium channels: emerging targets for novel analgesic drugs: IUPHAR Review 26. *British Journal of Pharmacology*, 176(2), 256–266.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.14518>
- Garami, A., Shimansky, Y. P., Pakai, E., Oliveira, D. L., Gavva, N. R., & Romanovsky, A. A. (2010). Contributions of Different Modes of TRPV1 Activation to TRPV1 Antagonist-Induced Hyperthermia. *The Journal of Neuroscience*, 30(4), 1435–1440.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5150-09.2010>
- Garami, A., Shimansky, Y. P., Rumbus, Z., Vizin, R. C. L., Farkas, N., Hegyi, J., Szakacs, Z., Solymar, M., Csenkey, A., Chiche, D. A., Kapil, R., Kyle, D. J., Van Horn, W. D., Hegyi, P., & Romanovsky, A. A. (2020). Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacology & Therapeutics*, 208, 107474.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107474>
- Gold, M. S., & Gebhart, G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, *16*(11), 1248–1257.
<https://doi.org/10.1038/nm.2235>
- Gould, H. J., England, J. D., Soignier, R. D., Nolan, P., Minor, L. D., Liu, Z. P., Levinson, S. R., & Paul, D. (2004). Ibuprofen blocks changes in nav 1.7 and 1.8 sodium channels associated with complete Freund's adjuvant-induced inflammation in rat. *The Journal of Pain*, *5*(5), 270–280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpain.2004.04.005>
- Grichnik, K. P., & Ferrante, F. M. (1991). The difference between acute and chronic pain. *Mt Sinai J Med*, *58*(3), 217–220.
- Gutierrez-Orozco, F., Thomas-Ahner, J., Berman-Booty, L., Galley, J., Chitchumroonchokchai, C., Mace, T., Bailey, M., Clinton, S., Lesinski, G., & Failla, M. (2014). Dietary alpha-mangostin exacerbates colitis and adversely alters the gut microbiota in mice. *Faseb Journal*, *28*(1). <Go to ISI>://WOS:000346646700094
- Hameed, S. (2019). Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Molecular pain*, *15*, 1744806919858801.
<https://doi.org/10.1177/1744806919858801>
- Han, Y., Luo, A., Kamau, P. M., Takomthong, P., Hu, J., Boonyarat, C., Luo, L., & Lai, R. (2021). A plant-derived TRPV3 inhibitor suppresses pain and itch. *British Journal of Pharmacology*, *178*(7), 1669–1683.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.15390>
- Hao, X. M., Li, L. D., Duan, C. L., & Li, Y. J. (2017). Neuroprotective effect of alpha-mangostin on mitochondrial dysfunction and alpha-synuclein aggregation in rotenone-induced model of Parkinson's disease in differentiated SH-SY5Y cells. *J Asian Nat Prod Res*, *19*(8), 833–845.
<https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1339349>
- Harper, A. A., & Lawson, S. N. (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, *359*, 31–46. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015573>
- He, Y., Zeng, K., Zhang, X., Chen, Q., Wu, J., Li, H., Zhou, Y., Glusman, G., Roach, J., Etheridge, A., Qing, S., Tian, Q., Lee, I., Tian, X., Wang, X., Wu, Z., Hood, L., Ding, Y., & Wang, K. (2015). A gain-of-function mutation in TRPV3 causes focal palmoplantar keratoderma in a Chinese family. *J Invest Dermatol*, *135*(3), 907–909.
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.429>
- Ingólfsson, H. I., Thakur, P., Herold, K. F., Hobart, E. A., Ramsey, N. B., Periole, X., de Jong, D. H., Zwama, M., Yilmaz, D., Hall, K., Marezky, T., Hemmings, H. C., Jr., Blobel, C., Marrink, S. J., Koçer, A., Sack, J. T., & Andersen, O. S. (2014). Phytochemicals Perturb Membranes and Promiscuously Alter Protein Function. *ACS Chemical Biology*, *9*(8), 1788–1798. <https://doi.org/10.1021/cb500086e>
- Jayakar, S., Shim, J., Jo, S., Bean, B. P., Singec, I., & Woolf, C. J. (2021). Developing nociceptor-selective treatments for acute and chronic pain. *Sci Transl Med*, *13*(619), eabj9837.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj9837>

