

Myrrha Induces Enhanced Keratinocyte Growth Factor in Scald Burn Skin of Rat

Hyun Gug Cho[†], Hang-Woo Lee¹, Jeong-Ki Kim², Yong-Deok Lee³ and Hyeung-Jae Chung³

Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi, Kyungbuk, 730-852, Korea

¹TMR Center, Keimyung University, Daegu, 704-701, Korea

²Department of Biology, Yeungnam University, Kyongsan, Kyungbuk, 712-749, Korea

³Department of Physical Therapy, Taegu Health College, Daegu, 702-260, Korea

The present study was conducted to determine whether skin spread of *Myrrha* has an effect on the cell regeneration as well as wound healing following dermal scald burn injury, keratinocyte growth factor (KGF) level was analyzed immunologically in conjunction with the histological changes occurred in skin tissue.

The KGF contents in *Myrrha* skin spread group, which shows cell regeneration ability in skin tissue after burn, increased after 5 hours. After 24 hours, the content of *Myrrha* skin spread group is noticeably higher than at 5 hours postburn. After 72 hours, KGF was decreased compared to at 24 hours postburn. Acceleration effect of KGF production in *Myrrha* skin spread group was high. Together with the result of histological changes, skin spread of *Myrrha* reduced protein degeneration and edema in dermis, and induced proliferation of epithelial cells.

The data suggest that *Myrrha* has accelerate cell regeneration and wound healing in case of scald burn skin by spreading of paste.

Key Words: KGF, Scald Burn, *Myrrha*

서 론

피부에 발생하는 외상은 손상 그 자체와 수복과정 모두 대단히 복잡하게 진행된다¹²⁾. 특히 화상은 의료를 포함한 사회의 발전에도 불구하고 발병률과 사망률이 심각한 상태에 있다^{2,8)}. 피부 화상은 심한 부종을 유발하며¹⁾, 혈관의 투과성 증가로 혈관 내 정수압이 감소하게 되어 허혈성 손상을 일으키게 된다^{2,6,16)}. 뿐만 아니라 화상 피부조직은 부분층화상 (partial thickness burn)과 전층화상 (full thickness burn)의 경우 식피술을 시행하여야 하는 어려움도 뒤따르게 된다.

일반적으로 외상에 의한 조직 손상에 다른 새로운 조직의 형성은 재생피화 뿐만 아니라 육아조직의 형성에 의존하며⁷⁾, 섬유모세포의 collagen 합성, 치유과정의 촉진현상은 일차적으로 성장인자 (growth factor)에 의해 이루어진다고 알려져 있다¹⁰⁾. 이러한 성장인자는 치유과정 중 그 양이 증가되며 recombinant growth factor를 손상 피부에 사용함으로써 섬유모

세포의 이동과 증식을 촉진시킬 수 있다고 보고되어 있다⁹⁾. Keratinocyte growth factor (KGF)는 fibroblast growth factor-10 (FGF-10)으로 알려진 섬유모세포 성장인자의 하나로 알려져 있으며, 피부를 포함하여 위장관, 유선의 상피세포 증식을 선택적으로 촉진하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. KGF-2는 정상인의 표피층 각질세포의 성장을 특이적으로 촉진시킨다고 보고 되어 있는데⁹⁾, 수술부 창상치유^{9,18)}와 피부레이양 모델¹⁹⁾에서 KGF-1이나 KGF-2에 대한 효과를 검증한 예는 있으나, 화상 피부조직의 재생과 치유에 대한 적용의 예는 거의 찾아볼 수가 없다.

따라서 본 실험에서는 흰쥐에 열화상을 유도한 다음, 한의학에서 외용 시 수렴작용과 소염작용이 있는 것으로 알려진 몰약을 화상 부위에 도포하여 피부조직 재생피화와 육아조직 형성을 촉진하는 KGF의 생성에 미치는 영향과 KGF의 생성 변화에 따른 피부의 조직변화를 관찰해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 약재는 영천시장에서 구입한 양질의 몰약 300 g을 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 확인한

*는 문 접수: 2001년 8월 13일

수정재접수: 2001년 9월 11일

[†]별책 요청 저자: 조현국 (우) 730-852 경북 구미시 산동면 인덕리 55, 경운대학교 안경광학과, e-mail: hgcho@kyungwoon.ac.kr

후 실험에 사용하였다.

