Journal of Korean Medicine Rehabilitation Vol. 33 No. 3, July 2023
pISSN 1229-1854 eISSN 2288-4114
https://doi.org/10.18325/jkmr.2023.33.3.47

JKMR
Original Article

당귀작약산의 창상 회복에 대한 효과

이윤진 · 우창훈 · 김영준 · 김현지 · 안희덕
대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

The Effect of *Dangguijakyak-san* on Wound Healing

Yun-Jin Lee, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D., Young-Jun Kim, K.M.D., Hyeon-Ji Kim, K.M.D., Hee-Duk An, K.M.D.
Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Objectives We evaluated the wound healing effects of *Dangguijakyak-san* (DJ) using C57BL/6 mice that were generated open wound.
Methods The study was conducted with seven C57BL/6 mice assigned to each group, divided into the normal group, control group, vitamin E group, DJ low-dose group, DJ high-dose group. We measured total polyphenol, flavonoid contents, the size of the wound, liver function, pro-inflammatory cytokine activity in serum, inflammation-related proteins, adhesion molecules and chemokine proteins, collagen-related proteins in skin tissue and histopathological changes by H&E and Masson's staining.
Results DJ treatment significantly reduced the area of the wound compared to the control group. Also, inflammatory cytokines were reduced and the expression of anti-inflammatory-related factors (interleukin-4 [IL-4] and IL-10) was significantly increased in the DJ treatment group. We identified that DJ treatment inhibits both pathways of inflammation, the mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-κB pathway. Moreover, the protein expressions of Sirt1 (sirtuin 1), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) were decreased by DJ administration. Also, the expression of α-smooth muscle actin and collagen type I alpha 1, collagen-related proteins, that help skin recovery was significantly increased in the DJ treatment group. Histopathologically, a relatively thin epithelial layer could be observed in the DJ administration group, as well as an increase in fibroblasts and collagen fibers.
Conclusions These data suggest that DJ treatment is effective in wound healing, suppressing inflammatory proteins, increasing skin repair factors and improving histopathological changes caused by wounds. **(J Korean Med Rehabil 2023;33(3):47-65)**

Key words *Dangguijakyaksan*, Wound healing, Anti-inflammatory agents, Collagen

RECEIVED June 20, 2023
REVISED July 6, 2023
ACCEPTED July 7, 2023

CORRESPONDING TO
Hee-Duk An, Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136 Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

TEL (053) 770-2116
FAX (053) 764-0566
E-mail okee@dhu.ac.kr

Copyright © 2023 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

서론»»»»

피부는 신체의 기관, 근육을 덮고 있는 구조물로 내부와 외부적 환경 사이에서 해부학적 장벽 기능을 수행한다. 표피, 진피, 피하지방층으로 구성되며 각 층을 구성하는 세포들이 복합적으로 염증반응과 상처치유에 관여한다[1].

창상이란 어떠한 자극에 의해 피부, 연부 조직이 손상되어 기능적, 해부학적 연속성이 결손된 상태를 의미하

는데 찰과상, 자상, 열상, 절상 등이 모두 창상에 속한다[2]. 창상 치유는 조직의 연속성과 기능을 회복하기 위한 다세포 유기체의 반응이며 출혈과 염증 조절, 상처 간극의 폐쇄와 적합한 조직으로의 개선을 포괄한다[3].

창상 치료에 대한 한의학적 연구로는 托裏消毒飮[4], 四君子湯[5], 當歸鬚散[6], 當歸飮子[7], 十全大補湯[8] 및 大補湯加味方[9], 桂枝茯苓丸[10], 黑蔘[11], 金銀花[12] 등 경구 투여 약재와 紫雲膏 연고제[13], 한방좌욕제[14], 黃耆약침[15] 등이 있다.

當歸芍藥散은 白芍藥, 澤瀉, 白朮, 赤茯苓, 當歸, 川芎으로 이루어져 있으며 『金匱要略』에서 養血和營, 行帶止痛, 健脾滲濕하는 효능으로 최초 기재되어 있다[16]. 『東醫寶鑑』에서는 임신 중 설사, 이질, 명치 아래 통증을 치료하는 데 두루 쓰며 부인과 질환의 통치방으로 언급하였다[17].

當歸芍藥散에 대한 연구로는 혈소판 응집 및 용혈에 대한 효과[18], Hela cell 증식 억제 영향[19], 대식세포와 사이토카인에 미치는 영향[20], 신질환의 면역 조절[21], 총경동맥 탄력도에 미치는 영향[22], 중대뇌동맥폐쇄 후 호르몬 및 뇌 위축에 미치는 영향[23], 상기도감염 후 후각장애 치료[24], 자궁내막증에 미치는 영향[25], 폐경 이후 삶의 질 개선에 대한 연구[26] 등이 있었으나 當歸芍藥散을 창상에 적용하는 연구는 없었다. 當歸芍藥散의 연구 중 Shin 등[20]은 當歸芍藥散이 염증 유발 모델에서 면역 조절 및 항염증 작용을 한다는 결과를 보고하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 當歸芍藥散이 창상 치유에도 유의한 효과가 있을 것으로 기대되어 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 창상 회복에 대한 當歸芍藥散의 효과를 확인하기 위해 상처를 유발한 모델에 當歸芍藥散을 투여하여 창상의 면적 감소, 항산화능, 항염증 인자, 피부 회복 인자와 피부 회복 양상을 평가하였고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 시약

In vitro 실험에 사용된 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide, sodium carbonate, quercetin, potassium persulfate, gallic acid, potassium phosphate monobasic, 7 mm 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였으며 aluminium chloride, diethylene glycol 및 L-ascorbic acid는 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다. In vivo 실험에 사용된 tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) 및 IL-6 assay kit는 Koma Biotech에서 구입하였다. 단백질 정량에 사용된 BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다. 또한 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.에서 protease inhibitor cocktail와 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)를 구입하였으며, nitrocellulose membranes와 ECL Western Blotting Detection Reagents는 Amersham GE Healthcare에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체인 p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs, p38; #9212), Histone H3 (#4499)는 Cell Signaling Technology Inc.에서 구입하였으며, α-smooth muscle actin (α-SMA; ab5694)은 Abcam에서 구입하여 사용하였다. 그리고 Santa Cruz Biotechnology에서 β-Actin (SC-47778), sirtuin1 (Sirt1; SC-15404), extracellular signal-related kinase (ERK; SC-292838), phospho-ERK (p-ERK; SC-7383), c-Jun N-terminal kinase (JNK; SC-7345), phospho-JNK (p-JNK; SC-6254), phospho-p38 (p-p38; SC-7973), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells p65 (NF-κB p65; SC-8008), nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α (IκBα; SC-1643), phospho-IκBα (p-IκBα; SC-8404), cyclooxygenase-2 (Cox-2; SC-19999), inducible nitric oxide synthase (iNOS; SC-7271), TNF-α (SC-133192), IL-1β (SC-1252), IL-4 (SC-53084), IL-6 (SC-57315), IL-10 (SC-365858), inter-

cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; SC-1511), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; SC-13160), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; SC-28879), collagen type I α 1 (COL1A1; SC-293182)을 구입하여 사용하였다. 2차 항체는 GeneTex, Inc.에서 구입하였다. Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)는 Asanpharm Co., Ltd.로부터 assay kit를 구입하여 사용하였다.

2) 실험기기

본 실험에서는 전자저울(CAS Co. Ltd.), 열탕추출기(Daewoong Bio), 동결건조기(Ilshin), vortex mixer (OHAUS), 회전식 감압 농축기(Buchi B-480; Buchi Labortechnik AG), centrifuge (GYROZEN Co. Ltd.), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd.), 조직용 분쇄기(Bio Spec Products), ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation), ultraviolet (UV) 분광광도계(Infinite M200 pro)를 사용하였다.

3) 약재

실험을 위해 『東醫寶鑑』[17]에 의거하여 當歸芍藥散에 들어가는 구성 한약재들을 옹기한약국에서 구입한 것들 중 생약규격집에 적합한 것만을 선택하여 사용하였으며 當歸芍藥散의 1첩 분량은 다음과 같다(Table I). 실험을 위하여 當歸芍藥散의 4첩 분량인 124 g을 10배수 증류수 1.24 L에 넣고 2시간 동안 100 ℃에서 열탕하여 추출한 후 여과지로 여과하여 나온 추출액을 감압농축기를 사용하여 농축한 후 동결 건조하여 파우더(*Dangguijakyak-san* [DJ], 23.5 g, 수율 18.95%)를 얻었다.

Table I. Composition of *Dangguijakyak-san*

Pharmacognostic name	Amount (g)
Paeoniae lactiflora Pallas	10
Cnidium officinale Makino	6
Alisma orientalis (Sam.) Juzep	6
Angelicae gigas Nakai	3
Poria cocos Wolf	3
Atractylodis macrocephala Koidzumi	3
Total amount (g)	31

4) 동물

본 실험에서는 DBL에서 제공받은 7주령의 웅성 C57BL/6 mouse를 사용하였다. 물과 고형 사료(Zeigler Bros, Inc.)를 충분히 공급해주었으며, 온도 22±2 ℃, 습도 55±5%, 조명 및 명암주기(light: dark cycle) 12/12시간이 유지되는 동물실 환경에서 7일간 적응시킨 다음 실험을 진행하였다. 본 동물 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(DHU2022-091)을 받아 동물관리 규정을 준수하여 진행되었다.

2. 방법

1) Total polyphenol과 total flavonoid

Total polyphenol 함량을 분석하기 위해 Folin Ciocalteu's 방법[27]을 사용하였다. E-tube에 2 mg/mL의 샘플 또는 농도별로 희석된 표준물질인 gallic acid 100 μL를 넣고 10%의 농도로 만들어진 Folin-ciocalteu's phenol reagent 500 μL, 7.5%의 농도로 만들어진 sodium carbonate 400 μL를 넣은 후, 잘 혼합하여 30분간 빛을 차광하여 반응시킨 다음, UV 분광광도계로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 표준 곡선에 대입하여 total polyphenol 함량인 mg (gallic acid equivalents [GAE])/g을 구하였다.

