

흰쥐의 피부상처 동물모델에서 苦蔘이 신생혈관형성에 미치는 영향

김범희^{1,3} · 강경화^{2,3*}

1 : 동의대학교 한의과대학 해부학교실, 2 : 동의대학교 한의과대학 생리학교실, 3 : 동의대학교 한의학 연구소

Enhancement of Angiogenesis by *Sophorae Radix* in Full-thickness Skin Wound of Rats

Bum Hoi Kim^{1,3}, Kyung-Hwa Kang^{2,3*}

1 : Department of Anatomy, 2 : Department of Physiology, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 3 : Research Institute of Oriental Medicine, Dong-eui University

Wound healing is the restoration in injured skin tissue and one of the most important therapeutic targets. The process consists of inflammation, proliferation, and remodeling. There have been reported multiple factors that accelerate and delay wound healing. In this study we tested the hypothesis that *Sophorae Radix* extract would improve the recovery of wound healing after full-thickness skin wound in rats. Twenty young male Sprague-Dawley rats were used for the studies. A full-thickness skin wound was made on the dorsal skin of the rats. Either *Sophorae Radix* water extract (SR) or saline (Control) was orally administrated every day. The wound area was measured and the percentages of wound contraction, wound healed and wound epithelization were evaluated. After 15 days, the skin tissues were excised and examined by histopathological and immunohistochemical method. In results, wound area in SR group was significantly decreased to compared with Control. SR group showed the significant enhancements in the percentages of wound contraction, wound healed and wound epithelization. Histopathological examination revealed that SR induces neo-vascularization potential in wound healing process. SR treatment in rats significantly accelerated cutaneous wound healing in the angiogenesis process by increasing VEGF and TGF- β 1 synthesis. These results suggest that *Sophorae Radix* enhance skin wound repair by increasing the angiogenic agents such as VEGF and TGF- β 1.

keywords : *Sophorae Radix*, Full-thickness skin wound, Angiogenesis, VEGF, TGF- β 1

서 론

상처치유(wound healing)이란 손상된 피부조직의 재생을 의미한다. 피부는 외피, 진피 및 모낭과 분비샘을 포함한 피부부속물로 구성된 복합기관이며, 상처가 치유되는 과정에서 손상부위는 피부부속물의 재생이 없는 상처조직(scar formation)을 만들게 된다¹⁾. 이러한 상처조직을 최대한 줄이기 위해서는 빠른 상처치유과정이 필요하다. 상처치유의 과정은 크게 염증기(inflammation), 증식기(proliferation), 그리고 재형성기(remodeling)로 구분된다²⁾. 이전 연구를 통해 여러 인자들이 이러한 상처치유의 과정을 촉진시키거나 혹은 지연시키는 것으로 알려졌으며, 다양한 치료법들이 상처치유의 각 단계에 영향을 미쳐 염증세포 감소, 섬유모세포의 증식, 과립 형성 및 신생혈관형성(angiogenesis) 촉진 등의 기능을 함으로써 치료효과를 가지는 것으로 보고되었다³⁻⁵⁾. 특히 증식기에는 혈관형성, 섬유조직형성(fibroplasia), 재상피화(reepithelialization)

등이 일어나는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 이 단계에서 섬유조직 증식과 신생혈관형성은 밀접하게 연관된 방식으로 진행되어 세포외기질(extracellular matrix)과 과립조직(granulation tissue)을 형성하게 된다.

상처치유 과정에서 TGF- β 1은 섬유아세포(fibroblast)를 근섬유아세포(myofibroblast)로 전환함으로써 피부의 섬유아세포에서의 collagen 생성을 자극하며, 상처 주변부의 신생혈관 형성과 상피수축을 촉진하는 것으로 알려졌다⁷⁻⁹⁾. 이전 연구에서, TGF- β 1 유전자제거 생쥐(knockout transgenic mouse)의 경우 상처부위의 재상피화가 지연되는 것으로 밝혀졌다⁷⁾. 또한 VEGF는 과립조직의 형성에 필수적인 신생혈관 형성을 자극하는 가장 중요한 cytokine 중 하나로서, 새롭게 형성되는 모세혈관의 수를 늘려서 결과적으로 혈관형성과 상처치유를 촉진하는 역할을 한다^{10,11)}.

苦蔘(*Sophorae Radix*)은 콩과에 속한 다년생 초본인 *Sophora Flavescens* Aiton의 뿌리로 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利尿

* Corresponding author

Kyung-Hwa Kang, Department of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea

E-mail : ghkang@deu.ac.kr Tel : +82-51-850-7423

Received : 2017/11/22 Revised : 2017/12/07 Accepted : 2017/12/12

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.12.31.6.334

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

의 효능을 가지고 있는 것으로 알려졌다¹²⁾. 苦蔘에 관한 실험적 연구로는 항염증¹³⁾과 항산화 효과¹⁴⁾, 암세포의 사멸효과¹⁵⁾, 아토피 억제효과¹⁶⁾ 및 항균작용¹⁷⁾ 등이 보고되었다. 또한 최근 연구결과에 따르면, 苦蔘이 주요 구성인 복합처방이 흰쥐를 이용한 항문주변 궤양 동물모델에서 염증반응을 억제시킴으로써 유의한 치료효과를 가지고 있음이 밝혀졌다¹⁸⁾. 그러나 염증기 이후의 피부손상에 대한 苦蔘의 효과와 그 기전에 대한 연구는 아직 부족한 것이 사실이다.

