



Original Article / 원저

흰쥐의 전층피부상처 동물모델에서 消風散이 VEGF 및 TGF- β 1 발현에 미치는 영향

김범희*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

Sopung-san Extract Enhances healing potential on Full-thickness Skin Wound in Rats: Role of VEGF and TGF- β 1.

Bum Hoi Kim*

Department of Anatomy, College of Korean Medicine and Research
Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

ABSTRACT

Wounds are commonly created during almost every kind of surgery, trauma and skin diseases. Delayed wound healing affects a plenty of patients and requires prolonged treatments that seriously reduce the quality of life for patients. Skin damage involving large areas or great severity can lead to disability or even death. Wound healing involves a complicated series of actions, of various tissues and cell lineages, concerning inflammation, migration, proliferation, reepithelialization, and remodeling.

Sopung-san is reported to have anti-inflammatory effect and has been used for various skin diseases such as allergic dermatitis and atopic dermatitis. In this study, the hypothesis that oral treatment with *Sopung-san* could enhance healing potential on rat full thickness skin wounds was tested. 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 *Sopung-san* water extract (SPS) or saline (Control) was orally administered every day. The wound area was measured and the percentages of wound contraction, wound healed and wound epithelization were calculated. Wound tissue samples were excised following injection for histopathological and immunohistological examination.

Wound area in rats of SPS group significantly was decreased compared to Control. SPS group showed significant promotion of wound healing compared to Control group in the percentages of wound contraction, wound healed and wound epithelization. Histopathological examination revealed that SPS induces neo-vascularization potential in wound healing process. SPS treatment in rats significantly accelerated cutaneous wound healing in the neo-vascularization process by increasing VEGF and TGF- β 1 synthesis. The results suggest that Sopung-san affects key cellular processes responsible for wound repair and point to a unique potential for this molecule in the therapy of skin wounds, particularly as an angiogenic agent.

Key Words : Sopung-san, skin wound, neo-vascularization, VEGF, TGF- β 1

I. 서론

상처는 다양한 종류의 수술, 외상, 피부질환에 의해 종종 발생하는데, 상처치유의 지연은 전체 치료기간의 연장을 초래하여 환자들의 삶의 질 저하에 영향을 미치게 된다¹⁾. 넓은 면적의 피부손상 혹은 정도가 심한 피부손상은 영구적인 장애나 사망을 초래할 수도 있다²⁾. 그럼에도 불구하고, 상처치유를 위해 사용되는 약제에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

상처치유는 조직의 염증(inflammation), 이동(migration), 증식(proliferation), 재상피화(re-epithelialization), 재구조화(remodeling)의 복잡한 과정을 거쳐 진행된다³⁾. 상처치유의 각 과정들은 서로 긴밀하게 연결되어 있으며, 각 단계들이 모두 상처조직의 완전하고 적절한 회복에 필수적인 역할을 하게 된다. 그런데, 이러한 과정 중에서 상처로 유발된 혈관의 손상이 회복되는 과정이 상처의 치유와 회복에 있어 가장 중요하다 할 수 있는데⁴⁾, 이를 angiogenesis 또는 neovascularization이라 부르며, vascular endothelial cell growth factor(VEGF), basic fibroblast growth factor(bFGF) 그리고 transforming growth factor beta 1(TGF- β 1)등의 cytokine에 의해 촉진된다^{5,6)}.

VEGF는 granulation tissue의 형성에 필수적인 신생혈관형성(angiogenesis)를 자극하는 가장 중요한 cytokine중에 하나이다⁷⁾. VEGF 발현의 상승은 새롭게 형성된 모세혈관의 수를 늘려서 granulation tissue의 형성을 촉진하여 결과적으로 혈관형성과 상처치유를 증가시키게 한다⁸⁾. 또한, TGF- β 1은 전체

상처치유 과정에 걸쳐서 중요한 역할을 하는데, 섬유모세포의 증식과 섬유모세포 안에서의 아교질의 생성 및 상처육아조직의 형성을 조절하며, 육아조직에서의 섬유모세포의 근육섬유모세포로의 분화를 촉진하는 것으로 알려졌다⁹⁾. 또한 상처 주변부의 신생혈관 형성과 상피수축을 촉진하는 데 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다¹⁰⁻¹²⁾. 이전 연구를 통해 TGF- β 1 유전자제거 생쥐(knockout transgenic mouse)에서 재상피화 과정이 지연되는 것을 발견하였으며, 이는 각질세포 이동의 저해에 의한 것으로 밝혀졌다¹⁰⁾.

消風散은 <外科正宗>에 수록된 처방으로 消風清熱하고 除濕止痒하는 효능이 있어서 습진, 풍진 및 과민성 피부염, 신경성 피부염 등에 사용할 수 있으며¹³⁾, 근래 아토피 피부염과 두드러기 치료에 응용되는 한의학 처방이다. 消風散에 관한 실험적 연구로는 BALB/c mouse에서의 아토피 피부염에 유효한 효과¹⁴⁾와 histamine에 의한 알러지성 피부염 동물모델에서의 효과¹⁵⁾ 등이 확인되었다. 그러나 피부손상에 대한 消風散의 효과는 아직 연구된 바 없다. 이에 본 연구에서는 임상적으로 피부염을 비롯한 다양한 피부질환에 효능이 있는 것으로 알려진 消風散이 피부에서의 상처치유 과정에 미치는 영향을 검증하기 위하여 흰쥐에 피부전층 상처를 유발한 후 消風散 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.