Total flavonoid는 aluminium chloride를 이용한 비색법[27]을 사용하여 측정하였다. E-tube에 2 mg/mL의 샘플 또는 농도별로 희석된 표준물질인 quercetin 100 μL를 넣고 10%의 농도로 만들어진 aluminium chloride 20 μL, 1M potassium acetate 20 μL, 증류수 560 μL를 넣은 후, 30분간 빛을 차광한 다음, UV 분광광도계로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 표준 곡선에 대입하여 total flavonoid 함량인 mg (quercetin equivalents [QE])/g을 구하였다.

2) DPPH 자유 라디칼 소거능

Blosis의 DPPH 자유 라디칼 소거법[28]을 사용하여 當歸芍藥散의 항산화능을 분석하였다. 96-well plate에 농도별로 희석된 샘플 또는 양성 대조 약물 L-ascorbic acid 100 μL와 60 μm DPPH 100 μL를 넣고 혼합하여 30분

간 빛을 차광하여 반응시킨 다음, UV 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 아래의 계산식에 대입하여 DPPH 자유 라디칼 소거능이 50%가 되는 샘플의 농도를 IC_{50}값으로 나타내었다.

DPPH free radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{control}}\right)\right] \times 100$$

Absorbance of sample: OD_{sample}

Absorbance without sample: $OD_{control}$

3) ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거법[29]을 이용해 當歸芍藥散의 항산화능을 분석하였다. 7 mm ABTS에 2.45 mm potassium persulfate를 넣고 잘 혼합하여 약 15시간 동안 빛을 차광하여 반응시켜 $ABTS^{+}$을 만들어진 용액을 30 ℃로 설정된 UV 분광광도계 415 nm에서 0.70±0.02의 값이 측정되도록 ethanol로 희석하였다. 96-well plate에 농도별로 희석된 샘플 또는 양성 대조 약물 L-ascorbic acid 5 μL와 ethanol로 희석한 ABTS 용액 95 μL를 넣고 혼합하여 15분간 반응시킨 다음, UV 분광광도계로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 아래의 계산식에 대입하여 ABTS 라디칼 소거능이 50%가 되는 샘플의 농도를 IC_{50}값으로 나타내었다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{control}}\right)\right] \times 100$$

Absorbance of sample: OD_{sample}

Absorbance without sample: $OD_{control}$

4) 실험동물 창상 유발 및 약물투여

실험은 창상을 유발하지 않은 정상군(Normal), 창상 유발 후 증류수를 투여한 대조군(Control), 창상 유발 후 vitamin E 200 mg/kg을 투여한 vitamin E 투여군(VitE; wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight), 창상 유발 후 當歸芍藥散을 0.60 g/kg으로 투여한 DJ 저농도 투여군(DJL; wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight), 창상 유발 후 當歸芍藥散을 1.21 g/kg으로 투여한 DJ 고농도 투여군(DJH; wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight)의 총 5군으로 나누어 각 군당 7마리의 C57BL/6 mouse를 배정하였다. 창상 유발을 위해 정상군을 제외한 모든 군을 마취한 다음 등 부위의 털을 제모하여 피혁용 펀치(직경 8 mm, Biopsy punch)로 원형 결손창을 만들어 2주간 약물투여를 진행하였다.

當歸芍藥散의 투여용량 계산은 다음과 같다. 當歸芍藥散의 1첩 분량인 31 g을 추출하여 약 5.87 g (수율 18.95%)의 추출물을 얻었으며, 이를 60 kg인 성인의 하루 섭취량으로 보았다. 이를 실험동물로 사용된 mouse의 체표면적 환산계수(12.33)로 환산하여 1첩 분량을 1.21 g/kg (5.87 g/60 kg×12.33), 반 첩 분량을 0.60 g/kg으로 계산하여 2주간의 투여를 진행하였다.

5) 실험기간 동안 체중 변화량 측정

Mouse의 체중은 전자체중계로 하루에 1회 동일한 시간과 조건에서 측정하였고, 실험 종료일 체중과 실험 개시 전 체중의 차이를 계산하여 체중 변화량(body weight change)을 산출하였다.

6) 창상 부위 육안적 관찰 및 창상 면적

창상이 유발된 동물모델에서 當歸芍藥散의 치유 진행 과정을 기록하기 위하여 2주간의 약물 투여 기간 동안 7일의 간격으로 디지털카메라를 사용하여 창상 부위를 일정 거리에서 촬영하여 창상의 변화를 육안적으로 확인하였다. 창상 부위의 면적은 아래의 타원의 넓이를 구하는 공식에 대입하여 구하였으며, 이를 각 군별로 창상 유발 1일째의 면적 대비(%)로 나타내었다.

Area of ellipse=(A/2)×(B/2)×π

A is transverse diameter.

B is vertical diameter.

7) 혈청 내 간 손상 지표

AST 수치를 측정하기 위해 E-tube에 기질액 25 μL와 혈청 5 μL를 넣고 잘 혼합하여 37 ℃에서 1시간 방치한 후, 정색 시액을 25 μL를 넣고 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 0.4 N NaOH 250 μL를 넣고 혼합하여 10분간 실온에서 반응한 후, UV 분광광도계로

505 nm에서 흡광도를 측정하여 AST 수치를 구하였다.

ALT 수치를 측정하기 위해 E-tube에 기질액 25 μL를 넣고 37 ℃에서 5분간 방치시킨 후, 혈청을 5 μL 넣고 잘 혼합하여 37 ℃에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 정색시액 25 μL를 넣고 혼합하여 실온에서 20분간 반응을 시켜주었다. 0.4 N NaOH 250 μL를 넣고 혼합하여 10분간 실온에서 반응한 후, UV 분광광도계로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 ALT 수치를 구하였다.

8) 혈청 내 전 염증성 사이토카인

혈청 내 전 염증성 사이토카인은 Koma Biotech의 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 assay kit의 프로토콜에 따라 측정되었다. 각 well plate에 wash buffer를 넣고 세척한 후 paper towel로 남은 잔류 용액을 제거해 주었다. 그 다음 100 μL의 표준물질, 샘플을 각 well에 추가한 다음 plate sealer로 덮어주고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 표준물질, 샘플을 제거하고 wash buffer로 세척한 후 희석된 detection antibody를 100 μL 추가하고 plate sealer로 덮고 실온에서 2시간 배양하였다. 그 다음 남아있는 액체를 제거하고 wash buffer로 세척 후, streptavidin-horseradish peroxidase를 100 μL 넣어주고 실온에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 남아있는 액체를 제거하여 세척해 주었으며, 마지막으로 각 well에 TMB solution을 100 μL 넣고 실온에서 배양한 다음 적절한 발색을 띄면 stop solution을 100 μL 추가해 주었다. 그다음, UV 분광광도계로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 단백질 발현량 분석

염증 유발 단백질과 염증 경로의 발현 정도를 평가하기 위해 western blotting하여 분석하였다. 실험이 끝난 후, 피부조직에 buffer A (10 mm hydroxyethyl piperazine ethane sulfonicacid [HEPES] [pH7.8], 0.1 mm ethylene-diamine-tetraacetic acid [EDTA], 1 mm dithiothreitol [DTT], 0.1 mm phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], protease inhibitor cocktail, 2 mm $mgCl_2$, 10 mm KCl)를 넣어준 다음 tissue grinder를 사용해 분쇄하였다. 분쇄된 조직을 30분간 ice 위에서 보관 후, 10% NP-40를 넣고 잘 혼합하여 2분간 4 ℃의 12,000 rpm에서 원심 분리시켜 세포질이 포함된 상층액을 분리하였다. 상층액 분리 후 남아있는 조직에 washing buffer (Buffer A, 10% NP-40)로 깨끗이 세척한 후, 재부유를 위해 buffer C (0.1 mm PMSF, 1 mm DTT, protease inhibitor cocktail, 50 mm KCl, 50 mm HEPES [pH7.8], 0.1 mm EDTA, 300 mm NaCl, 1% glycerol)를 넣고 30분 동안 10분 간격으로 vortex시켜주었다. 그 다음, 4 ℃의 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 핵이 포함된 상층액을 분리하였다. 피부조직 내 단백질의 발현량을 측정하기 위해 10~12 μg의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 전기영동한 후, nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane에 확인하고자 하는 1차 항체를 phosphate buffered saline with Tween 20 (PBS-T)로 1:1,000 희석하여 4 ℃의 조건으로 overnight하였다. 그 다음 1차 항체를 제거한 후 PBS-T를 사용해 세척해 주었다. 2차 항체를 PBS-T로 1:3,000으로 희석하여 각각의 1차 항체에 맞게 상온에서 2시간 반응시킨 후, PBS-T를 이용해 세척하였다. 마지막으로 membrane을 ECL reagents에 노출시킨 다음, Sensi-Q2000 Chemidoc으로 단백질 밴드를 촬영 후, 정량하였다. 각 군들 간의 단백질 수준은 정상군의 발현량에 대한 상대적 비로 나타내었다.

10) 조직병리학적 분석

피부조직의 회복상태와 콜라겐 섬유의 합성 정도를 관찰하기 위해 실험이 종료된 후 각 군들의 피부조직을 10%로 희석된 포르말린에 넣어 탈회시켜 주었다. 탈회 유무를 확인한 후, 파라핀왁스에 조직을 넣어 고정시킨 후, coronal section을 실시했다. 그 다음, 7 μm의 크기로 고정된 조직을 절단하였다. 절단된 조직에 hematoxylin & eosin (H&E), Masson's trichrome 염색을 시행하였으며, 이를 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

11) 통계처리

In vitro는 mean±standard error of the mean, in vivo는 mean±standard deviation으로 실험수치를 표시하였다. SPSS program for windows version 26 (IBM Corp.)의 one-way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 least significant difference로 사후검증을 실시하였으며, 각 실험군들 간의 유의수준은 $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$에서 판정하여 나타냈다.

결과»»»»

1. Total polyphenol과 total flavonoid 함량

當歸芍藥散의 total polyphenol 함량 분석 결과, 8.97±0.08 mg (GAE)/g으로 측정되었으며, total flavonoid 함량은 1.31±0.19 mg (QE)/g으로 측정되었다.

2. DPPH 자유 라디칼 소거능

항산화능 분석을 위하여 DPPH 자유 라디칼 소거능을 측정한 결과, 대조 약물인 L-ascorbic acid의 DPPH IC_{50} 값은 1.10±0.07 μg/mL로 측정되었으며, 當歸芍藥散의 DPPH IC_{50}값은 94.08±1.40 μg/mL로 나타났다(Fig. 1).