이에 본 연구에서는 임상적으로 피부에 생기는 염증과 아토피 등 다양한 피부질환에 효능이 있는 것으로 알려진 苦蔘이 피부에서의 상처치유 과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐에 피부전층 상처를 유발한 후 苦蔘 투여에 따른 상처 크기의 변화, 상처 부위의 조직학적 변화 및 모세혈관의 생성과 VEGF 및 TGF- β 1의 발현변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구의 모든 과정은 00대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었으며(승인번호: R2017-003), 실험동물은 샘타코(주)에서 구입한 9주령, 약 250 g 전후의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰 쥐를 20마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 21~23°C, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암을 유지하는 사육실에서 무균음료와 사료가 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 제조 및 실험군의 분리

실험에 사용한 苦蔘은 0000을 통해 구입하였으며, 苦蔘 200 g을 증류수 2,000 ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 동결건조시켜 사용하였다. 수득율은 22.8%이었으며, 최종 투여량은 60 kg 일반 성인의 하루 20 g 복용량으로 환산하여 흰쥐 체중 100g당 33.3 mg를 음용수에 희석하여 투여하였다.

3. 전층피부상처(Full-thickness skin wound) 유발¹⁹⁾과 약물의 투여

실험 당일 ethyl ether로 흰 쥐를 흡입 마취시키고 흰쥐의 등쪽 피부의 털을 제거한 후 수술부위를 70% ethanol로 소독하였다. 등쪽 피부를 biopsy punch(H-1983-8, Keyes, Pakistan)를 이용하여 직경 8 mm의 원형 피부전층 상처를 유발하였다. 상처유발 후 상처 부위의 감염을 방지하기 위해 상처부 주위를 소독하고, PBS로 상처부의 혈흔과 기타 삼출물을 정리하였다. 상처부위의 감염을 방지하기 위해 매일 상처부위를 소독하였다.

4. 실험군의 분리와 약물 투여

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 전층피부상처 유발 후 苦蔘 추출액을 투여하는 SR(*Sophorae Radix*)군과 동일량의 생리식염수를 투여한 Control군으로 분리하였으며, 물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

각 실험군에 苦蔘 추출액과 생리식염수의 투여는 상처 유발일부터 시작하여 15일간 매일 1회 오전 동일한 시간에 경구 투여를 통해 시행하였다.

4. 상처부위 면적의 측정²⁰⁾

실험동물에 피부 전층 상처유발 후 3, 7, 11, 15일째 같은 시간에 각 군의 동물들의 상처부위를 촬영하였다. 상처의 연속율은 상처유발 직후의 최초의 상처 테두리면적(W₀)에서 측정일별 연속된 상처의 테두리면적(W_i)의 차이값의 백분율로 계산하였다. 상처의 치유율은 상처유발 첫날의 상처 테두리면적(W₀)에서 각 측정일별 상처의 면적(U_i)의 차이값의 백분율로 계산하였다. 상처의 면적은 상처의 테두리에서 상피화된 부분을 제외한 면적을 말한다. 상처의 상피화율은 상처유발 후 7일째부터 측정하였는데, 측정일별 상피화 면적은 상처의 테두리면적(W_i)에서 측정일별 상처의 면적(U_i)의 차이값의 백분율로 계산하였다. 상처테두리 면적과 상처부위의 면적은 image processing program (NIH Image, version 1.52, Public Domain Software)을 이용하여 측정하였다.

$$\text{연속율 (\%)} = \frac{W_0 - W_i}{W_0} \times 100$$

$$\text{치유율 (\%)} = \frac{W_0 - U_i}{W_0} \times 100$$

$$\text{상피화율 (\%)} = \frac{W_i - U_i}{W_i} \times 100$$

5. 해부조직학적 분석

상처유발 후 15일에 실험동물을 희생하여 상처부와 주변 피부 조직을 채취하였다. 조직을 4% 중성 formalin 용액에 24시간 고정 한 후 상처 중앙을 통과하는 절편을 취하여 탈수시킨 후 paraffin 블록에 포매하였다. 조직을 5 μ m 두께로 조직절편기를 사용하여 절단한 다음 gelatin으로 코팅된 slide에 붙여 paraffin 제거 및 함수 과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 하였다. H&E 염색을 하기 위해서 조직절편을 xylene을 이용하여 paraffin을 제거한 후 100, 95, 90, 80, 70, 60% alcohol로 10분간 함수시켰으며, 증류수로 세척하였다. Harris hematoxylin으로 30초간 염색하고, 흐르는 물에 조직을 2분간 세척한 후, 1% HCl 용액에 4~5회 담근 후 다시 흐르는 물에 세척하였다. 세척이 끝난 조직을 ammonia water에 4~5회 담근 후 다시 흐르는 물로 15분간 세척한 후 eosin으로 10초간 염색반응을 유도하였다. 70, 80, 90, 95, 100% alcohol 및 xylene을 이용하여 탈수한 후 canada balsam을 이용하여 봉입하였다.