* Corresponding author : Bum Hoi Kim. College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7411, Fax : +82-51-850-7435, E-mail : bume@deu.ac.kr

• Received : April 26, 2017 / Revised : May 13, 2017 / Accepted : May 16, 2017

II. 실험방법

1. 실험동물

실험동물은 샘타코(주)에서 구입한 9주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 21~23℃, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암을 유지하는 사육실에서 무균음료와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

본 연구의 모든 과정은 OO대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2017-003).

2. 약물의 조제 및 투여

실험에 사용한 消風散 처방의 내용과 1첩 분량은 Table 1과 같다. 消風散 5첩 분량인 120g을 증류수 2,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전 동결건조시켜 물추출액기스 34.8g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 물추출액기스 102.9mg을 음용수에 녹여 피부 상처를 유발시킨 후 매일 정해진 시간에 경구투여 하였다.

Table 1. Herbal Composition of *Sopung-san*

Herb name	Scientific name
Danggwi(當歸)	Angelica Gigantis Radix
Jihwang(地黃)	Rehmanniae Radix
Seokgo(石膏)	Gypsum Fibrosum
Bangpung(防風)	Saposhnikovia Radix
Changchul(蒼朮)	Atractylodes Rhizoma
Moktong(木通)	Akebiae Caulis
Ubangia(牛蒡子)	Arctii Fructus
Jimo(知母)	Anemarrhenae Rhizoma
Homa(胡麻)	Sesami Semen Nigra
Seontoe(蟬退)	Cicandidae Periostracum
Gosam(苦參)	Sophorae Radix
Hyeonggae(荊芥)	Schizonepetae Spica
Gamcho(甘草)	Glycyrrhizae Radix
total	

3. 피부전층 상처(Full-thickness skin wound) 유발¹⁶⁾과 실험군의 분리

실험 당일 ethyl ether로 흰 쥐를 흡입 마취시키고 흰쥐의 등쪽 피부의 털을 제거한 후 수술부위를 70% ethanol로 소독하였다. 등쪽 피부를 정사각형(15×15 mm)을 작도한 후 멸균된 수술용 가위로 피하층까지 절개한 후 피하조직을 분리하여 피부전층 상처를 유발하였다. 상처유발 후 상처 부위의 감염을 방지하기 위해 상처부 주위를 소독하고, PBS로 상처부의 혈흔과 기타 삼출물을 정리하였다.

피부전층 상처를 유발 시킨 후 실험동물을 무작위로 각각 10마리 씩 두 군으로 나누어 消風散을 투여하는 SPS군과 동일량의 생리식염수를 투여하는 Control군으로 분리하였다. 약물의 투여는 상처 유발일부터 시작하여 15일간 매일 오전 동일한 시간에 경구 투여를 통해 시행하였다. 또한 상처부위의 감염을 방지하기 위해 매일 상처부위를 소독하였다.

4. 상처 면적의 변화¹⁷⁾

실험동물에 피부 전층 상처유발 후 3, 7, 11, 15일째 같은 시간에 각 군의 동물들의 상처부위를 촬영하였다. 상처의 연축율은 상처유발 직후의 최초의 상처 테두리면적(W_0)에서 측정일별 연축된 상처의 테두리 면적(W_i)의 차이값의 백분율로 계산하였다. 상처의 치유율은 상처유발 첫날의 상처 테두리면적(W_0)에서 각 측정일별 상처의 면적(U_i)의 차이값의 백분율로 계산하였다. 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.

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

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

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

5. Histological analysis

상처유발 후 15일에 실험동물을 희생하여 상처부와 주변 피부조직을 채취하였다. 조직을 4% 중성 formalin 용액에 24시간 고정한 후 상처 증상을 통과하는 절편을 취하여 탈수시킨 후 paraffin 블록에 포매하였다. 조직을 5 μ m 두께로 조직절편기를 사용하여 절단한 다음 gelatin으로 코팅된 slide에 붙여 paraffin 제거 및 함수과정을 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. VEGF의 관찰

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 상처주변의 동일 구간에서의 면역 양성반응의 결과를

정량화하기 위해 400 \times 의 배율의 현미경 하에 일정한 구역(1.2 \times 10⁵ μ m²) 안에서 관찰되는 면역 양성반응 세포수를 측정하여 수치화하였다.

7. 통계처리

실험결과와 분석은 Student T-test를 이용하여 위험도 P<0.05 및 P<0.01로 유의성을 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균 \pm 표준오차(mean \pm standard error)로 표시하였다.

III. 결과

1. 상처의 육안적 변화

전층 피부손상 유발 후 15일간 상처부위를 육안으로 관찰한 결과 SPS군이 Control군에 비해 상처치유가 촉진되는 것이 관찰되었다. 상처유발 당일에는 즉시 염증반응이 시작되어 모든 실험동물의 조직에서 혈액과 삼출물 분비가 관찰되었고, 3일째에는 육아조직들의 증식이 관찰되었다. 상처유발 7일 후에는 상처의 수축과 상피화가 진행된 것을 확인할 수 있었는데, SPS군에서 Control군에 비해 상처의 수축과 상피화가 상대적으로 빠르게 진행되는 것이 관찰되었다. 또한 SPS군에서 Control군과 비교하여 상대적으로 혈종이 감소되고 삼출물 분비가 줄어드는 것이 관찰되었다. 이러한 변화는 11일째에 더욱 뚜렷이 관찰되었으며, 실험 마지막 날인 15일째에는 상처부위의 크기가 SPS군이 Control군에 비해 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(Figure 1).

