한방안이비인후피부과학회지 제22권 제3호(2009년 12월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2009;22(3) : 71-79

葎草 추출물이 Rat의 paw edema에 미치는 영향

황순이[1)*] · 정호준[1)] · 장우석[2)] · 조미정[3)] · 김상찬[3)] · 지선영[1)]
[1)]대구한의대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실, [2)]내과학교실,
[3)]한방신약개발팀 (BK21 Team)

Anti-inflammaory effects of the MeOH extract of *Humulus japonicus in vitro*

Sun-Yi Hwang · Ho-Jun Jung · Woo-Seok Jang · Mi-Jeong Jo · Sang-Chan Kim · Seon-Young Jee

Objectives : The present study was examined to evaluate the anti-inflammatory effects of the *Humulus japonicus* MeOH extracts (HJE) in the carrageenan-induced paw edema model in rats.

Methods : The effects of HJE on anti-inflammation were measured in the carrageenan-induced paw edema model in rats and infiltrated Inflammatory Cells.

Results : 1. HJE (1.0 g/kg) and dexamethasone effectively inhibited paw edema measured 1~4 h after carrageenan injection. HJE (0.3 g/kg) effectively inhibited paw edema measured 1, 3, 4 hr.

2. In histopathological study in rats, 1.0 g/kg HJE and dexamethasone effectively inhibited the increases of hind paw skin thicknesses and inflammatory cell infiltrations induced by carrageenan treatment. But quite similar histopathological changes were detected in 0.3 g/kg HJE treated group as compared with carrageenan control.

Key words : *Humulus japonicus,* Anti-inflammaory effects, paw edema

I. 서 론

外瘍과 陽毒의 外敷에 사용되는 율초(葎草, *Humulus japonicus*)[1)]는 우리 주변에서 쉽게 구할 수 있음에도 불구하고 우리나라 임상에서 많이 응용되지 못하는 실정이다.

하지만 율초는 성분 및 그람음성, 양성균 및 진균에 대한 항균 작용 등의 약리작용이 알려져있고[2)], 세포보호작용[3)], 항산화작용[4)] 등으로 여러 방면에서 연구가 이루어지고 있으며 율초의 항염 작용에 대한 실험 보고도 최근까지 계속되었다[5)].

율초의 항염작용에 대한 연구로는 *in vitro*에서의 염증조절 작용연구 및 *in vivo*에서의 carrageenin으로 유도된 rat의 실험을 통해 율초가

교신저자 : 황순이, 대구 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후피부과교실
(Tel : 053-770-2178, E-mail : sunnyh1005@dhu.ac.kr)
• 접수 2009/10/31 • 수정 2009/11/25 • 채택 2009/11/30

진통, 소염, 이뇨작용에 유의하게 작용함을 보고하기도 하였다[6]. 그러나 소염 작용 중 부종의 효과에 관한 실험은 용적의 비교이며, 조직에 대한 관찰은 이루어지지 않았으며 소염작용에 있어서도 염증 세포에 대한 실험 등이 미흡하였다.

이에 저자는 carrageenan으로 유도한 급성염증 모델을 이용하여 rat의 paw edema 및 paw 실질 조직의 변화를 관찰하고 염증세포 수를 비교하여 HJE *(Humulus japonicus extract)*의 항염증 효과를 살펴보고자 본 연구를 실시하였다.

Ⅱ. 재료 및 실험방법

1. 율초 추출물 (HJE)의 제조

율초는 2008년 7월 대구광역시 수성구 외환동 원장지 주변에서 채취하였으며, 율초 400 g을 MeOH 6L에 넣고 3일간 추출한 후, 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000×*g*에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에 12시간 동안 넣어 동결시켰다. 동결된 율초 추출물을 동결건조기 (Labconco, USA)로 동결건조하여 28.81 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20 ℃에서 보관하였다. HJE의 수율은 7.20%였으며 실험동물에 투여 시 PEG (poly ethylene glycol)에 녹여 사용하였다.