6. 면역조직화학(Immunohistochemistry) 염색

상처주위 조직에서의 VEGF와 TGF- β 1의 발현을 관찰하기 위하여 polyclonal primary anti-VEGF antibody (1:400, Abcam, Cambridge, UK), polyclonal primary anti-TGF- β 1 antibody (1:300, Abcam, Cambridge, UK)를 primary antibody로 하고, biotinylated goat anti-rabbit IgG (Nichirei Co.)를 secondary antibody로 사용하여 염색한 후 변화를 관찰하였다. 또한 상처주

변의 동일 구간에서의 면역 양성반응의 결과를 정량화하기 위해 400×의 배율의 현미경 하에 일정한 구역(1.2×10⁵mm²) 안에서 관찰되는 면역 양성반응 세포수를 측정하여 수치화하였다.

7. 통계처리

측정된 모든 자료는 SPSS 10.0를 이용하여 분석하였다. 실험 결과의 분석은 Student t-test를 이용하여 유의수준 p<0.05 및 p<0.01로 유의성을 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

결 과

1. 상처부위의 육안적 변화

전층 피부손상 유발 후 15일간의 실험기간 동안 각 실험군의 모든 실험동물이 생존하였다. 상처부위를 육안으로 관찰한 결과 상처유발 당일에는 염증반응으로 인해 모든 실험동물의 조직에서 혈액과 삼출물 분비가 관찰되었고, 3일째에는 육아조직들의 증식이 관찰되었다. 상처유발 7일 후에는 상처의 수축과 상피화가 진행된 것을 확인할 수 있었다. Control군과 SR군 모두에서 이런 상처의 수축과 상피화 과정이 관찰되었으나, SR군이 상처의 수축과 상피화가 Control군에 비해 상대적으로 좀더 빠르게 진행되는 것으로 관찰되었으며, 혈종과 삼출물 분비도 줄어들었다. 이러한 변화는 11일째 이후에도 뚜렷이 나타났으며, 실험 마지막 날인 15일째에는 육안으로도 상처부위의 크기가 Control군에 비해 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

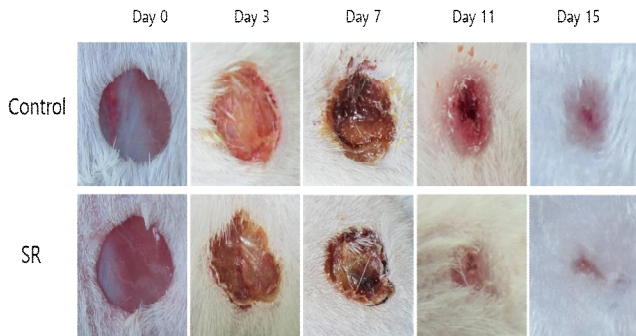


Fig. 1. Macroscopic findings of open wounds after initial wounding. The appearance of excision wounds after operation was observed on 0, 3, 7, 11, 15th day. *Sophorae Radix* treated (SR) group showed smaller open wound areas for 15 days to compared with Control group.

2. 상처 연축율

상처 연축율은 최초의 상처 테두리 면적으로부터 줄어든 테두리 면적의 차이 값으로 측정되었다. SR군이 Control에 비해 전반적으로 높은 연축률을 나타내었는데, 상처 유발 11일째부터 유의성 있는 변화를 나타내었다. 즉, 11일째에 Control군이 35.5±2.1%를 나타낸 반면, SR군의 경우 46.1±2.9%를 나타내어 유의성 있는 차이를 보였으며(Fig. 1, p<0.01), 13일째에도 Control군이 50.0±1.8%, SR군이 59.9±3.2%로 측정되어 마찬가지로 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 1, p<0.01). 실험이 종료되는 15일째에

는 Control군이 71.6±2.9%, SR군이 80.4±2.8%로 관찰되어 유의성 있는 변화를 보였으며(Fig. 1, p<0.05), 종료일의 Control군에 대한 SR군의 연축률 차이를 비교해 보면 약 12.3% 빠르게 상처의 연축이 진행되었음을 알 수 있었다.

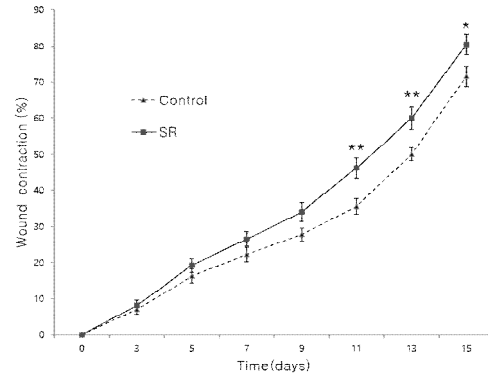


Fig. 2. Mean percentage of wound contraction(%) in Control and SR groups. The mean percentage of wound contraction in SR group was significantly increased after 11th day to compared with Control group. Data were expressed as mean±S.E. (* p<0.05, ** p<0.01)

