

흰쥐의 외과적 창상에 대한 Ginsenoside Rg1의 치료효과

임애경¹ · 김길수² · 박수정¹ · 홍주현³ · 최향자⁴ · 김대익^{1*}

¹(재)대구테크노파크 바이오산업지원센터, ²경북대학교 수의과대학
³대구가톨릭대학교 외식식품산업학부, ⁴소리소 화장품

Healing Effects of Ginsenoside Rg1 on Experimental Open Wound in Rat

Ae-Kyoung Lim¹, Kil-Soo Kim², Su-Jung Park¹, Joo-Heon Hong³,
Hyang-Ja Choi⁴, and Dae-Ik Kim^{1*}

¹Daegu Technopark Bio Industry Center, Daegu 704-801, Korea

²College of Veterinare Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

⁴Soriso Co. Ltd., Daegu 706-711, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the effect of ginsenoside Rg1 treatment on wound healing using SD rats by generating four full-thickness skin wounds on the dorsum. In the Rg1-treated groups (5,000 and 10,000 ppm), area of wounds and macroscopic inflammatory signs were significantly decreased compared to control group throughout the experimental period in a concentration dependent manner. Histological appearance after 20 days of treatment with Rg1 revealed the formation of epithelial layer, hair follicles and progressive angiogenesis and an increase in collagen and granulation as compared to control group. Rg1 treatment resulted in the increased expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA and reduced expression of transforming growth factor beta (TGF- β) mRNA in wounded skin compared to control group. The expression levels of VEGF and TGF- β mRNA in the Rg1-treated groups were similar to those of Fucidin[®] ointment-treated group. These results suggested that Rg1 should be helpful for the promotion of wound healing.

Key words: ginsenoside Rg1, wound healing, wound repair, VEGF, TGF

서 론

의약품의 발달로 창상 등의 상처치료제가 날이 갈수록 발전하고 있고 그 종류도 다양해지고 있다. 창상치유제의 역할은 파괴된 조직의 빠른 재생과 재생된 조직의 흔적, 즉 scar의 크기를 최소화하는 것이다. 이러한 상처 치료제의 원료로서 피부 재생효과가 우수하다고 알려진 인삼에 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다. 인삼은 미백, 노화방지, 피부개선, 항암 및 항균 등 복합 기능을 가지고 있어 화장품의 원료로 제품 제형화에 관계없이 다양하게 이용되고 있다. 이러한 인삼류의 약효성분으로는 배당체 성분인 ginsenoside를 비롯한 비사포닌계의 생리활성물질로서 polysaccharides, phenolic compounds, acidic polysaccharides, peptides, alkaloids, amino acids 유도체 등이 있다(1-3). 또 다른 인삼의 약리 활성물질로 알려진 사포닌(ginseng total saponin, GTS) 성분은 물이나 ethanol에 가용성이고 triterpene 골격을 유지하며 R1, R2, R3의 위치에 당류가 결합한

구조를 가지고 있으며, 인삼에 함유되어 있는 배당체를 크로마토그램에서 Rf(Rf=D1/D2; D1=각 용질이 이동한 거리, D2=용매가 이동한 거리)값의 순으로 ginsenoside-Re(Ra), -Rb1, Rb2, -Rc, Rd, -Re, -Rf, Rg, Rh라고 명명한다(3). 이와 같이 많은 종류의 사포닌 중 특히 ginsenoside Rg1(Rg1)은 피부 재생 효과가 탁월한 것으로 알려져 있으며(4,5), 인삼 잎에 다량 분포되어 있어(6,7) 추출과정에서의 수율 또한 높아 경제적 원료로 사용될 가치가 충분하다.

피부조직은 손상을 입게 되면 생체의 정상적인 리듬이 깨어지게 되어 창상을 치유하려는 반응이 시작되며 이러한 상처 치유 과정은 세 단계로 나눌 수 있다. 첫 단계는 염증기로서 혈관 수축, 혈소판 응고, 응 혈관 형성 등이 일어나며, 다음 단계인 육아기에는 새로운 모세혈관이 형성되며 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 상피성장인자(epithelial growth factor, EGF), 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF) 및 형질전환성장인자(transforming growth factor beta, TGF- β) 등의 여러 성장

*Corresponding author. E-mail: crs3814@hanmail.net
Phone: 82-53-602-1891, Fax: 82-53-602-1898

인자들이 방출되어 재생피화에 참여한다(8,9). 특히 TGF-β와 PDGF는 동물실험 모델에서 연부 조직의 창상치유를 촉진하는 인자로 알려져 있다(10). 또한 TGF-β는 섬유아세포로 하여금 교원질과 fibronectin에 생산을 증가시켜 세포외기질의 구성과 양을 조절하는 주된 생성인자로 반흔의 생성과도 밀접한 관계가 있다(11). 혈관 내피세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 혈관, 림프관의 발생과 항상성 유지에 관여하며 창상치유에도 중요한 효과를 가진다. VEGF는 저 산소 상태 및 TGF, 인터류킨, PDGF와 같은 세포 성장 인자들의 자극에 의해 혈관 내피세포, 조혈 세포, 기질세포에서 주로 생성된다. 이러한 TGF-β, VEGF와 같은 각종 성장인자들이 분비됨으로 인해 새로운 혈관형성과 육아조직 형성 및 교원섬유 등의 기질단백질을 합성하여 상처회복을 촉진하는 역할을 한다(12).