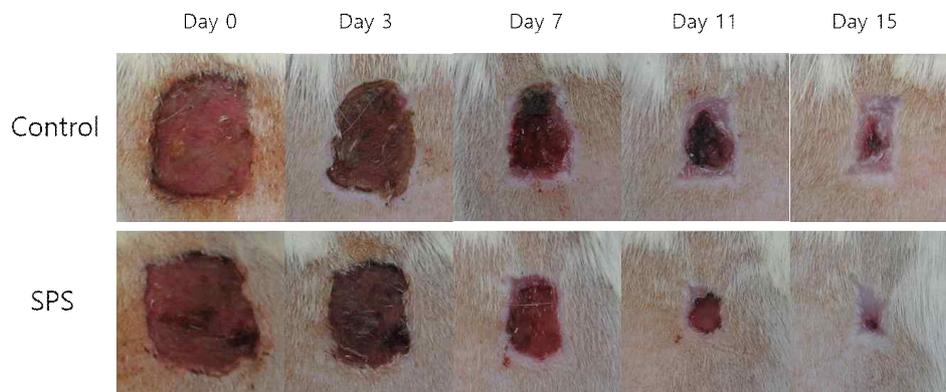
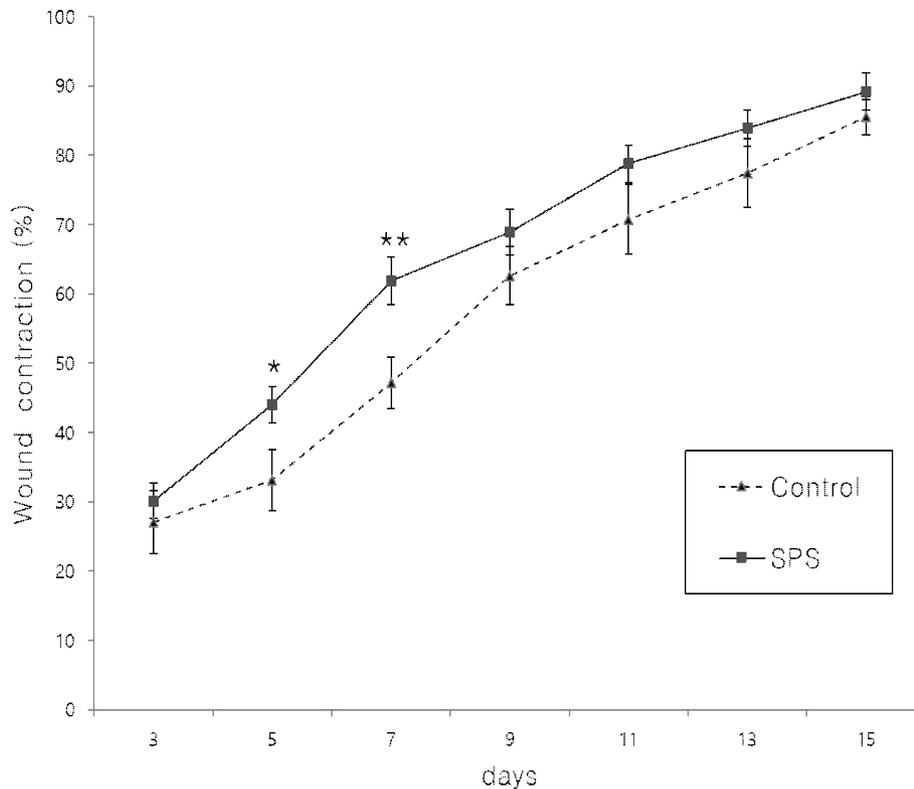


Figure 1. Representative clinical images of wounds of Control and *Sopung-san* treated (SPS) groups. The appearance of excision wounds after operation was observed every 4 days. Compared with Control group, rats of SPS group showed smaller open wound areas for 15 days.

2. 상처 연축율

최초의 상처 테두리면적에서 측정일별 상처의 연축된 테두리면적의 차이값으로 계산된 연축율의 비교에 있어 SPS군이 Control에 비해 전반적으로 높은 연축률을 나타내었다. 특히 상처 유발 5일째의 연축률의 비교에 있어 Control군이 33.1±4.4%를 나타낸 반면, SPS군의 경우 44.0±2.6%를 나타내어 유의성 있는 차이를 보였으며(P<0.05), 7일째에는 Control군이

47.2±3.7%, SPS군이 61.9±3.5%로 측정되어 그 차이가 더욱 뚜렷이 나타났다(P<0.01, Figure 2). SPS군의 경우 상처 유발후 7일째에 상처면적이 50% 이상 회복된 것에 반해, Control군의 경우는 9일째에 50%이상 회복된 것으로 확인되었다. 상처 유발 9일째 이후에도 비록 유의성 있는 차이는 아니었으나 SPS군이 Control군에 비해 연축율이 증가하는 것으로 관찰되었다.



	day 3	day 5	day 7	day 9	day 11	day 13	day 15
Control	27.1±4.6	33.1±4.4	47.2±3.7	62.6±4.2	70.7±5.0	77.5±4.9	85.5±2.5
SPS	30.2±2.5	44.0±2.6*	61.9±3.5**	68.9±3.3	78.8±2.7	83.6±2.6	89.2±2.7

Figure 2. Mean percentage of wound contraction(%) for each group.

Wound contraction was significantly greater in SPS groups than in rats of Control group on day 5 and 7.

