

야관문 추출물의 창상치유 효과

정희경¹ · 김길수² · 정유석^{1*}

¹(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터
²경북대학교 수의과대학

Wound Healing Effects of *Lespedeza cuneata* Extract

Hee Kyoung Jung¹, Kil-Soo Kim², and Yoo Seok Jeong^{1*}

¹BioHealth Convergence Center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

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

ABSTRACT In this study, the anti-inflammatory effects of *Lespedeza cuneata* extract on macrophages and wound-healing in wound-induced animal experiments were investigated. In an anti-inflammatory test, 0.1 mg/mL of *Lespedeza cuneata* extract did not affect growth of RAW 264.7 cells, and *Lespedeza cuneata* extract suppressed nitric oxide (NO) generation from inflammation-induced macrophages in a concentration-dependent manner. Wounds on the skin of rats were treated with vehicle containing *Lespedeza cuneata* extract (SSP), vehicle (SCO), and commercial ointment (CCO). The wound and scar sizes in the SSP group were significantly reduced in comparison to the SCO and CCO groups ($P < 0.05$). The epidermis and dermis of the SSP group also recovered faster than the SCO group based on Masson's trichrome staining. The gene expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) decreased and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) increased in wound tissue from the SSP group compared to that from the SCO group. These results show that *Lespedeza cuneata* extract accelerates wound-healing through anti-inflammatory activity and induction of collagen regeneration as well as reduces the scar area surrounding wounds. Accordingly, *Lespedeza cuneata* extract could be useful as a cosmeceutical in the cosmetic industry.

Key words: *Lespedeza cuneata*, cosmeceuticals, anti-inflammation, wound healing, wound repair

서 론

여성의 사회진출 증가와 생활수준 향상 그리고 문화적, 사회적 가치관의 변화에 따라 남녀노소를 불문하고 피부에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있다. 이에 따라 화장품의 소비도 증가하고 있으며 아름다움만을 위한 향장용보다 효능과 효과를 중요시 하는 기능성 화장품에 대한 소비가 급증하고 있다. 최근 기능성 화장품은 미용 기능성에서 한 단계 더 나아가 치료 기능까지 포함하는 코스메슈티컬(cosmeceuticals)이 화장품 시장에서 집중을 받고 있다(1,2). 또한 화장품에 사용되는 기능성 소재로 피부에 적합하며 부작용이 적고 안전성이 입증된 천연물 소재의 활용과 연구가 활발하다.

야관문(*Lespedeza cuneata* G. Don)은 콩과의 여러해살이 식물로 비수리, 삼엽초 등의 여러 이름으로 불리며 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있는 자원으로 간과 콩팥의 기능을 보호해주고 폐 기능 강화 및 혈액순

환에 효능이 있어 관련 질병에 약재로도 쓰이고 있다(3,4). 야관문 내 알려진 유용 생리활성 물질로는 pinitol, avicularin, trifolin, β -sitosterol, quercetin, kaempferol, vitexin 등의 플라보노이드가 있으며(5), Ding 등(6)은 야관문 내 함유되어 있는 미네랄과 아미노산 등을 분석하여 노화방지에 유용한 vitamin E 함량이 높음을 확인하였다. 또한 야관문 추출물이 항균 및 항산화 효과(3,7), 피부 광노화 억제 효과(8) 등을 나타내는 유용한 천연물 소재임이 보고된 바 있다.

피부는 외부 자극으로부터 몸을 보호하는 신체방어에 중요한 역할을 하며(9), 이를 구성하고 있는 외피 및 진피가 손상되어 피부 구조의 연속성이 파괴되는데 이를 창상이라고 하고 염증반응과 신생조직형성 및 재상피화 단계가 복합적으로 이뤄져 창상부위를 복구하는 과정을 창상치유라 한다(10). 일반적으로 창상에 많이 사용하는 후시딘산나트륨을 함유하는 연고가 피부에 알레르기 반응을 유도하거나 반흔 및 유착된 조직을 형성시키는 등 부작용이 보고되고 있어(11,12) 창상치유에 있어 부작용이 적고 우수한 효과를 지닌 천연물을 약이나 화장품 소재로 개발하려는 연구가 다양하게 진행 중이다. Park 등(13)은 복합허브추출물의 창상치유 효과에 대해 조사하였으며, 참느릅나무(*Ulmus parvifo-*

Received 15 October 2013; Accepted 6 February 2014

*Corresponding author.