3. 상처 치유율

맨 처음의 상처 테두리면적에서 각 측정일별 상처 면적의 차이 값의 백분율로 계산된 상처 치유율에 있어서도 Control군과 SR군 간에 뚜렷한 차이를 나타내었다. 즉, 상처 유발 7일째부터 두 군간에 유의성 있는 차이를 보였는데, 실험 개시 7일째에 Control군이 30.1±1.3%, SR군이 37.1±2.8%, 9일째에는 Control군이 38.1±1.5%, SR군이 47.1±4.0%로 측정되어 상처 치유율의 비교에 있어서 유의성 있는 차이를 보였다(Fig. 2, p<0.05). 이러한 차이는 이후 더욱 커져서, 11일째에 Control군이 50.0±2.0%, SR군이 64.7±3.6%, 13일째에는 Control군이 64.3±2.6%, SR군이 79.3±3.0%로 관찰되었다(Fig. 2, p<0.01). 최종적으로 실험 마지막 날인 15일째에는 Control군이 83.0±2.9%, SR군이 91.9±2.0%로 측정되었으며, Control군에 대한 SR군의 치유율 차이는 약 10.8%로 상처의 치유가 유의성 있게 빠르게 진행되었음을 알 수 있었다(Fig. 2, p<0.05).

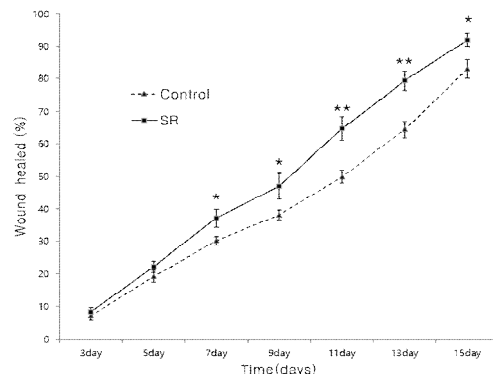


Fig. 3. Mean percentage(%) of wound healed in Control and SR groups. The mean percentage of wound healed in SR group was significantly increased after 7th day to compared with Control group. Data were expressed as mean±S.E. (* p<0.05, ** p<0.01)

4. 상처 상피화율

상처 상피화율은 Control군과 SR군 모두에서 상피화가 진행된 7일째부터 측정하였는데, 측정일별 상처의 테두리면적에서 상처의 면적의 차이값의 백분율로 계산하였다. 그 결과, 전반적으로 SR군이 Control군에 비해 상피의 재생이 빠르게 진행되는 것으로 관찰되었는데, 특히 상처유발 후 13일째에 Control군이 28.5±4.8%를 나타낸 반면, SR군의 경우는 50.0±5.1%로 측정되어 유의성 있는 상승을 나타내었다(Fig. 3, p<0.01).

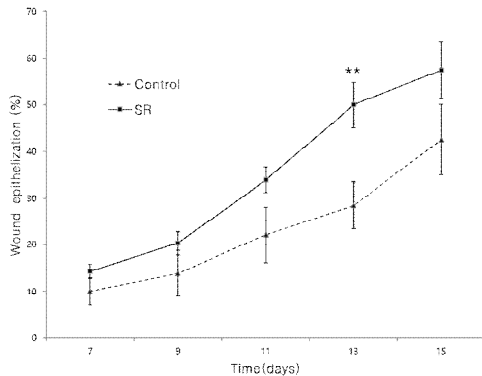


Fig. 4. Mean percentage(%) of wound epithelization in Control and SR groups. The wound epithelization percentage was determined after day 7. The mean percentage of rats in SR group was significantly increased on day 13 as compared to Control group. Data were expressed as mean±S.E. (** p<0.01)

5. 상처부위의 조직학적 변화

실험 마지막 날인 전종피부상처 유발 15일째에 상처부위의 피부를 적출하여 5µm 두께로 절편하였다. 이후 H&E 염색을 시행한 후 현미경으로 변화를 관찰하였다. 그 결과, Control군과 SR군에서 모두 상피화와 더불어 표피의 각질화가 일어났는데, SR군이 Control군에 비해 상피화가 상대적으로 더 많이 이루어진 것이 관찰되었다(Fig. 5A,B). Control군과 SR군에서 모두 상처부위에 염증세포와 섬유모세포 및 세포외기질의 축적이 관찰되었으며 진피층에서의 혈관형성이 관찰되었다. 특히 이러한 새로운 모세혈관의 증식은 SR군에서 Control군에 비해 더 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 5C,D). 동시에 신생혈관형성에 따른 세포소기관과 모낭(hair follicle) 등이 생성이 SR군에서 Control군에 비해 더 많이 발견되었다.

6. VEGF와 TGF-β1의 면역조직화학적 발현

면역조직화학 염색법을 통하여 각 실험군의 상처부위에서의 VEGF와 TGF-β1 단백질의 발현을 관찰하였다. 그 결과, VEGF의 경우 새롭게 형성되는 혈관 주변에서 주로 면역 양성반응 세포들이 관찰되었는데, SR군에서 Control군에 비해 VEGF의 발현이 더 뚜렷이 관찰되었으며, 신생혈관 형성도 더 많이 이루어 졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 6A, B).