Data were expressed as mean±S.E. (* P<0.05, ** P<0.01)

3. 상처 치유율

상처 치유율의 비교에 있어서도 消風散 추출물을 투여한 SPS군이 Control군에 비해 상처유발 후 15일 동안 전반적으로 높은 상처 치유율을 나타내었다. 특히 상처

유발 5일에 Control군이 34.5±3.6%, SPS군이 43.0±2.4%, 7일 후에는 Control군이 49.9±3.5%, SPS군이 61.0±3.0%로 측정되어 상처 치유율의 비교에 있어서 유의성 있는 차이를 나타내었다(Figure 3).

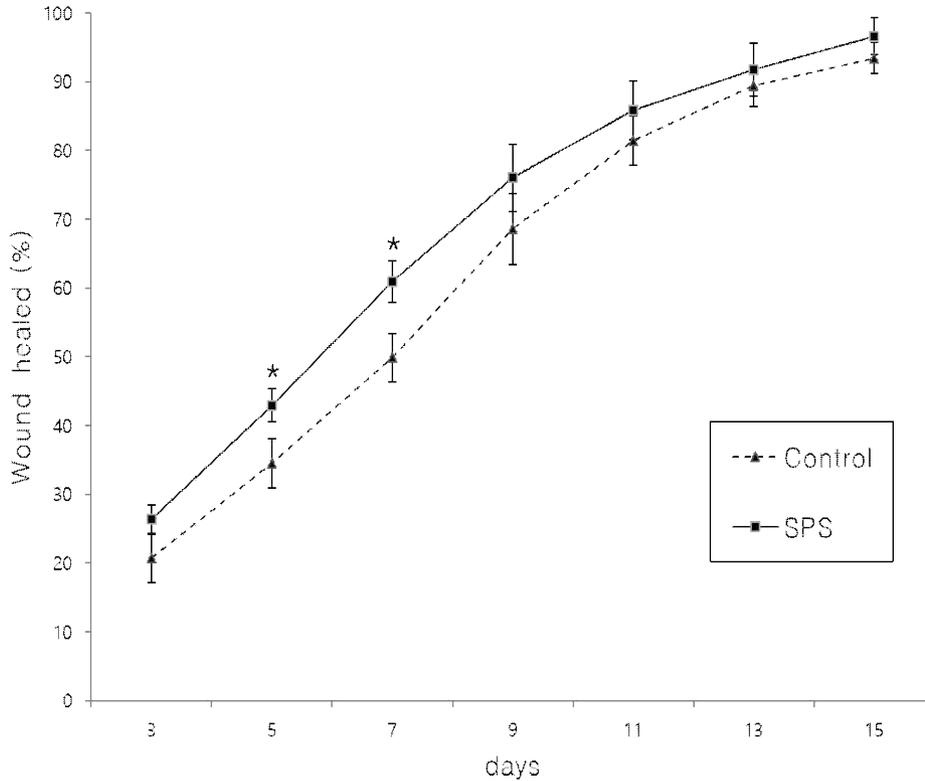


Figure 3. Mean percentage(%) of wound healed for each group.

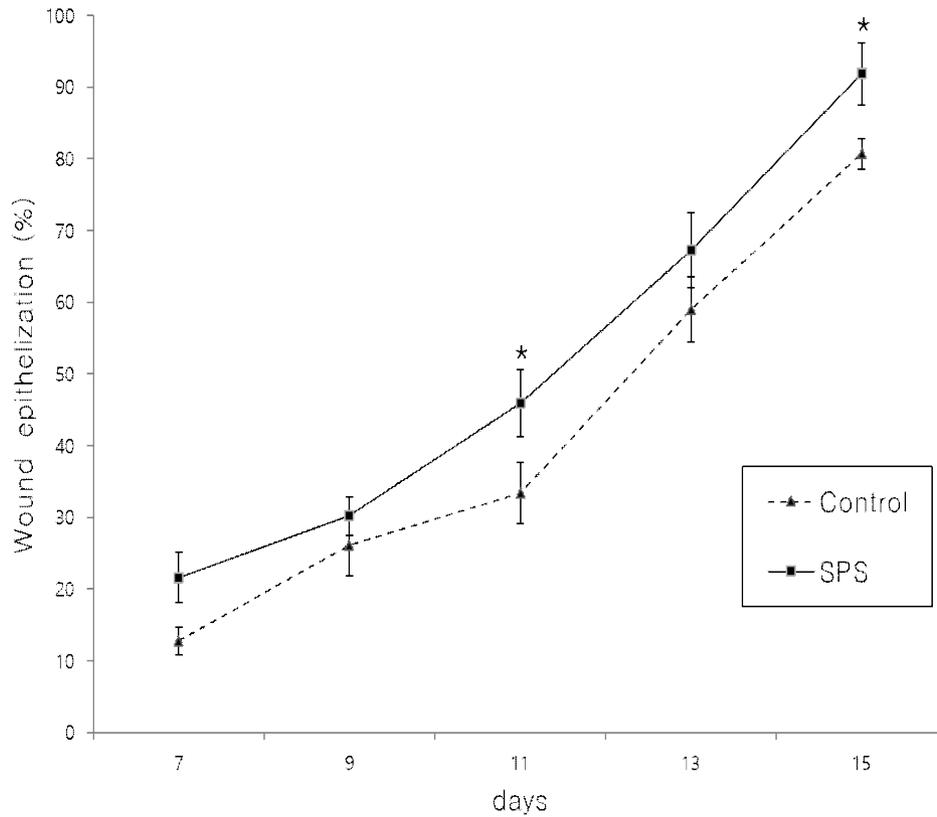
Mean percentage of wound healed in SPS group was significantly increased on day 5 and 7 as compared to Control group.