E-mail: carrot2p@ttp.org, Phone: +82-53-602-1885

lia Jacq.)(14), 꼭두서니(*Canthium parviflorum*)(15), 지근(*Lithospermi radix*)과 치자(*Gardeniae fructus*) 복합제제(16) 등도 창상치유 효과가 있다고 보고하였다. 또한 창상치유 과정에서는 산화적 스트레스 원인물질 발생으로 인해 염증관련 사이토카인들이 발현되어 염증반응이 일어나는데(17) 이를 개선 및 치료하기 위한 다양한 천연 항염증 소재 개발도 보고되고 있다(18,19). 그러나 창상치유가 염증반응과 조직재생이 복합적으로 이루어지고 있지만 상기의 연구들은 창상치유와 관련하여 단편적인 효과를 가지는 소재에 대해 연구를 수행한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 야관문 추출물이 염증반응 억제와 함께 조직재생에 도움을 줄 수 있는 코스메슈티컬 소재로써 적합한지 평가하고자 야관문 추출물의 항염증 효능과 피부결손창을 만든 동물모델을 대상으로 야관문 추출물이 첨가되어진 화장품 조성물의 창상치유 효과를 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료 제조

실험에 사용되어진 야관문 에탄올 추출물(이하 야관문 추출물, 고형분 35%) 및 야관문 추출물 함유 조성물은 소리소(Soriso Co., Gyeongsan, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 세포실험 시료는 야관문 추출물을 동결건조(FreeZone plus 12, Labconco, Kansas, MO, USA) 하여 얻은 고형물을 50% 에탄올에 녹여 사용하였으며, 창상유발 마우스 모델 동물실험에서는 Table 1과 같은 야관문 추출물 첨가(2%, w/w) 조건이 다른 화장품 조성물을 시료로 사용하였다.

RAW264.7 세포독성 측정

마우스 대식세포(RAW264.7)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 본 실험에 사용하였다. RAW264.7 세포는 100 unit/mL penicillin-streptomycin (GIBCO BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)과 fetal bovine serum(Welgene Inc., Daegu, Korea)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (Welgene Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기 (HERAccl 150, Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA)에서 배양하였다.

야관문 추출물에 대한 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원법(20)을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 24 well plate에 3×10⁴ cells/well 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 추출물을 다양한 농도(0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL)로 처리하였다. 이를 24시간 추가 배양한 후 MTT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)용액을 최종 농도 0.5 mg/mL로 첨가하고 다시 4시간 동안 배양한 다음 배지를 제거하고, 형성된 formazan crystal을 1 mL di-

Table 1. Composition of formula added with *Lespedeza cuneata* extract

Components	Ratio (%)	
	Base sample (vehicle)	Base sample containing <i>Lespedeza cuneata</i> extract
D. I. water	65.75	63.75
EDTA-2Na	0.03	0.03
Allantoin	0.12	0.12
1,2-Hexanediol	3	3
Glycerin	5	5
Hydroviton 24	2.5	2.5
Konjac mannan	5	5
Aristoflex AVC	1.00	1.00
Natrosol 250HHR (1%)	5.00	5.00
Hyaluronic acid (1%)	5.00	5.00
Carbopol 940 (2%)	5.00	5.00
Ethanol	0.90	0.90
Emalex HC-40	1.00	1.00
Vitamin E acetate	0.60	0.60
L-Arginine	0.10	0.10
<i>Lespedeza cuneata</i> extract (35%) ¹⁾		2
Total	100	100

¹⁾(): Contents of solid powder.

methyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Co.)로 용해시켜 microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 대한 세포독성은 시료를 처리하지 않은 세포의 흡광도 값을 100%로 하여 세포 생존율을 상대적인 값(%)으로 나타내었다.

Nitric oxide 생성량 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양은 Griess 법(21)으로 측정하였다. 24 well plate에 5×10⁴ cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양한 후 야관문 추출물을 다양한 농도(0.05, 0.075, 0.1, 0.2 mg/mL)로 처리하고 2시간 동안 반응시킨 다음 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich Co.) 1 µg/mL를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. RAW264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 배양액과 griess reagent(Sigma-Aldrich Co.) 각 100 µL를 혼합하고 15분간 상온에서 반응시킨 다음 microplate reader(Tecan)로 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 sodium nitrite(Sigma-Aldrich Co.)의 표준곡선 작성에 의해 산출(µM)하였다.

실험동물 및 창상유발

실험동물은 체중 180~210 g의 4주령 수컷 Sprague-Dawley rat을 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 일정한 온도(21.2±2.0°C), 상대습도(55.0±10.0%)를 유지하고 규칙적인 명암(12시간 명/암)을 인공조명으로 조절하였으며, 사료와 물은 충분히 공급하면서 1주일 동안 적

응시킨 후 실험에 사용하였다. 안정화 기간이 지난 후 실험 동물은 Zoletil 50(Virbac, Carros, France) 주사 마취하에 등 부위를 제모한 다음 피혁용 펀치(biopsy punch; 8 mm)를 이용하여 좌우대칭의 원형 결손창을 2개소 만들어 창상을 유발하였다. 동물실험에 관련된 모든 과정은 동물보호법의 3R 및 (재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 원칙을 준수하여 수행하였다.

