

Original Article / 원저

加味紫雲膏가 mouse의 피부화상 치료에 대한 분자생물학적 효과 및 기전연구

이종철 · 김경준

가천대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과

Effects of Gamijaungo on the burn mice model and the study of hematologic, pathologic and molecular mechanism

Jong-Chul Lee · Gyung-Jun Kim

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, College of Korean Medicine, Gachon University

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the wound healing effect of herbal ointment, Gamijaungo, on the burn-induced model. Reports about Gamijaungo on the wound healing effect by local application in mice model or human study have published in the several domestic or internationally, but most are anecdotal and lack solid scientific evidence.

Method: We observed the morphologic and histologic changes in the burn-induced mice model, we counted white blood cell and platelet changes, we confirmed VEGF, PI3K and pAkt protein expression by Western blot analysis.

Result: In this study, we observed that Gamijaungo showed strong wound healing effects in the morphologic and histologic changes in the burn-induced mice model. Also we found that the significant changes of white blood cell and platelet changes by the treatment of Gamijaungo. In molecular mechanism, we got the strong positive effect by Gamijaungo treatment on angiogenesis, a key process in the formation of the granulation tissue during wound healing.

Conclusion: These findings suggest the potential use of Gamijaungo as a therapeutic in thermal burn-induced skin injuries.

Key words : wound healing; burn healing; Gamijaungo; jaungo; PI3K-Akt; VEGF

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

火傷은 생체가 고온 물체에 직접 닿거나 강한 열방사를 받음으로써 생긴 상해를 말한다¹⁾. 화상 직후에는 모세혈관의 투과성 증가로 많은 혈장이 화상 표면에서 삼출액(exudate) 형태로 상실되고 화상부위 밑에 있는 피부 조직에 심한 부종을 유발한다^{2,3)}. 이러한 혈장손실로 인하여 혈관내 정수압은 감소하게 되고 혈액이 농축되어 적혈구용적율(hematocrit)이 올라간다. 또한 혈류가 느려져 혈소판과 백혈구가 모세혈관 내에서 응집되어 조직에 허혈성 손상을 일으킬 수 있다^{4,5)}.

일반적인 화상으로 인한 상처의 정상적인 치료 과정을 보면 지혈반응(Hemostasis) - 염증반응(Inflammatory response) - 증식반응(Proliferation) - 상처수축(Wound contraction)의 과정을 거친다⁶⁾. 상처 치유의 각 반응에서는 염증세포, 각질세포, 섬유아세포 등이 분비하는 여러 종류의 성장인자나 cytokine 등이 함께 작용하여 상처 치유에 관여하는데, 이는 상처치유과정에서의 상처부의 염증세포가 분비하는 매개체들의 신호에 의해서 단핵구나 대식세포들이 상처부위로 모여들고, cytokine 등을 분비하면, 상처 주변의 섬유아세포 등의 증식과 이동이 진행되고, 그 과정 중에 혈관생성에 관련되는 인자들이 같이 작용하여 손상된 상처부위의 진피층의 기질형성과 더불어 혈관생성 등이 일어나며 치유가 일어나게 된다^{7,8)}.

혈관생성에 관련되는 인자 중 VEGF(Vascular endothelial growth factor)는 내피세포 특이적인 유사분열 관련 펩타이드로 혈관의 투과성을 증가시켜서 염증관련 매개체 및 염증세포를 포함한 혈장단백 등

이 혈관 외로 이동하는 것을 돕는다⁹⁾. Phosphoinositide 3-kinase(PI3K) 역시 중요한 신호전달 효소로서 phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate의 인산화를 조절하여 phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3)를 형성한다. 이는 Tyrosine kinase 수용체, G-protein coupled 수용체(GPCR) 혹은 사이토카인 수용체의 활성화에 의해 궁극적으로 세포의 성장, 분화, 생존, 증식, 이동 및 사이토카인 생성 등에 관여한다.

이 중 PI3K의 아형인 p110delta는 VEGF의 발현과 활성화에 중요한 역할을 하는데^{10,11)}, 이는 VEGF를 매개로한 신호전달, 즉 VEGF 유발 PI3K 활성화와 관련되고, 이 기전은 생체 내에서 다양한 역할을 하게 되는데, 세포의 이동, 혈관 투과성, 세포의 생존 및 증식에 관여 된다¹²⁾.

그러나 창상치유 과정은 조직의 파괴에 따라 세포의 구조, 생리, 생화학적 변화가 일어나 손상 또는 결손 부위가 완전히 재생되지 않고 흉터를 남기고 치유되게 된다¹³⁾. 그렇기 때문에 화상치유제의 궁극적인 목적은 癍痕을 최소화하면서 가능한 빨리 화상부위가 감소하도록 하는 적극적 치료¹⁴⁾로 창상유발에 있어서 신속한 치료효과와 흉터를 최소화 시킬 수 있는 치료제가 요구되고 있다.

紫雲膏는 明代 陳實功의 『外科正宗』에 潤肌膏라 하여 피부를 滋潤하여 깨끗하게 하는 膏藥을 日本 에 도시대의 外科의 大家 華岡이 『春林軒膏方便覽』에서 潤肌膏에 紫草와 蜜蠟의 양을 늘리고 豚脂를 加하여 처음으로 紫雲膏라는 명칭을 사용한 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

紫雲膏는 현재 임상에서 알리지성 피부염, 아토피성 피부염^{16,17)} 등의 피부질환 치료 연고로 사용되고 있고, 화상이나 상처에 의해 야기된 피사조직 제거¹⁸⁾와 손상된 상피조직 재생에 관여하는 피부 면역체계를 활성화시킴으로써 치유 효과가 탁월하다고 알려져 있다¹⁹⁾. 또한 보습 효과가 우수하여 재생된 상피조직의 2차 감염 및 가피 생성을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다²⁰⁾.