Data were expressed as mean±S.E. (* P<0.05)

4. 상처 상피화율

상처 상피화율은 상피화가 진행되는 시기인 상처 유발 후 7일째부터 측정하였는데, 15일 동안의 상처의 상피화율의 비교에서 전반적으로 SPS군이 Control군에 비해 상피의 재생이 빠르게 진행되는 것으로 관찰되었다. 특히 상처유발 후 11일째에 Control군이 33.4±4.7%를 나타낸 반면, SPS군의 경우는 45.9±4.2%로 측정

되어 SPS군에서 Control군에 비해 유의성있는 차이로 빠르게 진행된 것으로 관찰되었다. 또한, 실험 마지막일인 15일째에는 상피화 진행율이 Control군이 80.7±4.4%, SPS군이 91.9±2.1%를 보여서 SPS군이 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Figure 4).



	day 7	day 9	day 11	day 13	day 15
Control	12.7±3.5	26.1±2.7	33.4±4.7	59.0±5.2	80.7±4.4
SPS	21.6±1.9	30.2±4.2	45.9±4.2*	67.3±4.5	91.9±2.1*

Figure 4. Mean percentage(%) of wound epithelization for each group.

The wound epithelization percentage was determined after day 7. The mean percentage of rats in SPS group was significantly increased on day 11 as compared to Control group.

Data were expressed as mean±S.E. (* P<0.05)

5. 상처부위의 조직학적 변화

피부전층 상처를 유발시킨 후 15일째에 Control군과 SPS군에서 모두 상피화와 더불어 표피의 각질화가 일어났는데, SPS군이 Control군에 비해 상피화가 상대적으로 더 많이 이루어진 것이 관찰되었다(Figure 5 A,B). Control군과 SPS군에서 모두 상처부위에 염증세포와 섬유모세포 및 세포외기질의 축적이 발견되었

으나 현미경 상에서 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 하지만, 진피층에서의 혈관형성에서는 SPS군이 Control군에 비해 모세혈관 증식이 뚜렷이 관찰되었다. 또한, 새로운 혈관이 형성되면서 세포소기관과 hair follicle 등의 생성이 발견되었으며, SPS군에서 Control군에 비해 더 증가되는 것으로 확인되었다(Figure 5 C,D).

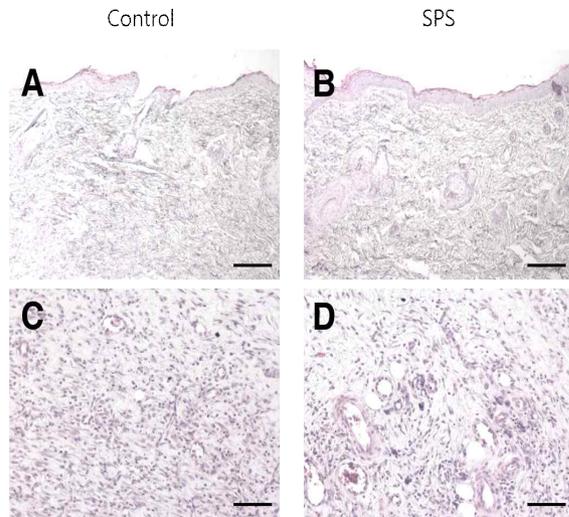


Figure 5. Hematoxylin and eosin (H&E) stained sections of the wounded skins(A, B) and dermis(C,D) in Control and SPS groups.

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 SPS group showed greater epidermal epithelialization compared with Control group. Magnification 100×(A, B), and 200×(C, D). Scale Bar 200 μ m(A, B), and 100 μ m(C, D).

6. VEGF와 TGF- β 1의 면역조직화학적 발현

피부의 전층 손상 유발 후 15일째에 각 실험군 상처부위 주변에서 VEGF와 TGF- β 1 단백질의 발현을 관찰한 결과, SPS군이 Control군에 비해 VEGF의 뚜렷한 양성 반응이 관찰되었다. 특히 신생혈관 주변에서 VEGF의 발현이 더욱 뚜렷이 관찰되었는데, SPS군이 Control군에 비해 신생혈관 형성이 더욱 촉진된 것이 발견되었다. TGF- β 1의 발현에서도 SPS군이 Control군에 비해 발현이 증가된 것이 관찰되었으며, 동시에 세포외기질의 축적도 더욱 활발한 것으로 확인되었다(Figure 6).

현미경 하의 일정면적에서의 면역 양성반응을 보인 세포수를 측정된 결과에서도 VEGF 발현의 경우 Control은 69.5 \pm 5.2개/ $1.2\times 10^5\mu\text{m}^2$ 인 반면, SPS군에서는 87.6 \pm 6.7개/ $1.2\times 10^5\mu\text{m}^2$ 로 유의성 있는 증가를 나타냈으며, TGF- β 1의 경우에서도 Control은 78.4 \pm 6.4개/ $1.2\times 10^5\mu\text{m}^2$ 인 반면, SPS군에서는 102.4 \pm 8.9개/ $1.2\times 10^5\mu\text{m}^2$ 로 양성면역세포수의 유의성 있는 증가가 관찰되었다(Figure 7).