실험군 분류 및 시료처리

실험군은 창상유발 후 시료를 처리하지 않은 무처리군(NO), 창상유발 후 vehicle 시료 도포 대조군(SCO), 상처치료용 시판 연고를 도포한 군(CCO)과 2% 야관문 추출물이 함유된 vehicle 시료 도포 시험군(SSP) 총 4개 군으로 분류하였으며, 각 군당 5마리씩 총 20마리로 실험을 수행하였다. 야관문 추출물의 창상치유 효능을 기존 시장 제품과 성능을 비교하기 위해 상처치료제로써 일반인들의 인지도가 높은 20 mg/g의 후시딘산나트륨이 함유된 시판 피부 외용제 연고를 사용하였다. 각 시료의 도포량은 가피가 탈각될 때까지 매일 1회씩 창상유발 부위가 덮일 정도로 충분하게 도포하였다.

육안적 변화의 관찰

창상치유 진행과정을 관찰하기 위해 창상유발 후 3일 간격으로 digital camera(CAMEDIA™, Olympus Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 각 군별로 일정한 거리에서 창상 부위를 촬영하여 상처의 변화를 육안으로 관찰하였으며, 객관적 지표로 나타내기 위하여 digital caliper(Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 창상의 면적을 측정하였다.

조직병리학적 변화의 관찰

창상유발 21일째에 각 실험군의 조직병리학적 검사를 위해 실험동물들을 ethyl ether(Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea)로 마취한 후 창상 부위가 포함된 조직 절편을 채취하여 10% 중성 formalin 용액에 24시간 동안 고정하였다. 고정된 조직은 창상 중앙을 통과하는 절편을 취하여 탈수하고 paraffin 블록에 포매한 후 조직절편기(RM2125, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 4 µm 두께로 절단한 다음, polylysine으로 coating된 slide에 부착하였다. 조직 절편은 xylene으로 paraffin을 제거하고 알코올과 증류수로 10분 동안 흡수시킨 후 증류수로 세척하였다. 이후 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 통한 피부세포 및 조직의 재생을 관찰하였으며, 진피 교원섬유 변화를 관찰하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하였다.

피부조직의 유전자 발현량 측정

창상유발 후 21일째 각 군별 실험동물들의 창상 부위 조직을 채취하여 RNAlater RNA stabilization reagent

(Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany)를 사용하여 4°C에 보관하면서 본 실험에 이용하였다. 조직으로부터 RNA는 RNeasy fibrous tissue mini kit(Qiagen)를 이용하여 추출한 후 RNA 2 µg을 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 cDNA 합성을 수행하였다. PCR 반응액은 cDNA 0.5 µL, forward primer(10 pmole) 1 µL, reverse primer(10 pmole) 1 µL, SYBR Green supermix(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 12.5 µL, 멸균증류수 10 µL를 혼합하여 준비한 다음, iCycler iQ5 real time PCR detection system(Bio-Rad Laboratories Inc.)을 사용하여 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 수행 후 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자 발현에 대한 각 유전자 발현 정도를 백분율(%)로 나타내었다. PCR 반응에 사용되어진 primer 염기서열은 다음과 같다: VEGF(vascular endothelial growth factor) forward primer 5'-AGT CTT GCC AAT GTG GAC TC-3', reverse primer 5'-GGC AGT GGA TTC TCA TCT TG-3'; TGF-β1(transforming growth factor-beta 1) forward primer 5'-GCC TCC GCA TCC CAC CTT TG-3', reverse primer 5'-GCG GGT GAC TTC TTT GGC GT-3'; IL-10(interleukine-10) forward primer 5'-GAA AAC AGA GCT TCA GCA TGC TTG G-3', reverse primer 5'-TTT GAG TGT CAC GTA GGC TTC TAT GC-3'; GAPDH forward primer 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3', reverse primer 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA(22).

통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 반복실험에 대한 평균값(mean)과 평균의 표준편차(SD)로 나타내었으며, 각 그룹간의 통계적 유의성은 SPSS ver 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 검정을 적용하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

RAW264.7 세포에 대한 세포 독성 측정

피부의 창상치유 과정에서 활성화된 혈소판이나 섬유소에 의해 상처 부위로 모이게 되는 대식구와 섬유모세포의 역할은 매우 중요하다(23). 이 중에서 대식구는 상처 부위에 파괴된 세포와 이물질 등을 제거하고 항염증 반응과 함께 교원질의 합성을 촉진시키며 상처치유 활성을 증가시키기도 한다(24). 본 연구에서는 대식구에 대한 독성 없이 야관문 추출물이 나타내는 항염증 반응을 조사하고자 잘 알려진 대식세포 RAW264.7에 대한 야관문 추출물 농도별 세포 독성을 확인하였으며, 그 결과 0.5 mg/mL 농도 조건에서 89%의 생존율을 보였으나 0.2 mg/mL 이하의 농도에서 모두

95% 이상의 생존율을 나타내었다(data not shown). 이는 Eun(25)이 야관문의 면역능에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행한 마우스의 흉선세포, 비장세포 및 대식세포에 대한 야관문 추출물의 세포독성을 평가한 결과와 유사하였다.