TGF-β1의 경우에도 SR군에서 Control군에 비해 발현이 더 증가된 것이 관찰되었으며, 동시에 세포외기질의 축적도 더욱 활발한 것으로 확인되었다(Fig. 6C, D).

이러한 VEGF와 TGF-β에 대한 면역반응을 수치화하기 위하여

현미경 하의 일정면적에서 양성반응을 보인 세포수를 측정하였다. 그 결과에서도 VEGF 발현의 경우 Control은 61.4±6.2개/1.2×10⁵ µm²인 반면, SR군에서는 82.2±8.0개/1.2×10⁵µm²로 SR군에서 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다(Fig. 6. p<0.05). TGF-β1의 경우에서도 Control군은 74.9±7.4개/1.2×10⁵µm²인 반면, SR군에서는 106.1±10.4개/1.2×10⁵µm²로 측정되어 VEGF에서와 마찬가지로 SR군이 Control군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다(Fig. 6. p<0.05).

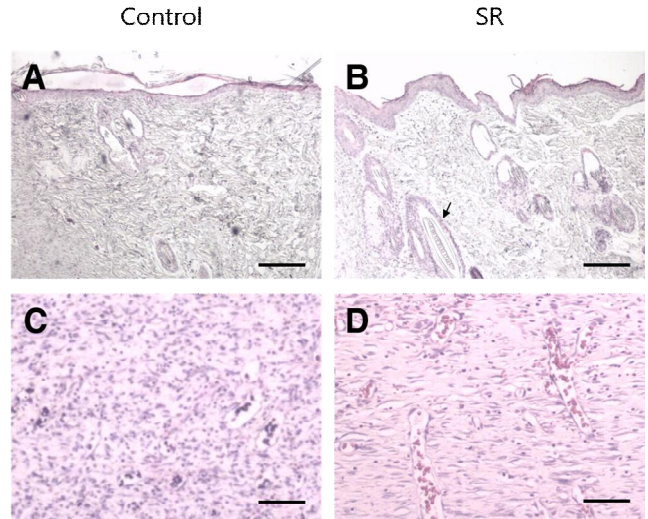


Fig. 5. Hematoxylin and eosin (H&E) stained sections of the wounded skins(A, B) and dermis(C, D) in Control and SR groups. The cross-sections, including wounds and surrounding skin tissues, from each group were collected on day 15 of the experiment for histopathological examination. The rats in SR group showed increased epidermal epithelialization and the production of hair follicles (arrow) as compared with Control group. Magnification 100×(A, B), and 200×(C, D). Scale Bar 200µm(A, B), and 100µm(C, D).

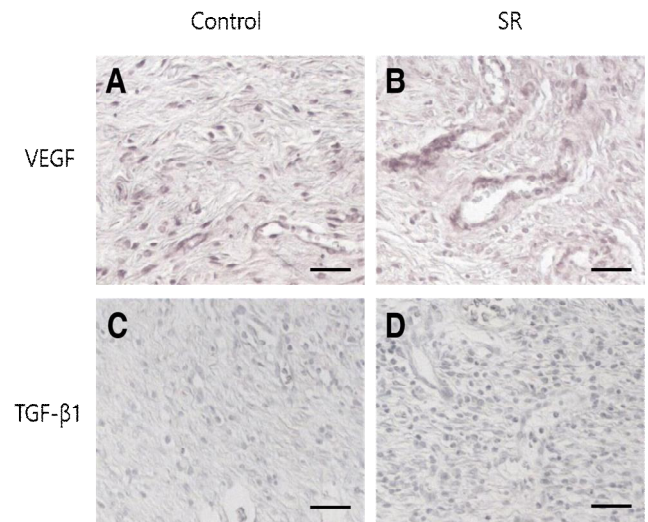


Fig. 6. Immunohistochemical staining for VEGF(A, B) and TGF-β1(C, D) of the wounded skins in Control and SR groups. Immunohistochemistry demonstrated that the distribution of VEGF positive and TGF-β1 positive cells in SR group was significantly more than that in Control group. Magnification 400×, Scale Bar 50 µm.

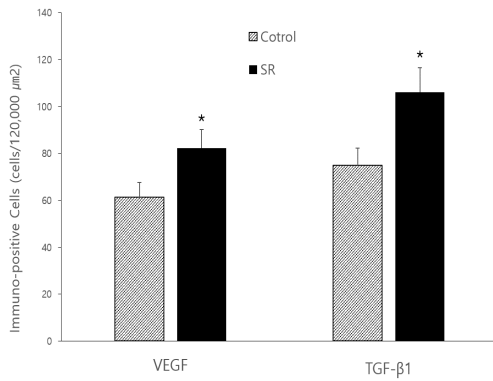


Fig. 7. The immunoreactivities for VEGF and TGF-β1 of the wounded skins in Control and SR groups. The immunoreactivities of both VEGF and TGF-β1 were significantly increased in SR group, as compared with Control group. Data were expressed as mean±S.E. (* p<0.05)

고찰

상처치유의 과정은 여러 단계를 거쳐 일어나는데, 각 단계별 생리학적 회복기전은 특정한 시기에 적절한 순서로 이루어져야 한다²⁾. 상처치유의 과정이 지연되거나 불완전하게 진행되는 경우 상처부위는 만성적인 염증상태로 변할 수 있으며, 외부의 감염에 노출되기 쉬워 심각한 이차적 후유증을 나타내게 될 수 있다. 따라서 상처치유의 과정에서는 상처 주변 피부조직의 빠른 수축과 회복이 중요하다²¹⁾.

