

## 歸脾湯이 인체피부 섬유아세포에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 한방부인과 교실  
제윤모, 유정은, 최경희, 임현정, 유동열

### ABSTRACT

#### Effects of *Kwibi-tang* on Dermal Fibroblast

Yun-Mo Je, Jeong-Eun Yoo, Kyung-Hee Choi, Hyun-Jung Lim, Dong-Youl Yoo  
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

**Objectives:** This study was performed to elucidate the effects of *Kwibi-tang* extract(KB) on dermal fibroblast.

**Methods:** To demonstrate the effects of KB on dermal fibroblast, we used human dermal fibroblast(F6) and UVB light(30 mJ/cm<sup>2</sup>) was used to damage to dermal fibroblast. we measured the nitrite production, LDH release in UVB-irradiated dermal fibroblast to elucidate the action-mechanism of KB. Also, we evaluated cell proliferation of dermal fibroblast and the amount of increased PICP, TIMP-1 in dermal fibroblast.

**Results:**

1. KB decreased the cell proliferation of F6 dermal fibroblast in concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ .
2. KB decreased the synthesis of PICP in concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ .
3. KB decreased the synthesis of TIMP-1 in concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ .
4. KB have no effect on the damage in UVB-irradiated F6 dermal fibroblast.

**Conclusions:** From the results, we concluded KB decreases the cell proliferation and collagen synthesis in dermal fibroblast. So we suggest that KB has the anti-hyperplasy of dermal fibroblast.

**Key Words:** *Kwibi-tang* Extract(KB), Dermal Fibroblast, Collagen, Anti-hyperplasy of Dermal Fibroblast

## I. 서 론

켈로이드와 비후성 반흔은 병리학적으로서는 창상이 치유되는 과정에 섬유아세포에 의해 콜라겐이 과잉 생산됨으로써 발생한다고 알려져 있으며 손상된 원래 부위를 전후하여 과잉 발육하게 되며 치료 후에도 흔히 재발하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

켈로이드 및 비후성 반흔은 창상치유에 대한 많은 기초연구에도 불구하고 효과적인 예방법이나 치료법을 찾기 어려워 방치되기 쉬운 질환이다. 외관상 보기 흉하고 때때로 참기 힘든 가려움이나 통증을 수반하여 일상생활에 지장을 준다. 특히 안면부나 상하지 등의 노출 부위에 발생 시에는 미용적인 문제를 야기하여 사회 활동에 지장을 초래 할 수 있어 환자에게 고통을 주는 질환이다<sup>2)</sup>. 켈로이드와 비후성 반흔을 감소시키기 위해서는 진피조직의 섬유아세포를 억제하거나 콜라겐의 과잉생성을 억제하는 것이 중요하다<sup>3)</sup>.

현재 사용되고 있는 치료방법은 수술적 치료와 부신피질호르몬제 국소주사와 같은 화학적 치료, 실리콘 겔 방법이나 압박치료와 같은 물리적 치료, 그리고 방사선 치료 등이 있으며 이러한 방법들을 단독이나 병행하여 사용하고 있다<sup>4)</sup>.

歸脾湯<sup>5)</sup>은 益氣補血, 健脾養心하는 효능으로 思慮過度와 勞傷心脾로 인한 心悸怔忡, 健忘不眠, 盜汗虛熱, 食小體倦과 脾不統血로 인한 便血, 崩漏 등을 치료하는데에 활용되고 있는 처방이다<sup>6)</sup>.

또한 歸脾湯은 실험적 연구를 통하여 항산화효과<sup>7-9)</sup>, 방사선 방호효과<sup>10)</sup>, 지혈효과<sup>11)</sup>, 항피로효과<sup>12)</sup>, 항stress효과<sup>13)</sup> 등

이 입증되었다.