RAW264.7 세포로부터 NO 생성에 미치는 효과

NO는 신경전달계 및 혈관 이완, 혈소판응집억제, 염증반응 매개 등 여러 생물학적 반응에 관여하는 활성산소 중의 하나로 대식구에 의해 활성화되어 염증유발에 중요한 역할을 한다(26,27). RAW264.7 세포에 염증유발 후 NO 생성 억제 정도를 통해 야관문 추출물의 염증반응 저해효과를 확인한 결과, LPS를 처리하지 않은 정상군에서 NO 생성량은 $1.04 \pm 0.60 \mu\text{M}$ 인 반면 LPS를 처리한 대조군에서는 $31.02 \pm 4.30 \mu\text{M}$ 로 정상군에 비해 약 30배 정도 증가하였다. 야관문 추출물 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 mg/mL 처리 후 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에서 NO의 생성량은 각각 18.51 ± 0.47 , 5.92 ± 1.66 , 2.44 ± 0.32 및 $1.91 \pm 0.23 \mu\text{M}$ 로 야관문 추출물에 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). Yoon과 Moon(28)은 LPS 처리를 통해 활성화된 염증반응이 창상치유를 지연시키고 대식구가 창상치유에 관여함

을 확인하였다. 또한 Schaffer 등(29)은 마우스 모델에서 창상 부위의 콜라겐 섬유 침착 정도와 물리적인 강도가 NO의 농도와 반비례함을 보고하였다. 따라서 염증반응이 유도되어진 대식세포에 대한 야관문 추출물의 NO 생성 저해효과는 야관문 추출물이 염증반응 억제를 통해 창상치유에 긍정적 효과를 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

상처 면적 및 피부표면 변화

창상 발생 후 상처 부위에는 염증기 단계와 함께 혈관수축 및 혈소판응고 반응이 일어나고 그 후 교원질의 합성, 신생혈관의 형성 등 복잡한 병리학적 과정이 일어나며 육아조직이 상처 부위를 채우는 재생피화 후 상처 부위가 수축되게 된다(12,30). Table 2와 같이 8 mm 창상유발 후 시료처리 3일째 상처면적을 확인한 결과, NO군과 SCO군 그리고 CCO군은 약 5% 정도 감소하였으나 SSP군에서는 약 17%의 상처 치유율을 보였다. 시료처리 12일째에는 NO군, SCO군과 CCO군은 각각 4.33 ± 1.09 , 3.86 ± 0.28 , 3.56 ± 0.11 mm의 상처 면적을 나타낸 반면, SSP군에서는 1.92 ± 0.19 mm로 유의적으로 크게 상처 면적 감소를 보였으며($P < 0.05$), NO군과 비교해 약 30% 정도 빠른 회복을 나타내었다. 창상치유 시 발생하는 일반적인 부작용으로 미용적 관심 대상인 반흔(Scar) 형성을 시료 처리 21일째 비교해 본 결과, NO군, SCO군, CCO군 및 SSP군에서 반흔 크기는 각각 5.65 ± 0.51 , 5.88 ± 0.70 , 5.64 ± 0.37 과 4.66 ± 0.29 mm로 SSP군이 유의적으로 가장 작게 형성되었다($P < 0.05$). 본 연구에서는 상처치유에 대해 일반 소비자들의 인지도가 높은 후시딘산나트륨이 함유된 시판 피부 외용제를 양성 대조군으로 사용하였으며 상처면적은 NO군 및 CCO군과의 유의적 차이는 관찰되지 않았다. 사용되어진 시판 피부 외용제는 세균의 단백질 합성을 저해하는 항생물질인 fusidic acid를 주성분으로 한다. 창상치유는 염증반응 억제 후 재생피화가 완료되고 상처 부위 수축을 시작하므로(31) NO군과 비교 시 CCO군에 의한 상처면적 감소 경향은 세균감염 방지에 의한 것이며, 일반 시판 상처치유용 피부 외용제는 재생피화에 대한 유효성은 없는 것으로 생각되어진다. 그러나 야관문 추출물은 항염증 효과와 함께 재생피화 가속화를 통해 상처

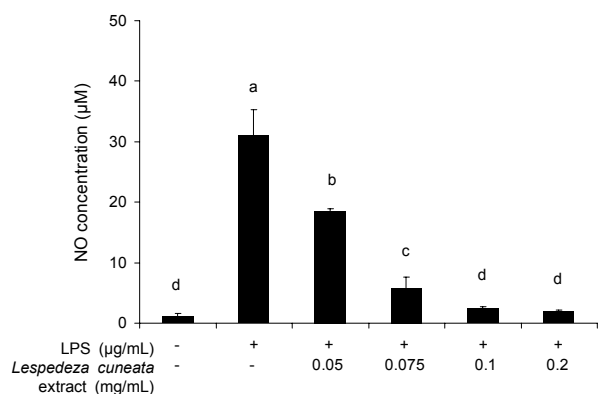


Fig. 1. Effect of *Lespedeza cuneata* extract on NO (nitric oxide) production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The levels of nitrite were determined by the Griess method as described in Materials and Methods. The results are expressed as means (bar) with SD (error bar) of triplicate determinations. Differences were considered statistically different at $P < 0.05$.