- Jeong, S. H., Kim, H. K., Song, I. S., Lee, S. J., Ko, K. S., Rhee, B. D., Kim, N., Mishchenko, N. P., Fedoryev, S. A., Stonik, V. A., & Han, J. (2014). Echinochrome A protects mitochondrial function in cardiomyocytes against cardiotoxic drugs. *Mar Drugs*, *12*(5), 2922–2936. <https://doi.org/10.3390/md12052922>
- Jihong Cui, W. H., Zhanjun Cai, Yingxue Liu, Siyuan Li, Wucheng Tao, Hui Xiang,. (2010). New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *95*(2), 166–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.021>.
- Jinsart, W., Ternai, B., Buddhasukh, D., & Polya, G. M. (1992). Inhibition of Wheat Embryo Calcium-Dependent Protein-Kinase and Other Kinases by Mangostin and Gamma-Mangostin. *Phytochemistry*, *31*(11), 3711–3713. <https://doi.org/Doi> 10.1016/S0031-9422(00)97514-9
- Kang, D., & Kim, D. (2006). TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, *291*(1), C138–146. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00629.2005>
- Kang, D., Kim, S. H., Hwang, E. M., Kwon, O. S., Yang, H. Y., Kim, E. S., Choi, T. H., Park, J. Y., Hong, S. G., & Han, J. (2007). Expression of thermosensitive two-pore domain K⁺ channels in human keratinocytes cell line HaCaT cells. *Exp Dermatol*, *16*(12), 1016–1022. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00626.x>
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, *12*(4), 390–399; quiz 400–391.
- Kennard, L. E., Chumbley, J. R., Ranatunga, K. M., Armstrong, S. J., Veale, E. L., & Mathie, A. (2005). Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *British Journal of Pharmacology*, *144*(6), 821–829. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706068>
- Kim, H. J., Park, S., Shin, H. Y., Nam, Y. R., Lam Hong, P. T., Chin, Y. W., Nam, J. H., & Kim, W. K. (2021). Inhibitory effects of α -Mangostin on T cell cytokine secretion via ORAI1 calcium channel and K(+) channels inhibition. *PeerJ*, *9*, e10973. <https://doi.org/10.7717/peerj.10973>
- Kim, H. K., Vasileva, E. A., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., & Han, J. (2021). Multifaceted Clinical Effects of Echinochrome. *Mar Drugs*, *19*(8). <https://doi.org/10.3390/md19080412>
- Kim, J. E., & Lee, K. W. (2018). Molecular Targets of Phytochemicals for Skin Inflammation. *Curr Pharm Des*, *24*(14), 1533–1550. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180426113247>
- Kittipaspallop, W., Taepavarapruk, P., Chanchao, C., & Pimtong, W. (2018). Acute toxicity and teratogenicity of α -mangostin in zebrafish embryos. *Exp Biol Med (Maywood)*, *243*(15–16), 1212–1219. <https://doi.org/10.1177/1535370218819743>
- Kosek, E., Cohen, M., Baron, R., Gebhart, G. F., Mico, J.-A., Rice, A. S. C., Rief, W., & Sluka, A. K. (2016). Do we need a third mechanistic