歸脾湯은 益氣補血하는 효능과 항산화 효과, 항stress효과가 있어 피부보호와 상처치유에 효과가 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 歸脾湯의 상처치유 효과를 확인하고자 인체피부 섬유아세포인 F6 세포를 배양하여, 인체피부 섬유아세포 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 분열능에 미치는 영향, PICP 생성능, TIMP-1 생성능을 측정하였으며, UVB에 의한 인체피부 섬유아세포 상해에 미치는 영향을 측정하기 위해 LDH 유리능, nitrite 생성을 측정한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 재 료

#### 1) 약 물

실험에 사용한 歸脾湯<sup>5)</sup>의 구성 약물은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Kwibi-tang*

韓藥名	生藥名	用量 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
龍眼肉	Longanae Arillus	4
酸棗仁	Zizyphi Spinosae Semen	4
人參	Ginseng Radix	4
黃芪	Astragale Radix Atractylodis	4
白朮	Macrocephalae Rhizoma	4
白茯苓	Hoelen Alba	4
遠志	Polygalae Radix	2
木香	Aucklandiae Radix	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.5
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	7
大棗	Jujubae Fructus	3
TOTAL		43.5

## 2) 시료 추출 및 검액 조제

歸脾湯 130.5 g(3첩 분량)의 건조된 한약재를 잘게 자른 후 증류수 1,500 ml를 가한 후 열탕추출기에서 열수 추출하였다. 4시간 이상 환류 추출하여 얻어진 추출물을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축한 다음 freeze dryer로 동결 건조하여 추출분말(이하 KB라 칭함) 23.88 g을 얻었다. 실험 시에는 추출물을 배지에 녹인 후, pore size 0.45  $\mu\text{m}$ 의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

## 3) 세포 배양

실험에 사용된 F6 섬유아세포는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 인체피부 섬유아세포 활성화에 미치는 영향 측정

#### (1) F6 세포 배양

Collagen 생성 및 분해 실험 연구에 F6 인체피부 섬유아세포를 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co. USA) 배지를 사용하여 5일간 배양하였으며, 1일 1회 배지를 교환하였다. 다시 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 KB를 가하여 3일간 배양하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과 후 사용하였다. Cell에 각 조건 별로 96 well plate에는 well당 100  $\mu\text{l}$ , 24 well plate에는 well당 500  $\mu\text{l}$ 로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml를 가하여 37°C

에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 사용한 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

#### (2) Cell proliferation 측정

처리하지 않은 F6 인체피부 섬유아세포(정상군)를 10% FBS와 penicillin / streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co., USA) 배지를 사용하여 5일간 배양하였으며, 1일 1회 배지를 교환하였다(대조군). 배양된 세포를  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부착한 다음, 분획하여 조제한 검액을 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가하여 3일간 배양하였다(실험군). 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, PBS로 희석하여 Hematocytometer(Fuchs-Rosenthal, Germany)로 세포수를 계측하였다.

#### (3) TIMP-1 assay

TIMP-1의 검출을 위해 위 조건에서 24 well plate에 준비한 cell을 배양한 medium을 1:10으로 dilution하고 그 중 50  $\mu\text{l}$ 를 사용하여 TIMP-1 immunoassay kit(R&D Systems Inc., USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (4) Collagen assay

96well plate에 100  $\mu\text{l}$ 의 세포 배양액을 넣고 25°C에서 120분간 incubation 시켰다. Washing용 buffer로 3번 씻어낸 후 anti-PICP를 100  $\mu\text{l}$  가하고 다시 22°C에서 45분간 incubation 시켰다. Washing buffer로 3번 다시 씻어 내고 enzyme conjugate 100  $\mu\text{l}$ 를 가한 다음, 22°C에서

45분간 incubation 시켰다. 다시 3번 씻어낸 다음 기질용액 100  $\mu$ 를 가하고 22°C에서 30분간 incubation 시킨 다음 stop solution 50  $\mu$ 를 가하고 405 nm에서 optical density를 구했다.