2. 실험동물 및 처치

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (130-160 g)를 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23℃, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

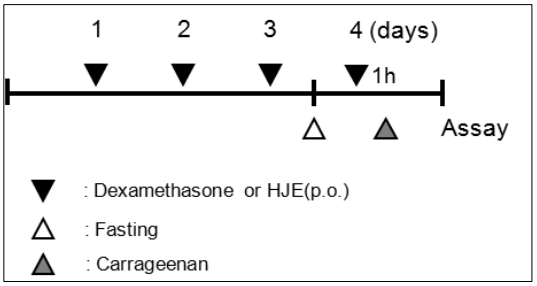
실험은 아무런 처치를 하지 않은 군을 normal group으로 하고 기염제인 carrageenan (Sigma Chemical Co, St Louis, USA; 100 μl/rat)만을 피하주사한 군을 carrageenan group으로 하였으며, carrageenan과 dexamethasone (1 mg/kg, p.o.)을 투여한 dexamethasone group, carrageenan과 0.3 g/kg의 율초를 투여한 0.3 g/kg HJE group, carrageenan과 1.0 g/㎏의 율초를 투여한 1.0 g/㎏ HJE group으로 나누었으며, 각 군당 동물 수는 6마리로 하였다. Dexamethasone과 HJE는 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물 투여 1시간 후 carrageenan을 100 μl/rat로 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하였다.

Table 1. Experimental Group Used in This Study

Group	Carrageenan	Dexamethasone	HJE 0.3 g/kg	HJE 0.1 g/kg
Normal	-	-	-	-
Carrageenan	+	-	-	-
Dexamethasone	+	+	-	-
0.3 g/kg HJE	+	-	+	-
1.0 g/kg HJE	+	-	-	+

3. Paw edema의 유도 및 측정

4일째 약물을 투여하고 1시간 후 carrageenan을 투여하여 paw edema를 유발시켰다. Paw edema의 측정은 carrageenan을 주입후 시간별로 (0, 1, 2, 3, 4시간) 부종측정기 (Plethysmometer, LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 이용하여 부종 정도를 측정하였다.



Scheme 1. Schedule of the *in vivo* study.

4. 조직처리

Paw edema의 유발과 회복여부를 살펴보기 위해 carrageenan으로 염증이 유발된 rat의 오른쪽 하지의 발목아래를 절단하여 조직을 채취하여 後肢의 발등 (*dorsum pedis*) 및 발바닥 (*ventrum pedis*)의 피부 실질조직을 분리하여 10% 중성포르말린에 6시간 이상 고정시킨 다음 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μm의 longitudinal 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 하고, 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하였다.

5. 조직학적 평가

김 등[7]의 방법을 변형시켜, 발등 및 발바닥 피부 (상피에서 진피)의 두께를 ㎜ 단위로 40배 현미경 시야에서 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 각각 측정하였으며, 각각 1 ㎟ 의 발등 및 발바닥 피부에 침윤된 염증세포의 수 역시 자동영상분석장치를 이용하여, 200배 현미경 시야에서 측정하였다.

6. 통계적 검증

실험 결과는 mean±SD로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of varience (ANOVA)로 검정한 후 Newman - Keuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p<0.05$ 또는 $p<0.01$로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Rat의 paw edema에 미치는 영향

Paw edema를 측정한 결과, carrageenan을 주입한 군에서는 1, 2, 3, 4 시간에 각각 1.71±0.14, 2.25±0.27, 3.18±0.43, 3.04±0.32를 나타내어 유의한 발 부종이 유발되었다. 그러나 발 부종 유도 후 dexamethasone을 처치한 군에서는 1.06±0.14, 0.99±0.14, 1.03±0.12, 1.01±0.16을 나타내어 실험 전시간 동안 유의한 발 부종 억제를 나타내었다. 0.3 g/kg HJE를 투여한 군에서는 1~4 시간에 1.05±0.11, 1.71±0.29, 1.73±0.27, 1.39±0.21을 나타내어 1, 3, 4 시간에 각각 유의한 발 부종 억제를 나타내었으며, 1.0 g/kg HJE를 투여한 군에서는 1.06±0.21, 1.38±0.23, 1.75±0.24, 1.43±0.11로 1~4시간 동안 유의한 억제를 나타내었다(Fig. 1).

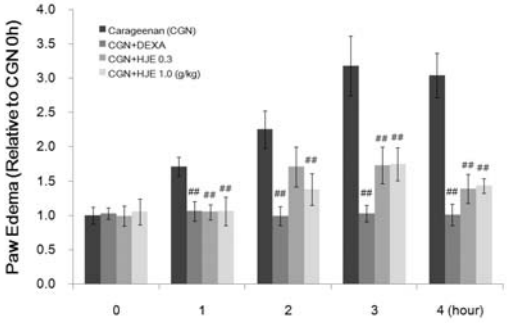


Fig. 1. Inhibition of carrageenan induced paw edema by HJE

HJE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The swelling of the paw was measured 1~4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean±SD of six animals.