苦蔘은 지금까지 주로 항염증^{12,13)}과 항산화 효과¹⁴⁾, 아토피 억제효과¹⁶⁾ 및 항균¹⁷⁾, 항암¹⁵⁾효과에 대한 연구가 이루어져 왔다. 본 연구에서는 상처치유에 苦蔘이 미치는 효과를 검증하기 위하여 흰쥐에 인위적인 전층피부손상을 유발시키고 苦蔘 물추출물을 15일간 경구투여하여 상처부위 변화를 관찰하였다. 그 결과, 상처치유의 과정을 육안으로 관찰하였을 때 苦蔘 추출액을 투여한 SR군이 Control군에 비해 상처크기의 축소와 상피화가 빠르게 진행되었으며, 혈종과 삼출물 등이 상대적으로 감소되는 등 상처유발로 인한 염증반응이 줄어드는 것으로 관찰되었다(Fig. 1). 상처 테두리의 감소를 나타내는 연속률과 상처크기의 감소를 나타내는 치유율을 비교한 결과에서 SR군은 Control군에 비해 빠른 치료효과를 나타냈다. 연속률의 경우 상처유발 후 11일째부터, 치유율의 경우는 7일째부터 유의성 있는 변화를 나타냈는데, 특히 11일째와 13일째에 뚜렷한 상승이 나타났다(Fig. 2, Fig. 3). 이러한 연속률과 치유율의 변화는 상처부위에서의 상피화와 밀접한 관련이 있는데, 상처 표면에서 육안으로 관찰된 상처부위의 수축 및 상피화가 SR군이 Control군에 비해 빠르게 진행된 것과 관련 있는 결과이다. 7일째 이후의 상피화를 비교에서도 SR군이 Control군에 비해 상피화가 상대적으로 빠르게 진행되었는데, 11일째에는 유의성 있는 변화를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과들을 통해 苦蔘이 피부손상의 회복에 있어 염증 반응을 억제하는 동시에 상처 부위의 피부 수축을 촉진시켜 상처면적을 감소시키고 상피의 재생을 촉진하는데 유의한 효과가 있음을 확인하였다.

앞서 언급한 바와 같이 상처 치유의 과정에서는 상처 주변 조직의 빠른 수축과 재생이 중요한데, 상처의 빠른 회복을 위해 상처

주위로의 새로운 혈관생성이 필수적이다²²⁾. 신생혈관 형성을 통해 섬유모세포의 교원질 형성과 세포의 기질의 축적을 촉진함과 동시에 재상피화와 상처수축을 위한 영양분을 제공할 수 있기 때문이다. 본 연구에서 상처유발 후 15일째에 H&E 염색을 통해 상처부위 피부조직의 변화를 현미경으로 관찰한 결과, SR군과 Control군 모두에서 섬유모세포와 세포외기질 형성이 관찰되었으며, 동시에 진피층에서는 새로운 혈관의 형성이 확인되었다. 苦蔘 추출액을 투여한 SR군에서 Control군에 비해 섬유모세포와 세포외기질의 형성이 상대적으로 많이 이루어졌으며, 특히 신생혈관 형성이 SR군에서 뚜렷이 증가하는 것으로 관찰되었다. 신생혈관 형성이 늘어나면서 세포소기관과 모공 등이 생성도 H&E 염색을 통해서 다수 발견되었다(Fig. 5). 이러한 결과들은 볼 때, 苦蔘 추출액이 전층피부상처 유발 후 상처크기의 감소를 촉진시키고 빠른 상피화에 유의한 효과를 나타낸 것은 苦蔘이 상처부위의 신생혈관 형성을 자극함으로써 상처치유과정을 촉진시키기 때문인 것으로 생각된다.