2) UVB에 의한 인체피부 섬유아세포 상해에 미치는 영향 측정

(1) 자외선 조사 및 약물처리

자외선 조사는 UVATEC(Uvatec INC, USA) 조사기를 이용하였으며, UVB lamp를 사용하여 290~320 nm 파장을 가지는 자외선을 조사하였다. 광량은 IL 1700 radiometer(International Light Inc., USA)를 사용하여 측정하였다. 자외선을 조사하기 전에 1시간 동안 약물 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml 을 가하여 미리 배양하였다. 자외선을 조사하기 위하여 DMEM 배지를 제거한 다음, PBS로 2번 씻어낸 후 UVB 파장의 자외선을 30 mJ/cm<sup>2</sup> 이 되도록 조사하였다(대조군). 자외선을 조사한 다음 PBS로 한번 씻어낸 후, 약물 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml 가 함유된 새로운 DMEM 배지를 넣고 일정 시간동안 배양한 후 실험에 사용하였다(실험군).

(2) LDH 유리능 측정

세포를 96 well plate를 이용하여 24시간 동안 미리 배양한 후, 1시간 동안 약물을 함유한 배지로 전 처리하였다. 세포는 well당 1×10<sup>4</sup> 개씩 넣었다. 배양액을 제거한 다음 각 well에 50  $\mu$ l의 PBS(phosphate buffered saline)를 넣은 다음, 세포에 UVB를 30 mJ/cm<sup>2</sup> 를 조사한 후 PBS를 제거하고 well당 약물이 포함된 200  $\mu$ l의 DMEM 배지를 첨가하였다. 24시간이 경과한 다음 배양액을 취하여 세포 손상의 지표로 LDH(lactate

dehydrogenase) 활성을 측정하였다. LDH 활성은 LDH kit(Sigma Co., USA) 을 이용하여 정량하였으며, ELISA Reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(3) Nitrite 생성능 측정

위에 기술한 LDH 측정법과 동일한 과정으로 배양한 다음 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO<sub>2</sub> 용액의 연속적인 희석 액을 만들어 최종농도가 0.05  $\mu$ M가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO<sub>2</sub> 희석 액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하였다. p<0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 인체피부 섬유아세포 활성에 미치는 영향

1) 분열능에 미치는 영향

실험 결과, 귀비탕(이하 KB)는 대조군에 비해 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의성(P<0.01) 있게 F6 세포 증식을 감소시켰다(Fig. 1).

2) PICP 생성능에 미치는 영향

실험 결과, KB는 대조군에 비해 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의성(p<0.01) 있게 PICP 생성을 감소시켰다(Fig. 2).

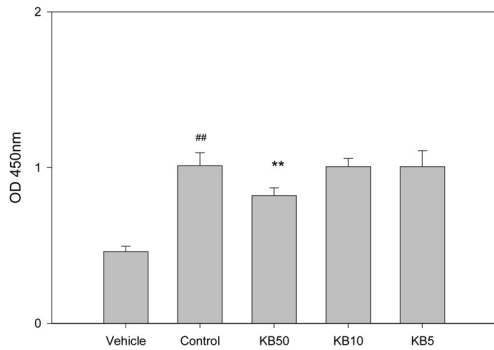


Fig. 1. Effect of KB on the Cell Proliferation of Dermal Fibroblast.

Vehicle : non-treated  
 Control : 10% FBS  
 KB50 : 10% FBS + KB(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB10 : 10% FBS + KB(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB5 : 10% FBS + KB(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 ## :  $p < 0.01$  vs Vehicle  
 \*\* :  $P < 0.01$  vs Control

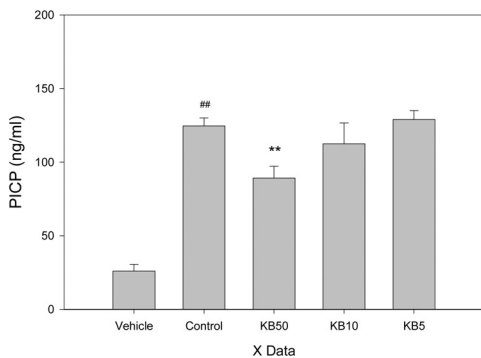


Fig. 2. Effect of KB on the PICP Expression in Dermal Fibroblast.

