

羌活續斷湯이 인체피부 섬유아세포에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 한방부인과 교실

유정은, 최경희, 임현정, 유동열

ABSTRACT

Effects of Kanghwalsokdan-tang on Dermal Fibroblast

Jeong-Eun Yoo, Kyung-Hee Choi, Hyun-Jung Lim, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to elucidate the effects of Kanghwalsokdan-tang extract(KS) on hyper-plasy of collagen and cell damage in UVB-irradiated dermal fibroblast.

Methods: To demonstrate the effects of KS on wound healing we used human dermal fibroblast(F6). We evaluated the amount of increased PICP, TIMP-1 in dermal fibroblast. PICP, TIMP-1 concentration was measured using EIA kit. Also, we measured the nitrite production, and LDH release in UVB-irradiated dermal fibroblast to elucidate the action-mechanism of KS.

Results:

1. KS decreased the cell proliferation of dermal fibroblast.
2. KS decreased the biosynthesis of collagen in dermal fibroblast.
3. KS decreased the synthesis of TIMP-1 in dermal fibroblast.
4. KS had no effect on the LDH-release of UVB-irradiated dermal fibroblast.
5. KS inhibited nitrite production in UVB-irradiated dermal fibroblast.

Conclusions: From the results, we concluded that KS has a protective effect on wound healing and photoaging.

Key Words: Kanghwalsokdan-tang extract(KS), Dermal Fibroblast, UVB, Collagen, Wound healing, Photoaging

I. 서 론

진피는 피부 부피의 대부분을 차지하며 표피와의 상호작용에 의해 피부의 재생을 돕는다. 진피의 결합조직은 collagen, elastin, dermal matrix 등으로 구성되어 있는데 이들은 모두 fibroblast에 의해 만들어 진다¹⁾.

Fibroblast는 일반적으로 피부진피조직에 존재하며 피부의 유연성, 탄력성, 장력을 유지하는 역할을 하며 피부 뿐 아니라 각종 장기에 존재하여 외부 공격으로 파괴된 조직을 복원하는 역할을 주로 하고 있다²⁾.

외부 자극에 의해 조직이 손상당하면 fibroblast는 자극을 받아 증식이 유도되고 collagen을 비롯한 섬유소질을 생산하여 피부를 복원하게 된다. 그러나, collagen이 과잉 생산되면 피부에 흉터를 생성하고, 장기 조직에서 과잉 생산될 경우 다양한 질병을 유발한다. 임상에서는 fibroblast의 과 증식으로 인해 비대흉터, 켈로이드, 피부섬유증, 피부경화증 등과 같은 질환이 나타난다^{1,3)}.

또한 자외선에 노출된 피부에서는 다양한 경로를 통해 활성산소(ROS reactive oxygen species)가 생성되는데 keratinocyte뿐만 아니라 진피의 fibroblast에서도 활성산소가 과도하게 생성되어 피부에 산화적(oxidative) 스트레스를 초래하고 세포사멸을 증가시킨다. 자외선을 흡수한 keratinocyte는 histamine, serotonin, interleukin, prostaglandin을 분비하고 이들은 진피로 염증세포를 방출시켜 홍반, 부종 등을 일으키고 궁극적으로 피부노화를 가속화시킨다^{1,4)}.

Fibroblast의 증식과 관련하여 紅蓼⁵⁾, 續斷⁶⁾, 태반추출물⁷⁾, 牧丹皮⁸⁾, 鷄血藤⁹⁾, 선삼¹⁰⁾ 등의 한약재를 이용한 실험적 연구들이 발표되었다.

羌活續斷湯은 《東醫寶鑑·外形篇》¹¹⁾ '足の脚氣治法'에 기재된 처방으로 "氣血虛者 宜獨活寄生湯 羌活續斷"이라 하였고, "治脚氣肝腎虛弱筋攣骨痛"이라 하여 補肝腎, 強筋骨의 효능으로 肝腎의 氣血虛弱으로 인한 腰膝의 痺痛에 활용하였다. 羌活續斷湯과 관련한 기존의 연구에서 김¹²⁾은 관절보호 효능을, 소¹³⁾는 위축근육에 대한 근 재생효과를, 이¹⁴⁾는 골세포에 미치는 영향을, 양¹⁵⁾은 멜라닌 생성 억제효과에 대해 보고하였으나, 인체피부 섬유아세포에 미치는 영향에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

이에 저자는 羌活續斷湯의 추출물(KS)을 이용하여 인체피부 섬유아세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해 F6 dermal fibroblast의 분열능과 PICP, TIMP-1 생성능을 측정하였고, UVB에 의한 인체피부 섬유아세포의 상해에 미치는 영향을 평가하기 위해 LDH 유리능과 nitrite의 생성능을 측정한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 약 물

실험에 사용한 羌活續斷湯¹¹⁾의 구성 약물은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Kanghwalsokdan-tang