- descriptor for chronic pain states? *Pain*, 157(7), 1382–1386. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000507>
- Lee, D. U., Weon, K. Y., Nam, D. Y., Nam, J. H., & Kim, W. K. (2016). Skin protective effect of guava leaves against UV-induced melanogenesis via inhibition of ORA11 channel and tyrosinase activity. *Exp Dermatol*, 25(12), 977–982. <https://doi.org/10.1111/exd.13151>
- Lennikov, A., Kitaichi, N., Noda, K., Mizuuchi, K., Ando, R., Dong, Z., Fukuhara, J., Kinoshita, S., Namba, K., Ohno, S., & Ishida, S. (2014). Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with the sea urchin pigment echinochrome in rats. *Molecular vision*, 20, 171–177. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24520186>
- Lesage, F., & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(5), F793–801. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.5.F793>
- Levine, J. D., & Alessandri-Haber, N. (2007). TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*, 1772(8), 989–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.01.008>
- Li, W. G., & Xu, T. L. (2015). Acid-sensing ion channels: a novel therapeutic target for pain and anxiety. *Curr Pharm Des*, 21(7), 885–894. <https://doi.org/10.2174/1381612820666141027124506>
- Li, Y., Xu, J., Xu, Y., Zhao, X. Y., Liu, Y., Wang, J., Wang, G. M., Lv, Y. T., Tang, Q. Y., & Zhang, Z. (2018). Regulatory Effect of General Anesthetics on Activity of Potassium Channels. *Neuroscience Bulletin*, 34(5), 887–900. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0239-1>
- Lin, Z., Chen, Q., Lee, M., Cao, X., Zhang, J., Ma, D., Chen, L., Hu, X., Wang, H., Wang, X., Zhang, P., Liu, X., Guan, L., Tang, Y., Yang, H., Tu, P., Bu, D., Zhu, X., Wang, K., . . . Yang, Y. (2012). Exome Sequencing Reveals Mutations in TRPV3 as a Cause of Olmsted Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 90(3), 558–564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.006>
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K. A., & Minor, D. L., Jr. (2017). K(2P)2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature*, 547(7663), 364–368. <https://doi.org/10.1038/nature22988>
- Lolignier, S., Gkika, D., Andersson, D., Leipold, E., Vetter, I., Viana, F., Noël, J., & Busserolles, J. (2016). New Insight in Cold Pain: Role of Ion Channels, Modulation, and Clinical Perspectives. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(45), 11435–11439. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2327-16.2016>
- Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., & Honoré, E. (1999). TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem*, 274(3), 1381–1387. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1381>
- Majtan, J., Bucekova, M., & Jesenak, M. (2021). Natural Products and Skin Diseases. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154489>
- Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich,

- A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K., & Tominaga, M. (2009). TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 458(6), 1093–1102. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0703-x>
- Mathie, A., & Veale, E. L. (2015). Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467(5), 931–943. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1655-3>
- Mathie, A., Veale, E. L., Golluscio, A., Holden, R. G., & Walsh, Y. (2021). Pharmacological Approaches to Studying Potassium Channels. *Handb Exp Pharmacol*, 267, 83–111. https://doi.org/10.1007/164_2021_502
- McCarl, C. A., Khalil, S., Ma, J., Oh-hora, M., Yamashita, M., Roether, J., Kawasaki, T., Jairaman, A., Sasaki, Y., Prakriya, M., & Feske, S. (2010). Store-operated Ca²⁺ entry through ORAI1 is critical for T cell-mediated autoimmunity and allograft rejection. *J Immunol*, 185(10), 5845–5858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001796>
- McCoull, D., Ococks, E., Large, J. M., Tickle, D. C., Mathie, A., Jerman, J., & Wright, P. D. (2021). A “Target Class” Screen to Identify Activators of Two-Pore Domain Potassium (K2P) Channels. *SLAS Discovery*, 26(3), 428–438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/2472555220976126>
- Mishchenko, N. P., Fedoreev, S. A., & Bagirova, V. L. (2003). Histochrome: a New Original Domestic Drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(1), 48–52. <https://doi.org/10.1023/A:1023659331010>
- Mishchenko, N. P., Vasileva, E. A., Gerasimenko, A. V., Grigorchuk, V. P., Dmitrenok, P. S., & Fedoreyev, S. A. (2020). Isolation and Structure Determination of Echinochrome A Oxidative Degradation Products. *Molecules*, 25(20), 4778. <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/20/4778>
- Moore, C., Gupta, R., Jordt, S.-E., Chen, Y., & Liedtke, W. B. (2018). Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neuroscience Bulletin*, 34(1), 120–142. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0200-8>
- Moore, C., Gupta, R., Jordt, S. E., Chen, Y., & Liedtke, W. B. (2018). Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neuroscience Bulletin*, 34(1), 120–142. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0200-8>
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S. R., Andahazy, M., Story, G. M., & Patapoutian, A. (2005). Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science*, 307(5714), 1468–1472. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1108609>
- Muegge, I., Heald, S. L., & Brittelli, D. (2001). Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>
- Nelli, G. B., K, A. S., & Kilari, E. K. (2013). Antidiabetic effect of α-mangostin and its protective role in sexual dysfunction of streptozotocin induced diabetic male rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59(6),