Table 2. Comparisons of wound size and scar size changes

		NO ¹⁾	SCO ¹⁾	CCO ¹⁾	SSP ¹⁾
Wound size (mm)	0 day	$8.00 \pm 0.00^{2)}$	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00
	3 days	$7.58 \pm 0.19^{a3)}$	7.51 ± 0.46^a	7.57 ± 0.35^a	6.62 ± 0.38^b
	6 days	5.63 ± 0.10^b	6.35 ± 0.44^a	6.65 ± 0.26^a	5.00 ± 0.21^c
	9 days	4.10 ± 0.64^{ab}	3.90 ± 0.17^b	4.67 ± 0.24^a	2.84 ± 0.06^c
	12 days	4.33 ± 1.09^a	3.86 ± 0.28^a	3.56 ± 0.11^a	1.92 ± 0.19^b
Scar size (mm)	18 days	6.38 ± 0.47^b	7.42 ± 0.39^a	7.48 ± 0.04^a	3.45 ± 0.32^c
	21 days	5.65 ± 0.51^a	5.88 ± 0.70^a	5.64 ± 0.37^a	4.66 ± 0.29^b

¹⁾NO: wound of non-treated rat, SCO: wound of rat treated with vehicle, CCO: wound of rat treated with commercial ointment (fusidic ointment), SSP: wound of rat treated with vehicle containing *Lespedeza cuneata* extract.

²⁾Values are mean±SD of dorsal 2 hole in rats (n=5).

³⁾Values within a row with different superscripts letters are significantly different each other groups (n=5) at $P < 0.05$.

크기와 창상치유 기간을 감소시킬 뿐만 아니라 반흔 형성을 최소화할 수 있는 소재로 기대된다.

조직병리학적 변화

창상유발 후 21일째에 실험동물들로부터 채취한 창상 부위의 피부조직을 H&E 염색과 Masson's trichrome 염색을 실시하여 광학현미경을 통해 관찰되어진 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 조직염색 소견으로 NO군, SCO군, CCO군 및 SSP군의 모든 실험군에서 섬유아세포의 증식 및 교원질(collagen fibers, CF)의 합성이 관찰되었으며 SSP군의 경우 NO군에 비해 상피층(epidermis, ED)의 두께가 얇고 일정하고 부드럽게 형성된 것을 확인할 수 있었다. 또한 SSP군이 진피층(dermis, DM)에서의 모낭(hair follicle, HF)을 비롯한 기타 피부부속기관과 구성조직의 재형성이 NO군에 비해 더욱 치밀하고 활발하게 일어난 것을 확인하였다. SSP군을 제외한 다른 실험군은 육아조직을 보이는 반면 SSP군은 시험되어진 다른 군에 비해 교원질이 일정하게 가장 빨리 재형성된 것을 관찰할 수 있었다. 복잡한 단단계 과정을 통해 일어나는 창상치유는 염증이 이후 상피화를 통해 창상조직으로 세포들이 이동 증식하여 창상표피 재생에 관여하게 되고, 섬유아세포가 교원질을 형성하는 활성으로 창상 내부 구조재생에의 관여는 섬유증식기가 일어나게 되고, 창상부위 내외부적 구성성분이 수축활동을 통해 결합 및 구성조직들이 재배치되게 되는 수축기를 마지막으로 완료되게 된다(32). 동일 실험기간 내 SSP군이 가장 빠른 조직재생을 나타냄으로써 야관문 추출물은 염증반응은 물

론 교원질과 같은 피부조직 재생 수준까지의 창상치유 속도를 가속화시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 반흔 형성은 염증반응(33)과 신생조직의 과형성 및 교원질의 불균형적 형성(34)으로 인해 발생되어진다고 알려져 있다. 다른 실험군 대비 야관문 추출물 처리군에서 감소된 반흔 형성은 조직병리학적 결과로 미루어 볼 때, 야관문 추출물이 균형적인 교원질 형성을 유도함으로써 나타난 결과로 사료된다.