韓藥名	生藥名	用量(g)
羌活	Ostericii Radix	2
防風	Saposhnikovia Radix	2
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	2
細辛	Asari Radix	2
杜沖	Eucommiae Cortex	2
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	2
秦艽	Gentianae Macrophyllae Radix	2
續斷	Dipsaci Radix	2
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	2
當歸	Angelicae Gigantis Radix	2
人參	Ginseng Radix	2
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	2
赤茯苓	Poria cocos	2
桂枝	Cinnamomi Ramulus	2
川芎	Cnidii Rhizoma	2
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	6
TOTAL		36

2) 시료 추출 및 검액 조제

羌活續斷湯 108 g(3첩 분량)의 건조된 한약재를 잘게 자른 후 증류수 1,500 ml를 가한 후 열탕추출기에서 열수 추출하였다. 4시간 이상 환류 추출하여 얻어진 추출물을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축한 다음 freeze dryer로 동결 건조하여 추출분말(이하 KS라 칭함) 14.9 g을 얻었다. 실험 시에는 추출물을 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μm의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

3) 세포

실험에 사용된 F6 dermal fibroblast는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 인체피부 섬유아세포의 활성화에 미치는 영향 측정

(1) F6 세포 배양

세포배양에 사용된 배지는 10 % FBS와

penicillin, streptomycin이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co., USA) 배지를 사용하여 5일간 배양하였으며 1일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화 시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation(56℃ water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다. Cell에 각 조건 별로 96 well plate에는 well 당 100 μl, 24 well plate에는 well 당 500 μl로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37℃에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심 분리(1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

(2) Cell Proliferation 측정

처리하지 않은 F6 dermal fibroblast(정상군)를 10 % FBS와 penicillin, streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co., USA) 배지를 사용하여 5일간 배양하였다(대조군). 배양된 세포를 2×10^4 cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부착한 다음, 분획하여 조제한 검액을 50, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 KS를 첨가하여 3일간 배양하였다(실험군). 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, PBS로 희석하여 Hemacytometer(Fuchs-Rosenthal, Germany)로 세포수를 계측하였다.

(3) TIMP-1 assay

TIMP-1의 검출을 위해 위 조건에서 24 well plate에 준비한 cell을 배양한 medium을 1:10으로 dilution하고 그 중 50 μl 를 사용하여 TIMP-1 immunoassay kit(R&D Systems Inc., USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) Collagen assay

96 well plate에 100 μl 의 세포 배양액을 넣고 25°C에서 120분간 incubation 시켰다. Washing용 buffer로 3번 씻어낸 후 anti-PICP를 100 μl 가하고 다시 22°C에서 45분간 incubation 시켰다. Washing buffer로 3번 다시 씻어 내고 enzyme conjugate 100 μl 를 가한 다음, 22°C에서 45분간 incubation 시켰다. 다시 3번 씻어낸 다음, 기질용액 100 μl 를 가하고 22°C에서 30분간 incubation 시킨 다음, stop solution 50 μl 를 가하고 405 nm에서 optical density를 구했다.

2) UVB에 의한 인체피부 섬유아세포 상해에 미치는 영향 측정

(1) 자외선 조사 및 약물처리

자외선 조사는 UVATEC(Uvatec Inc., USA) 조사기를 이용하였으며, UVB lamp를 사용하여 290~320 nm 파장을 가지는 자외선을 조사하였다. 광량은 IL 1700 radiometer (International Light Inc., USA)를 사용하여 측정하였다. 자외선을 조사하기 전에 1시간 동안 약물을 각 50, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가하여 미리 배양하였다. 자외선을 조사하기 위하여 DMEM 배지를 제거한 다음, PBS로 2번 씻어낸 후 UVB 파장의 자외선을 30 mJ/cm^2 가 되도록 조사하였다(대조군). 자외선을 조사한 다음 PBS로 한번 씻어낸 후, 약물 50, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ 가 함유된 새로운 DMEM 배지를 넣고 일정 시간동안 배양한 후 실험에 사용하였다(실험군).

(2) LDH 유리능 측정

세포를 96 well plate를 이용하여 24시간 동안 미리 배양한 후, 1시간 동안 약물을 함유한 배지로 전 처리하였다. 세포는 well당 1×10^4 개씩 넣었다. 배양액을 제거한 다음 각 well에 50 μl 의 PBS(phosphate buffered saline)를 넣은 다음, 세포에 UVB를 30 mJ/cm^2 를 조사한 후 PBS를 제거하고 well당 약물이 포함된 200 μl 의 DMEM 배지를 첨가하였다. 24시간이 경과한 다음 배양액을 취하여 세포 손상의 지표로 LDH(lactate dehydrogenase) 활성을 측정하였다. LDH 활성은 LDH kit(Sigma Co., USA)을 이용하여 정량하였으며, ELISA Reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(3) Nitrite 생성능 측정

위에 기술한 LDH 측정법과 동일한 과정으로 배양한 다음 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO_2 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05

μM가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO₂ 회색액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 실험성적

1. 인체피부 섬유아세포 활성화에 미치는 영향

1) 분열능에 미치는 영향

羌活續斷湯 추출물(이하 KS)을 처리한 경우, 대조군에 비해 10 μg/ml ($P < 0.05$)와 50 μg/ml의 농도 ($P < 0.01$)에서 F6 dermal fibroblast의 증식을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 1).