Vehicle : non-treated  
 Control : 10% FBS  
 KB50 : 10% FBS + KB(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB10 : 10% FBS + KB(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB5 : 10% FBS + KB(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 ## :  $p < 0.01$  vs Vehicle  
 \*\* :  $P < 0.01$  vs Control

3) TIMP-1 생성에 미치는 영향

실험 결과, KB는 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 TIMP-1 생성을 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 감소시켰다(Fig. 3).

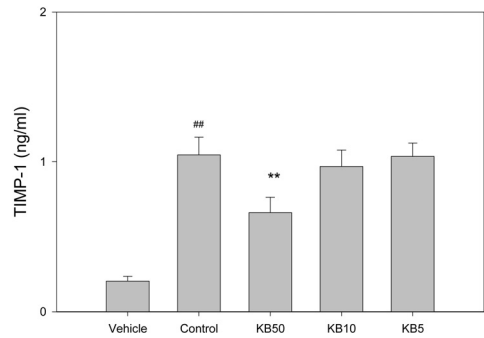


Fig. 3. Effect of KB on the TIMP-1 Expression in Dermal Fibroblast.

Vehicle : non-treated  
 Control : 10% FBS  
 KB50 : 10% FBS + KB(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB10 : 10% FBS + KB(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB5 : 10% FBS + KB(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 ## :  $p < 0.01$  vs Vehicle  
 \*\* :  $P < 0.01$  vs Control

2. UVB에 의한 인체피부 섬유아세포 상해에 미치는 영향

1) LDH 유리에 미치는 영향

실험 결과, KB를 처리한 경우 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 LDH의 유리를 억제하는 효과는 있었지만 유의성은 없었다(Fig. 4).

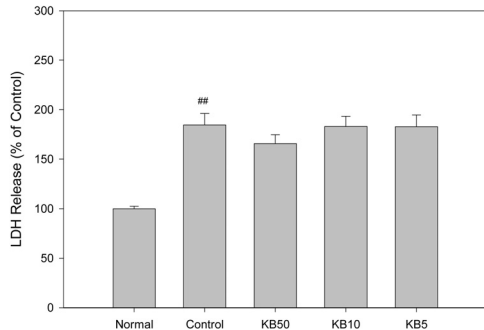


Fig. 4. Effect of KB on the LDH Release of UVB-irradiated Dermal Fibroblast.

Cells were UVB-irradiated(30mJ/cm<sup>2</sup>) and further incubated with KB. The results are expressed as mean  $\pm$  SE.

Normal : UV-free  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 KB50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + KB(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB10 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + KB(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 KB5 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + KB(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 ## :  $p < 0.01$  vs Normal

2) Nitrite 생성능에 미치는 영향  
실험 결과, KB를 처리한 경우, UVB만 조사한 대조군에 비해 nitrite 생성에 영향을 주지 못했다(Fig. 5).

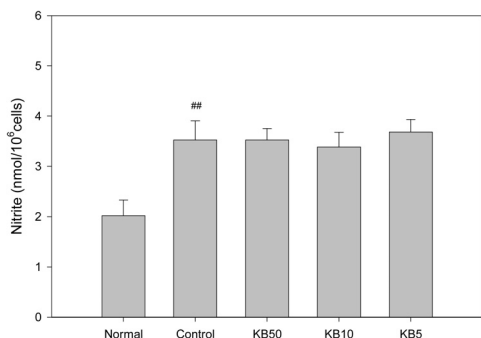


Fig. 5. Effect of KB on the Nitrite Production of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated(30mJ/cm<sup>2</sup>) and further incubated with KB. The results are expressed as mean ± SE.