3. ABTS 라디칼 소거능

항산화능 분석을 위하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 대조 약물인 L-ascorbic acid의 ABTS IC_{50}값은 3.28±0.06 μg/mL로 측정되었으며, 當歸芍藥散의 ABTS IC_{50}값은 235.69±1.79 μg/mL로 나타났다(Fig. 2).

4. 실험 기간 동안 체중 변화량

실험 기간 동안의 체중 변화량 측정 결과, 정상군 1.58±0.70 g과 비교하여 창상을 유발한 대조군에서 0.27±0.07 g ($p<0.001$)으로 유의하게 감소하였다. 반면에 약물 투여군들의 체중 변화량은 VitE 군 0.88±0.14 g ($p<0.05$), DJL 군 0.61±0.20 g, DJH 군 1.04±0.01 g ($p<0.01$)으로 증가하였다.

5. 창상 부위 육안적 관찰 및 창상 면적

실험동물의 등 부위에 창상을 유발한 후 2주간 약물 투여 기간 동안 7일 간격으로 촬영을 진행하여 피부 창상의 면적 변화를 관찰하였으며, 그 수치들은 각 군들의 유발 첫날 창상 면적(100%)을 대비로 나타내었다. 약물 투여 2주차 창상 면적은 대조군 38.75%, VitE 군 5.99%, DJL 군 19.09%, DJH 군 5.91%로 대조군과 비교하여 모든 약물 투여군들이 유의하게 감소하였다 ($p<0.001$) (Figs. 3, 4).

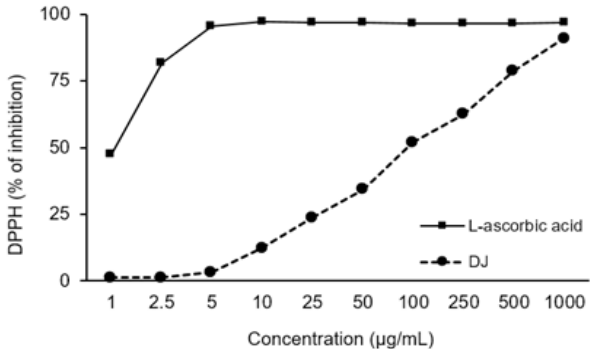

Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of DJ. All values are mean±standard error of the mean of triplicate experiments. DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl.

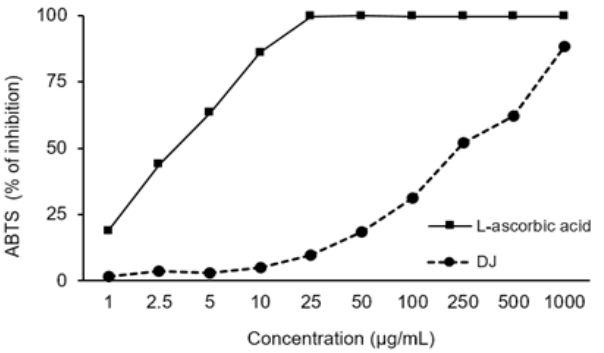

Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of DJ. All values are means±standard error of the mean of triplicate experiments. DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

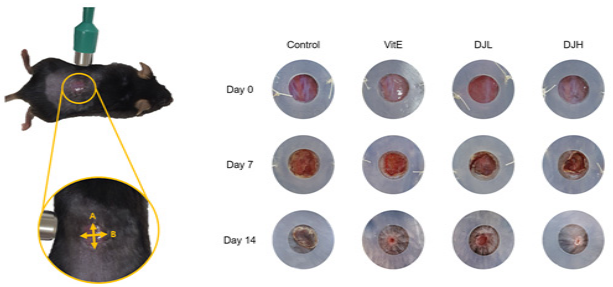

Fig. 3. Representative images of the wound healing process upon DJ treatments. DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight.

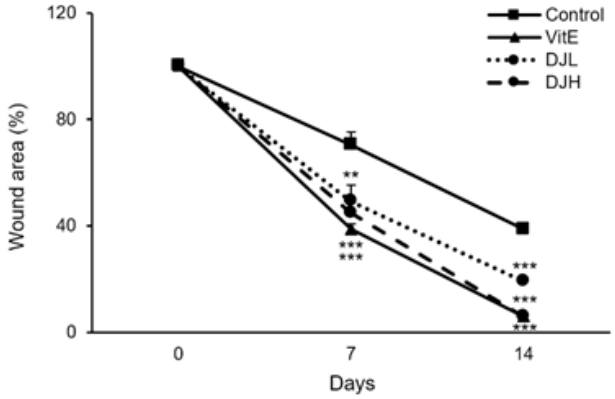

Fig. 4. Wound area for each group over time. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with *Dangguijakyak-san* water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with *Dangguijakyak-san* water extract 1.21 g/kg body weight. $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

6. 혈청 내 간 손상 지표

혈청 내 간 손상 지표 인자인 AST와 ALT를 측정하였다. AST 측정 결과, 정상군 수치 12.53±0.41 IU/L에 비하여 대조군 수치는 13.79±0.30 IU/L로 정상군보다 10.08% 유의하게 증가하였으며($p<0.05$), 약물 투여군들의 AST 수치는 VitE 군 12.87±0.34 IU/L, DJL 군 12.93±0.32 IU/L, DJH 군 12.72±0.31 IU/L로 측정되었으며, DJH 군의 경우 대조군보다 7.77% 유의하게 감소하였다($p<0.05$) (Fig. 5A). ALT 측정 결과, 정상군 수치 2.22±0.10 IU/L에 비하여 대조군 수치는 2.54±0.16 IU/L로 정상군보다 14.66% 유의하게 증가하였으며($p<0.05$), 약물 투여군들의 ALT 수치는 VitE 군 2.45±0.08 IU/L, DJL 군 2.46±0.08 IU/L, DJH 군 2.39±0.07 IU/L로 측정되었다(Fig. 5B).

7. 혈청 내 전 염증성 사이토카인

전 염증성 사이토카인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6를 혈청에서 측정하였다. 혈청 내 TNF-α 측정 결과, 대조군의 수치가 창상 유발로 인하여 정상군의 2.08배로 유의하게 증가하는 것으로 나타났다($p<0.001$). 반면에 VitE 군, DJL 군, DJH 군은 각각 대조군 수치에 0.73배($p<0.001$), 0.87

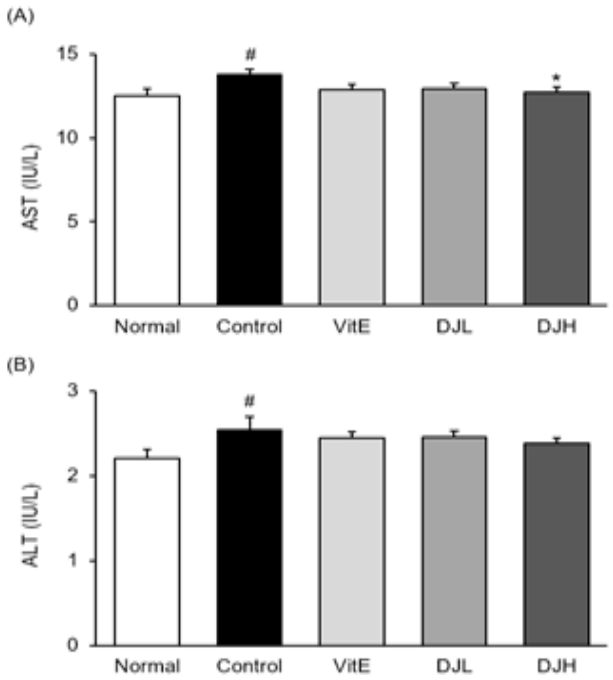

Fig. 5. Effects of DJ on the levels of AST and ALT in the serum of wound-induced mice. Levels of (A) AST and (B) ALT in serum measured by ELISA. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{\#}p<0.05$ vs. Normal and $^{*}p<0.05$ vs. Control.

배($p<0.001$), 0.71배($p<0.001$)로 대조군보다 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 6A). 혈청 내 IL-1β 측정 결과, 대조군의 수치가 정상군 수치의 3.28배로 유의하게 높게 나타났으며($p<0.001$), 약물 투여군들인 VitE 군, DJL 군, DJH 군은 각각 대조군 수치의 0.46배($p<0.001$), 0.57배($p<0.001$), 0.51배($p<0.001$)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 6B). 혈청 내 IL-6 측정 결과, 대조군의 수치가 정상군 수치의 2.95배로 유의하게 높게 나타났으며($p<0.001$), 약물 투여군들인 VitE 군, DJL 군, DJH 군은 각각 대조군 수치의 0.38배($p<0.001$), 0.52배($p<0.001$), 0.36배($p<0.001$)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 6C).

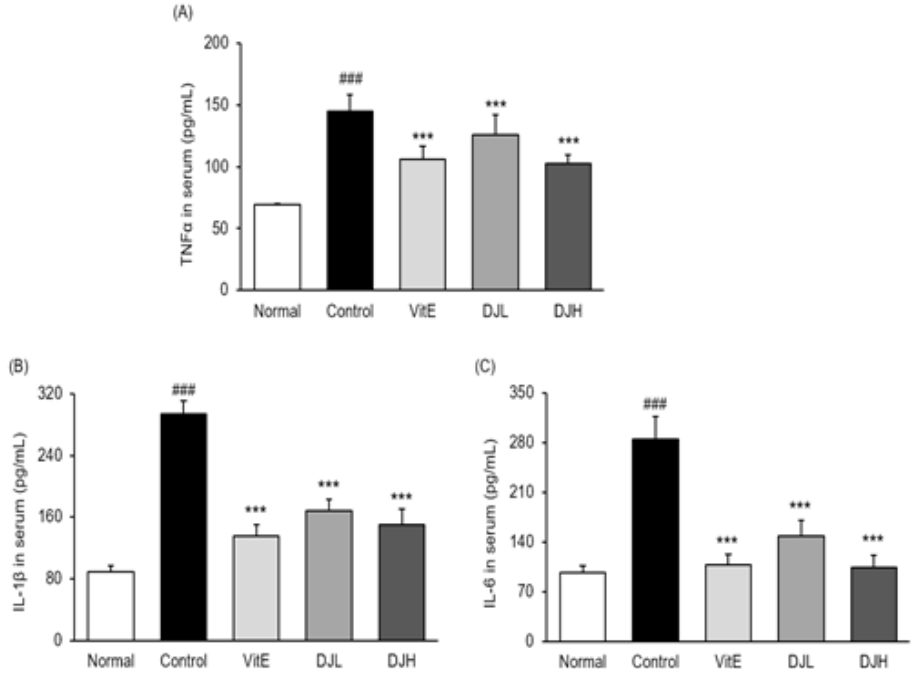

Fig. 6. Effects of DJ on the levels of pro-inflammatory cytokines in the serum of wound-induced mice. Levels of (A) TNF-α, (B) IL-1β, and (C) IL-6 in serum measured by ELISA. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, TNF-α: tumor necrosis factor α, IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{***}p<0.001$ vs. Control.