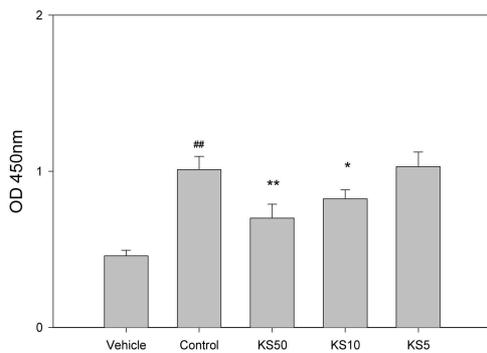


Fig. 1. Effect of KS on the Cell Proliferation of F6 Dermal Fibroblast.

Vehicle: non-treated

Control: 10 % FBS

KS50: 10 % FBS + KS(50 μg/ml)

KS10: 10 % FBS + KS(10 μg/ml)

KS5: 10 % FBS + KS(5 μg/ml)

##: $p < 0.01$ vs Vehicle

** : $P < 0.01$ vs Control

* : $p < 0.05$ vs Control

2) PICP 생성능에 미치는 영향

KS를 처리한 경우, 대조군에 비해 50, 10 μg/ml의 농도에서 PICP 생성을 유의성 ($P < 0.01$) 있게 감소시켰다(Fig. 2).

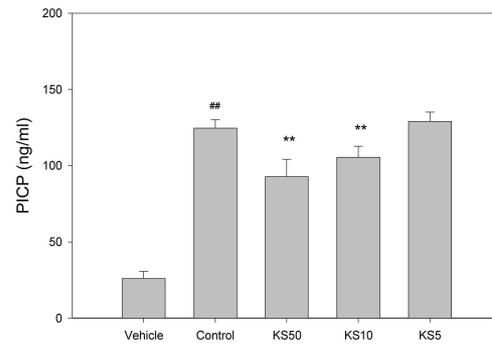


Fig. 2. Effect of KS on the PICP Expression in F6 Dermal Fibroblast.

Vehicle: non-treated

Control: 10 % FBS

KS50: 10 % FBS + KS(50 μg/ml)

KS10: 10 % FBS + KS(10 μg/ml)

KS5: 10 % FBS + KS(5 μg/ml)

##: $p < 0.01$ vs Vehicle

** : $P < 0.01$ vs Control

3) TIMP-1 생성에 미치는 영향

KS를 처리한 경우, 대조군에 비해 10 μg/ml ($P < 0.05$)와 50 μg/ml의 농도 ($P < 0.01$)에서 TIMP-1 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3).

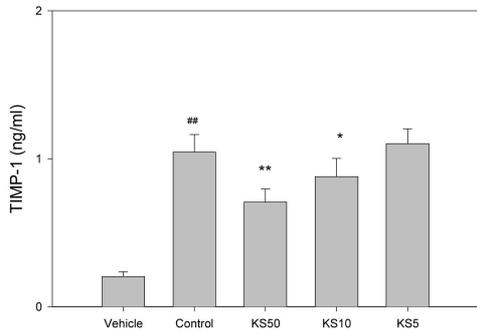


Fig. 3. Effect of KS on the TIMP-1 Expression in F6 Dermal Fibroblast.

Vehicle: non-treated

Control: 10 % FBS

KS50: 10 % FBS + KS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

KS10: 10 % FBS + KS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

KS5: 10 % FBS + KS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p < 0.01$ vs Vehicle

** : $P < 0.01$ vs Control

* : $p < 0.05$ vs Control

2. UVB에 의한 인체피부 섬유아세포 상해에 미치는 영향

1) LDH 유리에 미치는 영향

KS를 처리한 경우, 대조군에 비해 LDH의 유리를 억제하는 효과는 있었지만 유의성은 없었다(Fig. 4).

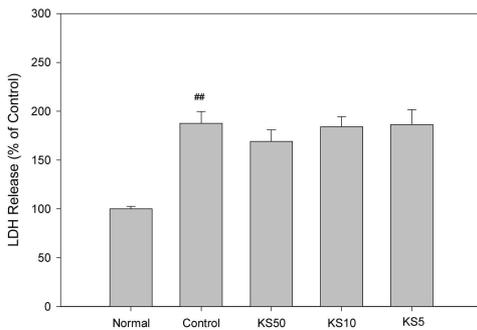


Fig. 4 Effect of KS on the LDH Release of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblast. Cells were UVB-irradiated (30 mJ/cm^2) and further incubated with KS. The results are expressed as mean \pm SE.

Normal : UVB-free

Control: UVB(30 mJ/cm^2)

KS50: UVB(30 mJ/cm^2) + KS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

KS10: UVB(30 mJ/cm^2) + KS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

KS5: UVB(30 mJ/cm^2) + KS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p < 0.01$ vs Normal

2) Nitrite 생성능에 미치는 영향

KS를 처리한 경우, 대조군에 비해 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 nitrite 생성을 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소시켜, UVB에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 작용을 나타내었다(Fig. 5).