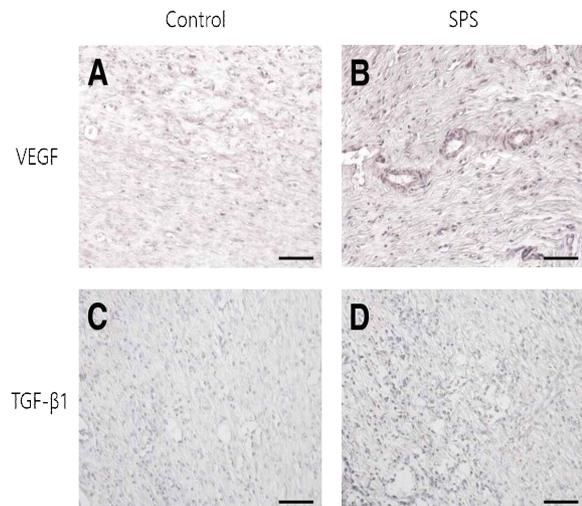


Figure 6. Immunohistochemical staining for VEGF(A, B) and TGF- β 1(C, D) of the wounded skins in Control and SPS groups.

Immunohistochemistry demonstrated that the distribution of VEGF positive and TGF- β 1 positive cells in SPS group was significantly more than that in Control group. The extracellular matrix (ECM) deposition was increased in dermis of rats of SPS group, as compared with Control group. the ECM deposition was coincident with the number of TGF- β 1 positive cells.

Magnification 400 \times , Scale Bar 50 μ m.

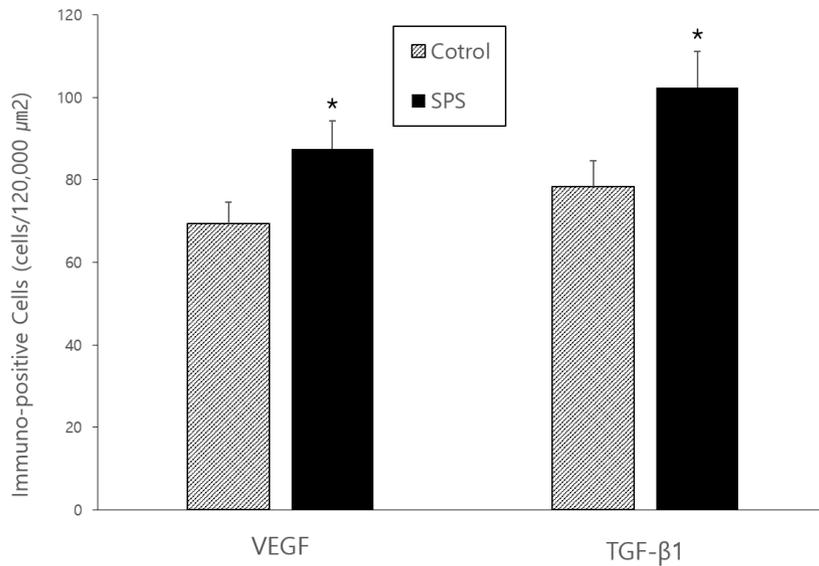


Figure 7. The immunoreactivities for VEGF and TGF-β1 of the wounded skins in Control and SPS groups.

The immunoreactivities of both VEGF and TGF-β1 were significantly increased in SPS group, as compared with Control group.

Data were expressed as mean±S.E. (* P<0.05)

IV. 고찰

일반적인 상처치유의 과정은 염증기(inflammation), 육아기(granulation), 상피화기(epithelialization), 섬유증식기(fibroplasia), 수축기(contraction) 등을 포함하는 복잡한 과정을 거치게 된다^{3,18}). 염증기에는 혈소판 응고가 일어나며 응고인자를 방출하여 섬유소를 생성하고 혈액응고를 일으킨다. 육아기에는 섬유모세포(fibroblast)가 상처부위로 이동하고 증식하여 새로운 세포외기질(extracellular matrix: ECM)을 합성한다. 상피화기에 이르면 표피는 두꺼워지고 상처 주변의 기저세포(maginal basal cell)가 커지고 상처부위로 이동하게 된다. 조직결손이 많은 상처일수록 염증기와 육아기가 진행된 후에 상피화 과정은 상대적으로 늦게 일어난다. 섬유증식기에는 섬유모세포에서 생성된 새로운 교원섬유(collagen fiber)들이 나타나는데, 교원성 기질이 형성되면서 상처내부 구조를 만들게 된다. 수축기에는 주로 근섬유모세포(myofibroblast)가 상처수축을 주도하게 된다¹⁹).

消風散은 消風清熱의 효능이 있어서 주로 아토피

피부염과 알러지성 피부염에 개선효과가 있으며, 실험적인 연구를 통해서도 항염효과가 입증되었다^{14,15}). 본 연구에서는 흰쥐에 전층피부손상을 유발시킨 후 消風散 물추출물을 15일간 경구투여하면서 상처부위의 변화를 살펴본 결과, 消風散을 투여한 SPS군이 Control군에 비해 상처주위의 조직 수축과 상피화가 빠르게 진행되었으며, 혈종과 삼출물의 감소 등 상처유발로 인한 염증반응을 억제시키는 것으로 관찰되었다(Figure 1). 상처의 연축율 및 치유율의 비교에서도 SPS군이 Control군에 비해 빠른 치료효과를 나타냈는데, 연축율과 치유율이 주로 상처유발 후 5일 및 7일째에 유의성 있는 증가를 나타내는 것으로 관찰되었다(Figure 2, Figure3). 이러한 변화는 상처유발 7일째 이후에 SPS군이 Control군에 비해 상처 표면에서 육안으로 관찰된 상처부위의 수축 및 상피화가 빠르게 진행된 것과 관련 있는 결과이다. 상처유발 7일 이후의 상피화를 비교에서도 SPS군이 Control군에 비해 상피화가 더 빠르게 진행되었는데, 상처유발 후 11일째와 실험 마지막 일인 15일에 유의성 있는 변화를 나타내었다(Figure 4). 이러한 결과들은 消風散이 피부손상의 치유에 있어 염증 반응을 억제시키는 동

시에 상처의 수축을 촉진시켜 상처부위의 면적을 감소시키고 상피의 재생을 촉진하는데 유의한 효과가 있는 것을 나타내는 것이라 할 수 있다.