흔히 상처치유 용도로 사용하는 연고로는 항생연고제, 면역억제제 및 드레싱류 등이 있는데 이런 연고제의 작용은 단순히 피부에 적당히 도포하여 수분손실, 기계적 손상, 질병을 일으키는 미생물의 침입 및 유해물질 등의 영향으로부터 피부조직에 대한 보호막 구실만을 제공하여 부가적인 증상만을 억제하는 것이므로 적극적인 치료의 개념이 아니다(13). 그러나 창상치유 과정은 조직의 파괴에 따라 일어나는 역동적이고 복잡한 과정으로서 세포의 구조, 생리, 생화학적 변화가 일어나 손상 또는 결손 부위가 완전히 재생되지 않고 흉터를 남기고 치유되게 된다(14). 이러한 창상치유제의 궁극적인 목적은 반흔을 최소화하면서 가능한 빨리 창상부위가 감소하도록 하는 적극적 치료(15)로 창상유발에 있어서 신속한 치료효과와 흉터를 최소화 시킬 수 있는 치료제가 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 Rg1 함유 연고가 상처치유에 필수적인 피부 세포성장인자의 생성과 피부재생 능력에 미치는 영향을 관찰하여 창상치유제를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

Ginsenoside Rg1 도포액 제조

Rg1을 분리하는 공정은 인삼 잎을 세척 후 건조한 다음 에탄올로 추출하여 얻은 추출물에 클로로필과 농약을 제거하고, 사포닌을 HPLC분리법(16)을 이용하여 HPLC(Agilent 1100 series, Agilent Co., Santa Clara, CA, USA), 칼럼은 ZORBAX Eclipse C18(4.6 mm×250 mm, Agilent Co.)을 사용하고 유속은 1.0 mL/min로, injection volume은 5 μL로 하였으며, 이동상은 증류수와 acetonitrile로 하여 분리한 다음 acetonitrile와 water의 농도 조절법(17)을 따라 LC-MS에 의한 질량분석기로 Rg1을 분석하여 약 18.5±0.5 mg/mL의 농도의 Rg1을 얻었다. 이것을 분말화 하여 창상치유용 도포 연고로 만들기 위해 점성이 있으며 피부자극이 없는 1% carboxy methyl cellulose(CMC) 현탁액에 5,000 및 10,000 ppm 농도로 첨가하여 Rg1 도포액을 제조하였다.

실험동물 및 창상유발

실험동물은 체중 200~300 g의 4주령 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 (주)오리엔트 바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 온도 21±2°C, 상대습도 55±10%를 유지하고 밤과 낮의 길이를 12시간씩 인공조명으로 조절하여 사육하였으며, 사료(commercial diet)와 물은 충분히 공급하였다. 일주일간 적응시킨 후 ethyl ether 마취하에 등쪽 피부의 털을 면도한 다음 요오드팅크를 사용하여 표피를 소독한 후 피혁용 펀치(biopsy punch; 8 mm)를 이용하여 좌우대칭의 원형 절제 창을 4개소 만들어 창상을 유발하였다. 동물실험은 (재)대구테크노파크 바이오산업지원센터의 실험동물규정에 의거하여 윤리사용에 적합함을 승인받고 수행하였다.

실험군 분류 및 창상실험

실험군은 Table 1과 같이 5개의 군으로 분류하였다. 즉 창상유발 후 약물을 처리하지 않은 비처리군(Normal control; NO), 창상유발 후 용매(1% CMC) 도포군(Control; CO), 창상유발 후 후시딘산나트륨 20 mg/g이 함유된 시판 연고를 도포한 양성대조군(Positive control; PC), 창상유발 후 Rg1 5,000 ppm이 함유된 1% CMC 도포군(Rg1 low; Rg1L), 창상유발 후 Rg1 10,000 ppm이 함유된 1% CMC 도포군(Rg1 high; Rg1H)으로 분류하여 각 군당 5마리씩 총 25마리로 실험을 진행하였다. 이때 Rg1의 농도결정은 선행 연구된 용량별(1,000 ppm, 5,000 ppm, 10,000 ppm) 항산화 *in vitro* test 결과에서 가장 좋은 효과를 보였던 5,000 ppm을 *in vivo* test 기준 용량으로 삼고 농도 의존적인지를 확인하기 위하여 10,000 ppm 군을 추가로 설정하였다. 도포액은 가피가 탈락될 때까지 매일 1회씩 창상을 입은 부위가 덮일 정도로 충분히 도포하여 외부공기와와의 접촉을 최소화하였다.