8. 피부조직 내 Sirt1의 발현

염증 매개 물질을 조절하는 단백질로 알려진 Sirt1의 활성을 western blot 분석으로 확인한 결과, 정상군에 비하여 창상이 유발된 대조군의 발현이 55.4% ($p<0.001$) 유의하게 감소하였다. 반면에 약물 투여군들은 대조군과 비교해 각각 VitE 군 111.7% ($p<0.001$), DJL 군 56.5% ($p<0.01$), DJH 군 99.4% ($p<0.001$) 유의하게 증가하였다 (Fig. 7).

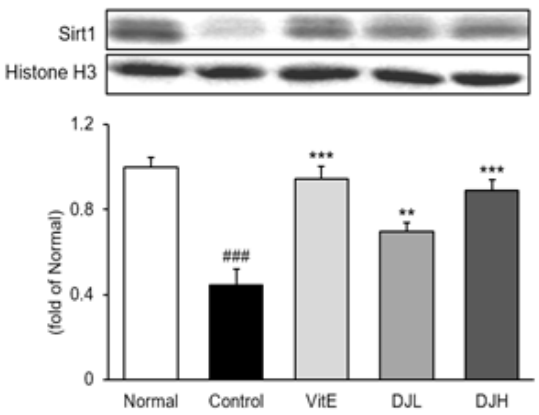

Fig. 7. Effects of DJ on the Sirt1 in the skin of wound-induced mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, Sirt1: Sirtuin 1, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

9. 피부조직 내 MAPKs 경로의 발현

여러 염증성 질환에서 염증을 조절하는 역할을 하는 MAPKs 경로(ERK, JNK, p-38)의 인산화를 western blot 분석으로 확인한 결과, 정상군에 비하여 창상이 유발된 대조군에서 MAPKs 경로의 인산화를 유의하게 증가하였다($p<0.001$). 반면에 증가된 ERK의 인산화를 VitE 군,

DJL 군, DJH 군이 각각 36.8% (p<0.001), 23.6% (p<0.01), 40.8% (p<0.001) 유의하게 감소시켰다(Fig. 8A). 또한 JNK의 인산화를 VitE 군, DJL 군, DJH 군이 각각 34.4% (p<0.001), 23.2% (p<0.05), 49.8% (p<0.001) 유의하게 감소시켰다(Fig. 8B). 그리고 p-38의 인산화 또한 VitE 군, DJL 군, DJH 군에서 각각 44.6% (p<0.001), 32.9% (p<0.01), 37.9% (p<0.01) 유의하게 감소하였다(Fig. 8C).

10. 피부조직 내 NF-κB p65 경로의 발현

1) NF-κB p65 및 p-IκBα

염증성 전사인자인 NF-κB p65의 발현을 측정한 결과, 대조군의 발현이 정상군 발현보다 62.8% 유의하게 증가하였다(p<0.001). 반면에 VitE 군, DJL 군, DJH 군은 대조군 발현과 비교하여 각각 20.4% (p<0.01), 15.5% (p<0.05), 24.7% (p<0.001) 감소시켰다(Fig. 9A). IκBα는 인산화를 통해 NF-κB p65의 핵 내 전사과정을 유도한다고 알려져 있다. 이에 p-IκBα의 발현을 측정한 결과, 정상군의 발현보다 대조군의 발현이 60.3% 유의하게 증가하였다(p<0.001). VitE 군, DJL 군, DJH 군은 각각 대조군보다 25.1% (p<0.001), 14.5% (p<0.01), 16.8% (p<0.01) 유의하게 감소하였다(Fig. 9B).

2) 염증성 매개 인자

염증성 매개 인자(Cox-2, iNOS)의 발현을 측정한 결과, 창상 유발로 인하여 대조군의 Cox-2 발현이 정상군 발현보다 70.0% 유의하게 증가하였다(p<0.001). 증가한 Cox-2의 발현은 약물 투여군들에서 대조군보다 각각 VitE 군 28.9% (p<0.01), DJL 군 19.3% (p<0.05), DJH 군 30.9% (p<0.001) 유의하게 감소시켰다(Fig. 10A).

피부조직에서 iNOS의 발현을 측정한 결과, 대조군의 발현이 정상군 발현과 비교하여 58.3% 유의하게 증가하였으며(p<0.001), 약물 투여군들에서 대조군보다 VitE 군

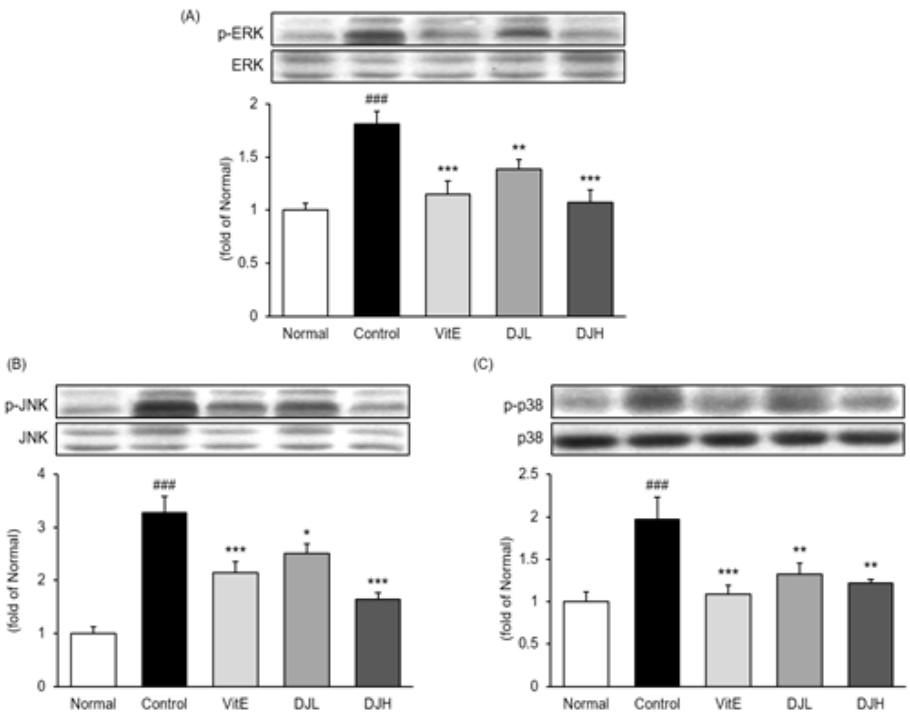

Fig. 8. Effects of DJ on the MAPKs in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) p-ERK, (B) p-JNK, and (C) p-p38 in skin measured by western blot. All data are expressed means±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}$p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Control.

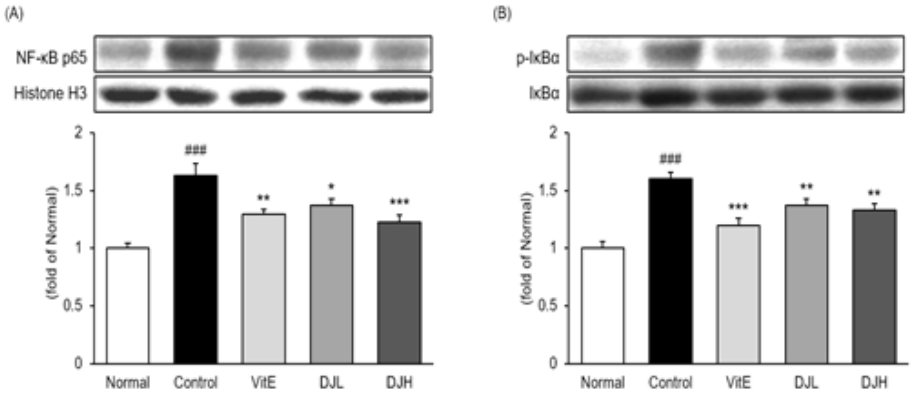

Fig. 9. Effects of DJ on the NF-κB p65 and p-IκBα in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) NF-κB p65 and (B) p-IκBα in skin measured by western blot. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, NF-κB p65: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells p65, p-IκBα: phospho-nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

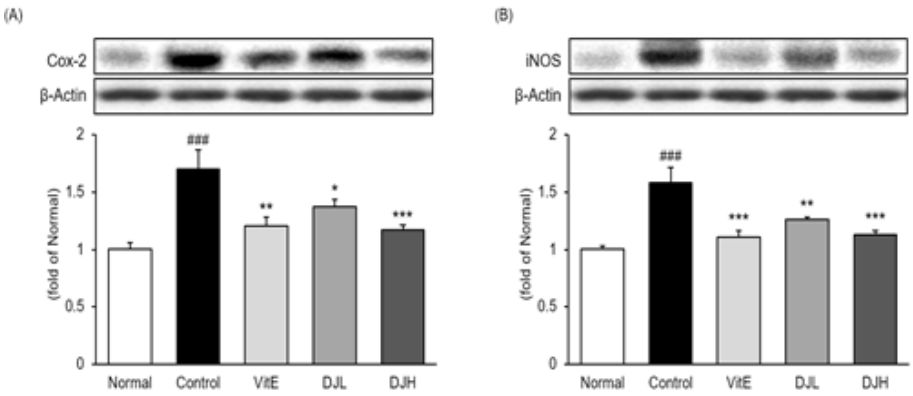

Fig. 10. Effects of DJ on the inflammatory mediators in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) Cox-2 and (B) iNOS in skin measured by western blot. All data are expressed means±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, Cox-2: cyclooxygenase-2, iNOS: inducible nitric oxide synthase, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

30.1% ($p<0.001$), DJL 군 20.3% ($p<0.01$), DJH 군 28.7% ($p<0.001$) 유의하게 감소시켰다(Fig. 10B).