- 319–328. <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.820369>
- Nikolaeva–Koleva, M., Butron, L., González–Rodríguez, S., Devesa, I., Valente, P., Serafini, M., Genazzani, A. A., Pirali, T., Ballester, G. F., Fernández–Carvajal, A., & Ferrer–Montiel, A. (2021). A capsaicinoid–based soft drug, AG1529, for attenuating TRPV1–mediated histaminergic and inflammatory sensory neuron excitability. *Sci Rep*, *11*(1), 246. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80725-z>
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., & Lazdunski, M. (2009). The mechano–activated K⁺ channels TRAAK and TREK–1 control both warm and cold perception. *The EMBO Journal*, *28*(9), 1308–1318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/emboj.2009.57>
- Obeng, S., Hiranita, T., León, F., McMahan, L. R., & McCurdy, C. R. (2021). Novel Approaches, Drug Candidates, and Targets in Pain Drug Discovery. *J Med Chem*, *64*(10), 6523–6548. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00028>
- Oh, S.–J., Seo, Y., Ahn, J.–S., Shin, Y. Y., Yang, J. W., Kim, H. K., Han, J., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., Stonik, V. A., & Kim, H.–S. (2019). Echinochrome A Reduces Colitis in Mice and Induces In Vitro Generation of Regulatory Immune Cells. *Marine Drugs*, *17*(11), 622. <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/11/622>
- Ovalle–Magallanes, B., Eugenio–Perez, D., & Pedraza–Chaverri, J. (2017). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): A comprehensive update. *Food Chem Toxicol*, *109*(Pt 1), 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.021>
- Paice, J. A. (2002). Understanding nociceptive pain. *Nursing*, *32*(3), 74–75. <https://doi.org/10.1097/00152193-200203000-00064>
- Park, G. T., Yoon, J. W., Yoo, S. B., Song, Y. C., Song, P., Kim, H. K., Han, J., Bae, S. J., Ha, K. T., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., Stonik, V. A., Kim, M. B., & Kim, J. H. (2021). Echinochrome A Treatment Alleviates Fibrosis and Inflammation in Bleomycin–Induced Scleroderma. *Mar Drugs*, *19*(5). <https://doi.org/10.3390/md19050237>
- Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2002). A Heat–Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science*, *296*(5575), 2046–2049. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1073140>
- Plant, L. D. (2012). A Role for K2P Channels in the Operation of Somatosensory Nociceptors. *Front Mol Neurosci*, *5*, 21. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00021>
- Pope, L., & Minor, D. L., Jr. (2021). The Polysite Pharmacology of TREK K(2P) Channels. *Advances in experimental medicine and biology*, *1349*, 51–65. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4254-8_4
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., & Hogan, P. G. (2006). Orail is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, *443*(7108), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>
- Prescott, S. A., & Ratté, S. (2017). Chapter 23 – Somatosensation and Pain.

- In P. M. Conn (Ed.), *Conn's Translational Neuroscience* (pp. 517–539). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00037-3>
- Proks, P., Schewe, M., Conrad, L. J., Rao, S., Rathje, K., Rödström, K. E. J., Carpenter, E. P., Baukrowitz, T., & Tucker, S. J. (2021). Norfluoxetine inhibits TREK-2 K2P channels by multiple mechanisms including state-independent effects on the selectivity filter gate. *Journal of General Physiology*, *153*(8). <https://doi.org/10.1085/jgp.202012812>
- Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E., & Bolognesi, M. L. (2018). A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clinical and Translational Medicine*, *7*(1), e3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40169-017-0181-2>
- Reyes-Fermin, L. M., Avila-Rojas, S. H., Aparicio-Trejo, O. E., Tapia, E., Rivero, I., & Pedraza-Chaverri, J. (2019). The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation. *Antioxidants*, *8*(5). <https://doi.org/ARTN13310.3390/antiox8050133>
- Reyes-Fermin, L. M., Avila-Rojas, S. H., Aparicio-Trejo, O. E., Tapia, E., Rivero, I., & Pedraza-Chaverri, J. (2019). The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation. *Antioxidants*, *8*(5), 133. <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/5/133>
- Romanovsky, A. A., Almeida, M. C., Garami, A., Steiner, A. A., Norman, M. H., Morrison, S. F., Nakamura, K., Burmeister, J. J., & Nucci, T. B. (2009). The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev*, *61*(3), 228–261. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001263>
- Ruankham, W., Suwanjang, W., Phopin, K., Songtawee, N., Prachayasittikul, V., & Prachayasittikul, S. (2021). Modulatory Effects of Alpha-Mangostin Mediated by SIRT1/3-FOXO3a Pathway in Oxidative Stress-Induced Neuronal Cells. *Front Nutr*, *8*, 714463. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.714463>
- Sani, M. H., Taher, M., Susanti, D., Kek, T. L., Salleh, M. Z., & Zakaria, Z. A. (2015). Mechanisms of α -mangostin-induced antinociception in a rodent model. *Biol Res Nurs*, *17*(1), 68–77. <https://doi.org/10.1177/1099800414529648>
- Sani, M. H., Taher, M., Susanti, D., Kek, T.L., Salleh, M.Z., Zakaria, Z.A. (2015). Mechanisms of alpha-mangostin-induced antinociception in a rodent model. *Biol. Res. Nurs.*, *17*, 68–77. <https://doi.org/10.1177/1099800414529648>
- Sayed, D. A., Soliman, A. M., & Fahmy, S. R. (2018). Echinochrome pigment as novel therapeutic agent against experimentally - induced gastric ulcer in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *107*, 90–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.173>
- Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., Gonzalez, W., Musinszki, M., Tegtmeier, M., Pryde, D. C., Belabed, H., Nazare,