육안적 상처 변화의 관찰

상처치료의 진행 과정을 관찰하기 위해 창상유발 후 2일 간격으로 digital camera(CAMEDIA™, Olympus Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 각 군별로 일정 거리에서 촬영하여 상처의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 또한 객관적 지표로 나타내기 위하여 digital calliper(Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 창상의 면적을 측정하였다.

조직병리학적 검사(H&E and Masson's trichrome)

창상유발 후 5, 10, 15, 20일째에 각 해당일에 실험동물 3두씩 선택하여 ethyl ether 마취하에 조직병리학적 검사를

Table 1. Experimental design of animals

Groups	Treatment
NO	No treatment
CO	Vehicle (1% carboxy methyl cellulose) treated wound rat
PC	Fucidin® ointment treated wound rat
Rg1L	Ginsenoside Rg1 5,000 ppm treated wound rat
Rg1H	Ginsenoside Rg1 10,000 ppm treated wound rat

위하여 4개소의 창상 부위 중 1개소의 원형 창상부위가 포함된 조직을 채취하고, 10% 중성 formalin 용액에 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 창상 증상을 통과하는 절편을 취하여 탈수하고 paraffin 블록에 포매한 후 조직절편기(RM2125, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 4 µm 두께로 절단한 다음, polylysine으로 coating된 slide에 부착하였다. 조직절편은 xylene을 이용하여 paraffin을 제거하고, ethanol과 증류수로 10분간 합수시킨 후 증류수로 세척하였다. 이후 혈관의 증식 및 육아조직의 증식소견을 관찰하기 위하여 Hematoxylin-Eosin 염색과 진피 내 collagen fiber의 양과 형태를 관찰하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하였다(18). 창상유발 후 20일이 경과한 후 실험동물은 보건사회부고시 제88-39호의 실험동물의 사육 및 관리등에 관한 기준에 명시된 항정신성약의 과잉투여에 의한 방법에 따라 ethyl ether를 이용하여 안락사 시켰다.

피부조직의 분자생물학적 관찰

창상유발 후 20일이 경과한 실험동물 등쪽 피부조직의 RNA 분리를 위하여 피부를 적출하고 바로 액체질소에 동결시킨 후, 필요시까지 -70°C에 보관하였다. 저온으로 유지된 피부조직 약 100 mg을 1 mL의 Easy blue Reagent(iNtRON Biotechnology Co., Seongnam, Korea)에 넣고 homogenization 한 후, 0.2 mL의 chloroform을 첨가하여 혼합하였다. 약 2~3분간 실온에서 incubation 한 후 원심분리하고, 상층액을 취하여 isopropyl alcohol 0.5 mL을 넣어준 후 혼합하여 원심분리 하였다. 원심분리 한 시료의 상층액을 제거하고, 75% ethanol을 이용해 수세한 후 pellet을 건조시키고, 건조된 RNA pellet을 RNase inhibitor 1 µL와 DEPC water 약 50 µL로 용해시켜 -70°C에 보관하였다. 피부조직에서 TGF-β, VEGF의 mRNA의 발현은 RT-PCR으로 분석하였다. Reverse transcriptase 반응은 RT premix(Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하였다. 총 RNA 약 2 µg과 oligo (dT)₁₈ primer(Promega, Madison, WI, USA) 1 µL를 tube에 넣고 total volume이 11 µL가 될 때까지 증류수를 채운 후, 이것을 70°C에서 5분간 incubation 시킨 후 바로 얼음에서 냉각시키고, spin down하여 미리 만들어 놓은 solution(5X reaction buffer, RNase inhibitor[20 U/µL], 10 mM dNTP mix)을 넣고, 37°C에서 5분간 incubation 하였다. 이후 M-MuLV reverse transcriptase(Promega)를 넣어 총 20 µL를 맞춘 후, 37°C에서 60분, 70°C에서 10분간 incubation 하여 -20°C에 보관하였다. 총 RNA 2 µg과 DEPC를 처리한 물을 1시간 동안 45°C에서 가열하고 RTase의 불활성화를 위하여 5분간 94°C에서 가열한 다음 100 µL가 될 때까지 DEPC를 가하였다. Accupower PCR PreMix kit(Bioneer Co.)를 사용하여 template 2 µL, forward primer와 reverse primer(10 pmol/L, Bioneer Co.)를 각각 1.4 µL, 멸균된 증류수 15.2 µL를 섞고 PCR 반응(Bio-RAD, Mycycler™ thermal cycle, Philadelphia, PA, USA)을 실시하였다.