2. 피부 화상의 유도과 몰약 도포

250 g 내외의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐에 ketamine hydrochloride를 복강 투여하여 마취시킨 후 배쪽면 (dorsal surface)의 털을 깎고 (15% of total body surface area)¹⁵⁾, 100°C 물로 10초간 데인 후 완전 건조시킨 몰약 분말을 화상 개체 당 3 g 씩 생리식염수로 반죽하여 화상 유발 직후 10분 이내에 화상 환부에 1회 도포하였다. 그리고 각각 5시간, 24시간, 72시간이 경과한 다음 처치하였다.

3. 피부조직 내 KGF 함량 측정

피부조직 내 KGF 생성 양을 측정하기 위하여 human KGF immunoassay kit (R&D, MN, USA)를 사용하였다. 적출한 피부조직 0.25 g 당 protease inhibitor가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 4 ml를 가하여 조직 마쇄한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 채취하였다. 채취한 상등액으로 assay procedure에 따라 시행하여 microtiter plate reader (BioRad 550, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고 그 함량을 계산하였다.

4. 피부조직의 광학현미경 관찰

피부조직 적출 즉시 10% neutral buffered formalin에 고정시킨 다음, 흐르는 물에 수세하고 알코올의 농도를 순차적으로 증가시키면서 탈수시켰다. 탈수가 끝난 조직을 파라핀에 포매시키고 박절기 (Lipshaw Model-45, USA)를 이용하여 4 µm 두께로 절편하여, Masson's trichome 염색을 실시한 다음 광학현미경 (BH-2, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

1. 피부조직 내 KGF 함량변화

화상 유발 후 피부조직의 치유와 세포재생능을 알아보기 위해 실시한 피부조직 내 KGF 함량변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 정상군이 0.79 ± 0.55 로 그 함량이 대단히 적었고 화상 후 5, 24, 72시간 경과 후 모두 KGF 함량이 측정되지 않았다. 화상 직후 몰약을 도포한 경우 KGF의 생성이 증가되었는데, 화상 유발 5시간 후에 21.76 ± 9.24 , 화상 유발 24시간 후에는 50.67 ± 13.23 로 매우 높게 나타났다. 그리고 화상 유발 72시간 후에는 몰약 도포군이 18.48 ± 5.75 로 24시간군과 비교하여 볼 때 현저히 낮게 나타났다. 화상 유발 후 시간 경과에 따른 피부조직 내 KGF 생성양상은 몰약의 도포 시 화상 후 점진적으로 증가되었다가 72시간 후에 감소되는 것으로 나타났다.

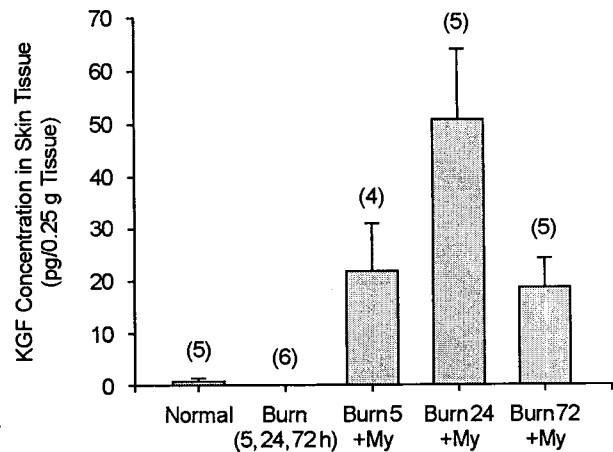


Fig. 1. Levels of KGF in the skin of postburn rats and the changes of KGF levels by skin spread of *Myrrha*. Data are expressed as mean \pm S.E. The numbers of determinations are in the parentheses. My: *Myrrha*

2. 피부조직의 형태학적 변화

정상군 (Fig. 2)은 상피층 (epidermis)과 진피층 (dermis)들이 서로 잘 경계 되어져 있었고, 기저판에 의한 결합이 잘 이루어진 형태로 관찰되었다. 중층편평 상피세포들로 구성된 상피층은 적색으로 염색되어 나타났으며, 결합조직들로 구성된 진피층은 청색으로 관찰되었다.

화상 유발 5시간 후 (Fig. 3), 상피층 세포들은 위축되거나 피사된 형태로 관찰되었고, 진피층은 화상에 의한 산화의 결과로 적색으로 염색되어 관찰되었다. 뿐만 아니라 진피 내 모낭들은 심한 부종현상을 보였다. 하지만 몰약을 도포한 경우 (Fig. 4) 상피층 세포들의 위축현상과 피사가 방지되었고, 상피층과 진피층이 기저판에 의해 결합되어 잘 경계 지워져 있을 뿐만 아니라 진피층 내 산화현상도 현저히 감소되어 관찰되었다.