- M., de Groot, B. L., Decher, N., Fakler, B., . . . Baukrowitz, T. (2019). A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K(+) channels. *Science*, *363*(6429), 875–880. <https://doi.org/10.1126/science.aav0569>
- Seol, J. E., Ahn, S. W., Seol, B., Yun, H. R., Park, N., Kim, H. K., Vasileva, E. A., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., Stonik, V. A., & Han, J. (2021). Echinochrome A Protects against Ultraviolet B-induced Photoaging by Lowering Collagen Degradation and Inflammatory Cell Infiltration in Hairless Mice. *Mar Drugs*, *19*(10). <https://doi.org/10.3390/md19100550>
- Shin, D. H., Seo, E. Y., Pang, B., Nam, J. H., Kim, H. S., Kim, W. K., & Kim, S. J. (2011). Inhibition of Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ channel (CRAC) and K⁺ channels by curcumin in Jurkat-T cells. *J Pharmacol Sci*, *115*(2), 144–154. <https://doi.org/10.1254/jphs.10209fp>
- Sleigh, J. N., Weir, G. A., & Schiavo, G. (2016). A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Research Notes*, *9*(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1915-8>
- Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J. P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K. J., Smart, D., Randall, A. D., Anand, P., & Davis, J. B. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*, *418*(6894), 186–190. <https://doi.org/10.1038/nature00894>
- Smith, P. A. (2020). K(+) Channels in Primary Afferents and Their Role in Nerve Injury-Induced Pain. *Front Cell Neurosci*, *14*, 566418. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.566418>
- Souza Monteiro de Araujo, D., Nassini, R., Geppetti, P., & De Logu, F. (2020). TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opin Ther Targets*, *24*(10), 997–1008. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1815191>
- Șterbuleac, D. (2019). Molecular determinants of chemical modulation of two-pore domain potassium channels. *Chem Biol Drug Des*, *94*(3), 1596–1614. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13571>
- Takei, K., Denda, S., Nagayama, M., & Denda, M. (2016). Role of STIM1–Orail system in intra-cellular calcium elevation induced by ATP in cultured human keratinocytes. *Exp Dermatol*, *25*(4), 323–325. <https://doi.org/10.1111/exd.12928>
- Talavera, K., Startek, J. B., Alvarez-Collazo, J., Boonen, B., Alpizar, Y. A., Sanchez, A., Naert, R., & Nilius, B. (2020). Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol Rev*, *100*(2), 725–803. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2019>
- Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., & Bayliss, D. A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *21*(19), 7491–7505. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-19-07491.2001>