피부조직의 유전자 발현량 변화

창상치유 과정은 PDGF(platelet-derived growth factor), VEGF, EGF(epidermal growth factor), TGF- β , IL-10 등의 growth factor와 cytokine이 세포 및 조직들에서 복합적으로 활성을 나타내어 이뤄진다(35,36). 본 연구에서는 VEGF, TGF- β 1, IL-10 유전자를 대상으로 시료가 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 4). 창상유발 후 21일째 실험군들의 조직에서 VEGF 유전자는 NO군 66.6%, SCO군 66.1%, CCO군 65.5%, SSP군 61.4%로 SSP군이 유의적으로 낮은 발현 정도를 나타내었으며, TGF- β 1 유전자는 NO군 75.2%, SCO군 70.33%, CCO군 70.3%, SSP군 79.8%로 SSP군이 유의적으로 높은 발현 정도를 나타내었다($P < 0.05$). VEGF는 창상유발 후 초기단계에 발현되어져 염증성 사이토카인 및 저산소 상태 등의 자극에 의해 신생혈관 형성에 관여하며(34,37), TGF- β 1은 섬유아세포의 분화와 증식으로 인한 육아조직 형성과 재상피화단계에 관여하여 창상치유에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(34,38). 본 연구에서 SSP군이 다른 실험군에 비해 낮은

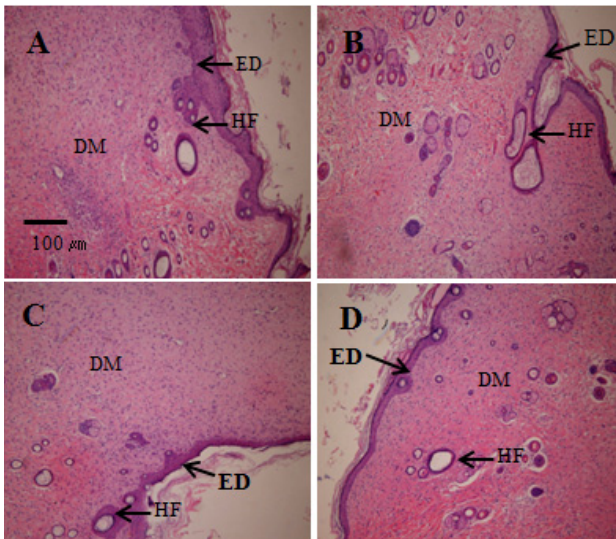


Fig. 2. Histological appearance of wounded skin from experimental groups by H&E (Hematoxylen and Eosin) staining on 21 days after initial wounding. A: NO group (wounded skin of non-treated rats), B: SCO group (wounded skin of rats treated with vehicle), C: CCO group (wounded skin of rats treated with commercial ointment, fucidin ointment), D: SSP group (wounded skin of rats treated with vehicle containing *Lespedeza cuneata* extract). ED: epidermis, DM: dermis, HF: hair follicle.

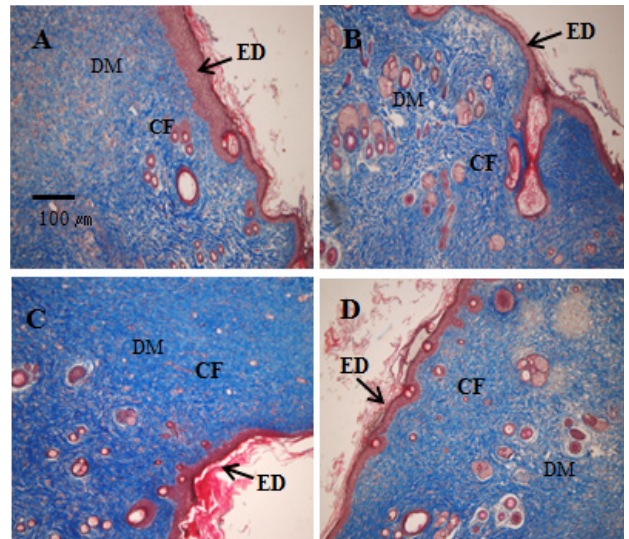


Fig. 3. Histological appearance of wounded skin from experimental groups by Masson trichrome staining on 21 days after initial wounding. A: NO group (wounded skin of non-treated rats), B: SCO group (wounded skin of rats treated with vehicle), C: CCO group (wounded skin of rats treated with commercial ointment, fucidin ointment), D: SSP group (wounded skin of rats treated with vehicle containing *Lespedeza cuneata* extract). ED: epidermis, CF: collagen fibers.

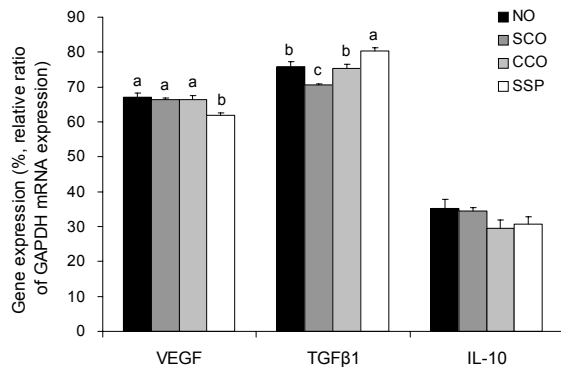


Fig. 4. Gene expression of experimental groups on 21 days after wounding. Comparison of gene expression by RT-PCR. The results are expressed as means (bar) with SD (error bar) of triplicate determinations (n=5). Differences were considered statistically different at $P < 0.05$.