한편, 상처치유 과정에서의 신생 혈관의 형성은 상처 주위에 존재하는 세포들로부터 분비되는 각종 성장인자 및 cytokine들에 의하여 조절되는데, 대표적인 것이 vascular endothelial growth factor(VEGF), transforming growth factor beta(TGF-β)와 platelet derived growth factor(PDGF) 및 epidermal growth factor(EGF) 등이다^{23,24)}. 특히, VEGF는 가장 강력한 내피세포 유사분열촉진물질(mitogen)으로써 새로운 혈관생성에 관여하는데, 내피세포의 수용체 인산화효소(receptor kinase)에 부착하여 혈관투과성을 변화시키고 점진적으로 혈관을 형성하는 세포내 신호전달을 유도하는 기능을 한다²⁵⁾. VEGF는 배아발생, 종양성장, 상처치유 등 다양한 생리학적, 병리학적 상황에서의 신생혈관 생성에 관여하는데, 특히 상처치유의 과정에서 VEGF 생성의 증가에 의한 혈관생성의 촉진은 육아조직의 생성과 성숙을 유도하고 탄력섬유의 증가와 빠른 상처의 회복을 일으킬 수 있다²¹⁾. 이전 연구를 통해 상처치유에 효과가 있는 것으로 알려진 다양한 약물들이 VEGF의 발현을 증가시켜 신생혈관생성을 촉진하는 것으로 밝혀졌다^{26,27)}. 본 연구에서는 전층피부 손상 유발 후 15일간 苦蔘 추출액을 경구투여하고 상처부위에서 VEGF의 발현을 면역조직화학적 방법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 苦蔘을 투여한 SR군에서 Control군에 비해 VEGF의 양성 반응이 현저히 증가되는 것이 확인되었다. 이러한 양성 반응세포의 증가는 신생혈관 주변에서 더욱 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 5). VEGF에 대한 양성 반응을 수치화하기 위하여 현미경 하의 일정면적에서의 VEGF에 대한 면역 양성 세포수를 측정된 결과에서도, SR군에서 Control군에 비해 양성세포수의 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 7). 이러한 결과들은 통해 苦蔘의 빠른 상처치유 효과는 상처부위에서의 VEGF 생성을 촉진함으로써 새로운 모세혈관 형성을 자극하기 때문인 것으로 사료된다.

한편, 상처치유 과정에서의 조절인자 중 하나인 TGF-β1도 신생혈관형성을 자극하여 상처치유를 촉진하는 것으로 알려졌다^{7,21)}. 이 외에도, TGF-β1는 상처치유과정의 여러 단계에 작용하여 섬유모세포의 이동과 증식을 통한 세포외기질의 생성 및 상처육아조직의 형성을 조절하며, 근육섬유모세포로의 분화를 촉진하는 등의 기능을 가지고 있어서 상처치유 과정에서 치유의 속도와 상처부위의 강

도 등을 조절하는 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다^{8,9)}. 본 연구에서 상처 유발 후 15일째에 TGF- β 1의 발현을 면역조직화학법으로 관찰하여 비교한 결과, 苦蔘을 투여한 SR군에서 Control군에 비해 TGF- β 1에 대한 양성세포수가 현저히 증가되는 것으로 나타났으며, VEGF에서 유사하게 새롭게 형성되는 혈관 주위에서 뚜렷이 관찰되었다. 또한 TGF- β 1 발현증가와 함께 세포외기질의 증가도 관찰되었다(Fig. 6). TGF- β 1에 대한 양성 반응을 수치화하기 위하여 일정면적 안에서의 양성 반응세포수를 측정된 결과에서도 SR군이 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다(Fig. 7). 즉, 苦蔘의 상처부위에서 VEGF 뿐 아니라 TGF- β 1의 생성을 촉진하는 혈관형성을 자극하고 빠른 상처치유의 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 이러한 결과는 상처치유를 촉진하는 것으로 알려진 다양한 약물들이 VEGF 및 TGF- β 1의 생성을 동시에 증가시킴으로써 상처부위에서의 혈관형성을 자극한다는 이전 연구결과와도 관련이 있다고 할 수 있다^{28,29)}.

위의 모든 결과들을 종합하면, 苦蔘은 상처치유 과정에서 VEGF와 TGF- β 1의 생성을 촉진함으로써 상처치유 과정의 증식기와 재형성기에 상처주위로 새롭게 형성되는 모세혈관의 수를 증가시켜 섬유모세포의 활동과 세포외기질의 축적을 촉진하는 것으로 판단된다. 이를 통해 상처부위에서의 상처크기 감소와 재생피화를 가속시키는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 상처의 연속률, 치유율 및 상피화율의 비교를 통해서도 확인할 수 있었다. 다만, 본 연구에서는 상처치유과정의 단계에서 증식기 이후의 신생혈관형성 과정에서 苦蔘이 미치는 효과를 주로 관찰하였는데, 이후 추가적인 연구를 통해 초기 단계의 염증기에서 미치는 영향에 대해서도 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 뿐만 아니라, 상처치유과정에 관여하는 다른 다양한 분자적 기전에서의 연구도 필요하다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 피부상처 치유과정에서 苦蔘이 미치는 영향을 검증하고자 흰쥐에 인위적인 전층피부손상을 유발시키고 15일간 苦蔘 추출액을 경구투여하고 상처의 회복과정을 육안으로 확인하고, 피부조직을 적출하여 H&E 염색을 통한 해부조직학적 관찰과 VEGF와 TGF- β 1에 대한 면역조직화학염색법을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

苦蔘은 전층피부손상 이후의 상처치유과정에서 육안적으로 상처부위의 빠른 회복을 나타냈으며, 상처 연속률, 치유율, 상피화율을 유의성 있는 증가시켰다. 해부조직학적 관찰에서는 상처부위의 상피화를 촉진시키고, 신생혈관 형성 및 세포외기질의 축적을 증가시켰으며, 이러한 빠른 상처치유의 기전은 상처부위에서의 VEGF와 TGF- β 1의 생성 촉진에 의한 것으로 확인되었다. 따라서 苦蔘은 피부상처의 치유에 있어 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2013년도 동의대학교 연구년 지원과 중소기업청에