- Tiwari, A., Khera, R., Rahi, S., Mehan, S., Makeen, H. A., Khormi, Y. H., Rehman, M. U., & Khan, A. (2021). Neuroprotective Effect of α - Mangostin in Ameliorating Propionic Acid-Induced Experimental Model of Autism in Wistar Rats. *Brain Sciences*, *11*(3), 288. <https://www.mdpi.com/2076-3425/11/3/288>
- Tsantoulas, C. (2015). Emerging potassium channel targets for the treatment of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*, *9*(2), 147-154. <https://doi.org/10.1097/SPC.000000000000131>
- Tsantoulas, C., & McMahon, S. B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends in Neurosciences*, *37*(3), 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.002>
- Vaeth, M., Kahlfuss, S., & Feske, S. (2020). CRAC Channels and Calcium Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Immunology*, *41*(10), 878-901. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.it.2020.06.012>
- Vandenberghe, M., Raphaël, M., Lehen'kyi, V., Gordienko, D., Hastie, R., Oddos, T., Rao, A., Hogan, P. G., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2013). ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(50), E4839-4848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310394110>
- Vandenberghe, M., Raphaël, M., Lehen'kyi, V. y., Gordienko, D., Hastie, R., Oddos, T., Rao, A., Hogan, P. G., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2013). ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(50), E4839-E4848. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1310394110>
- Verkest, C., Salinas, M., Diochot, S., Deval, E., Lingueglia, E., & Baron, A. (2022). Mechanisms of Action of the Peptide Toxins Targeting Human and Rodent Acid-Sensing Ion Channels and Relevance to Their In Vivo Analgesic Effects. *Toxins*, *14*(10), 709. <https://doi.org/10.3390/toxins14100709>
- Wang, G., & Wang, K. (2017). The Ca²⁺-Permeable Cation Transient Receptor Potential TRPV3 Channel: An Emerging Pivotal Target for Itch and Skin Diseases. *Molecular Pharmacology*, *92*(3), 193-200. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107946>
- Wang, M.-H., Zhang, K.-J., Gu, Q.-L., Bi, X.-L., & Wang, J.-X. (2017). Pharmacology of mangostins and their derivatives: A comprehensive review. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *15*(2), 81-93. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30024-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30024-9)
- Wei, N. N., Lv, H. N., Wu, Y., Yang, S. L., Sun, X. Y., Lai, R., Jiang, Y., & Wang, K. (2016). Selective Activation of Nociceptor TRPV1 Channel and Reversal of Inflammatory Pain in Mice by a Novel Coumarin Derivative Muralatin L from *Murraya alata*. *J Biol Chem*, *291*(2), 640-651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.654392>
- Woo, J., Jeon, Y. K., Zhang, Y. H., Nam, J. H., Shin, D. H., & Kim, S. J. (2019). Triple arginine residues in the proximal C-terminus of TREK K(+) channels are critical for biphasic regulation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Am J Physiol Cell Physiol*, *316*(3), C312-c324.

- <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00417.2018>
- Woodbury, A., McCrary, M. R., & Yu, S. P. (2018). Molecular Targets and Natural Compounds in Drug Development for the Treatment of Inflammatory Pain. *Curr Drug Targets*, 19(16), 1905–1915. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180514120438>
- Woolf, C. J. (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3 Suppl), S2–s15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030>
- Wulff, H., Beeton, C., & Chandy, K. G. (2003). Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 6(5), 640–647.
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P. S., Curtis, R., & Clapham, D. E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*, 418(6894), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature00882>
- Yaksh, T. L., Woller, S. A., Ramachandran, R., & Sorkin, L. S. (2015). The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000Prime Rep*, 7, 56. <https://doi.org/10.12703/p7-56>
- Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., & Basir, R. (2018). General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *Int J Mol Sci*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>
- Yamamoto, Y., Hatakeyama, T., & Taniguchi, K. (2009). Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neurosci Lett*, 454(2), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.069>
- Yan, S., Chen, W., Zhang, Y., Li, J., & Chen, X. (2019). Calcium release-activated calcium modulator 1 as a therapeutic target in allergic skin diseases. *Life Sci*, 228, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.001>
- Yang, A., Liu, C., Wu, J., Kou, X., & Shen, R. (2021). A review on α - mangostin as a potential multi-target-directed ligand for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 897, 173950. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173950>
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., & Mori, Y. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology*, 2(11), 596–607. <https://doi.org/10.1038/nchembio821>
- Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 207. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>
- Yun, H. R., Ahn, S. W., Seol, B., Vasileva, E. A., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., Stonik, V. A., Han, J., Ko, K. S., Rhee, B. D., Seol, J. E., & Kim, H. K. (2021). Echinochrome A Treatment Alleviates Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mice via IL-4 and IL-13 Suppression. *Mar Drugs*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/md19110622>