화상 유발 24시간 후 (Fig. 5), 상피층의 탈락과 진피층 내 부종현상이 관찰되었다. 상피층의 탈락은 진피층과의 경계 부분에서 진행되고 있음을 관찰하였다. 몰약을 도포한 경우 (Fig. 6) 상피층 세포들의 약한 위축현상은 관찰되지만 상피층은 진피층과 잘 결합되어 있었고, 진피층 내에는 약간의 산화에 의한 변성이 관찰되었다.

화상 유발 72시간 후 (Fig. 7), 상피층의 탈락이 두드러졌고, 상피층이 보전된 곳에서도 세포들은 기저부 세포들의 핵 배열모습이 관찰되지 않아 정상적인 성장을 하지 못하는 상태로 관찰되었다. 몰약의 도포 결과 (Fig. 8), 진피층 내 산화적 손상은 남아 있으나 상피층의 탈락현상이 방지되었을 뿐만 아니라 상피세포들은 정상적인 분열과 성장상을 보여 표층으로는 케라틴의 형성도 정상적으로 나타났다.



Fig. 2. Normal skin tissue in rat, Masson's trichome stain, scale bar=100 μ m. Tissue structure was intact. Epidermal cells and dermal fibroblasts were stained to red color, dermal connective tissue was stained to blue. E: epidermis, D: dermis, HF: hair follicle, K: keratin

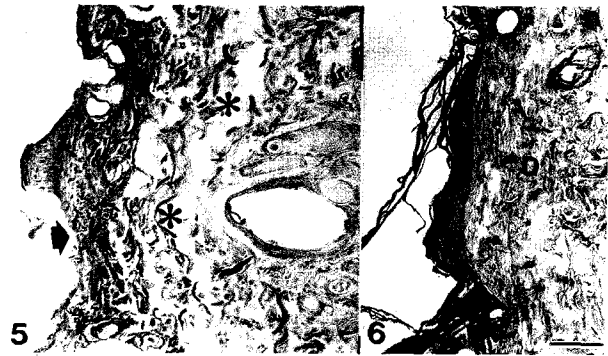


Fig. 5. At 24 h postburn skin, Masson's trichome. Epidermal detachment (arrow) and dermal edema (*) were shown.

Fig. 6. At 24 h postburn skin applied with *Myrrha*, Masson's trichome, scale bar=100 μ m. Tissue structure was intact except to dermal heat degeneration. E: epidermis, D: dermis

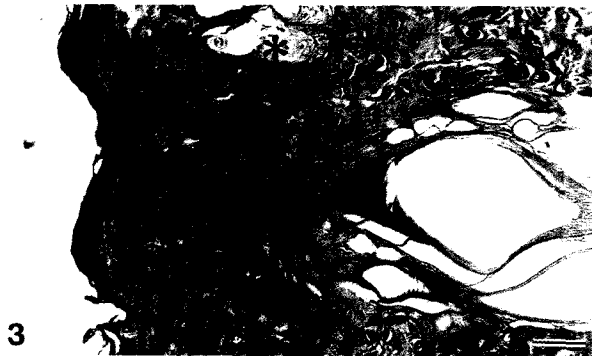


Fig. 3. At 5 h postburn skin, Masson's trichome stain, scale bar=100 μ m. Shrinkage and necrosis of epithelial cells, edema (*), and dermal heat degeneration were shown. E: epidermis, D: dermis

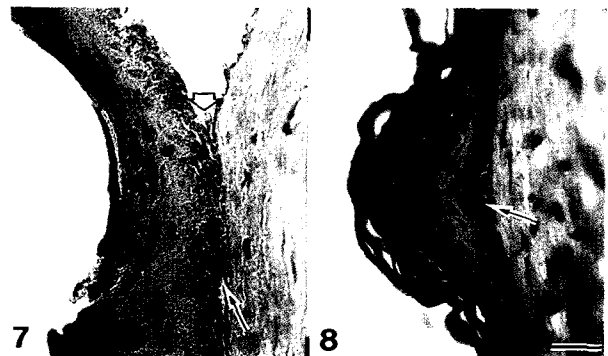


Fig. 7. At 72 h postburn skin, Masson's trichome. Epidermal detachment showed in basal layer (line arrow) of epidermis, and epidermal cell growth was abnormal because of nuclear arrangement of basal layer (white arrow) was not observed.