Primer는 대조군으로 GAPDH(58°C, 35 cycle)를 사용하여 그 정량 치료 보정하였고, 실험군으로 VEGF, TGF-β를 사용하였으며 사용된 primer들의 염기서열은 다음과 같다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)(forward: 5'-AACGGATTTGGYCGTATTGG-3', reverse: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGGTGAAGAC-3'), transforming growth factor beta(TGF-β)(forward: 5'-AAACT-AAGGCTCGCCAGTCC-3', reverse: 5'-GTTGGTATC-CAGGGCTCTCC-3'), vacula endothelial growth factor (VEGF)(forward: 5'-GATCATGCGGATCAAACCTCA-CC-3', reverse: 5'-CCTCCGACCCAAAGTGCTC3-3'). PCR condition은 5분간 94°C, 1분간 94°C에서 denaturation, 30초간 62°C에서 annealing, 30초간 72°C에서 extension, 37 cycle로 하였다. Tis-acetate ethylenediaminetetra acetic acid(TEA) buffer를 이용하여 1~1.5% agarose gel에 전기영동 시켜 ethidium bromide에 염색한 후 수세하고 UV를 조사하여 Eagle eyes image analysis software(Stratagene Co., La Jolla, CA, USA)를 이용하여 band를 확인하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 각 그룹 및 평균간 통계적 유의성은 SPSS 10.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

상처면적 및 피부표면 변화

Fig. 1은 창상유발 당일에서 창상유발 후 20일 경과시점까지 NO군을 제외한 창상유발 군(CO, PC, Rg1L, Rg1H)에서 선택한 동일 개체의 창상부분을 4일 간격으로 촬영하여 상처면적 변화를 나타낸 것이며, Table 2는 창상부분의 크기를 4일 간격으로 digital calliper로 측정하여 나타낸 결과 값이다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 창상유발 당일에는 모든 창상유발 군에서 염증과 삼출액이 분비되고, 이러한 급성 염증성 변화는 창상유발 후 8일까지 지속되었다. 특히 창상유발 4일 경과 후 용매만 도포한 CO군에서 다른 군에 비하여 염증성 삼출액의 양이 많아 이물질이 상처에 자주 부착되었다. 이에 반해 Rg1 도포군은 염증반응이 억제되어 부종과 삼출액 분비가 감소되었다. 창상유발 12일 경과 후부터는 더 이상 삼출액 분비가 없었으며, 상처반경이 감소하면서 상처가 회복되기 시작하였다. 특히 창상유발 8일 경과 후 CO군의 상처 크기와 비교할 때 Rg1L, Rg1H군은 8.9~17.7%의 현저한 창상면적의 감소효과를 보여주었다(Table 2). 양성대조군인 PC군보다는 Rg1L에서 상처면적이 넓었으나, 창상유발 12일 경과 후 Rg1L과 Rg1H군의 창상면적은 CO군과 비교할 때 11.1~18.7% 감소하였고, PC군에 비하여 7.2~11.6% 감소하여 Rg1이 창상치유에 탁월한 효과를 나타냄을 알 수



Fig. 1. Macroscopic appearance of wound on CO, PC, Rg1L, Rg1H treated-rats on 0-20th day post-wounding. Appearance normal (NO), control (CO), positive control (PC; Fucidin® ointment), ginsenoside Rg1 5,000 ppm (Rg1L), and ginsenoside Rg1 10,000 ppm (Rg1H).

Table 2. Comparisons of wound size and scar size changes between CO, PC, Rg1L and Rg1H groups at the 0 day, 4th day, 8th day, 12th day, 16th day and 20th day after ginsenoside Rg1 treatment in which continuous clinical observation were made in the same rats

		CO	PC	Rg1L	Rg1H
Wound size (mm)	Day 0	8.00±0.00 ^{NS}	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00
	Day 4	7.14±0.57 ^a	6.52±0.55 ^b	6.46±0.26 ^b	6.45±0.23 ^b
	Day 8	5.46±0.37 ^a	4.83±0.51 ^{ab}	4.97±0.98 ^{ab}	4.49±0.56 ^b
	Day 12	5.12±0.08 ^a	4.55±0.70 ^{ab}	4.22±0.71 ^b	4.02±0.38 ^b
Scar size (mm)	Day 16	5.33±0.23 ^a	4.86±0.84 ^{ab}	4.78±0.62 ^{ab}	4.36±0.34 ^b
	Day 20	5.12±0.21 ^a	4.61±0.43 ^b	4.55±0.39 ^{bc}	4.16±0.19 ^d

Values are mean±SD of dorsal 4 hole in 3 rats.