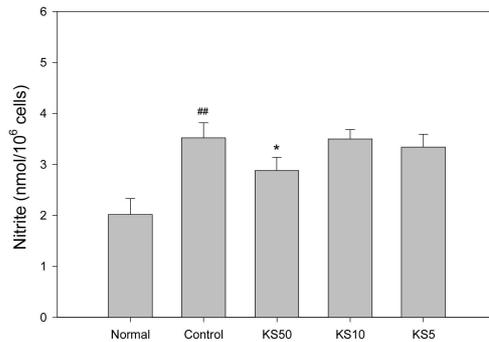


Fig. 5. Effect of KS on the Nitrite Production of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts. Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm^2) and further incubated with KS. The results are expressed as mean \pm SE.

Normal: UVB-free

Control: UVB (30 mJ/cm^2)

KS50: UVB(30 mJ/cm^2) + KS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

KS10: UVB(30 mJ/cm^2) + KS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

KS5: UVB(30 mJ/cm^2) + KS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p < 0.01$ vs Vehicle

* : $p < 0.05$ vs Control

IV. 고찰

진피의 결합조직은 collagen, elastin, dermal matrix 로 구성되며 이들은 모두 fibroblast에 의해 만들어진다. 이 중 collagen은 진피의 주성분이며 피부 건조 중량의 75%를 차지하여 피부에 장력을 제공해준다. 성인의 진피에 있는 collagen은 2개의 $\alpha 1$ 소체와 1개의 $\alpha 2$ 소체로 구성되어 있는

type I이 80%를 차지하며 15%는 type III이다¹⁾.

Collagen은 collagenase라 불리는 단백질 가수분해효소(MMP)에 의해 계속적으로 분해되고 새롭게 합성된다. Collagen의 합성을 증가시키는 체내 물질로는 TGF- β , IGF-1, endothelin-1, IL-1, IL-4가 알려져 있다. 이들은 fibroblast에서 Ap-1 과정을 거쳐 생성되는 collagen 발현을 촉진하고, MMP-1의 작용을 억제하는 TIMP-1 발현을 촉진하여 collagen 분해를 억제한다¹⁶⁾. 이와는 달리 TNF- α , PGE2, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-17 등은 fibroblast에서 MMP-1을 발현시켜 collagen의 분해를 유발한다¹⁷⁾.

Collagen의 생합성은 fibroblast에서 이루어지며 3개의 pro-alpha 폴리펩티드 사슬이 서로 꼬여서 procollagen 분자를 형성함으로써 시작된다. Collagen 분자는 분자 간에 끝과 끝이 연결되는 것이 아니라 분자 측면끼리 cross-link 되는 특징을 가지고 있어서 아미노산 구조와 함께 collagen이 장력을 가지도록 만드는 데, collagen 섬유의 합성과 cross-linking은 상처치유와 흉터형성에 중요한 역할을 한다¹⁸⁾.

상처치유는 여러 종류의 세포와 이들 세포에서 분비되는 cytokine, 세포의 기질 및 화학 전달물질 등이 관여하는 복잡한 과정으로 이루어진다. 상처치유 단계는 크게 염증기(imflammatory phase), 증식기(proliferative phase), 개조기(remodeling phase)로 나누어 볼 수 있는데 fibroblast는 상처치유의 초기부터 말기까지 다양하고 중요한 역할을 담당한다. 이중 개조기(remodeling phase)는 상처치유 과정에서 매우 중요한 시기로 튼튼한 collagen

network 형성 여부에 따라서 치유 결과에 많은 영향을 미친다. 개조기(remodeling phase)초기에는 섬유소, 섬유결합소와 fibroblast가 생산하는 glycosaminoglycan, proteoglycan, cysteine과 같은 단백질이 모여서 가장 기초적인 기질 모양을 갖추게 된다. 시간이 지나면서 이들은 좀 더 강하고 체계화된 collagen으로 대체되는데 초기에 형성된 육아조직엔 collagen type III이 약 30%를 차지하지만 치유가 완성되면서 흉이 만들어지면 10%까지 감소한다. 이때, collagen type III가 type I으로 전환되지 않으면 비대흉터나 켈로이드가 나타날 수 있다. Collagen의 생산은 보통 상처 발생 후 4~5주 동안 지속되는데 이는 fibroblast의 증가와 세포 당 collagen 생산의 증가에 따라 영향을 받는다. Collagen의 굵기와 배열은 피부의 최종 조직 장력과 관련이 있기 때문에 중요한 사항이다. 일반적으로 상처의 인장강도는 상처 발생 3주 후면 정상의 30%에 이르지만 3개월이 지나도 정상의 80% 이상을 넘지는 못한다¹⁹⁾.

비대흉터와 켈로이드의 원인은 확실치 않으나 소인이 있는 사람에서만 발생되며 외상이 직접적인 유발요인이 되지만 그렇지 않은 경우도 있다. 켈로이드는 유색인종 특히 흑인에서 흔히 나타나고 많이 발생하는 부위는 상흉부, 귀, 턱, 어깨, 목, 하지 등이다. 이외에 가슴의 염증성 좌창 및 화상에서도 동반되기도 한다²⁰⁾.