Normal : UV-free

Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)

KB50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + KB(50 μg/ml)

KB10 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + KB(10 μg/ml)

KB5 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + KB(5 μg/ml)

## : p<0.01 vs Normal

#### IV. 고 찰

피부미용에 대한 여성들의 관심은 현대뿐 아니라 각종처방과 한약재가 사용되었던 것을 미루어 보아 과거로부터 있어왔음을 알 수 있다<sup>14)</sup>. 미백, 주름개선, 광노화 방지와 더불어 켈로이드와 비후성 반흔의 치료도 피부미용의 주요한 영역이다.

켈로이드와 비후성 반흔의 정의는 '원래 상처의 경계를 전후하여, 정상조직 피부와 각막에까지 침범하고, 오랜 기간에 걸쳐 콜라겐의 과다한 양이 침착으로 인해 사람의 피부와 각막에 나타나는 두

꺼운 흉터 조직'으로 알려져 있다. 10대 및 20대에서 비후성 반흔 및 켈로이드의 발생률이 유의하게 높았으며, 이는 10대에서는 성장이 급격하게 진행됨에 따라 콜라겐 합성 대사율이 높으며 장력 역시 증가하여 유병율이 높다고 하였다<sup>1)</sup>.

켈로이드와 비후성 반흔의 병인에 관련될 수 있는 여러 가지 전신적 또는 국소적 면역인자 등을 조사해서 면역학적으로 원인을 설명한 보고 중에서 켈로이드의 발생은 조직 내 저산소증으로 인한 콜라겐 형성 조절부전이 원인이라고 설명하였다<sup>15)</sup>.

오늘날 일상생활로 복귀하는데 장애가 되는 비후성 반흔 및 켈로이드가 주된 치료의 대상이 되고 있으며 켈로이드와 비후성 반흔에 대한 원인이나 치료에 대한 논의들이 활발히 이루어지고 있다<sup>1)</sup>.

현재 사용되고 있는 치료방법은 수술적 치료와 부신피질호르몬제 국소주사와 같은 화학적 치료, 실리콘 겔 방법이나 압박치료와 같은 물리적 치료, 그리고 방사선 치료 등이 있으며 이들을 술자에 따라 단독이나 병행하여 사용하고 있다<sup>4)</sup>.

그러나 이와 같은 치료법은 켈로이드나 비후성 반흔 부위가 광범위한 경우에 사용에 제한을 받으며, 특히 광범위하게 사용되는 부신피질호르몬제 주사는 통증이 심하고 스테로이드제의 일반적인 부작용으로 인해 장기간에 걸쳐 사용하거나 짧은 기간 동안 여러 번 사용할 수 없는 등의 제약이 따른다. 결정적으로 이러한 치료들은 장기간 추적관찰시 재발률이 높아 치료에 어려움이 있다<sup>3)</sup>.

또한 최근 피부과나 한의원에서 시술되고 있는 subcision(subcutaneous incision)은 흉터부위의 콜라겐 섬유가 다른 정상

부위보다 딱딱하게 굳어있다는 점에 착안하여 이를 교정하여 흉터를 개선시키기 위해 개발된 것으로, 여드름 흉터조직은 콜라겐의 증식이 과도하게 일어나는 것이 특징인데 역학적인 측면에서 볼 때 과증식된 콜라겐 조직(흉터조직)은 피부를 밑으로 잡아당기는 방향으로 힘이 작용하게 된다. 따라서 피부가 정상 피부면에 비해 밑으로 당겨지게 되어 패인 형태를 띠게 되는 것인데 박<sup>16)</sup>의 논문에서는 이럴 경우 피부와 근육을 당기고있는 조직을 끊어주면서 새로운 피부층이 재생될수 있도록 치료하는 것이 중요하다고 서술하고 있다.