Zheng, H., Nam, J. H., Pang, B., Shin, D. H., Kim, J. S., Chun, Y.-S., Park, J.-W., Bang, H., Kim, W. K., Earm, Y. E., & Kim, S. J. (2009). Identification of the large-conductance background K⁺ channel in mouse B cells as TREK-2. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(1), C188-C197. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00052.2009>

Abstract

Effects of α -Mangostin and Echinochrome A on the Ion Channels Associated with Nociceptive Dorsal Root Ganglion Neuron and Skin Function

KIM SUNG EUN

Dept. Biomedical Sciences

Major. Biomedical Sciences, Physiology

The Graduate School

Seoul National University

In this study, I investigated the effects of α -mangostin, a xanthone isolated from the pericarp of *Garcinia mangostana* Linn (*mangosteen*), and Echinochrome A (Ech A), a dark red pigment isolated from the spines of sea urchins, on the ion channels playing key roles in the nociception and protective functions of skin. Although previous studies indicated anti-inflammatory and analgesic effects of the two compounds, their pharmacological actions on the relevant ion channels have not been conducted yet.

Whole-cell patch clamp study using mouse small dorsal root ganglion (DRG) neurons and HEK293T cells overexpressed with

TRPV1 and various two-pore domain K⁺ channels (TREK-1, TREK-2, TRAAK, TRESK) revealed that micromolar ranges of α -mangostin (1-3 μ M) inhibits TTX-sensitive voltage-gated Na⁺ channel (Na_v) and TRPV1 channel, while activating TREK-1, TREK-2 and TRAAK. The multiple effects on the DRG neuronal ion channels resulted in the membrane hyperpolarization and inhibition of action potential firing as well as the nociceptive receptor potential. Molecular docking simulation suggested that α -mangostin stably binds with the ion channels. Furthermore, *in silico* ADME tests revealed that α -mangostin satisfies drug-likeness properties.

Then I investigated the effects of Ech A on the TRPV3, CRAC, TRPV1, TREK-1, TREK-2, TRAAK, TRESK and TASK-1 channels overexpressed in HEK 293 cells. Ech A inhibited TRPV3 and CRAC current with IC₅₀ of 2.1 and 2.4 μ M, respectively. The capsaicin-activated TRPV1 current was slightly augmented by Ech A. Although Ech A alone did not change the amplitude of TREK-2 current (I_{TREK2}), a partial activation of TREK-2 by known agonists (2-APB, arachidonic acid, acidic extracellular pH) could be markedly augmented by the combined application of Ech A. Similar facilitation effects of Ech A on TREK-1 and TRAAK were observed when stimulated with 2-APB and arachidonic acid, respectively. On the contrary, Ech A did not affect TRESK and TASK-1 currents. Interestingly, the I_{TREK2} maximally activated by the combined application of 2-APB and Ech A was not inhibited by norfluoxetine, but was still completely inhibited by ruthenium red. The selective

loss of sensitivity to norfluoxetine suggested altered molecular conformation of TREK-2 by Ech A. The molecular docking simulation also indicated a common site with similar binding energy with norfluoxetine and Ech A.

Above studies suggest that α -mangostin might be a candidate analgesic agent with multi-target modulation of ion channels. Also, I suggest that the Ech A-induced inhibition of Ca^{2+} permeable cation channels and facilitation of TREK/TRAAK K2P channels might underlie the analgesic and anti-inflammatory effects of Ech A.

Keywords: Pain, Analgesic effect, Keratinocyte, DRG neuron, Natural products, Ion channels.

Student Number: 2017 – 21575

감사의 글

제가 어느 덧 석박통합 과정으로 입학한지 6년이 흘러 무사히 박사학위를 받고 졸업하게 되었습니다. 정말인지 짧으면서도 길었던 순간들이었고 결코 쉽지 않았던 한 걸음 한 걸음이었던거 같습니다. 그리고 그 시간과 걸음이 모여 이렇게 한 권의 학위논문으로 제 연구결과를 여러분들께 보여드릴 수 있어 감회가 새롭고 그 기회에 감사드립니다.