#: significant compared with carrageenan alone, ## $p<0.01$

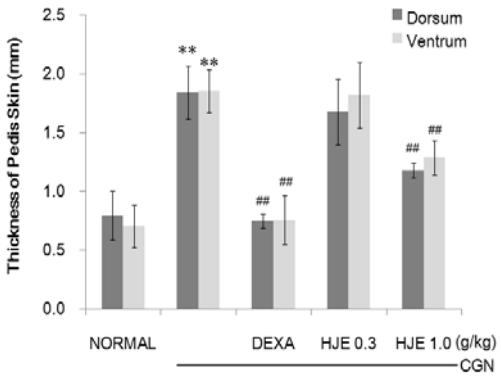


Fig. 2. Inhibition of paw thickness induced by carrageenan.

HJE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The swelling of the paw was measured 1~4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean±SD of six animals.

*: significant compared with normal control, ** $p<0.01$

#: significant compared with carrageenan alone, ## $p<0.01$

2. Rat의 paw 조직 변화에 미치는 영향

Carrageenan으로 유도된 발 부종의 조직학적 평가를 위하여 4 시간째 발 부종 측정을 끝내고 실험동물을 희생하여 부종 발의 발등 부분과 발바닥 부분에서 피부두께 및 침윤 염증세포를 측정하였다.

Table 2. Infiltrated Inflammatory Cells in the Present Study

Groups	Infiltrated inflammatory cells (cell/mm^2)	
	Dorsum pedis skin	*Ventrum pedis* skin
Controls		
Normal	7.20 ± 2.28	8.00 ± 3.54
Carrageenan	31.20 ± 1.64**	955.00 ± 159.39**
Dexamethasone	9.80 ± 1.92##	118.20 ± 56.23##
HJE Treated Groups		
0.3 g/kg	27.60 ± 8.76	874.60 ± 150.77
1.0 g/kg	12.00 ± 5.61##	264.20 ± 78.16##

Values are expressed as mean±SD of 5 histological fields HJE.