^{NS}Not significant.

^{a-d}Values within a row with different superscript letters are significantly different each other groups at p<0.05.

있었다.

Singer와 Clark(14)은 창상이 유발되면 상처 발생 즉시 염증반응이 시작되어 삼출액이 분비되며, 이 과정은 염증이 끝날 때까지 지속되고 이후 치료과정에서 염증반응이 억제되고 재생피화가 완료되면 상처는 수축하기 시작한다고 보고하였다. 이러한 수축기가 지나면 상처는 반흔(Scar)으로 남게 되는데 이것은 조직 결손 부를 메운 육아조직의 표면을 표피가 덮어서 생긴 면으로 결합조직이 많고 모세혈관은 적은 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 반흔에는 정상적인 피부나 피질이 없고 광택이 생기며, melanocyte가 정상적으로 재생되지 못하면 색소침착이나 색소탈실을 초래하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서도 모든 창상유발 군에서 16일째에는 모두 재생피화가 일어났다. 또한 과도한 창상구축은 반흔을 크게

형성하는 것으로 알려져 있는데(19), 본 실험에서도 모든 창상에서 창상의 반흔이 형성되었다. Fig. 1에서 창상유발 후 16일, 20일에서 반흔의 모양을 관찰할 수 있었는데, CO군에 비하여 PC, Rg1L, Rg1H 군에서 반흔의 반경이 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 창상유발 후 20일에서 Rg1L군에서는 전반적으로 정상표피의 형태로 회복되었으며, Rg1H군에서는 반흔의 반경이 줄고 넓이가 현저히 감소함을 볼 수 있었으며 체모생성이 관찰되었다. 창상유발 후 20일의 반흔 크기는 CO군과 비교하여 Rg1L군 및 Rg1H군에서 11.1~18.7%의 현저한 반흔 면적 감소효과를 보였다.

조직병리학적 변화

창상유발 후 20일째의 창상부를 포함한 부위의 병리조직학적 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다. 5, 10, 15일째 병리조직학적 실험결과는 뚜렷한 변화양상이 나타나지 않

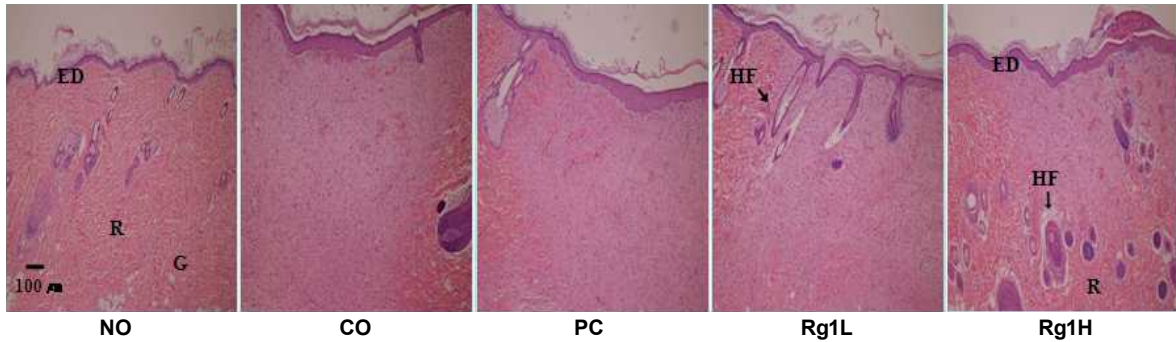


Fig. 2. Histological appearance of wounds from experimental groups on 20 days after wounding. Appearance normal (NO), control (CO), positive control (PC; Fucidin® ointment), ginsenoside Rg1 5,000 ppm (Rg1L), and ginsenoside Rg1 10,000 ppm (Rg1H). The skin samples were stained with hematoxylin-eosin; original magnification, $\times 100$; scale bars, 100 μm . Hematoxylin/eosin staining of skin sections of wound edges from normal, control and material treated rats 15 days after wounding. ED, epidermis; HF, hair follicle; R, reticular layer; G, granulation tissue.