피부손상과 그에 따르는 혈관손상은 혈액구성성분의 유출을 일으키고 혈소판응집과 혈액응고를 일으킨다. 이러한 손상은 염증반응을 일으키고 회복 과정을 준비하게 되는데, 조직손실에 대한 반응으로 섬유모세포가 증식하여 손상부위로 옮겨져서 상처부위에 섬유모세포가 위치하고 세포외기질이 축적되게 된다²⁰. 즉, 섬유모세포는 증식과 이동을 거쳐 상처를 수축시키며 교원질 등의 세포외기질을 합성하는데, 이러한 활동은 상처부위에 새롭게 형성되는 모세혈관의 영향을 많이 받게 된다²¹. 다시 말해, 신생혈관 형성을 통해 섬유모세포의 교원질 형성과 세포외기질의 축적을 촉진함과 동시에 재상피화와 상처수축을 위한 영양분을 제공할 수 있다. 본 연구에서 상처유발 후 15일째에 H&E염색을 통해 상처부위 조직의 변화를 관찰한 결과 SPS군과 Control군에서 섬유모세포와 세포외기질 형성이 관찰되었으며, 진피층에서 신생혈관 형성이 다수 관찰되었다. 또한 새로운 모세혈관이 형성되면서 세포소기관과 모공(hair follicle) 등이 H&E 염색을 통해서 발견되었는데, 消風散을 투여한 SPS군이 Control군에 비해 상대적으로 신생혈관의 형성이 증가되는 것으로 관찰되었다(Figure 5). 이러한 결과는 전층피부상처 유발 후 15일간의 실험기간 동안 消風散이 빠른 회복효과를 나타낸 것이 상처부위의 신생혈관 형성을 자극함으로써 상처치유과정을 촉진한 것임을 말해주는 것이라 할 수 있다.

한편, 상처치유 과정에서의 이러한 신생 혈관의 형성은 상처 주위에 존재하는 세포들로부터 분비되는 각종 성장인자 및 cytokine들에 의하여 조절되는데, 세포간의 상호작용을 위한 신호전달과 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 cytokine으로는 vascular endothelial growth factor(VEGF), transforming growth factor beta(TGF- β)와 platelet derived growth factor(PDGF) 및 epidermal growth factor(EGF) 등이 있다^{5,6,22}. 특히, VEGF는 각질세포에서 생성되는데 가장 강력한 내피세포 유사분열촉진물질(mitogen)으로써 새로운 혈관생성에 관여하는데, 내피세포의 수용체 인산화효소(receptor kinase)에 부착하여 혈관투과성을 변화시키고 점진적으로 혈관을 형성하는 세포내 신호전달을 유도한다. VEGF는 배아발생, 중앙

성장, 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 있다²³. 본 연구에서도 전층피부 손상을 일으킨 후 消風散 물추출물을 15일간 경구투여하여 상처부위에서 VEGF의 발현을 면역조직화학적 방법을 통해 관찰한 결과, SPS군에서 Control군에 비해 양성 반응이 증가되는 것으로 관찰되었으며, 특히 신생혈관 주변에서의 VEGF의 발현이 더욱 뚜렷이 확인되었다(Figure 6). 현미경 하의 일정면적에서 VEGF에 대한 면역 양성 반응을 보인 세포수를 측정된 결과에서도 SPS군이 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다(Figure 7). 이러한 결과는 다양한 천연물 약제들이 상처치유의 과정에서 VEGF의 발현을 증가시켜 신생혈관생성을 촉진하여 상처회복을 돕는다는 이전의 연구결과들과도 관련이 있는 것으로²⁴⁻²⁶, 消風散의 빠른 상처치유 효과는 이러한 VEGF 생성 촉진을 통한 모세혈관 형성에 의한 것으로 짐작할 수 있다.

TGF- β 1은 섬유모세포의 이동과 증식, 섬유모세포에 의한 기질의 생성 및 상처육아조직의 형성을 조절하며, 근육섬유모세포로의 분화를 촉진하는 기능을 가지고 있어서 상처치유 과정에서 치유의 속도와 상처부의 강도 등에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{9,27}. 또한 TGF- β 1은 신생혈관형성을 자극하여 상처치유를 촉진하는 것으로도 알려졌다. 본 연구에서 상처 유발 후 15일째에 TGF- β 1의 발현을 면역조직화학법으로 관찰하여 비교한 결과, SPS군이 Control군에 비해 발현이 현저히 증가되는 것으로 관찰되었으며, 발현증가와 더불어 세포외기질의 축적도 증가된 것으로 확인되었다(Figure 6). 일정면적 안에서의 TGF- β 1의 양성 반응수를 측정된 비교에서도 SPS군이 Control군에 비해 증가되어 유의성 있는 차이를 나타냈다(Figure 7). 이러한 결과는 상처치유를 촉진하는 것으로 알려진 다양한 약제들이 VEGF의 생성을 증가시킬 뿐 아니라 동시에 TGF- β 1의 생성을 증가시킴으로써 상처주위의 새로운 모세혈관을 형성을 자극하여 유효한 작용을 나타낸다는 이전 연구결과들^{27,28}과도 일치하는 것으로, 消風散 경구투여는 상처부위에서 VEGF와 TGF- β 1의 생성을 모두 촉진하는 것으로 사료된다.