VEGF 유전자 발현과 높은 TGF- β 1 유전자 발현 정도를 결과하는 것은 야관문 추출물이 창상치유 가속화에 기여하여 나타난 것으로 사료된다. IL-10은 대식세포 활성화와 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 전염증 cytokine 생산을 저해함으로써 염증반응을 완화시키는 항염증 인자로 창상치유 과정에 관여한다(39,40). 유의적이진 않으나 CCO군과 SSP군에서 IL-10 유전자 발현이 낮은 경향을 보이는 것은 창상치유 단계에서의 염증반응이 완료되어 나타난 결과로써 사료된다. Kapoor 등(41)은 창상회복기간 중 VEGF 발현이 낮아지며, Shah 등(38)과 Rolfe 등(42)은 TGF- β 1의 과발현이 반흔을 감소시켜 주며 콜라겐 합성에 기여한다고 보고한 바 있다. 상기의 결과들을 종합적으로 보았을 때 화장품 조성물 내 첨가된 야관문 추출물은 창상치유 속도를 가속화하는 동시에 창상과 반흔 면적 감소에 기여함으로써 피부 창상치유와 관련한 코스메슈티컬 소재로서 유효성을 나타내며 이는 산업적 활용에 유용할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 야관문 추출물의 마우스 대식세포에 대한 항염증 활성화와 창상유발 동물실험 모델을 통한 창상치유 효과를 조사하였다. RAW264.7 세포에서 야관문 추출물은 0.2 mg/mL 이하 농도에서 세포생존에 영향을 주지 않았으며, 염증반응이 활성화된 대식세포에 대해 농도 의존적으로 유의적인 NO 생성 감소를 나타내었다. 창상유발 동물실험 모델에서 야관문 추출물을 함유한 화장품 조성물의 창상치유 효과에 대해 육안적으로 관찰한 결과, SCO군과 CCO군보다 야관문 추출물을 함유한 SSP군에서 약 20~30% 빠른 상처 면적 감소 효과를 나타내었으며, 반흔 크기 역시 약 12% 작게 형성되었다. 또한 SSP군 조직의 외피와 진피 재생회복 속도가 빨라진 것을 Masson's trichrome 염색을 통해 확인할 수 있었으며, VEGF 및 TGF- β 1 유전자 발현이 SCO군과 비교 시 각각 감소 및 증가하였다. 이러한 결과는 야관문

추출물이 항염증 및 교원질 생성 유도를 통한 조직재생 활성화에 기여하여 창상치유 속도를 가속화하고 반흔 면적을 감소시킬 수 있는 피부 창상치유와 관련한 코스메슈티컬 소재로서 산업적 활용이 가능함을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부의 지역산업기술개발사업(과제번호: A000200004)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Park JM, Lee SP, Son ES. 2002. An analysis on the regulations, technology, and market of cosmeceuticals. *Kor J Technol Innovat Soc* 5: 293-306.
- Lee HH. 2007. A prospect on development of functional foods in the cosmetics industry. *Kor J Aesthet Cosmetol* 5: 83-90.
- Lee HJ, Lim GN, Park MA, Park SN. 2011. Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. Don. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 63-69.
- Kwon DJ, Kim JK, Ham YH, Bae YS. 2007. Flavone glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* G. Don. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 344-347.
- Numata A, Hokimoto K, Yamaguchi H. 1980. C-Glycosylflavones in *Lespedeza cuneata*. *Chem Pharm Bull* 23: 964-965.
- Ding JL, Lim IJ, Lee HD, Cha WS. 2006. Analysis of minerals, amino acids and vitamin of *Lespedeza cuneata*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 414-417.
- Kim SJ, Kim DW. 2007. Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. *Korean J Food Preserv* 14: 332-335.
- Kim HJ, Kim KS, Kim DI. 2012. Inhibitory effects of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photo aging. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1540-1545.
- Choi KM, Lee CW, Lee MY. 2008. Effect of ore minerals in the healing of full-thickness skin injury model of rat. *J Environ Sci* 17: 809-816.
- Waldron DR, Zimmerman-Pope N. 2003. Superficial skin wounds. In *Textbook of Small Animal Surgery*. Elsevier Health Science, Philadelphia, PA, USA. p 259-273.
- Lee AY. 2005. Allergic contact dermatitis due to sodium fusidate, an ingredient of fucidin ointment. *Medical Postgraduates* 5: 261-263.
- Han DO, Kim GH, Choi YB, Shim IS, Lee HJ, Lee YG, Kim JH, Chang GT, Hahm DH. 2005. Healing effects of *Astragalus radix* extracts on experimental open wounds in rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 19: 92-97.
- Park ST, Kim JW, Jeong SH, Seo YM. 2012. The effect of extract from several herbs grown naturally in namwon province wound treatment. *J Korean Biol Nurs Sci* 14: 122-128.
- Song JH. 2006. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of root bark of *Ulmus parvifolia*. *J Wonkwang Medi Sci* 20: 313-318.
- Mohideen S, Ilavarasan R, Hemalatha S, Anitha N, Sasikala E. 2003. Wound healing and diuretic activities of *Canthium parviflorum* lam. *Nat Prod Sci* 9: 102-104.