Fig. 8. At 72 h postburn skin applied with *Myrrha*, Masson's trichome, scale bar=25 μ m. Epidermal cell proliferation and cell growth were normal. The nuclear arrangement (white arrow) was clearly observed to keratinized stratified squamous cell layer. E: epidermis, K: keratin

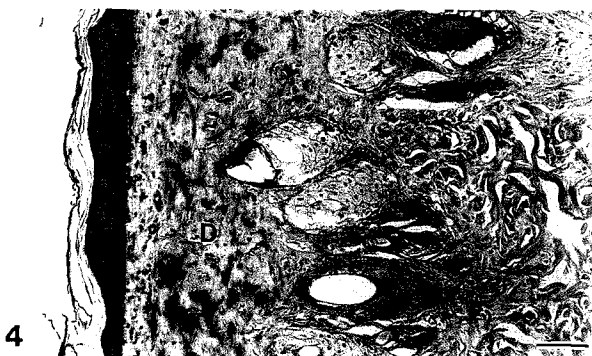


Fig. 4. At 5 h postburn skin applied with *Myrrha*, Masson's trichome stain, scale bar=100 μ m. Epithelial cell injury and dermal heat degeneration was decreased compared to at 5 h postburn group. E: epidermis, D: dermis

고 찰

피부 화상은 그 상해 정도가 클 경우 반흔조직의 형성 뿐만 아니라 부분충화상, 전층화상의 경우 식피술을 시행하여야 하는 어려움이 뒤따르게 된다. 조직의 재상피화와 육아조직의 형성 촉진은 외상의 치유과정에 대단히 중요하며, 일반적으로 피부의 창상 치유과정 동안 일어나는 재상피화와 육아조직의 형성은 매우 다양한 성장인자와 분화인자에 의해 매개된다¹⁷⁾. KGF는 이러한 치유과정에 일차적으로 작용하는 성장인자로 알려져 있다. 화상에 있어서 어떠한 외과적 시술

없이 상처치유가 이루어진다면 가장 이상적인 치료법이 될 것이다. 이러한 목적에 부합될 만한 물질로서 본 실험에서 사용한 몰약은 고대로부터 방부제, 출혈방지제로 사용하였고 전해오고 있으며, 한의학에서 외용 시 수렴작용과 소염작용이 있는 것으로 기록되어 있다. 이러한 몰약이 화상 피부의 상처치유를 촉진하는지에 대해 알아보고자 열화상을 유도한 흰쥐의 피부에 몰약을 도포한 다음, 피부조직 내 KGF의 생성양상과 이에 따른 피부의 조직학적 변화를 관찰하였다.

실험 결과, 화상 유발된 실험 동물의 화상 심도는 표피에는 수포의 형성은 없었으나 조직학적 관찰에서 진피의 유두층은 물론 망상층까지도 손상이 나타나 심 2도 화상으로 분류되었다. 또한 72시간 경과 후에도 표피층의 탈락현상 등 손상소견이 심해져 화상에 대한 자연적 치유현상은 없는 것으로 나타나 전층화상으로 판단되었다.

상피재생능을 검증하기 위하여 화상 후 시간 경과에 따라 피부조직 내 KGF 함량변화를 측정하였다. KGF는 FGF계의 하나로 피부 뿐만 아니라 위장관계와 유선을 포함하는 광범위한 상피조직의 증식을 선택적으로 촉진시킴으로 인해¹³⁾ KGF는 각종 피부 상처의 재생능을 파악하는데 지표로 이용되고 있다.^{9,14)} 조직 손상 시 새로운 조직의 형성은 육아조직의 형성과 더불어 재생피화 과정이 동반되게 된다.^{7,11,19)} 이때 섬유모세포는 섬유형성과 상처치유부의 장력 형성에 주된 역할을 담당하며, 이를 촉진하는 FGF는 KGF와 그 구조의 동일성이 높은 것으로 알려져 있다. 이는 곧 재생피화 과정이 상처 치유과정과 동반되어 진행된다는 것을 의미한다. 본 실험 결과 몰약은 화상 유발 5시간 후에 이미 KGF 생성을 촉진시켰고, 24시간 후에는 KGF 함량이 가장 높았으며, 화상 유발 72시간 후까지도 생성 촉진효과가 지속되고 있음이 나타났다. 그러나 흰쥐의 정상 피부조직 내에서는 그 함량이 아주 낮게 나타났는데, Beer 등¹⁷⁾에 따르면 사람에게 있어서 KGF의 생성 발현은 정상 피부에서는 낮게 이루어지나 피부 손상 후 진피의 섬유모세포에 의한 조절상승이 야기된다고 하였다. 그리고 각질세포의 수용체 작용으로 표피세포의 이동과 증식이 유도된다고 하였다.