*: significant compared with normal control, ** $p<0.01$

#: significant compared with carrageenan alone, ## $p<0.01$

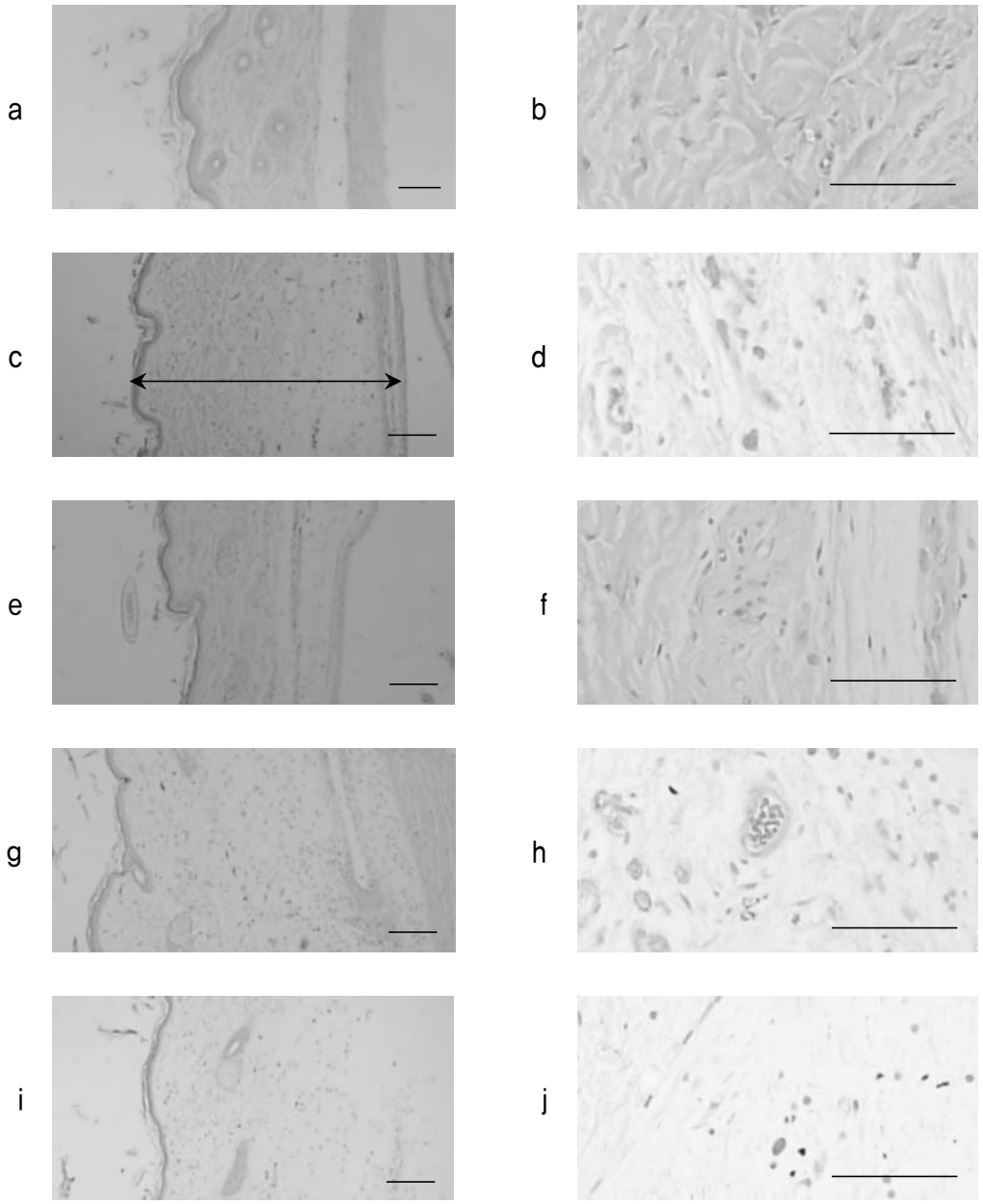


Fig. 3. Changes on Histological Profiles of the *Dorsum Pedis* Skin in normal control (a, b), carrageenan control (c, d), dexamethasone (e, f), 0.3 g/kg HJE (g, h), 1.0 g/kg HJE (i, j) treated groups.

Note that marked increases of skin thicknesses due to edematous changes were detected by carrageenan treatment with increases of inflammatory cell infiltrations. However, these carrageenan-induced acute edematous inflammatory changes were dramatically inhibited by treatment of 1.0 g/kg HJE and dexamethasone but quite similar histopathological changes were detected in 0.3 g/kg HJE treated group as compared with carrageenan control in the present study. Arrow indicated total thicknesses measured.

All HE stain; Scale bars = 80μm.