3) 전 염증성 사이토카인

피부조직 내 전 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β 및 IL-6)의 발현을 분석하였다. 그 결과, 창상 유발로 인하여 대조군에서 정상군보다 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현이 유의하게 증가하였다. 반면에 증가된 TNF-α를 VitE 군, DJL 군, DJH 군이 각각 39.1% ($p<0.001$), 21.2% ($p<0.01$), 42.2% ($p<0.001$) 유의하게 감소시켰다(Fig. 11A). 또한 IL-1β를 VitE 군, DJL 군, DJH 군이 각각 26.1% ($p<0.001$), 13.8% ($p<0.01$), 22.4% ($p<0.001$) 유의하게 감소시켰다(Fig. 11B). 그리고 IL-6 또한 VitE 군, DJL 군, DJH 군이 각각 23.3% ($p<0.001$), 13.1% ($p<0.01$), 29.2% ($p<0.001$) 유의하게 감소시켰다(Fig. 11C).

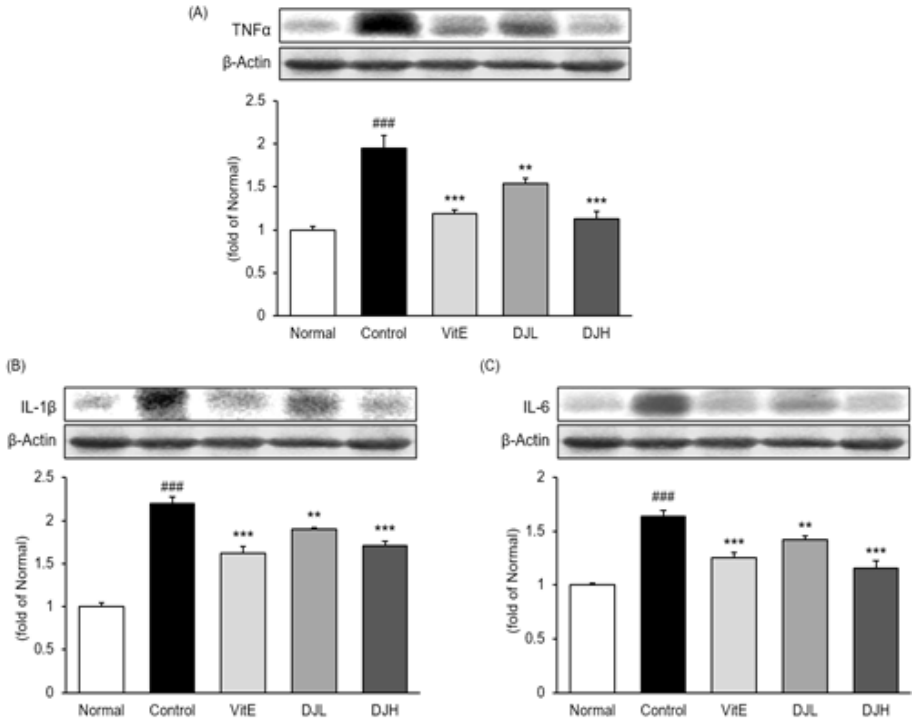

Fig. 11. Effects of DJ on the pro-inflammatory cytokines in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) TNF-α, (B) IL-1β, and (C) IL-6 in skin measured by western blot. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, TNF-α: tumor necrosis factor α, IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

11. 피부조직 내 항염증성 사이토카인의 발현

피부조직 내 항염증성 사이토카인(IL-4, IL-10)의 발현을 측정하였다. IL-4의 경우, 대조군의 발현이 정상군의 발현보다 41.0% 유의하게 감소하였으며($p<0.001$), VitE 군 47.6% ($p<0.01$), DJL 군 36.3% ($p<0.05$), DJH 군은 57.8% ($p<0.001$) 유의하게 증가하였다(Fig. 12A). IL-10의 경우, 대조군의 발현이 정상군의 발현보다 54.1% 유의하게 감소하였으며($p<0.001$), 감소한 IL-10의 발현을 약물 투여군들이 VitE 군 106.9% ($p<0.001$), DJL 군 68.5% ($p<0.01$), DJH 군은 105.5% ($p<0.001$) 유의하게 증가시켰다(Fig. 12B).

12. 피부조직 내 유착분자 및 케모카인의 발현

피부조직 내 유착분자인 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 측정한 결과, 창상으로 인하여 대조군에서 ICAM-1과 VCAM-1의 발현이 정상군의 발현보다 유의하게 증가하였다($p<0.001$). ICAM-1의 경우 VitE 군, DJL 군, DJH 군에서 각각 31.4% ($p<0.001$), 23.5% ($p<0.01$), 32.8% ($p<0.001$) 유의하게 감소하였다(Fig. 13A). 또한 VCAM-1의 경우, VitE 군, DJL 군, DJH 군이 각각 25.7% ($p<0.01$), 18.4% ($p<0.05$), 22.4% ($p<0.01$) 유의하게 감소시켰다(Fig. 13B). 피부조직 내 케모카인 단백질인 MCP-1의 발현을 분석한 결과, 대조군의 발현이 정상군의 발현보다 67.0% 유의하게 증가하였으며($p<0.001$), 증가한 MCP-1의 발현을 약물 투여군들이 VitE 군 28.3% ($p<0.001$), DJL 군 15.4% ($p<0.05$), DJH 군은 19.2% ($p<0.01$) 유의하게 감소시켰다(Fig. 13C).

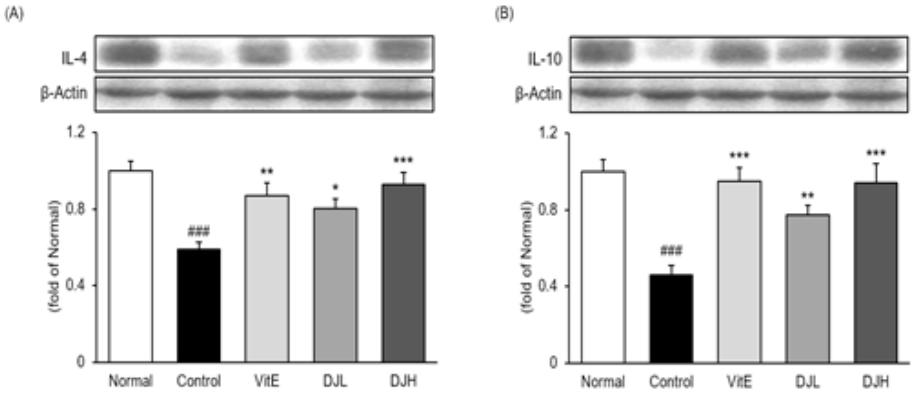

Fig. 12. Effects of DJ on the anti-inflammatory cytokines in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) IL-4 and (B) IL-10 in skin measured by western blot. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, IL-4: interleukin-4, IL-10: interleukin-10, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weightm DJH: Wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

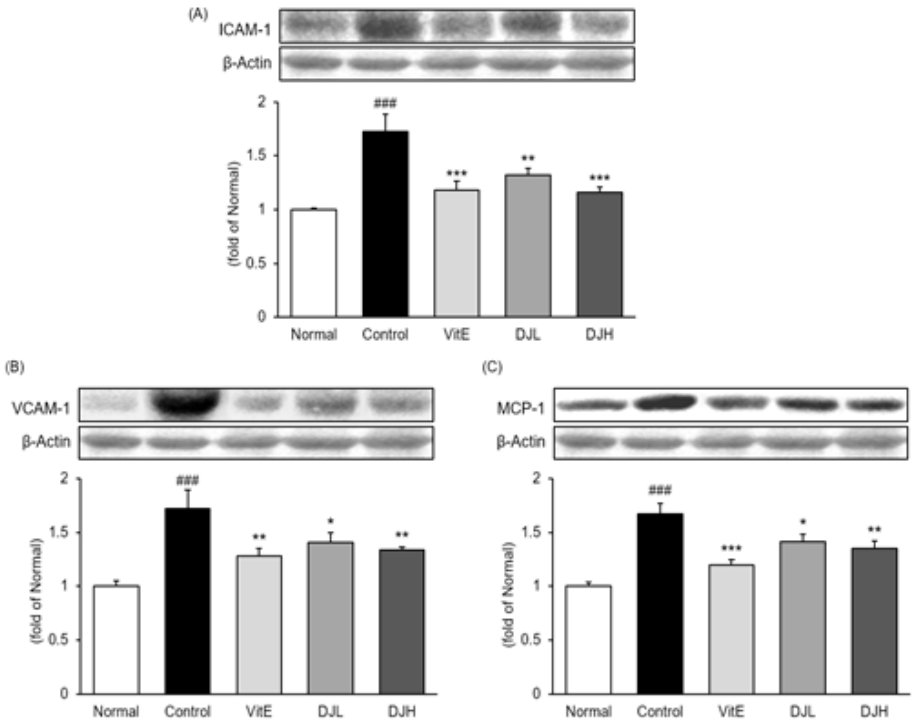

Fig. 13. Effects of DJ on the adhesion molecule and chemokine in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) ICAM-1, (B) VCAM-1, and (C) MCP-1 in skin measured by western blot. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. Control.

13. 피부조직 내 콜라겐 관련 단백질의 발현

피부조직 내 콜라겐 관련 단백질인 α-SMA과 COL1A1의 발현을 측정하였다. α-SMA의 경우, 정상군과 비교해 대조군에서 발현이 51.4% 유의하게 감소하였으나($p<0.001$), VitE 군 75.6% ($p<0.01$), DJL 군 48.3% ($p<0.05$), DJH 군 76.7% ($p<0.01$)로 유의하게 증가하였다(Fig. 14A). COL1A1 또한 대조군에서 정상군 발현과 비교하여 55.0% 유의하게 감소하였으나($p<0.001$) VitE 군, DJL 군, DJH 군들은 각각 대조군보다 59.3% ($p<0.01$), 39.9% ($p<0.05$), 72.6% ($p<0.01$) 유의하게 증가하였다(Fig. 14B).