위의 모든 결과들을 종합하면, 消風散 투여는 상처 회복의 과정에서 VEGF와 TGF-β1의 생성을 촉진함으로써 새롭게 만들어지는 모세혈관의 수를 증가시켜 섬유모세포의 활동과 세포외 기질의 축적을 촉진함과 동시에 상처부위에서의 재생피화와 상처수축의 속도를 증가시키는 것으로 사료된다. 이처럼 消風散은 앞서 언급한 아토피 및 알러지성 피부염에서의 효능 뿐 아니라 피부상처의 회복과정에서도 유효한 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 결과들을 통해 상처치유에 대한 한의학적 기초연구 뿐 아니라 실제 임상에도 활용할 수 있으리라 기대해 본다.

V. 결론

본 연구에서는 피부상처 치유과정에서 消風散이 미치는 영향을 검증하고자 흰쥐에 인위적인 전층피부손상을 유발시킨 후 15일간 消風散 물추출물을 경구투여하고 피부상처의 회복과정을 육안으로 확인하고, 이후 피부조직을 적출하여 상처부위에서의 H&E 염색 및 VEGF와 TGF-β1에 대한 면역조직화학염색법을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

消風散은 전층피부손상에 의한 피부손실의 회복과정에서 육안적으로 빠른 피부재생을 유도하였으며, 상처 연축율, 상처 치유율, 상처 상피화율의 비교에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. 해부조직학적 검사에서 消風散은 상처부위의 상피화를 촉진시키고, 신생혈관 형성 및 세포외기질의 축적을 증가시켰다. 消風散에 의한 이러한 빠른 상처회복의 기전은 상처부위에서의 VEGF와 TGF-β1의 생성 촉진에 의한 것으로 확인되었다. 따라서 消風散은 피부상처의 치유에 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

References

1. Hayouni EA, Miled K, Boubaker S, Bellasfar Z, Abedrabba M, Iwaski H, Oku H, Matsui T, Limam F, Hamdi M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine*. 2011;18(11):976-984.
2. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.

3. Bhaskar Rao A, Prasad E, Deepthi SS, Haritha V, Ramakrishna S, Madhusudan K, Surekha MV, Venkata Rao YS. Wound healing: a new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3579-3588.
4. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol*. 2016; 100(5): 979-984.
5. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care*. 2014;3(10):647-661
6. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):40-46.
7. 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.
8. 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):218-235.
9. Wang Y, Han G, Guo B, Huang J. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. *Pharmacol Rep*. 2016;68(6):1126-1132.
10. 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-1β, NO, TGF-β. *J Ethnopharmacol*. 2016;187:213-223.
11. 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: 3507-3518.
12. Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Amano H, Shichiri M, Majima M. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF-β1 and impairs wound

- healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother.* 2015;70:317-325.
13. Jiang Keming, Bao Minghui. *Jian ming fang ji ci dian*. Shanghai: Shanghai ke xue ji shu chu ban she; 1989:1038.
 14. Park SN, Jung HS, Lee JY. Effect of Sopungsan in BALB/c Mouse Model of Atopic Dermatitis. *The Journal of Kyung Hee University.* 2004; 20(2):129-141.
 15. Seo HS, Roh SS. The study on the Inhibitory effect of Allerg by SoPungSan. *The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology.* 2000;13(1):22-29.
 16. 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.
 17. Yaseen Khan M, Ali SA, Pundarikakshudu K. Wound healing activity of extracts derived from *Shorea robusta* resin. *Pharm Biol.* 2016;54(3):542-548.
 18. Shen HM, Chen C, Jiang JY, Zheng YL, Cai WF, Wang B, Ling Z, Tang L, Wang YH, Shi GG. The N-butyl alcohol extract from *Hibiscus rosa-sinensis* L. flowers enhances healing potential on rat excisional wounds. *J Ethnopharmacol.* 2017;198:291-301.
 19. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599-610.
 20. Woodley DT. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatol Clin.* 2017;35(1):95-100.
 21. Li M, Zhao Y, Hao H, Han W, Fu X. Theoretical and practical aspects of using fetal fibroblasts for skin regeneration. *Ageing Res Rev.* 2017;36:32-41.
 22. Dik B, Baş AL, Yazıhan N. The effect of mid-kine on growth factors and oxidative status in an experimental wound model in diabetic and healthy rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016:1-6.
 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. Wang Y, Han G, Guo B, Huang J. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. *Pharmacol Rep.* 2016;68(6):1126-1132.
 25. 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):1070-1076.
 26. Wedler J, Daubitz T, Schlotterbeck G, Butterweck V. In vitro anti-inflammatory and wound-healing potential of a *Phyllostachys edulis* leaf extract—identification of isoorientin as an active compound. *Planta Med.* 2014;80(18): 1678-1684.
 27. 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) :17166-17179.
 28. 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):843-847.