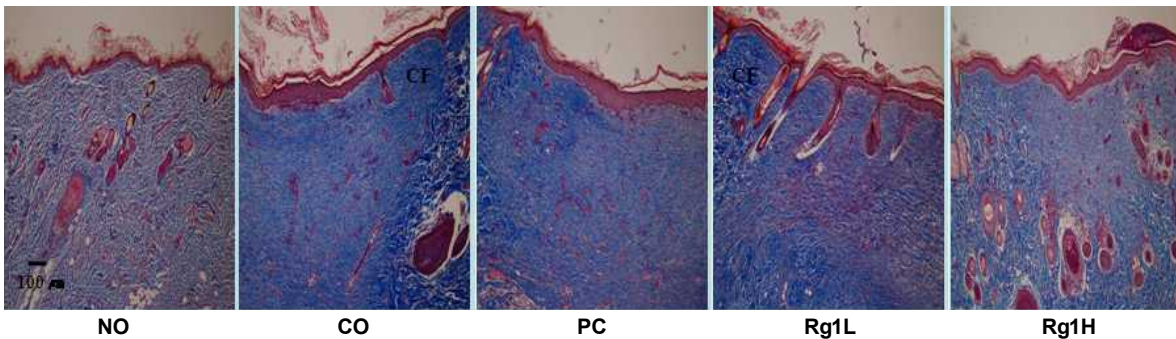


Fig. 3. Collagen appearance of wounds from experimental groups on 20 days after wounding. Appearance normal (NO), control (CO), positive control (PC; Fucidin® ointment), ginsenoside Rg1 5,000 ppm (Rg1L), and ginsenoside Rg1 10,000 ppm (Rg1H). The skin samples were stained with Masson's trichrome; original magnification, $\times 100$; scale bars, 100 μm . CF, collagen fibroblast.

아 본 결과에서 제외하였다. 흰쥐 피부의 Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색 및 교원질을 관찰하기 위하여 시행한 Masson's trichrome 염색소견에서 대조군, 양성대조군, Rg1 처리를 실시한 모든 실험군에서 섬유아세포의 증식 및 교원질의 치밀한 침착이 관찰되었다. Rg1 처리군의 경우 대조군에 비하여 상피 층의 표면두께가 균일하며 표층이 부드럽게 형성되었으며, 결합조직도 더 일정한 방향으로 형성되었음을 확인하였다. 진피 층에서도 Rg1을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 모낭(hair follicle) 및 피지선 등의 재형성이 활발하게 일어나고 있었다. 이러한 피부상피조직의 재생과 각질층의 형성 및 기저 층에서 망상 층의 증식 및 부속기관의 형성은 양성대조군에 비하여 뚜렷하게 활성화되었으며, 조직형성층이 두껍고 치밀할 뿐만 아니라 일정한 방향으로 균일하게 생성되었다. 한편, 창상유발 후 5일후의 조직사진에서는 모든 실험군에서 염증세포침윤, fibrin, 적혈구 및 섬유아세포 등이 관찰되었으며, 교원질의 발달은 주목할 만한 차이가 없었으나 Rg1 처리 실험군과 후시딘산나트륨을 처리한 양성대조군은 전체적으로 염증의 정도가 경미하였고 교원질의 발달은 초기에 대조군에 비하여 다소 강하게 나타났다.

창상 치유는 손상되거나 조직을 회복시키는 복잡한 생물

학적인 과정이며, 재생피화, 창상수축, 육아조직형성 및 교원질 합성 등을 포함한 여러 과정을 통하여 이루어진다. 이러한 과정은 일련의 현상으로 혼재되어 일어난다(15). 창상 부위에서 상피의 재생과정은 필수적인 치유과정으로 창상 후 24시간 정도가 경과되면 창상면의 진피 층에서 기저세포가 분열하기 시작하여 피부의 결손부위로 이동한다. 섬유소 그물을 따라 창상 경계면에서부터 창상 중심부로 이동하던 기저세포는 반대쪽의 기저세포와 서로 접하게 되어 표피의 두께가 정상화될 때까지 유사분열을 계속하여 상피세포의 밀도를 증가시키게 된다(20,21). 상피조직과 결합조직은 광범위하게 재생되나 대부분의 조직은 그 재생능력이 한정되어 있어서 척추동물에서의 창상치유는 주로 염증반응 말기에 새로운 모세혈관 형성, 섬유증식, 상피조직 재생을 동반한다고 알려져 있다(22). 창상의 수축은 근섬유모세포의 수축력에 매개되는 것으로 알려져 있다. 이러한 근섬유모세포는 정상피부의 섬유모세포에서 유래하며, 이는 창상 주위세포에서 분비되는 성장인자들에 의해 영향을 받는다(23-25).

이러한 복잡한 과정 중에 Rg1의 도포는 정상피부에서 분비되는 성장인자들의 분비를 촉진시켜 교원질의 발달을 가져오고, 이로 인해 결합조직을 치밀하게 형성시켜 반흔의 정도를 감소시키며 또한 모낭의 재생을 촉진시켜 창상부위

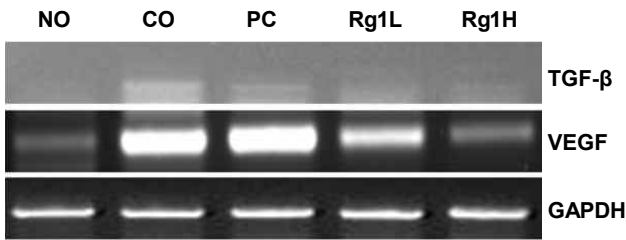


Fig. 4. RT-PCR for TGF-β and VEGF in rat skin 20 days after incision wound. Appearance normal (NO), control (CO), positive control (PC; Fucidin® ointment), ginsenoside Rg1 5,000 ppm (Rg1L), and ginsenoside Rg1 10,000 ppm (Rg1H).