저에게 처음 생리학이라는 학문이 무엇이고 과학적인 사고를 어떻게 해야 논리적으로 결과를 이끌어낼 수 있는지 끊임없이 가르쳐 주신 저희 김성준 교수님께 먼저 무한한 감사를 드립니다. 석사 때부터 매번 있었던 실험적인 토론과 질문 그리고 교수님의 열정적이고 헌신적인 가르침은 큰 자극이 되었고, 제가 중간에 힘들어서 연구실을 그만두고 싶었을 때에도 끝까지 버티게 해주어 저에게 큰 동기부여가 되었습니다. 김성준 교수님께서 저를 끝까지 지도해주신 덕분에 정말인지 제가 무사히 박사를 졸업할 수 있게 되었고 다시 한번 감사의 말씀을 드립니다.

박사학위 심사 때 학문적인 조언과 개인적인 조언과 격려를 해주셨던 서인석 교수님, 이지연 교수님, 예심 때 포스트잇으로 한 장 한 장 제 오타와 수정해야될 부분들을 정성 들여 수기로 작성해서 주셨던 고재홍 교수님, 그리고 언제나 따뜻한 조언과 저에 대해 신경써주시고 물어봐주시는 장은화 교수님께도 이렇게 서면으로 감사의 말씀을 드립니다. 제 박사학위 논문의 큰 주제 2개를 함께 진행하면서 실험적인 조언과 논문이 나아가야할 방향을 꼼꼼하고 더 나은 스토리를 이끌고자 너무나도 큰 도움을 주셨던 동국의대 남주현 교수님께도 감사드립니다.

항상 모르는게 많았고 실수도 많아 어설펠던 저에게 끊임없는 잔소리와 진심을 담아 선배로서 저에게 조언을 해주셨던 저희 연구실 선배님들에게도 크나큰 감사의 말씀을 드립니다. 석사때부터 항상 때로는 무섭게 다그치기도 했고, 때로는 일단 하면 된다고 기운을 주셨던 저희 김혜진 선생님, 윤명철 선생님, 최성우 선생님, 우주한 선생님, 임혜월 선생님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 박사과정이 되면서부터 실험실에서 날을 꼬박 새면서 실험을 하거나 데이터를 정리하는 일이 부지기수였는데 같이 남아줬던 후배들인 정다솔 선생, 박나경 선생, 최혜성 선생에게도 고마웠다고 전하고 싶습니다.

무엇보다 석사 때부터 같이 울고 웃고 티격태격 서로 싸우기도 하면서 같이 진로도 고민하고 실험적인 디스커션도 함께 했던 동기인 최시원 선생에게도, 힘들었던 일들이 많았지만 그래도 함께 이 길을 걸어와줬고 함께 나란히 박사학위를 받고 졸업하게 되어 기쁘다고 진심으로 말하고 싶고 또 감사드립니다.

학문적으로 저에게 도움을 주셨던 분들뿐 만 아니라 학위과정을 하면서 체력적으로 정신적으로 힘든 일들이 정말 많았는데 그 때마다 제 심신과 체력 그리고 언제나 웃음으로 저를 맞이해주고 함께 경기뛰면서 저를 단련시켜준 저희 서울대 펜싱부원 모두에게도 감사드립니다. 또한 지치거나 힘들어도 언제나 제 편이 되어서 함께 제 길을 응원해준 제 소중한 오랜 친구들에게도, 그리고 다른 연구실에서 연구를 하고 있는 제 친구들에게도 이 자리를 빌어 감사의 말씀을 드립니다.

마지막으로 너무나도 사랑하는 우리 가족에게, 서른이 넘도록 공부하는 큰 딸을 항상 뒤에서 물심양면으로 지원을 전폭적으로 해주시는 저희 아빠, 엄마 그리고 동생 경은이에게도 너무나도 감사하고 고맙다고 말씀드리고 싶습니다. 엄마, 아빠가 든든하게 저를 지지해주신 덕분에 제가 걱정 없이 원하는 공부를 마음껏 할 수 있었습니다. 사랑합니다. 그리고 제 부모님이셔서 진심으로 감사합니다.

제 학위기간동안 도움을 주셨던 수많은 교수님들, 선배님들, 후배님들을 모두 다 이 글에 언급하지 못했지만, 저를 거쳤던 모든 분들의 가르침이 있었기에 제가 성장할 수 있었습니다. 감사합니다.

짧은 글이지만 제 진심을 오롯이 여기에 담아 모두에게 감사의 말씀을 드립니다.