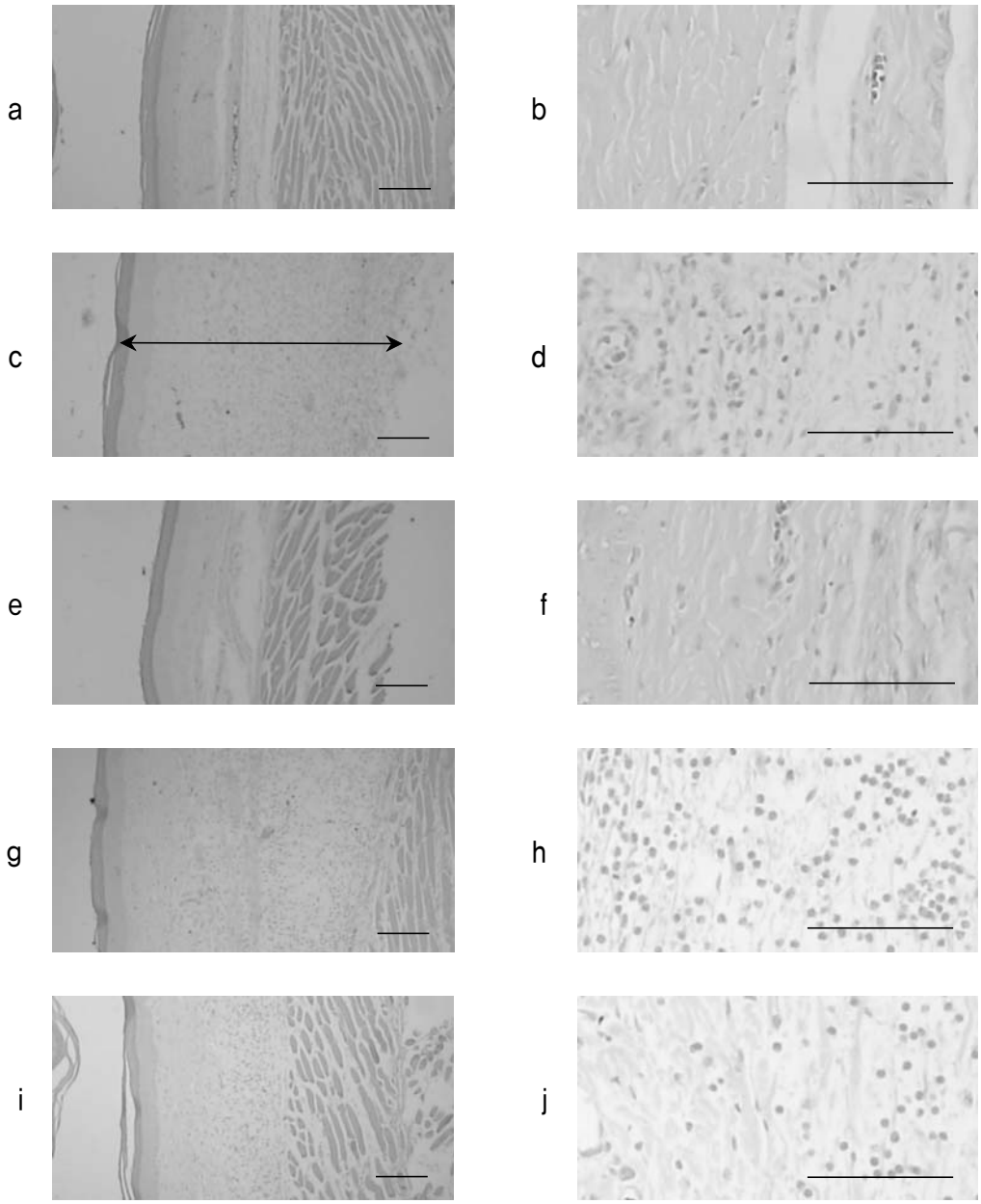


Fig. 4. Changes on Histological Profiles of the *ventrum pedis* Skin in normal control (a, b), carrageenan control (c, d), dexamethasone (e, f), 0.3 g/kg HJE (g, h), 1.0 g/kg HJE (i, j) treated groups.

Note that marked increases of skin thicknesses due to edematous changes were detected by carrageenan treatment with marked increases of inflammatory cell infiltrations. However, these carrageenan-induced acute edematous inflammatory changes were dramatically inhibited by treatment of 1.0 g/kg HJE and dexamethasone but quite similar histopathological changes were detected in 0.3 g/kg HJE treated group as compared with carrageenan control in the present study similar to the *dorsum pedis* skin, respectively.

M: muscle layers; Arrow indicated total thicknesses measured.

All HE stain; Scale bars = 80μm.

본 실험의 결과 발등 피부의 두께는 정상 군에서 0.791±0.209, carrageenan group이 1.839±0.227 ㎜로 유의성 있게 증가하였다. 이러한 피부의 두께는 dexamethasone과 0.3 및 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 0.744±0.058, 1.675±0.279, 1.178±0.063 ㎜으로 감소하였으나 유의성은 없었으며, dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 유의성이 있었다. 발바닥 부위의 피부두께에 있어서도 정상군은 0.702±0.178 ㎜이었으나, carrageenan group에 있어서는 1.851±0.183 ㎜으로 유의성 있게 증가하였다. 이러한 발바닥 피부의 두께 역시 dexamethasone과 0.3 및 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 0.756±0.207, 1.818±0.280, 1.288±0.145 ㎜로 감소하였으나, 유의성은 dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 있었다(Fig. 2, 3, 4).