몰약을 도포한 피부조직의 조직학적 관찰에서도 형태적 변화양상은 KGF 생성양상과 일치된 결과를 보였는데, 화상 유발 5시간 후에 나타난 진피층의 부종과 상피·진피층에 걸쳐 나타난 물질변성을 감소시킨 것으로 나타났다. 화상 유발 24시간 후부터 몰약의 도포로 상피세포의 재생능이 보이기 시작하여 72시간 후에는 상피세포의 핵의 배열과 케라틴층의 구조, 그리고 기저층 세포들의 모습은 정상적인 모습으로 관찰되었다. 또한 진피층의 섬유형성도 24시간 후부터 촉진된 모습이었고, 72시간 후에는 표피층 바로 아래부분을 제외한 심부에는 풍부한 섬유조직의 형성이 나타났다.

결과적으로 화상 피부에 몰약을 도포함으로써 KGF의 생성이 촉진되었으며, 이와 시기를 같이 하여 열에 의한 피부조직의 물질변성을 방지하고 상피재생에도 큰 효과가 있는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- 1) Arturson G and Mellander S (1964): Acute changes in capillary filtration and diffusion in experimental burn injury. *Acta Physiol Scand*, **62**: 4577-5463.
- 2) Datubo-Brown DD and Kejeh BM (1989): Burn injuries in Port Harcourt Nigeria. *Burns*, **15**: 152-154.
- 3) Fournier AY, Courty J, Muller E et al. (1986): Eye-derived growth factor isolated from bovine retina and used for epidermal wound healing in vivo. *J Invest Dermatol*, **87**: 76.
- 4) Gibbs S, Pinto ANS, Murli S, Huber M, Hohl D and Ponem M (2000): Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair and Regeneration*, **8(3)**: 192-203.
- 5) Greenhalgh DG (1996): The role of growth factors in wound healing. *J Trauma*, **41(1)**: 159.
- 6) Hatherill JR, Till GO, Bruner LH and Ward PA (1986): Thermal injury, intravascular hemolysis and toxic oxygen products. *J Clin Invest*, **78**: 629-636.
- 7) Horn DB (1995): Growth factors in wound healing. Wound healing for the otolaryngologist. *Head Neck Surg*, **28**: 5.
- 8) Huang YS, Yang ZC, Liu XS et al. (1998): Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns*, **24**: 706-716.
- 9) Jimenez PA and Rampy MA (1999): Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res*, **81**: 238-242.
- 10) McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, Barbour R and Detettriou AA (1988): Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res*, **45**: 145.
- 11) Moulin V, Auger FA, Garrel D and Germain L (2000): Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns*, **26(1)**: 3-12.
- 12) Peacock EE Jr: *Wound Repair*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders.
- 13) Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon H-G, Taylor WG, Fortney E, Sakata H, Finch PW and LaRochelle

- (1995): Keratinocyte growth factor. *Cell Biol Int*, **19**: 399-411.
- 14) Soler PM, Wright TE, Smith PD, Maggi SP, Hill DP, Ko F, Jimenez PA and Robson MC (1999): In vivo characterization of keratinocyte growth factor-2 as a potential wound healing agent. *Wound Repair and Regeneration*, **7(3)**: 172-178.
- 15) Spector WS (1956): In: Handbook of Biological Data. Philadelphia, PA Saunders, p.157.
- 16) Till GO, Guilds LS, Mahrougui M, Friedl HP, Trentz O and Ward PA (1989): Role of xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am J Pathol*, **135(1)**: 195-202.
- 17) Tsuboi R, Sato C, Kurita Y, Ron D, Bubin JS and Ogawa H (1993): Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **101(1)**: 49-53.
- 18) Wu L and Mustoe TA (1995): Effect of ischemia on growth factor enhancement of incisional wound healing. *Surgery*, **117(5)**: 570-576.
- 19) Xia YP, Zhao Y, Marcus J, Jimenez PA, Ruben SM, Moore PA, Khan F and Mustoe TA (1999): Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J Pathol*, **188(4)**: 431-438.
-