14. 조직병리학적 분석

실험이 종료된 후 피부조직을 H&E 염색 후 관찰한 결과, 대조군에서 창상 유발로 인하여 정상군보다 상피층이 두꺼워졌으며 염증세포가 증가했다. 반면, VitE 군, DJL 군, DJH 군들에서는 대조군보다 일정하고 얇은 상피층을 관찰할 수 있었다(Fig. 15). 진피층의 결합조직인 콜라겐 특수염색인 Masson's trichrome 염색을 실시하여 피부

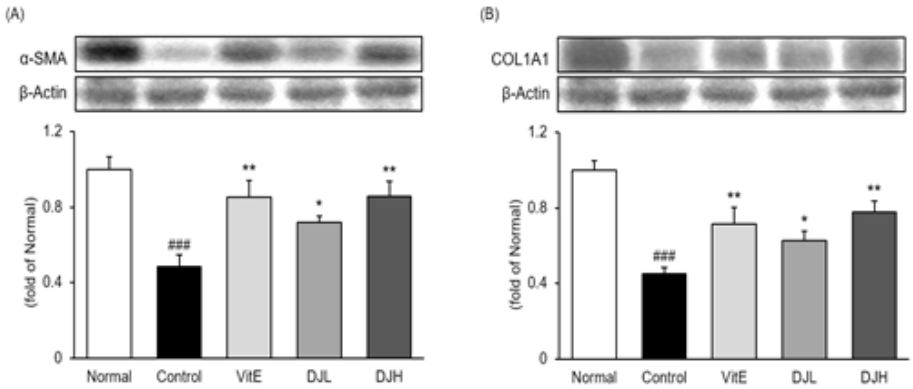

Fig. 14. Effects of DJ on the α-SMA and COL1A1 in the skin of wound-induced mice. Expression of (A) α-SMA and (B) COL1A1 in skin measured by western blot. All data are expressed mean±standard deviation, n=7 mice per group. Tested with the ANOVA (least significant difference). DJ: *Dangguijakyak-san* water extract, α-SMA: alpha-smooth muscle actin, COL1A1: collagen type I alpha 1, Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with DJ water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with DJ water extract 1.21 g/kg body weight. $^{###}p<0.001$ vs. Normal and $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ vs. Control.

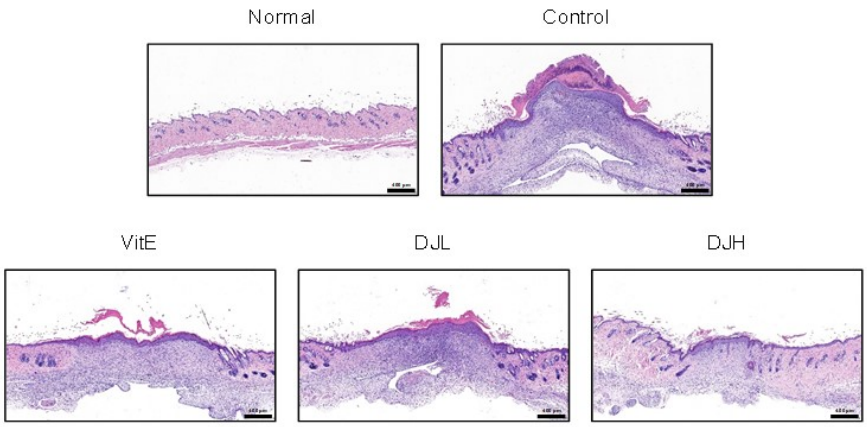

Fig. 15. Representative photomicrographs of skin sections stained by hematoxylin & eosin (×50, scale bar 400 μm). Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with *Dangguijakyak-san* water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with *Dangguijakyak-san* water extract 1.21 g/kg body weight.

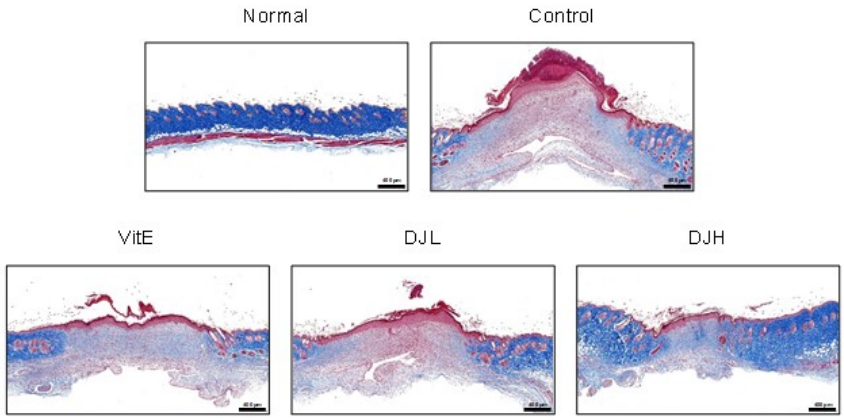

Fig. 16. Representative photomicrographs of skin sections stained by Masson's trichrome staining (×50, scale bar 400 μm). Normal: not wound-induced mice, Control: wound-induced mice administrated with distilled water, VitE: wound-induced mice administrated with vitamin E 200 mg/kg body weight, DJL: wound-induced mice administrated with *Dangguijakyak-san* water extract 0.60 g/kg body weight, DJH: wound-induced mice administrated with *Dangguijakyak-san* water extract 1.21 g/kg body weight.

조직의 회복상태를 확인한 결과, 모든 투여군들에서 대조군보다 푸른색으로 염색된 섬유아세포와 콜라겐 섬유가 증가되었다. 특히 DJH 군의 경우 다른 군에 비하여 콜라겐 섬유의 합성이 가장 많이 이루어졌다(Fig. 16).

고찰

한의학적으로 창상은 初期, 成膿, 潰後 3단계로 나누어지며 각 단계별로 각각 消, 托, 補의 치료법을 쓴다. 농이 형성되지 않은 초기에는 消法으로 消散하며 중기에는 托法으로 毒邪가 외부로 나가도록 돕는다. 후기에는 補法으로 正氣를 북돋아 상처 부위를 아물게 한다[30].

창상 치유의 단계가 제대로 이루어지지 않는다면 육아조직 과형성, 켈로이드(흉터종) 등 비정상적 병변이 유발될 수 있는데 현재는 이에 대한 완벽한 치료법이 없으며 수술적 치료에도 재발률이 높다[31]. 육아조직과 켈로이드로 인한 외관상의 문제, 통증, 소양증 등이 장기간 지속되면 정신적, 사회적으로도 영향을 받게 되므로[32] 창상에 대한 효과적인 치료가 필요한 이유이다.

當歸芍藥散의 구성 약재를 살펴보면 當歸, 川芎은 活血祛瘀, 補血하고 白芍藥은 養血, 止痛, 收斂하므로[33] 상처로 인한 어혈을 풀어주고 상처 회복에 필요한 補血, 止痛, 收斂 작용을 기대할 수 있다. 또한 赤茯苓은 滲利濕熱, 澤瀉는 利水滲濕하고 白朮은 健脾燥濕하므로[33] 상처로 생긴 부종, 삼출물을 완화할 수 있을 것으로 예상되었다. 當歸芍藥散 구성 약재들의 피부 회복 및 염증 완화 효과에 대한 연구들을 살펴보면 白芍藥의 피부 염증[34] 및 손상 완화 효과[35]가 보고되어 있으며 當歸의 피부 회복[36] 및 피부 염증 완화 효과[37], 항산화[38], 항염증 효과[39]가 연구되었다. 川芎에 대해서도 피부 장벽 보호 및 염증 완화 효과[40], 항산화 효과[41]가 밝혀졌으며 白朮과 赤茯苓의 항염증 및 항산화 효과와[42,43] 澤瀉의 항산화 효과[44]가 입증되었다. 當歸芍藥散은 養血和營, 行帶止痛, 健脾滲濕하는 효능이 있어 월경통, 산전, 산후 장애뿐 아니라 피부에서는 동창(凍瘡), 기미에도 그 적응증이 있다[45]. 특히 최근 當歸芍藥散이 피부조직의 SOD (superoxide dismutase)를 활성화시켜 피부에서 항산화 작용과 미세 순환을 개선시키므로 기미 및 안면 피부 손상 회복에 효과적이라는 연구 결과가 보고되었다[46]. 또한 염증 유발 모델에서 當歸芍藥散이 면역 조절 및 항염증 작용에 유의한 작용을 한다는 연구결과가 밝혀졌다[20]. 이러한 선행 연구들을 종합해 보았을 때 當歸芍藥散의 창상 회복에 대한 효과가 기대되어 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 C57BL/6 mouse에 상처를 유발한 후 當歸芍藥散 물 추출물(DJ)을 투여하여 활성산소에 대한 항산화능, 육안적 창상 면적의 변화, 전 염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인의 발현, 염증 단백 인자, 염증성 경로의 발현, 콜라겐 단백에 미치는 영향과 함께

조직병리학적 분석을 시행하여 창상 회복에 대한 효과를 평가하였다.

먼저 DJ의 활성 산소 제거능을 측정하기 위해 가장 대표적인 방법인 DPPH와 ABTS법을 사용하였다. DPPH는 라디칼이 제거되면 탈색되어 색이 변하는 특성으로 시료와 반응시켜 흡광도를 측정한다[47]. ABTS법은 라디칼이 소거되면 흡광도가 감소되므로 이를 이용하여 항산화능을 평가하는 방법이다. 본 연구에서 DPPH, ABTS법 시행 결과 두 가지 수치 모두 농도 의존적으로 활성산소가 감소하였다.

DJ 투여 시 안전성 평가를 위해 치료 전후 체중 변화와 간 수치 변화 폭을 함께 평가하였다. 대조군은 체중 증가의 폭이 더뎠으나 DJ 투여군은 체중 증가 폭이 비교적 양호하였고 특히 DJH 군은 VitE 군보다도 정상군의 체중 증가 폭에 가까운 양상을 보였다. 간세포 및 세포막이 손상되면 혈청에서 높아지는[48] AST, ALT 측정에서 모두 대조군에 비해 낮은 수치를 보여 유의미한 간 손상이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

DJ의 항염증 효과를 평가하기 위해 외상과 관련된 대표적 사이토카인인[49] TNF-α, IL-1β, IL-6를 측정하였다. IL-1과 TNF-α는 대식세포와 T세포에서 분비되며 혈관내피의 투과성을 증가시켜 부종, 열, 발적, 통증과 같은 급성 염증을 일으키게 된다[50]. IL-6는 외상, 수술 후 혈중 농도가 손상 정도에 비례하여 높아지며 외상에서 중요한 사이토카인이다[51]. 혈청 내, 피부조직 내의 TNF-α, IL-1β, IL-6 세 가지 인자를 분석한 결과 모두 DJ 투여군에서 농도 의존적으로 낮게 활성화되었다. 특히 DJH 군의 TNF-α와 IL-6 발현은 혈청 내, 피부조직 내 모두에서 VitE 군보다 낮게 나타났다. 이와 같은 결과에서 DJ 투여는 사이토카인의 활성을 낮추며 특히 TNF-α와 IL-6의 발현을 효과적으로 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다.