기전으로는 발생부위의 조직 장력과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 상처부위의 조직 장력이 커지면 fibroblast는 필요 이상의 collagen을 분비하는데 켈로이드에서는 collagen생성이 정상 피부에

비해 20배나 더 많고, 비대 흉터에 비해 3배 더 많다. 또한 과증식된 fibroblast와 collagen의 유리질화가 나타난다. 켈로이드 내에는 이러한 collagen을 분해하는 효소들을 방해하는 인자들이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다²¹⁾.

비대흉터와 켈로이드는 초기에는 비슷한 증상을 보이다가 비대흉터는 일 년 내지는 수년 내에 자연적으로 소실되나 켈로이드는 계속 존재하면서 본래의 손상 부위보다 더 넓게 퍼진다. 켈로이드의 경우 시간이 경과됨에 따라 피부가 갈색으로 단단하고 딱딱해지며 자각증상으로 소양 및 민감한 느낌이 들고 압통 및 동통이 심하게 된다^{1,20)}.

켈로이드는 예방이 매우 중요한데 켈로이드가 흔히 발생하는 사람에서는 외과적인 단순 절제는 피하고 절제 후에는 X-선 조사를 하고 냉동치료, 부신피질 호르몬제를 병변 내에 주사한다. 트리암시놀론 용액을 병변 내에 투입하는 것도 효과적으로 알려져 있다. 이외에도 압력요법, 국소 인터페론 주사, 레이저치료 등을 활용하는데 치료율이 높지 않고 부작용이 수반되어 새로운 치료물질 개발이 요구되는 실정이다^{22,23)}.

한의학에서 비대흉터나 켈로이드는 鋸痕症에 해당하며 癩疔, 肉龜瘡, 黃瓜癰, 黃疽 등으로 불리는데 《太平聖惠方·滅癩痕諸方》에 “夫癩痕者, 皆是風熱毒氣, 在于臟腑, 沖注于肌肉, 而生瘡疹, 及其瘡愈, 而毒氣尙全散, 故瘡痂速落, 其癩猶黯, 或凹凸肉起, 宜用消毒滅癩痕之藥以敷.”라고 하였다²⁰⁾.

鋸痕症은 先天稟賦 不足으로 生肌機能이 弱하여 쉽게 외상에 의해 상처를 입거나 癩疽, 疔瘡 등이 치유된 후에 餘毒

이 未盡되어 肌膚를 阻塞하고 氣血이 痞澁되고 凝聚되어 발생하며, 이러한 경우 解毒散結, 行經通絡하는 解毒通絡飲에 가감하여 활용하였다. 또한 여러 종류의 外傷이나 外邪의 侵襲으로 經絡이 손상되어 營衛不和 및 氣滯血瘀가 일어나서 肌膚가 점차 증대되어 발생할 때에는 活血理氣, 解毒軟堅하는 桃紅四物湯, 軟皮丸에 가감하여 활용하였다^{20,24)}. 이렇듯 한의학에서는 피부를 臟腑氣血의 상태를 반영하는 外表로 인식하여 병변의 치료에 있어서도 臟腑의 기능을 充實하게 하고 氣血의 흐름을 원활하게 하는 內治法을 활용하였음을 알 수 있다.

《外科啓玄》에서는 피부질환 및 瘡傷의 치료에서 초기에 祛邪 시키는 消散法, 化膿期에 排膿시키는 透托法, 회복기에 生肌작용을 돕는 內托法을 제시하였다^{20,25)}. 이 중 內托法은 扶正을 시키는 補法으로 補血益氣, 健脾和胃, 補益肝腎 등의 치법이 있는데, 선천적으로 신체가 허약한 경우, 大病後나 皮膚病後期에 補益肝腎, 強筋壯骨시키는 左歸飲, 六味地黃湯加減方을 활용하며, 重症皮膚疾患의 後期에 회복이 잘 안되고 瘡傷이 不愈한 경우에 調和陰陽, 補益氣血시키는 十全大補湯加減, 八珍湯 등을 활용하고 있다^{20,26)}.

羌活續斷湯은 《東醫寶鑑·外形篇》¹¹⁾ '足の脚氣治法'에 기재되어 있으며 '肝과腎이 虛하여 脚氣가 생겨서 힘줄이 오그라들고 뼈가 아픈 것을 치료한다'고 하였는데, 교원병, 류머티스성 관절염, 다발성 신경염에 활용할 수 있다는 연구보고가 있다²⁷⁾.