이와 같이 피부 내 콜라겐의 이상증식으로 인하여 비후성 반흔 및 켈로이드와 같은 흉터가 생긴다고 판단할 수 있으며, 콜라겐의 이상증식으로 피부의 흉터가 잘 낫지 않는 경우가 있다고 볼 수 있다. 따라서 효능이 우수하면서 안전성과 안정성이 높은 콜라겐 이상증식 억제제에 대한 연구가 요구되고 있다.

歸脾湯은宋代嚴用和가 편찬한《濟生方·卷之四·驚悸怔忡健忘門·健忘論治》에 최초로 기재되었고 처방은 酸棗仁, 龍眼肉, 黃芪, 白朮, 茯苓, 人蔘, 木香, 甘草, 生薑, 大棗로 구성되었다<sup>17)</sup>.

歸脾湯의 原出典인《濟生方》에서의 구성 내용은 현재 쓰이고 있는《東醫寶鑑》의 歸脾湯과는 藥物構成內容에서 차이가 있다.《濟生方》의 歸脾湯에 當歸, 遠志를 추가하고 人蔘의 양을 증가한 것이 校註婦人良方の 歸脾湯이고,《醫學入門》에서는 茯苓을 茯神으로 바꾼 것이 차이가 있다. 각각의 출전에 따라 木香, 甘草의 분량의 약간의 차이가 있으며, 生薑, 大棗의 유무와 분량의 차이가 있다.

귀비탕에 있어서 '歸脾'는 心, 腎, 肝, 肺 四臟의 神, 志, 魂, 魄을 조화시켜 모두 脾로 귀향시킨다는 뜻이며<sup>18)</sup>, 脾는 음식을 소화시켜 음식의 精華를 전신에 수포함으로써 氣血生化의 근원이 된다<sup>19)</sup>.

저자는 歸脾湯의 상처치유 효과를 확인하고자 인체피부 섬유아세포 활성화에 미치는 영향을 측정하기 위해 분열능에 미치는 영향, PICP 생성능, TIMP-1 생성능을 측정하였으며 UVB에 의한 인체피부 섬유아세포 상해에 미치는 영향을 측정하기 위해 LDH 유리, nitrite 생성능에 대하여 알아보았다.

콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되며 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포접착의 지탱, 세포분할과 분화의 유도 등의 기능이 있다<sup>20)</sup>. 콜라겐의 감소는 피부의 주름 형성과 밀접한 관계가 있다<sup>21-23)</sup>. 한약재가 콜라겐 합성에 미치는 영향에 대한 기존의 연구 중에는 丹梔逍遙散<sup>24)</sup>, 熟地黃, 當歸 등의 補血滋陰之劑가 콜라겐 합성을 증가시킨다<sup>14)</sup>는 보고가 있었다.

그러나 상처치유과정에서 콜라겐이 과잉 생산되는 경우 켈로이드와 비후성 반흔을 생성하게 된다<sup>3)</sup>. 따라서 켈로이드와 비후성 반흔을 감소시키기 위해서는 진피조직의 섬유아세포를 억제하거나 콜라겐의 과잉생성을 억제하는 것이 중요하다. 실험 결과, KB는 인체피부 섬유아세포 증식을 50 µg/ml의 농도에서 유의성(p<0.01) 있게 감소시켰다(Fig. 1).

Collagen의 전구체인 procollagen은 성숙한 collagen과 여분의 peptide로 구성되어 있는데, 이 peptide는 collagen이 성장하고 있는 collagen fibril로 끼어 들어가기 전에 특이한 protease에 의해 분해된다.

이 분해된 peptide중 deraml fibroblast가 가장 많이 생산하는 제 I형 procollagen의 분해산물인 PICP(Procollagen Type I C-Peptide)는 진피 collagen 합성의 지표가 된다<sup>30)</sup>. 실험 결과, KB는 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 PICP 생성을 감소시켰다(Fig. 2).