Sirt1은 NF-κB를 조절하여 종양괴사인자수용체(TNF receptors)의 발현을 유발하며 다양한 전사 인자들(Ku70, FOXO, E2F1, p53)을 탈아세틸화시킨다[52]. 특히 Sirt1은 NF-κB p65의 아세틸화 정도를 조절하면서 IL-1, TNF-α, IL-8, IL-6 등의 염증 인자에도 영향을 미치므로[53] Sirt1의 활성은 염증 조절이 원활하다는 것을 의미한다. 본 실험 결과, DJ 투여군에서 대조군에 비해 Sirt1이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였으므로 DJ 투여군에서보다 효과적으로 염증 매개 물질이 조절되고 있음을 확인할 수 있었다.

염증 발현 및 사이토카인 생성에 중요한 역할을 하는 경로는 크게 MAPKs와 NF-κB 두 가지로 나눌 수 있다. 두 가지 경로 중 첫 번째로 MAPKs는 ERK, JNK, p-38 세 가지로 구성된다. 평상시 MAPKs는 활성화되지 않은 상태로 세포질에 존재하다가 인산화로 활성화되면 핵으로 이동하여 사이토카인 생성에 영향을 미친다[54]. 대조군에 비해 DJ 투여군은 피부조직 내에서 ERK, JNK, p-38 세 가지 인자의 인산화를 모두 감소시켜 염증반응을 유의하게 감소시켰을 뿐만 아니라 이 중 ERK, JNK에서는 VitE 군보다도 효과적으로 염증 발현을 억제하였다. 특히 JNK의 인산화는 대조군의 절반 수준까지 감소시켰다. 두 번째 경로인 NF-κB는 세포질 내에서 IκBα와 결합되어 있다가 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 염증 자극이 있으면 분리되어 핵 안으로 이동하게 된다. 이후 p65와 같은 전사 인자를 발현시켜 전 염증성 사이토카인과 NO를 생성한다[55]. 본 연구에서 p65의 전사 정도와 IκBα의 인산화 정도를 측정하였을 때 대조군에서는 염증 작용이 활발해져 p65의 전사 및 IκBα의 인산화 정도가 큰 폭으로 증가하였으나 DJ 투여군에서는 두 가지 인자 모두 농도 의존적으로 억제되었다. 특히 p65의 전사 억제에 있어서는 vitamin E보다도 뛰어난 효과를 보였다. 따라서 DJ는 MAPKs와 NF-κB 두 가지 염증 경로를 모두 억제하므로 효과적인 항염증 작용을 할 것으로 사료된다.

DJ의 항염증 작용을 확인하기 위해 각 군의 iNOS와 COX-2의 발현 정도를 평가하였다. COX 중 COX-2는 LPS, cytokine 등 염증성 자극을 받아 아라키돈산(arachidonic acid)을 프로스타글란딘(prostaglandin)으로 전환하고 thromboxane 생성을 유도하여 염증반응을 일으킨다[56]. NOS 중 iNOS는 외상, 상처 등으로 염증반응이 나타나 자극을 받으면 다량의 NO를 생성하는 특징이 있어 염증반응의 지표 물질로 여겨진다[57]. 본 연구에서는 NO를 생성하는 iNOS와 COX-2의 발현을 피부조직에서 평가한 결과 COX-2, iNOS는 VitE 군, DJL 군, DJH 군 모두에서 대조군보다 발현이 감소되었다. 특히 DJH 군에서는 COX-2 발현이 VitE 군보다 더 크게 감소되어 유의미한 항염증 효과를 보였다.

IL-4, IL-10은 대표적인 항염증성 사이토카인이다. Th

2형 사이토카인인 IL-4는 염증성 사이토카인인 IL-1의 합성 억제, 대식세포 생성 저하, immunoglobulin isotypes의 분비를 제한한다[58]. IL-10은 전 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1, IL-6 등을 조절하는 강력한 인자로 알려져 있다[59]. DJ 투여군에서는 농도 의존적으로 IL-4, IL-10을 유의하게 증가시켰다. 특히 IL-4의 발현에 있어서 DJH 군은 VitE 군보다도 우수한 증가 폭을 나타내었으며 IL-10은 대조군에 비해 2배 이상의 발현을 나타내었다. 앞선 결과와 종합해 보면 DJ 투여는 전 염증성 사이토카인은 줄이고 항염증성 사이토카인 분비는 증가시키는 방향으로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

외상으로 인한 염증이 발생하면 세포부착분자인 ICAM-1, VCAM-1과 케모카인 단백질인 MCP-1의 발현을 증가된다. 이들은 단핵구, 대식세포를 혈관벽으로 끌어들여 혈관 염증 반응을 일으키는 데 중요한 역할을 하지만[60] 과량 발현되면 과다한 염증반응을 유발할 수 있다[61]. ICAM-1, VCAM-1, MCP-1은 염증이 없는 정상 상태에서는 거의 발현되지 않고 염증성 사이토카인의 자극이 있으면 급속히 증가되기 때문에[60] 본 연구에서는 염증 발현 정도의 지표로 해당 인자들을 평가하였다. DJ 투여군은 유착 분자 ICAM-1, VCAM-1과 케모카인 단백질 MCP-1의 발현을 모두 유의하게 감소시켰으며 세 가지 인자에서 모두 농도 의존적인 양상을 보였다. 특히 DJH 군에서 모든 실험군 중 가장 큰 ICAM-1 감소율을 보여주었다.

육아조직 형성은 상처치유 과정의 기본 단계로 이는 α-SMA, COL1A1을 관찰하여 분석할 수 있다. COL1A1은 피부의 주요한 콜라겐 유형이며 상처 부위에서 각질세포와 섬유아세포의 이동을 안내하는 역할을 한다[62]. α-SMA는 섬유 신생(fibrogenesis)에 중요한 역할을 하며 근섬유 아세포를 도와 상처 회복을 가속화시킨다[63]. DJ를 투여하였을 때 α-SMA, COL1A1 인자 모두 유의하게 증가하였으며 DJH 군에서는 α-SMA, COL1A1 증가에 있어서 VitE 군보다도 큰 증가폭을 보여 DJ가 조직 재생 및 회복에도 우수한 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

상처 치유 과정 중 조직 형성기에 상처 부위로 섬유아세포, 콜라겐, 기질 등이 모여서 육아조직을 형성하고 결손부를 메워준다. 이와 함께 섬유아세포가 분비하는 효소로 콜라겐 섬유가 교차 결합되며 창상의 장력이 증가하고 반흔이 수축되며 상처치유가 이루어진다[1]. 상처치유에 있어서 중요한 섬유아세포, 콜라겐의 발현 정도를 조직 염색을 통해 살펴보았을 때 VitE 군, DJ 투여군 모두에서 대조군에 비해 섬유아세포, 콜라겐이 증가되어 있었고 세 처치 군 중에서 DJH 군의 콜라겐 증가가 가장 많이, 뚜렷하게 관찰됨을 알 수 있었다. 더불어 상피층이 두꺼워진 대조군에 비해 DJ 투여군은 상피층도 비교적 얇고 일정한 양상을 보여 DJ는 상처치유를 촉진할 뿐 아니라 상처치유의 질적인 면에서도 도움을 줄 수 있는 약제라 생각된다.

본 실험에서는 상처를 유발한 쥐에 當歸芍藥散을 투여하여 총 polyphenol, flavonoid 함량 측정과 DPPH 및 ABTS 법으로 항산화능을 알 수 있었다. 또한 창상의 육안적 면적이 대조군에 비해 유의하게 감소했고 전 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6와 염증 관련 단백질 Sirt1, 염증 발현 경로 MAPKs, NF-κB p65를 모두 유의하게 억제하였다. 항염증성 사이토카인인 IL-4, IL-10은 유의하게 증가시켰으며 유착 분자 ICAM-1, VCAM-1과 케모카인 단백질 MCP-1은 억제시켰다. 콜라겐 관련 단백질 α-SMA, COL1A1은 유의하게 증가하였다. 조직병리학적 분석상으로도 콜라겐 합성이 많이 이루어졌고 상피층 또한 일정하고 얇게 회복되었다.

모든 결과를 종합해 볼 때, 當歸芍藥散은 항염증 효과와 함께 창상 회복을 유의미하게 촉진한다는 것을 확인하였다. 그러나 본 연구에서는 當歸芍藥散의 항산화 인자들에 대해 더 많은 지표를 확인하지 못했다는 점에서 한계점이 있다. 향후 추가적인 연구들을 통해 當歸芍藥散이 창상 회복에 있어서 효과적인 치료제로 활용되기를 기대한다.

결론»»»»

當歸芍藥散은 창상이 유발된 동물모델에서 염증 유발 단백질을 억제함과 동시에 콜라겐 관련 인자들을 유의하게 증가시켰으며, 창상 유발로 인한 조직병리학적 변화를 개선함으로써 피부 창상을 회복하는 것에 효과가 있다고 생각된다.