羌活續斷湯은 補氣血의 효능이 있는 八物湯의 주요약물에 強筋骨하는 杜沖,

牛膝, 續斷을 배합하고 祛風止痛하는 羌活, 防風, 白芷, 秦艽와 溫經止痛하는 桂枝, 細辛을 배합하였다²⁸⁾. 각 구성약물의 효능을 살펴보면, 羌活은 祛風散寒, 除濕止痛, 防風은 祛風勝濕, 發表疏散을 白芷는 散風發汗, 消腫排膿, 細辛은 溫中發汗, 祛風散寒, 秦艽는 祛風濕, 舒筋絡의 효능이 있고, 杜冲은 強筋骨, 補肝腎, 牛膝은 排膿止痛, 補肝腎, 散瘀血, 續斷은 生肌止痛, 續折傷, 益筋骨的 효능이 있고, 熟地黃은 補虛養血, 滋補肝腎, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 川芎은 排膿, 通經通絡, 活血行氣, 白芍藥은 養血柔肝, 緩中止痛, 人蔘은 大補元氣, 補脾益氣, 茯苓은 開胃健脾, 調中滲濕의 효능이 있고, 桂枝는 發汗解肌, 溫經通脈, 助陽化氣, 生薑은 溫中散寒, 回陽通脈의 효능이 있다^{29,30)}. 이로 보아 羌活속단탕은 補益肝腎, 生肌止痛, 強筋壯骨하므로 창상치유의 회복에 효과가 있을 것으로 생각되어 이번 연구에 사용하였다.

최근 아름다운 외모를 추구하는 여성들의 욕구에 힘입어 인체의 가장 바깥쪽에 위치하여 일차적으로 드러나는 피부 미용에 대한 관심이 높아지고 있다. 한방 부인과 임상에서도 건강하고 아름다운 피부를 위한 다양한 요법이 시행되고 있으며 이와 관련하여 실험적 연구도 활발히 진행되고 있다. 한약재를 이용한 미백효과에 대한 연구로는 六味地黃湯合二至丸加減方³¹⁾, 美白散³²⁾, 六味地黃湯合加減方³³⁾, 柴胡疏肝散加減方³⁴⁾, 赤何首烏³⁵⁾, 柿葉³⁶⁾을 활용한 연구가 있었으며, 자외선에 의한 피부상해와 관련한 연구로는 生脈散³⁷⁾, 丹樞逍遙散³⁸⁾ 등을 활용한 연구가 있었으나 섬유아세포의 증식과 관련한 흉터치료에 대한 연구는 아직

미흡한 실정이다.

이에 저자는 본 연구에서 羌活續斷湯이 인체피부 섬유아세포의 collagen 합성에 미치는 영향을 측정하였다. 실험결과, KS는 FBS를 가한 fibroblast의 증식능을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p<0.05$)와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도($p<0.01$)에서 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 1).

강활속단탕 추출물(KS)이 fibroblast에서 collagen 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 collagen 전구체인 procollagen의 생성에 미치는 영향을 측정하였다. Procollagen은 성숙한 collagen과 여분의 peptide로 구성되어 있는데, 이 peptide는 성장하고 있는 collagen fibril로 끼어 들어가기 전에 특이한 protease에 의해 분해된다. 이 분해된 peptide인 PICP (Procollagen Type I C-Peptide)는 세포 밖으로 유리되어 나타나 collagen 합성의 지표가 된다³⁹⁾. 실험 결과, KS는 FBS 처리한 fibroblast의 PICP 생성을 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 감소시켰다(Fig. 2).

Collagen을 분해하는 MMP-1의 작용은 특이적인 저해제인 TIMP-1(tissue inhibitor of martrix metalloproteinase-1)에 의해 조절된다. TIMP-1는 MMP-1의 작용을 억제하여 직접적으로 진피 조직의 collagen을 보호하는 parameter로 평가할 수 있다⁴⁰⁾. 실험 결과, KS는 FBS처리한 fibroblast의 TIMP-1 생성을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도($p<0.05$)와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도($p<0.01$)에서 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3).

최근 오존층의 파괴와 같은 지구환경의 변화로 인해 피부는 자외선에 더 많이 노출되고 있으며 이로 인해 피부의 건강이 위협받고 있다. 자외선(UV)은 파장에 따라 UVA, UVB, UVC로 나뉘지

며, 이 중 UVB(290-320 nm)는 결합조직에 영향을 주어 광노화를 일으킨다⁴¹⁾.

피부가 UV에 노출되면 피부 표면의 각질세포에서 뿐만 아니라 진피조직의 fibroblast에서 활성산소(ROS, reactive oxygen species)가 생성 된다. 활성산소는 인체에서 발생하는 거의 모든 병의 발생과 진행에 관여하지만 특히 피부세포의 노화, 유전적 변형에는 가장 중요한 병리적 요소로 알려져 있다⁴²⁾. 활성산소는 피부의 면역기능을 억제시키고, 염증을 유발하여 탄력 감소, 주름 및 기미, 주근깨 등의 각종 피부질환을 유발하고 결국 피부노화를 가속화시키는 원인이 된다⁴³⁾. 따라서 피부 노화를 방지하기 위해 생체 내뿐만 아니라 피부에서 활성산소로부터 피부세포를 보호해 줄 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{44,45)}. 활성산소는 정상적인 세포내 산소호흡과정에서도 발생하는데, 여기에는 NADPH cytochrome P450 reductase, NADPH oxidase, lipoxygenase 등이 관여한다^{46,47)}. 생체 내에서는 활성산소의 작용을 억제하여 세포를 보호하기 위한 방어수단으로 SOD (superoxide dismutase), catalase, GSH-PX (glutathione peroxidase) 등이 활성화되어 있지만⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 자외선과 같은 세포독성을 유발하는 인자에 노출된 세포에서는 급격한 활성산소의 증가가 나타나며, 이와 함께 세포의 사멸이 증가하게 된다⁵¹⁾.