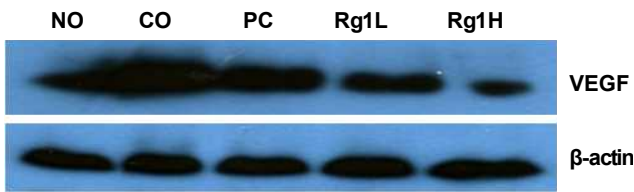


Fig. 5. Western blot for VEGF in rat skin 20 days after incision wound. Appearance normal (NO), control (CO), positive control (PC; Fucidin® ointment), ginsenoside Rg1 5,000 ppm (Rg1L), and ginsenoside Rg1 10,000 ppm (Rg1H).

의 재생 효과가 뛰어나는 것으로 사료된다.

분자생물학적 관찰

연부 조직의 창상 치유를 촉진하는 인자로 알려져 있는 TGF-β, VEGF의 발현정도를 RT-PCR과 western blot을 통하여 관찰한 결과 Fig. 4 및 Fig. 5에서와 같이 나타났다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 Rg1 도포군 (Rg1L, Rg1H)에서 TGF-β의 발현양상이 흐리게 나타났다. 동물실험 모델에서 섬유모세포는 상처유발 후 약 5일경부터 나타나서 2주 전후까지 세포성분으로 작용하는데 이러한 섬유모세포는 상처부위의 이주에 각종 기질 단백질 및 성장 인자가 필요하다(14). 또한 창상부위에서 기질단백질과 섬유모세포 표면의 integrin과의 접합은 섬유모세포 내의 세포 내 신호전달 경로를 활성화시키면서 창상 치유에 중요한 각종기능을 시작하는데 이러한 기능은 혈관신생효과가 있으며 각종성장인자, 즉 TGF-β, FGF 등에 의해 매개됨이 밝혀져 있다. 특히 VEGF은 혈관신생을 유도하는데 이러한 VEGF는 TGF-β 등에 의하여 자극을 받으며 또한 TGF-β는 섬유모세포, 대식구 및 각질형성세포, 혈관내피세포 등에서도 분비되어 주로 섬유화 및 육아조직을 이루는데 기여하는 것으로 알려져 있다(26). Kerr 등은 TGF-β의 억제제가 다양한 면역억제 효과를 얻을 수 있다고 보고하였으며(27), 본 연구에서는 Rg1이 조직 내 TGF-β의 억제와 교원질 생성 억제효과를 나타내어 Rg1이 피부창상에 의한 반흔 치료에 효과적인 것으로 판단되었다. 그러나 본 연구에 이용된 RT-PCR 방법은 정확한 발현부위를 분석하기에는 어려움이 있어 면역조직화학 염색을 수행하여 정확한 부위를 밝히는 연구가 더 수행되어야 할 것으로 사료된다. Uchida 등에 의하면 창

상유발 후 5~7일째에 VEGF의 발현 양이 최고조에 달하다가 10일 이후에는 감소하는 것으로 알려져 있는데(28), 본 연구의 Fig. 4에서 Rg1 도포군에서 CO군과 PC군에 비하여 VEGF의 발현 양의 감소를 확인할 수 있었다. 이는 Fig. 5의 western blot 실험결과에서도 같은 양상으로 나타났다. 혈관 생성 인자인 VEGF의 발현 시간이 Rg1의 도포로 인해 당겨져서 창상치유 및 회복시간을 앞당기는 효과가 있는 것으로 사료되며, 특히 고농도 Rg1 도포에서 그러한 경향이 더욱 나타났다. 또한 창상의 면적에 있어서도 Rg1 도포군에서 유의하게 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