References»»»»

1. Korean Dermatological Association Editing Commission. Dermatology. 6th ed. Korea Medical Book Publishing Company. 2014:1-29.
2. Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons. Textbook of plastic surgery. Koonja Publishing Co. 2009:83-9.
3. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color Atlas of traumatic injuries to the theeth. Daehan Narae Publishing Co. 2022:4-9.
4. Seo HS, Roh SS. The effects of Gamitaklisodocyum on wound healing. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology. 2001; 14(2):89-111.
5. An SH, Im GS, Lee GN. Effects of Sagunja-tang extract and Sagunja-tang added Radix Astragali extract on the granulation tissues. The Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology. 1989;2(1):17-31.
6. Bak JW, Sim BY, Kim DH. The effects of Danggwisusan on restoration ability in wound induced animal models. The Korea Journal of Herbology. 2014;29(5):55-63.
7. Kim BH. Effects of Danggwieumja on the healing of full-thickness skin injury in rat. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2011;25(5):887-93.
8. Shin MH, Roh SS, Kim BT. Effect of Sip-Jeon-Dae-Bo-Tang (SJDBT) extract on wound healing. Journal of Korean Medicine. 1993;14(1):31-44.
9. Jung H, Lee HJ, Kim B, Lee CH, Lee EJ, Heo DS, Oh MS. The effects of Sibjeondaebotanggamibang on the treating of wound. J Korean Med Rehabil. 2014; 24(3):51-69.
10. Jung H, Lee EJ, Oh MS. The effects of Gyejibokryeonghwan for wound healing after skin suture. J Korean Med Rehabil. 2016;26(2):29-50.
11. Kim TR, Kim YJ, Woo CH. Effects of oral administered hot water extracts of Korean black ginseng on wound healing in mice. J Korean Med Rehabil. 2022;32(1): 1-19.
12. Won JH, Woo CH. The effect of Lonicera japonica extract in wound-induced rats. J Korean Med Rehabil. 2020;30(1):47-61.
13. Kim SK, Choi HY, Jee SY, Lee SK. An experimental study on the synergic effect of Jawoongo and Gentamicin in dermal wound healing and skin wound infection against Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, and Pseudomonas aeruginosa. The Korea Journal of Herbology. 2004;19(1):137-60.
14. Kwon SK, Choi MS, Yoon SH, Kim DI. Effect of herbal decoction for sitz bath on dermoepidermal recovery to wound tissue in rats. The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology. 2010;23(1):30-41.
15. Hong CH, Kang KH, Yoon HJ, Yoon HM, Song CH, Kim CH. Effect of Astrgali Radix pharmacocupuncture for wound healing of full-thickness skin wound in mouse. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology. 2018;31(1):22-31.
16. Jang JK. Jungkyung-junseo. Daesung Munhwasa. 1984: 428, 438.
17. Heo J. Lee NK. Dong-uibogam. Pobin Munhwasa. 2011:1262.
18. Kim JG, Kim CH, Park SY, Kim JS, Choi JY, Kim CH, Park WH. An experimental study on the effect of Geijibokryunghwan, Dangguijakyaksan and each constituent herb on inhibition of platelet aggregation. The Journal of The Korea Institute of Oriental Medical Diagnostics. 2000;4(2):71-84.
19. Park MW, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Inhibitory effects of Dangguijakyaksan on cell proliferation in HeLa cells. The Journal Of Oriental Gynecoloy. 2006;19(2):34-48.
20. Shin SW, Lee YS, Park JH, Kwon TK, Suh SI, Kwon YK. Effects of Dangguijakyak-san extract on nitric oxide production and cytokine gene expression in RAW 264.7 macrophages Cell. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(5):1443-8.
21. Jang WM, Ahn SY, Doo HK. The effects of Dangguijakyak-san and Wuelbigachul-tang on mesangial cell proliferation and on ICAM-l and β1-integrin expression. Journal of Korean Medicine. 2000;21(3):140-8.
22. Kim SH, Seo YN, Bae IH, Cho KH, Moon SK, Jung WS, Jin C. Effects of Dangui-jakyak-san on common carotid artery elasticity in healthy subjects; a randomized controlled crossover study. Journal of the Society of Stroke on Korean Medicine. 2020;21(1):21-32.
23. Choi JY, Yoon SH, Lee WC. Effect of Dangkijakyaksan on female sex hormones and cerebral atrophy following middle cerebral artery occlusion in rate. East-west Medical Research Institute Journal. 1998;1998:179-94.
24. Moon YK, Kang SH, Park JG, Nam HJ, Kim YB, Kim KS. A case of postviral olfactory disorder treated with Dangguijakyak-san and acupuncture. The Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology. 2017;30(1):118-25.
25. Park SY, Noh EJ, Seo CS, Lee SK, Shin HK. A study on the regulation of endometrial and placental cell function by water extract of 3 types of herbal medicines and ethanol extract on Scutellariae Radix. The Journal Of Oriental Gynecology. 2021;34(3):1-14.
26. Park JM, Yang JM, Kim DI. A clinical trial to verity the

quality of life improvement efficacy of Dangguijakyaksan and Gyejibongnyeong-hwan granulation in postmenopausal women. The Journal Of Oriental Gynecology. 2007;20(3):213-28.
27. Rama P, Vignesh A, Lakshmanan G. In vitro antioxidant activity of Achyranthes Aspera Linn. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences. 2013;3(2):67-78.
28. Blosis MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181(4617):1199-200.
29. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999;26(9-10):1231-7.
30. Common Editing Commission. Test of traditional Korean dermatology & surgery. Sunwoo Publishing Co. 2007:142.
31. Brody GS. Keloid and hypertrophic scars. Plastic and Reconstructive Surgery. 1990;86(4):804.
32. Murray JC. Scars and keloids. Dermatologic Clinics. 1993;11:697-708.
33. Common Editing Commission. Herbalogy. Yeonglimsa. 2020.
34. Kwon MH, Min KJ, Kim YC. Inhibitory Effects of Peonia japonica water extract on skin aging (I) : focussed on alleviative effects of inflammation and skin barrier damage. Environmental Health and Toxicology. 2009;24(2):159-67.
35. Kim DY, Kim MK. Anti-inflammatory effect of Paeonia japonica extracts in HaCaT cells. Journal of Investigative Cosmetology. 2019;15(3):247-54.
36. Lee JH, Lee SN, Kim MG, Kim MH, Kim HJ, Jo HJ. Effects of Angelica gigantis Radix extracts on the collagenase activity and procollagen synthesis in HS68 human fibroblasts and tyrosinase activity. The Korea Journal of Herbology. 2011;26(1):29-33.
37. Huh J, Park H, Kim EJ, Kim EY, Sohn YJ, Jung HS. Effect of Angelicae gigantis Radix for inflammatory response in HaCaT cells. The Korea Journal of Herbology. 2022;37(3):9-19.
38. Kang SA, Han JA, Jang KH, Choue RW. DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (Angelica gigas). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2004;33(7):1112-8.
39. Jang SI, Kim HJ, Hwang KM, Pae HO, Yun YG, Chung HT, Kim YC. Anti-Inflammatory effect of ethanol extract of Angelica uchiyamana in activated murine RAW 264.7 macrophages. Herbal Formula Science. 2002;10(2):189-97.
40. Kim SE, Gang SR, Park MS, Kim YC. Alleviating effects of Cnidium officinale water extract on skin barrier and inflammation in hairless mouse. Journal of Investigative Cosmetology. 2011;7(2):137-45.
41. Oh YJ, Jung DS, Seo HR, Choi YM. Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of Cnidium officinale Makino. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2010;18(6):373-8.
42. Oh HK. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Atractylodes japonica according to extract methods. Journal of the Korean Applied Science and Technology. 2021;38(6):1543-52.
43. Jang YA, Lee JT. The evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging of extract Solvent and Poria cocos by parts. Asian Journal of Beauty and Cosmetology. 2015;13(3):377-83.
44. Kim SE, Rhyu DY, Yokozawa T, Park JC. Antioxidant effect of Alisma plantago-aquatica var. orientale and its main component. Korean Journal of Pharmacognosy. 2007;38(4):372-5.
45. Ministry of Food and Drug Safety. Drug information of Dangguijakyaksan ext. granule [Internet]. Ministry of Food and Drug Safety; [cited 2023 Jul 6]. Available from: URL: https://nedrug.mfds.go.kr/pbp/CCBBB01/getItemDetailCache?cacheSeq=199803339aupdateTs2022-03-07%2017:54:21.008999b.
46. Peng T. A clinical review of 80 cases of melasma treated with Danggui shaoyao-san. The Journal of Medical Theory and Practice. 2017;30(20):3047-8.
47. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry. 2009;113(4):1202-5.
48. Korean Society for Laboratory Medicine. Laboratory medicine. 5th ed. Beommun Education. 2016:406.
49. Ryu SY, Jin HC, Noh JY, Kim HY, Han SW, Kim KW, Kim SJ, Han TH. Relationship of interleukin-4, 6, 10, 12 and tumor necrosis factor-α serum levels to severity of injury and clinical outcome in trauma patients. The Journal of the Korean Society of Emergency Medicine. 2003;14(4):415-24.
50. Jung HJ. Human pathology. Jungdam media. 3th ed. 2013:63, 74-7.
51. Scheingraber S, Bauernfeind F, Dobbert D, Dralle H. Monitoring of interleukin 10, tumour necrosis factor alpha and procalcitonin in addition to conventional parameters in the detection of postoperative complications after major abdominal surgery. British Journal of Surgery. 2001;88(8):1150.
52. Kim EJ. The role of Sirt1 in cancer and aging. Molecular and Cellular Biology News. 2010;22(1):51-60.
53. Iside C, Scafuro M, Nebbioso A, Altucci L. SIRT1 activation by natural phytochemicals: an overview. Frontiers in Pharmacology. 2020;7(11):1225.
54. Oh CH. Simple immunology. Medical Korea. 2006:161-200.

55. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annual Review of Immunology. 1994;12(1):141-79.
56. Kim MJ. COX-2 Inhibitor. Clinical Pain. 2002;1(2): 79-88.
57. Yim CY. Nitric oxide and cancer. The Korean Journal of Medicine. 2010;78(4):430-6.
58. Harris, DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor α, and Th2 cells. The Journal of Immunology. 2005;175(11):7103-7.
59. Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB, DiPiro JT. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. Journal of Trauma and Injury. 1996;40(4):613-6.
60. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annual Review of Immunology. 2000; 18(1):217-42.
61. Lee SI, Kwon KB, Han JH, Ryu DG. Effects of Olibanum extracts on vascular cell adhesion molecules expression. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2011;25(3):445-50.
62. Park SI, Sunwoo YY, Jung YJ, Chang WC, Park MS, Chung YA, Lee SM, Han YM, Shin HS, Lee JS, Lee SH. Therapeutic effects of acupuncture through enhancement of functional angiogenesis and granulogenesis in rat wound healing. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;2012:1-10.
63. Tai Y, Woods, EL, Dally J, Kong D, Steadman R, Moseley R, Midgley AC. Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis. Biomolecules. 2021;11(8):1095.