본 연구에서는 UVB에 의한 피부 진피세포의 세포사멸에 대한 羌活續斷湯 추출물(KS)의 영향을 평가하고자 진피세포의 세포상해를 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포 내막에 존재하는데, 세포가 파괴될 때 세포 밖으로 유출되기 때문에 세포의 상해여부를 측정하

는 유력한 기준이 된다⁵²⁾. 실험결과, UVB는 배양된 인체피부 섬유아세포인 F6의 상해를 증가시켜 LDH의 유리를 증가시켰다. 이는 UVB에 의해 ROS 생성이 증가되고, ROS 물질들이 단백질, 지방, 핵산 등 생체 구성 물질을 변형시켜 세포막이 파괴된 것을 의미한다⁵³⁾. 실험결과, KS는 UVB에 의해 증가된 LDH 유리를 억제하는 효과는 있었지만 유의성은 없었다(Fig. 4).

다음으로 UVB에 의한 피부 진피 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여, F6 세포에 UVB를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정하였다. 생체 내에서 NO(Nitric oxide)는 L-arginine가 nitric oxide synthase(NOS)의 작용으로 인해 산화되어 생성되는 것으로, 생성된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 ROS의 하나인 superoxide anion(O_2^-)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite(ONOO⁻)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화한다⁵⁴⁾. NO는 반응성이 매우 크고 불안정한 자유기이므로 NO자체의 농도를 측정할 수 없어, NO의 안정된 대사산물인 nitrite를 측정하여 대조군과 비교해 보았다.

실험결과, UVB 조사시 F6 세포에서 생성되는 nitrite 양이 증가하였고, KS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 nitrite 생성을 유의성 ($p < 0.05$)있게 감소시켜, UVB에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 작용을 나타내었다(Fig. 5).

이상의 결과, 羌活續斷湯 추출물(KS)은 dermal fibroblast에서 세포의 증식을 감소시키고, collagen과 TIMP-1의 합성

을 감소시켰다. 또한, KS는 UVB 조사로 인해 증가한 dermal fibroblast의 유도성 nitrite 생성을 억제하였다. 따라서 KS는 dermal fibroblast에서 collagen의 과 증식과 UVB로 유도된 염증반응을 억제하여, 한방 부인과 임상에서 흉터를 치료하고 광노화로 인한 피부손상을 예방하는데 활용할 수 있을 것으로 사료 된다.

V. 결 론

羌活續斷湯 추출물(KS)이 인체피부 섬유아세포의 활성화에 미치는 영향과 UVB에 의한 인체피부 섬유아세포의 상해에 미치는 영향을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 羌活續斷湯은 F6 dermal fibroblast의 세포 증식을 유의성 있게 감소시켰다.
2. 羌活續斷湯은 F6 dermal fibroblast의 collagen 생합성을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 羌活續斷湯은 F6 dermal fibroblast의 TIMP-1의 합성을 유의성 있게 감소시켰다.
4. 羌活續斷湯은 UVB 조사로 인해 증가한 F6 dermal fibroblast의 LDH 생성을 억제하였으나 유의성은 없었다.
5. 羌活續斷湯은 UVB 조사로 인해 증가한 F6 dermal fibroblast의 nitrite 생성을 유의성 있게 억제하였다.

- 투 고 일 : 2012년 1월 25일
- 심 사 일 : 2012년 2월 1일
- 게재확정일 : 2012년 2월 7일

참고문헌

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학 제5판. 서울:여문각. 2008:26-7, 134, 538, 625-6, 729-32, 783.
2. Henderson EA. The potential effect of fibroblast senescence on wound healing and the chronic wound environment. J Wound Care. 2006;15:315-8.
3. 이혜영 등. 피부과학. 서울:군자출판사. 2007:26, 81-5.
4. Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 206:474-9.
5. 김나미 등. 紅蓼이 섬유아세포의 콜라겐 생합성과 MMP-1 활성화에 미치는 영향. 고려인삼학회지. 2007;31(2):86-92.
6. 유석주 등. 續斷의 생리활성성분이 치은섬유아세포의 세포주기조절에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 2005;35(1): 87-98.
7. 최천필, 류지호, 이무형. 태반 추출물이 섬유아세포의 증식에 미치는 영향. 대한피부과학회지. 2005;43(2):191-2.
8. 김경진, 김경준. 당노환쥐의 콜라겐 감소 및 인간 피부 섬유아세포의 MMP-1 증가에 대한 牡丹皮의 항 피부노화 효과. 대한한방안이비인후피부과학회. 2008;21(1):1-15.
9. 심관섭 등. 鷄血藤 추출물의 항산화와 사람 피부 섬유아세포에서의 Matrix Metalloproteinase-1 발현저해 효과. 한국생물공학회지. 2005;20(1):40-5.