28 kD glycoprotein인 TIMP-1(tissue inhibitor of martrix metalloproteinase-1)은 활성화된 MMP-1과 1 : 1 복합체를 이루어 collagen을 분해하는 MMP의 활성을 억제한다<sup>31)</sup>. 따라서, TIMP-1를 감소시키는 물질은 진피조직의 collagen의 분해를 촉진할 수 있다. 실험 결과, KB는 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 TIMP-1 생성을 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 감소시켰다(Fig. 3).

UVB에 의한 피부진피 세포 상해에 대한 KB의 영향을 평가하고자 인체피부 섬유아세포인 F6에 UVB를 조사한 후 유리되는 LDH를 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포 내막에 존재하므로 세포가 파괴되어야 세포 밖으로 유출될 수 있어 세포의 상해여부를 측정하는 유력한 기준이 된다<sup>25)</sup>. 측정 결과, UVB 조사 시에 세포로부터 LDH의 유리가 증가하였다. 이는 UVB에 의한 ROS 생성이 증가되고, ROS 물질들이 단백질, 지방, 핵산 등 생체 구성물질의 변성을 유발한 결과 세포막이 파괴되는 것을 의미한다<sup>26)</sup>. KB를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 LDH의 유리를 억제하는 효과는 있었지만 유의성은 없었다(Fig. 4).

다음으로 UVB에 의한 피부 진피 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여 F6 세포에 UVB를 조사한 후 생성되

는 nitrite를 측정하였다. 생체 내에서 NO(Nitric oxide)는 L-arginine가 nitric oxide synthase(NOS)의 작용으로 인해 산화되어 생성되는 것으로, 생성된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 ROS의 하나인 superoxide anion( $\text{O}_2^-$ )과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite( $\text{ONOO}^-$ )를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화한다<sup>27,28)</sup>. NO는 반응성이 매우 크고 불안정한 자유기이므로 NO자체의 농도를 측정할 수 없어<sup>29)</sup>, NO의 안정된 대사산물인 nitrite를 측정하여 대조군과 비교해 보았다. 실험 결과, UVB 조사시 F6 세포에서 생성되는 nitrite 양이 증가하였고, KB를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 nitrite 생성에 영향을 주지 못했다(Fig. 5).

이상의 결과 귀비탕은 인체피부 섬유아세포에서 세포의 증식을 감소시켰고 PICP, TIMP-1의 합성은 감소시켰지만 UVB에 의한 F6 세포 손상으로 인한 LDH 유리 및 nitrite 생성에는 영향을 주지 못하였다.

따라서 귀비탕은 인체피부 섬유아세포의 기능을 억제하여 인체피부 섬유아세포의 과잉발현으로 유발될 수 있는 질환의 치료 및 예방에 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

## V. 결 론

歸脾湯의 상처치유 효과를 확인하고자 피부노화 및 상처 치유에 작용하는 인체피부 섬유아세포의 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, UVB로 유발된 손상 F6 세포의 상해에 미치는 영향을 측정하



여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 귀비탕은 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성( $P<0.01$ ) 있게 F6 세포 증식을 감소시켰다(Fig. 1).
2. 귀비탕은 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성( $p<0.01$ ) 있게 PICP 생성을 감소시켰다(Fig. 2).
3. 귀비탕은 대조군에 비해 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 TIMP-1 생성을 유의성( $p<0.01$ ) 있게 감소시켰다.
4. 귀비탕은 UVB 조사로 인해 증가한 F6 세포의 상해에 영향을 주지 못했다.

□ 투 고 일 : 2011년 10월 28일

□ 심 사 일 : 2011년 11월 01일

□ 게재확정일 : 2011년 11월 07일

## 참고문헌

1. 신승준. 켈로이드 및 비후성 반흔의 소인에 관한 임상적 고찰. 아주대학교 일반대학원 의학과. 2007.
2. 이원재 등. 켈로이드 및 비후성 반흔 환자를 대상으로 한 트라닐라스트의 안전성과 유효성. 대한성형외과학회지. 2002;29:162-8.
3. Al-Attar A et al. Keloid Pathogenesis and Treatment. Plast Reconstr Surg. 2006;117:286-300.
4. Shaffer JJ, Taylor SC, Cook-Bolden F. Keloidal scars : A review with a critical look at therapeutic options. J Am Acad Dermatol. 2002;46:63-79.
5. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:대성출판사. 2000

:56.