부종 발의 발등 조직에서 침윤 염증세포의 수는 정상군에서는 7.20±2.28 cell/㎟이었으나, carrageenan group은 31.20±1.64 cell/㎟로 유의성 있게 증가하였다. 이러한 염증세포의 증가는 dexamethasone과 HJE 0.3 및 1.0 g/kg의 처치에 의해 9.80±1.92, 27.60±8.76, 12.00±5.61 cell/㎟을 나타내어 감소되었으나 유의성은 없었으며, dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 유의성이 있었다. 부종 발의 발바닥 조직에서의 침윤 염증세포는 정상군이 8.00±3.54 cell/㎟이었으나, carrageenan group은 955.00±159.39 cell/㎟로 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 염증세포의 침윤은 발등 조직에서와 마찬가지로 dexamethasone과 0.3 및 1.0 g/kg HJE의 처치에 의해 118.20±56.23, 874.60±150.77, 264.20±78.16 cell/㎟으로 염증세포의 침윤을 억제하였으나 유의성은 dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에 있었다(Table 2).

Ⅳ. 고 찰

염증(inflammation)은 전통적으로 "균의 감염, 열, 외상, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전"라고 정의되지만, 현재에는 염증을 신체 국소에서 일어나는 상해에 대한 생체조직의 방어반응으로 인식되고 있다. 즉, 각종 유해한 자극에 응답하여, 자극에 대한 상해를 제거하여 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이 염증반응이다. 염증이라는 용어가 "불 같은 상태"라는 어원에서 유래된 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창과 같은 징후가 발생된다[8,9].

한의학에서는 염증반응을 正邪 투쟁의 결과로 보고있으며, 염증의 국소 증상인 발적, 발열, 동통, 종창은 대개 火 와 熱의 개념으로 보고 있다[10].

梁代 陶弘景의 《名醫別錄[11]》에 勒草로 처음 수록되어 있는 율초(葎草, *Humulus japonicus*)의 氣味는 味甘苦하고 性寒 하며 氣薄味厚하여 陰中之陽이 되고, 歸經으로는 足厥陰肝經, 手太陰肺經, 手陽明大腸經, 足太陽膀胱經에 入한다. 效能으로는 主五淋 利小便 止水痢 陰虐 虛熱渴 淸熱利尿 消瘀 解毒 消炎退熱 健胃 潤五臟 消五穀 益五臟 除九蟲의 효과가 있음을 근거로 임 등은 율초의 진통, 소염, 이뇨 작용을 확인하고자 rat 실험을 하였다[6].

하지만 임 등은 rat의 부종의 연구를 하였으나 용적에 의한 비교만 있을 뿐 실질조직의 평가까지는 이루어지지 않아 본 연구는 조직 비교를 하였으며 침윤염증세포의 수를 비교하였고, 대조군으로 항염작용이 있는 dexamethasone을 사용하여 연구를 진행하였다.

Carrageenan은 염증세포의 침윤을 동반한 급성 부종을 초래하므로, 현재 항염증 물질의 급성 염증에 대한 효력평가에 널리 이용되고 있는 *in vivo* 모델로[12,13], 조직학적으로는 투여부위에 국소적인 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종을 유발

하는 것으로 알려져 있다1[14-7].

Paw edema를 측정한 결과, carrageenan을 주입한 군에서는 1~ 4 시간에 각각 유의한 발 부종이 유발되었다. 발 부종 유도 후 dexamethasone을 처치한 군에서는 실험 전 시간 동안 유의한 발 부종 억제를 나타내었다. 0.3 g/kg HJE를 투여한 군에서는 1, 3, 4 시간에 각각 유의한 발 부종 억제를 나타내었으며, 1.0 g/kg HJE를 투여한 군에서는 전 시간 동안 유의한 억제를 나타내었다(Fig 1).

Carrageenan으로 유도된 발 부종의 조직학적 평가를 위하여 4 시간째 발 부종 측정을 끝내고 실험동물을 희생하여 부종 발의 발등 부분과 발바닥 부분에서 피부두께 및 침윤 염증세포를 측정하였다.

본 실험의 결과 발등 피부의 두께는 정상군 및 carrageenan group에서 유의성 있게 증가하였으며, 이러한 피부의 두께는 dexamethasone과 0.3 및 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 모두 감소하였으나 유의성은 dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서만 있었다. 발바닥 부위의 피부두께에 있어서도 정상군에 비해 carrageenan group에서 유의성 있게 증가하였다. 이러한 발바닥 피부의 두께 역시 dexamethasone과 0.3 및 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 감소하였으나 dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 유의성이 있었다(Fig. 2, Table 2).