10. 송규춘. 선삼이 피부진피세포 활성화와 자외선에 의한 손상억제 및 유전자 발현에 미치는 영향. 경원대학교대학원. 2010.
11. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:여강출판사. 2005:1095.
12. 김근찬, 이명중. 羌活續斷湯이 adjuvant 유발 관절염 동물 model에 미치는 영향. 한방재활의학과학회. 2004;14(1):1-18.
13. 소갑석 등. 후지체공 유발 흰쥐의 위축 근육에 대한 羌活續斷湯의 근 재생 효과. 한방재활의학과학회. 2009;19(4):19-35.
14. 이택준 등. 羌活續斷湯이 골세포 기능에 미치는 영향. 대한예방한의학회지. 2004;8(2):13-30.
15. 양수광. 羌活續斷湯이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2008.
16. Yamamoto T et al. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. J Immunol, 2000;164(12):6174-9.
17. McKay IA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Br J Dermatol. 1991;124(6):513-8.
18. 안성열 역. 임상의를 위한 미용피부과학. 서울:신홍메드사이언스. 2003;3, 92-4.
19. 대한미용피부외과학회. 미용피부외과학. 서울:한미의학. 2006:63-75, 209-25.
20. 노석선. 원색 피부과학. 서울:아이비씨기획. 2006:865-6, 882.
21. Al-Attar A et al. Keloid pathogenesis and treatment. Plast Reconstr Surg. 2006;117:286-300.
22. Connel PG, Harland CC. Treatment of keloid scars with pulsed dye lasers and intralesional steroid. J Cutan Laser Ther. 2000;2:147-50.
23. Kelly AP. Medical and surgical therapies for keloids, Dermatol Ther. 2004;17:212-18.
24. 徐宜厚. 皮膚病中醫診療學. 北京:人民衛生出版社. 1995:32-3.
25. 張志禮. 中西醫結合皮膚性病學. 北京:人民衛生出版社. 2000:74-5.
26. 손병원, 전홍룡, 윤규범. 東醫外科學. 서울:여강출판사. 1992:85-90.
27. 동의과학원. 東醫處方大典 2. 서울:여강출판사. 1993:767-8.
28. 윤용갑. 新東醫方劑圖解臨床活用. 서울:정담. 2006:155-6.
29. 강병수. 韓藥臨床配合應用. 서울:영림사. 2004:131-2, 448-9.
30. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 本草學. 서울:영림사. 2004:156, 161, 163, 165, 172, 348, 450, 575, 581, 632, 635, 637.
31. 신선미, 유동열. 六味地黃湯合二至丸加減方이 멜라닌 생성과 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(4):28-45.
32. 김수민, 유동열. 美白散이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(4):1-18.
33. 김진경, 유동열. 六味地黃湯加減方이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(3):66-82.

34. 김주영 등. 柴胡疏肝散加減方이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(1):95-109.
35. 송종석, 유동열. 赤何首烏가 멜라닌 생성억제와 작용기전에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2008;21(2):59-75.
36. 장두현, 유동열. 柿葉이 멜라닌 생성억제와 작용기전에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2009;22(2):43-59.
37. 김은섭. 生脈散이 자외선에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2010.
38. 임현정. 丹樞逍遙散이 자외선을 조사한 피부진피세포의 활성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2010.
39. Prockop DJ. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med.* 1979;301:13-23.
40. Brenneisen P et al. Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1(MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Bio Chem.* 1998;273:5279-87.
41. Fisher GJ et al.. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Eng J Med.* 1997;337:1419-28.
42. Sander CS et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2002;618-25.
43. Darr D et al. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 1994;102(5):671-5.
44. 김형우 등. 蒲公英 추출물의 항산화 효과 및 피부 각질세포 보호효과. 대한본초학회지. 2009;24(3):103-8.
45. 이진영 등. 黃耆의 자외선에 의한 세포 손상을 막는 보호효과. 생약학회지. 2008;39(4):300-4.
46. Saeki M et al. mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;27(4):333-6.
47. Chenevier-Gobeaux C et al. Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha. *Inflamm Res.* 2006;55(11):483-90.
48. Kobayashi T et al. Ultrastructural localization of superoxide dismutase in human skin. *Acta Derm Venereol.* 1993;73(1):41-5.
49. Masaki H, Okano Y, Sakurai H. Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(3):113-8.
50. Sun W et al. Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochem Cell Bio.* 1994;72(7-8):321-31.
51. Lardinois OM, Rouxhet PG. Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation. *Biochem*

- Biophys Acta. 1996;1298(2):180-90.
52. Nakai K et al. Effects of high glucose on NO synthesis in human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Dermatol Sci.* 2003;31(3):211-8.
53. Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 206:474-9.
54. Carla Biondi et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E2 biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. *Journal of Reproductive Immunology.* 2003;60(1): 35-52.