서 지원하는 2017년도 산학협력력 기술개발사업(No. 과제번호 C0510429)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1):1-12.
2. Kasuya A, Tokura Y. Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci.* 2014;76(3):169-72.
3. Zhang Z, Zheng Y, Li Y, Bai H, Ma T, Song X, Zhao J, Gao L. The effects of sodium usnic acid by topical application on skin wound healing in rats. *Biomed Pharmacother.* 2017;97:587-93.
4. Wu H, Li F, Wang S, Lu J, Li J, Du Y, Sun X, Chen X, Gao J, Ling D. Ceria nanocrystals decorated mesoporous silica nanoparticle based ROS-scavenging tissue adhesive for highly efficient regenerative wound healing. *Biomaterials.* 2018;151:66-77.
5. Asfour MH, Elmotasem H, Mostafa DM, Salama AAA. Chitosan based Pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: In vitro and in vivo study. *Int J Pharm.* 2017;534(1-2):325-38.
6. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci.* 2013;72(3):206-17.
7. Pereira Lde P, Mota MR, Brizeno LA, Nogueira FC, Ferreira EG, Pereira MG, Assreuy AM. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . *J Ethnopharmacol.* 2016;187:213-23.
8. Albaayit SF, Abba Y, Rasedee A, Abdullah N. Effect of *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae) leaf extract on wound healing and antioxidant activity in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3507-18.
9. Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Amano H, Shichiri M, Majima M. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- β 1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother.* 2015;70:317-25.
10. Li WW, Talcott KE, Zhai AW, Kruger EA, Li VW. The role of therapeutic angiogenesis in tissue repair and regeneration. *Adv Skin Wound Care.* 2005;18(9):491-500.
11. Andrikopoulou E, Zhang X, Sebastian R, Marti G, Liu L, Milner SM, Harmon JW. Current Insights into the role

- of HIF-1 in cutaneous wound healing. *Curr Mol Med.* 2011;11(3):218-35.
12. Jung HA, Jeong DM, Chung HY, Lim HA, Kim JY, Yoon NY, Choi JS. Re-evaluation of the antioxidant prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(5):908-15.
 13. Jin JH, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(3):589-95.
 14. Piao XL, Piao XS, Kim SW, Park JH, Kim HY, Cai SQ. Identification and characterization of antioxidants from *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(9):1911-5.
 15. Liu T, Song Y, Chen H, Pan S, Sun X. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(10):1740-5.
 16. Hong MH, Lee JY, Jung H, Jin DH, Go HY, Kim JH, Jang BH, Shin YC, Ko SG. *Sophora flavescens* Aiton inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of the NF kappaB/IkappaB signal pathway in human mast cell line (HMC-1). *Toxicology in vitro.* 2009;23(2):251-8.
 17. He X, Fang J, Huang L, Wang J, Huang X. *Sophora flavescens* Ait.: Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol.* 2015;172:10-29.
 18. Xu X, Li X, Zhang L, Liu Z, Pan Y, Chen D, Bin D, Deng Q, Sun YU, Hoffman RM, Yang Z, Yuan H. Enhancement of Wound Healing by the Traditional Chinese Medicine Herbal Mixture *Sophora flavescens* in a Rat Model of Perianal Ulceration. *In Vivo.* 2017;31(4):543-9.
 19. Gul Satar NY, Cangul IT, Topal A, Kurt H, Ipek V, Onel GI. The effects of *Tarantula cubensis* venom on open wound healing in rats. *J Wound Care.* 2017;26(2):66-71.
 20. Yaseen Khan M, Ali SA, Pundarikakshudu K. Wound healing activity of extracts derived from *Shorea robusta* resin. *Pharm Biol.* 2016;54(3):542-8.
 21. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
 22. Besson JCF, Hernandez L, Campos JM, Morikawa KA, Bersani-Amado CA, Matioli G. Insulin complexed with cyclodextrins stimulates epithelialization and neovascularization of skin wound healing in rats. *Injury.* 2017;48(11):2417-25.
 23. Ram M, Singh V, Kumawat S, Kumar D, Lingaraju MC, Uttam Singh T, Rahal A, Tandan SK, Kumar D. Deferoxamine modulates cytokines and growth factors to accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;764:9-21.
 24. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000;5(1):40-6.
 25. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care.* 2014;3(10):647-61.
 26. Wang Y, Han G, Guo B, Huang J. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. *Pharmacol Rep.* 2016;68(6):1126-32.
 27. Lin LX, Wang P, Wang YT, Huang Y, Jiang L, Wang XM. Aloe vera and *Vitis vinifera* improve wound healing in an in vivo rat burn wound model. *Mol Med Rep.* 2016;13(2):1070-6.
 28. Fan ZW, Pang YX, Wang K, Yu FL, Wang D, Yang Q, Ma QS, Li XT, Zou J, Zhang WQ, Wu LF. *Blumea balsamifera* Oil for the Acceleration of Healing of Burn Injuries. *Molecules.* 2015;20(9):17166-79.
 29. Tamri P, Hemmati A, Boroujerdnia MG. Wound healing properties of quince seed mucilage: in vivo evaluation in rabbit full-thickness wound model. *Int J Surg.* 2014;12(8):843-7.