부종 발의 발등 조직에서 침윤 염증세포의 수는 정상군과 비교하여 carrageenan group은 유의성 있게 증가하였다. 그러나 이러한 염증세포의 증가는 dexamethasone과 HJE 0.3 및 1.0 g/kg의 처치에 의해 감소되었으나 dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에서 유의성이 있었다. 부종 발의 발바닥 조직에서의 침윤 염증세포는 정상군과 비교해 carrageenan group은 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 염증세포의 침윤은 발등 조직에서와 마찬가지로 dexamethasone과 0.3 및 1.0 g/kg HJE의 처치에 의해 염증세포의 침윤을 억제하였으나 유의성은 dexamethasone과 1.0 g/kg HJE를 처치한 실험군에 있었다(Fig. 2, Table 2).

본 실험의 결과에서도 정상군에 비해 carrageenan 유발군은 현저한 침윤 염증세포의 수적 증가 및 부종성 변화에 의한 발등 및 발바닥 피부 두께의 증가가 관찰되었다. 그러나 이러한 carrageenan 유발 급성 부종성 염증 소견이 dexamethasone 및 1.0 g/kg HJE 투여에 의해 유의성있게 억제되었다. 1.0 g/kg HJE 투여군에서 발등 및 발바닥 피부 두께의 증가 억제는 dexamethasone에 비해 비교적 낮은 것으로 관찰되었으나, 염증세포 침윤 억제 정도는 dexamethasone과 유사한 것으로 관찰되었다. 한편 0.3 g/kg HJE 투여군에서는 발등 및 발바닥 피부의 두께 및 염증세포 침윤 정도에서 carrageenan group보다는 조금 낮은 경향을 보였으나 유의성이 있지는 않았다.

이상의 연구결과는 농도에 따라 약간의 차이는 있으나 율초추출물 (HJE)의 消炎 효과를 보여주는 것이나, 최선의 효과를 위한 농도 연구 및 임상에서의 활용을 위한 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 영림사. 서울. 1997:449-50.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 중약대사전. 정담. 1998:4377-80.
3. 이정헌, 이강창, 하대호, 손일홍, 이환봉, 오연균, 최대호, 김원신, 박승택, 전병훈. Methotrexate의 심근독성에 대한 율초의 효과. 동의생리병리학회지. 2001;15(4):585-9.

4. 박승우, 정신교, 박종철. 환삼덩굴로부터 분리한 Luteolin-7-*O*-β-D-Glucoside의 활성산소 소거능. 한국식품영양과학회지. 2000;29(1):106-10.
5. 황순이, 조미정, 김상찬, 지선영. 율초가 항염효과에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2009;22(2):92-103.
6. 임덕빈, 이영종. 율초가 진통 소염 이뇨작용에 미치는 영향. 본초분과학회지. 1993;8(1):69-75.
7. Kim HD, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Park BR, Jang HJ, Lim LS, Lee HS, Ku SK. Effect of exopolymers from Aureobasidum pullulans on formalin-induced chronic paw inflammation in mice. J Microbiol Biotechnol. 2006;16: 1954-60.
8. 박광균. 구강생화학. 서울. 군자출판사. 1999: 318-25.
9. 약품생화학분과위원회편. 분자약품생화학. 서울. 동명사. 2003:59-71.
10. 정순영, 서형식. 三黃洗濟가 Raw 264.7 cell에서의 항염 효과에 미치는 영향. 2009; 22(1):108-19.
11. 陶弘景. 名醫別錄. 北京. 人民衛生出版社. 1986:165.
12. Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, Selvan VT. Antiinflammatory evaluation of leaves of Plumeria acuminata. BMC Complement Altern Med. 2006;6:36.
13. Rao CV, Verma AR, Gupta PK, Vijayakumar M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of Fumaria indica whole plant extract in experimental animals. Acta Pharm. 2007;57:491-8.
14. Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. Br J Pharmacol. 2005;146:467-76.
15. Liu J, Zhang W, Zhou L, Wang X, Lian Q. Anti-inflammatory effect and mechanism of osthole in rats. Zhong Yao Cai. 2005;28:1002-6.
16. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. Anesthesiology. 2006;105:128-38.
17. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. Br J Pharmacol. 2008;154(1):165-73.