요 약

상처치료 과정 중 ginsenoside Rg1(5,000 ppm, 10,000 ppm) 처리에 의한 효력을 평가하기 위해 SD rats의 등쪽 피부에 biopsy punch를 이용한 4개의 창상을 유발 후, 이 과정에서 일어나는 피부조직의 변화를 관찰하였다. 상처에 Rg1의 도포로 인해 창상치료과정이 활발해짐을 관찰할 수 있었다. Rg1을 처리한 군에서 절개된 상처의 표피화과 수축이 더 빨라졌고 창상면적에 있어서도 양성대조군인 시판연고 도포군과 비교하여 유의하게 줄어들었다. 염색한 조직의 현미경 관찰 결과에서는 정상대조군에서 볼 수 있는 완전한 상피층은 찾을 수 없었으나 Rg1 처리군에서 모낭과 신생혈관이 관찰되었고 상피층의 회복조직도 관찰되었다. 병변의 TGF-β 및 VEGF의 발현량을 조사한 결과 Rg1의 도포에 의하여 더 많은 VEGF의 발현을 유도하고 TGF-β의 활성화를 차단하여 반흔 형성을 감소시켰다. 이러한 결과를 종합하여 Rg1은 흰쥐의 외과적 창상에 치료효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역산업기술개발사업(과제번호: 70003957)의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Moon KS. 1985. *Ingredient and use of medical plant*. Il Wol press Co., Ltd., Seoul, Korea. p 500.
2. Matsuda H, Kobo M, Mizuno M. 1987. Pharmacological study on *Panax ginseng* C.A. Meyer (VIII). Cardiovascular effect of red ginseng. *Yakugaku Zasshi* 41: 125-134.
3. Nam KY. 1996. *Contemporary Korean ginseng (chemical constituents and pharmacological activity)*. ChunIl printing Co., Seoul, Korea. p 56.
4. Choi JH, Oh SK. 1983. Studies on the anti-aging action of Korean ginseng. *Korean J Food & Nutr* 12: 323-335.
5. Jung NP, Jin SH. 1996. Studies on the physiological and biochemical effects of Korean ginseng. *Korean J Ginseng Sci* 20: 431-471.
6. Zhang S, Yao X, Chen Y, Cui C, Tezuka T, Kikuchi T. 1989.

- Ginsenoside Ia, a novel saponin from the leaves of *Panax ginseng*. *Chem Pharm Bull* 37: 1966-1968.
7. Han JH, Park SJ, Ahn CN, Wee JJ, Kim KY, Park SH. 2004. Nutritional composition, ginsenoside content and fundamental safety evaluation with leaf and stem extract of *Panax ginseng*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 778-784.
 8. Horrest I. 1983. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *Br J Surg* 70: 133-140.
 9. Peacock EE. 1984. *Wound repair*. 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, USA. p 38-55.
 10. Hatamochi AJ, Mori K, Ueki H. 1994. Role of cytokines in controlling connective tissue gene expression. *Arch Dermatol Res* 341: 738-746.
 11. Hiroshi U, Haruo Y, Ichiro T, Naoki K, Mitsunobu M, Masahiro O, Tsuyoshi K, Toru F. 1999. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 20: 1407-1414.
 12. Christophers E, Mrowietz U. 2003. Psoriasis. In *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. 6th ed. McGraw-Hill, NY, USA. p 407-427.
 13. Ohno N, Miura NN, Chiba N, Adachi Y, Yadomae T. 1995. Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single helical schizophyllan in mice. *Biol Pharm Bull* 18: 1242-1247.
 14. Singer AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738-746.
 15. Hasan W, Zhang R, Lin M, Warn JD, Smith PG. 2000. Coordinate expression of NGF and α -smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res* 300: 97-109.
 16. Chuang WC, Sheu SJ. 1994. Determination of ginsenoside in ginseng crude extracts by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 685: 243-251
 17. Choi SH, Suh BS, Oh KS, Kim KS. 2006. Ginsenosides contents of Korean ginseng and ginseng products. *Korean J Food Culture* 21: 559-564.
 18. Han CD, Lee WM, Lee HB, Hahn MH, Yu WW. 2003. Effect of steroid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on acute wound healing and collagen synthesis in rat skin. *J Korean Orthop Assoc* 38: 393-397
 19. Brody GS, Peng ST, Landel RF. 1981. The etiology of hypertrophic scar contracture: another view. *Plast Reconstr Surg* 67: 673-684.
 20. Coulombe PA. 2003. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 121: 219-230.
 21. Martin P. 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75-81.
 22. Schilling JA. 1968. Wound healing. *Physiol Rev* 48: 374-423.
 23. Park JS, Kim JY, Cho JY, Kang JS, Yu YH. 2000. Epidermal growth factor (EGF) antagonizes transforming growth factor (TGF)- β 1-induced collagen lattice contraction by human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull* 23: 1517-1520.
 24. Schmitt-Gräff A, Desmoulière A, Gabbiani G. 1994. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 425: 3-24.
 25. Gabbiani G. 1996. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 192: 708-711.
 26. Detmar MD, Brown LF, Berse B, Jacman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP. 1997. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 108: 263-268.
 27. Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM. 1990. TGF- β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61: 267-278.
 28. Uchida S, Sakai A, Kudo H. 2003. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and marrow after drill-hole injury in rat. *Bone* 32: 491-501.

(2010년 3월 19일 접수; 2010년 10월 11일 채택)