6. 韓醫科大學 方劑學教授 共編著. 方劑學 改正增補版. 서울:永林社. 2003:290-2.
7. 전희준 등. 귀비탕(歸脾湯)이 Glutamate에 의한 정상 세포의 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2007;25(2):184-93.
8. 임재환 등. 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 항산화 효과 및 6-Hydroxydopamine에 대한 PC12 세포 보호효과 비교연구. 동의신경정신과학회지. 2009;20(1):1-19.
9. 박선동, 박현준, 주왕석. 歸脾湯 및 그 構成藥物群이 抗酸化效果에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):11-27.
10. 김성호 등. 생쥐에서 귀비탕 및 구성단미의 방사선 방호효과. 한국식품영양과학회지. 1999;28(3):698-704.
11. 박인기, 김경준. 歸脾湯 및 歸脾湯加味方의 止血效果에 관한 實驗的 研究. 대한안이비인후피부과학회지. 2003;16(1):63-76.
12. 박재우 등. 歸脾湯의 抗疲勞效能에 關한 研究. 대한한방성인병학회지. 2000;6(1):162-73.
13. 최보인. 갱년기질환에 활용되고 있는 가미귀비탕의 항stress효과에 관한 실험적 연구. 대전대학교대학원. 2000.
14. 김선영 등. 한방미용제제(자음미단)의 Hairless Mouse Model에서의 피부광노화 억제 및 섬유아세포의 UVB 손상 저해효과. 2002;23(3):43-53.
15. Kischer CW, Hendrix MJ. Fibronectin (FN) in hypertrophic scars and keloids. Cell Tissue Res. 1983;231(1):29-37.
16. 박진미. 피부미용 및 성형에서의 침구법 연구 - 오행침법시스템 중 수

- 침시시스템의 임상적용과 효과. 대한한방비만학회지. 2007;7(1):107-15.
17. 嚴用和. 嚴氏濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
  18. 王子接. 絳雪園古方選註(文淵閣本) 卷7. 서울:여강출판사. 1986:9-10.
  19. 배병석. 기초한의학. 서울:성보사. 2005:307-14.
  20. Perlish JS, Lemlich G, Fleischmajer R. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J Invest Dermatol.* 1988;90(1):48-54.
  21. El-Domyati M et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol.* 2002;11(5):398-405.
  22. Giacomoni PU, Rein G. Factors of skin ageing share common mechanisms. *Biogerontology.* 2001;2(4):219-29.
  23. Wlaschek M et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B.* 2001;63(1-3):41-51.
  24. 임현정, 유동열. 단치소요산(丹梔逍遙散)이 자외선을 조사한 피부진피세포의 활성화 및 유전자발현에 미치는 영향. 2011;24(2):13-32.
  25. 서기석 등. Asiaticoside의 입술 주름 개선 효과. 고신대학교의과대학학술지. 2007;22(1):220-31.
  26. 김지은. 인체피부 섬유아세포에서 열 자극에 의해 유도되는 type I procollagen, MMP-1과 TIMP-1 발현에 대한 녹차추출물(epigallocatechin-3-gallate)의 효과. 고려대학교 생명환경과학대학원. 2004.
  32. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 apoptosis에 미치는 영향. 대한산부회지. 2002;45(5):766-73.
  33. Carla Biondi et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E2 biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. *Journal of Reproductive Immunology.* 2003;60(1):35-52.
  34. 신형직. 알코올 의존 환자에서 혈청 nitrite 농도와 임상적, 생화학적 상태와의 관련성. 한림대학교대학원. 1999.