16. Min DH, Kim DK, Lim JP, Yang JH. 2005. Transdermal drug delivery & therapeutic effect of the preparations of *Lithospermi radix* and *Gardeniae fructus* extracts on the burn & wound healing. *J Kor Pharm Sci* 35: 255-263.
17. Kader KN, Coyle CH. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species: implications for cardiovascular device engineering. *J Biomed Mater Res Part B* 83B: 138-144.
18. Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, An BJ. 2010. Anti-oxidant and anti-inflammation activity of fractions from *Aster glehni* Fr. Schm. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38: 434-441.
19. Kim JM, Kim DJ, Kim TH, Kim HS, Choe M. 2010. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of water extract from *Perillae semen* in RBL-2H3 cells. *Korean J Nutr* 43: 367-373.
20. Saeavanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK. 2003. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Vet Parasitol* 113: 211-216.
21. Kim DH, Yi HS, Yun HJ, Cha CM, Park SD. 2010. Anti-inflammatory effect of methanol extract of Keum-Ryung-Ja-San in mouse macrophages. *Kor J Herbology* 25: 89-98.
22. Hayashi Y, Tsuji S, Tsuji M, Nishida T, Ishii S, Iilima H, Nakamura T, Eguchi H, Miyoshi E, Hayashi N, Kawano S. 2008. Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 523-531.
23. Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH. 1982. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. *Ann Surg* 196: 379-387.
24. Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goodson WH 3rd, Andrews WS. 1984. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 96: 48-54.
25. Eun JS. 2011. Effect of *Lespedeza cuneata* G. Don on the activity of murine immune cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 837-842.
26. Thippeswamy T, Mckay JS, Quinn JP, Morris R. 2006. Nitric oxide, a biological double-faced janus-is this good or bad. *Histol Histopathol* 21: 445-458.
27. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
28. Yoon JH, Moon HB. 1994. The effect of macrophages on the wound healing delayed by immunosuppression. *J Korean Surg Soc* 46: 10-22.
29. Schaffer MR, Tantry U, Gross SS, Wasserkrug HL, Barbul A. 1996. Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res* 63: 237-240.
30. Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Woo SO, Baek HJ, Park KK. 2006. The effects of *Bombyx mori* silk protein for the expression of epithelial growth factor in the wound healing process of the hairless mouse. *Korean J Seric Sci* 48: 56-60.
31. Kim JS, Han SH, Jung BK, Park SJ, Kim HW, Chae H, Kwon YK, Kim BJ. 2010. Effects of Korean herbal bathing candidates on allergic contact or wound induced dermatitis mice model. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 24: 481-489.
32. Martin P. 1997. Wound Healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75-81.
33. Muller MJ, Hollyoak MA, Moaveni Z, Brown TLH, Herndon DN, Heggers JP. 2003. Retardation of wound healing by silver sulfadiazine is reversed by *Aloe vera* and nystatin. *Burns* 29: 834-836.
34. Diegelmann RF, Evans MC. 2004. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9: 283-289.
35. Macri L, Silverstein D, Clark RAF. 2007. Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Delivery Rev* 59: 1366-1381.
36. Cornelissen LH. 2004. Which molecules of the initial phase of wound healing may be used as markers for early detection of skin damage. <http://www.mate.tue.nl/mate/pdfs/4703.pdf>.
37. Hong JH, Kim HS, Kim HR, Park MK, Yoon CH, Lee SH, Kim HY, Park SH. 2005. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in Behcet's syndrome. *J Korean Rheum Assoc* 12: 189-196.
38. Shah M, Revis D, Herrick S, Baillie R, Thorgenirson S, Ferguson M, Roberts A. 1999. Role of elevated plasma transforming growth factor- β 1 levels in wound healing. *Am J Pathol* 154: 1115-1124.
39. Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P. 2001. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes *in vitro*. *Cytokine* 13: 280-286.
40. Lee JH, Byun JA, Yeo SW, Kim JK, Park YS. 2011. Role of interleukin-10 on mouse otitis media model using lipopolysaccharide. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 43-47.
41. Kapoor M, Howard R, Hall I, Appleton I. 2004. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Am J Pathol* 165: 299-307.
42. Rolfe KJ, Richardson J, Vigor C, Irvine LM, Grobbelaar AO, Linge C. 2007. A role for TGF- β 1-induced cellular responses during wound healing of the non-scarring early human fetus. *J Invest Dermatol* 127: 2656-2667.