Corresponding author : Gyung-Jun Kim,
Gachon University Oriental Medicine Hospital Gil
Medical Center, 12, Dokjeom-ro 29beon-gil,
Namdong-gu, Incheon, Korea(Tel : 032-468-0330, Fax :
032-468-4033, E-mail : kkjo215@gachon.ac.kr)
• Recieved 2015/1/7 • Revised 2015/1/28 • Accepted 2015/2/4

본 실험에서는 화상의 치유효과를 극대화하기 위하여 紫雲膏의 기본 구성약물 紫草, 當歸에 항균효과²¹⁾와 항염작용²²⁾이 보고된 甘草와 淸熱, 排膿의 효과가 있는 金銀花, 黃芩, 黃柏²³⁾을 加味하여 조제하였다.

따라서 본 연구에서는 加味紫雲膏의 화상치료 효과를 보기 위하여 2도 화상 mouse의 조직학적 변화를 관찰하였고, 혈관투과성 변화와 염증반응을 관찰하기 위하여 혈액학적 검사를 통한 백혈구 수치, 혈소판수치, 적혈구 및 헤모글로빈 수치, 헤마토크리트를 측정하였고, 손상된 상처부위의 진피층의 기질형성과 더불어 혈관생성과 관련 있는 VEGF와 PI3K 및 그 하위기전에 Akt 발현 등의 변화를 통해 화상 및 상처치유 효과를 검토하였다.

하여 20-30 min 정도 동결 시킨 후 -70 °C 동결건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)를 이용하여 1시간 동안 건조하였다. 이렇게 얻은 가미자운고의 총량은 44 g으로 총 수율은 22 %였다.

Table 1. Prescription of Gamijaungo

Herbal Name	Scientific Name	Dose (g)
자초	<i>Lithospermi Radix</i>	40
당귀	<i>Angelica Gigantis Radix</i>	60
감초	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	40
황백	<i>Coptidis Rhizoma</i>	20
황금	<i>Scutellaria Radix</i>	20
금은화	<i>Ronicerae Flos</i>	20
Total Amount		200

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재 추출

본 실험에서 사용한 약재인 가미자운고는 자초 (*Lithospermi Radix*) 40 g, 당귀(*Angelica Gigantis Radix*) 60 g, 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 40 g, 황백 (*Coptidis Rhizoma*), 황금(*Scutellaria Radix*), 금은화 (*Ronicerae Flos*) 각각 20 g의 총량 200 g의 약재를 움니허브(Youngcheon, Korea)에서 구입하여 상온에서 2 L의 80 % 에탄올에 Ultra-sonicator (Branson, U.S.A)에서 15분간 sonication을 시킨 다음 약간의 break time (10분)을 가진 (발열반응이 일어남) 후 재차 한 번 더 반복한다. 추출된 액은 3 mm 여과지 (Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과한다. 여과하고 남은 잔사물은 다시 2 L의 80 % ethanol을 넣고 위의 과정을 반복한 후 1차와 2차 추출액을 혼합하여 45 °C 이하에서 감압농축기(rotary vacuum evaporator, N-1000, Eyela, Japan)를 이용하여 감압농축하였다. 농축 후 예비 동결 기계를 이용

2) 연고 조제

전통적인 화상치료제는 基劑가 기름(胡麻油)이거나 전분(粳米飯)이어서 피부에 적용하기 위해서 별도의 부착방법을 사용해야만 하는 문제가 있었다²⁴⁾. 따라서 실험에 사용한 가미자운고는 80 % 에탄올의 추출물을 바셀린(주)성광제약²⁵⁾과 함께 섞어 부착성을 높인 후 사용하였다. 가미자운고를 사용하기 위해 가미자운고의 농도가 100 mg/ml이 되도록 탈이온수에 녹인 후, 여기에 바셀린 100 μl씩 넣어 후 교반하여 바셀린과 혼합된 연고를 조제하였다.

3) 실험동물

실험동물은 (주)오리엔트로부터 BALB/c mouse (웅성, 4~6주령, 중앙실험동물)를 분양 받아 사용하였으며, 사육실 온도는 25±1 °C, 습도 55±10 %를 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 조도 150~300 Lux의 사육환경에서 일주일간 적응 순화시켰으며, 사료는 (주)오리엔트로부터 상용화되고 있는 배합사료를 이용하였다. 고형 사료와 물을 제한 없이 자유로이 먹을 수 있도록 하였다.

2. 방법

1) 연구 디자인 및 화상유발

화상 실험은 Bruen, Min 등의 방법을 응용하였다^{26,27}. 실험동물인 mouse 27마리를 정상군, 화상유도군 및 가미자운고 처리군의 세 군으로 나누어 실험하였다. 먼저 mouse를 마취시킨 후 등 부위를 전기면도기를 이용하여 털을 깨끗이 제거하였다. 털을 제거한 후 다음날 10 mm 지름의 stainless steel bar를 100℃까지 가열시킨 후 제모한 등 피부에 9초간 밀착시켜 화상을 유발하였다. 화상을 유발한 mouse는 다음날부터 한약제를 발라준다. 이때 연고는 화상과 상처를 입은 부위가 덮일 정도로 충분히 도포하였다. 각 군은 다시 화상 유발 후 1, 8, 15일로 구분하였고 각각 3마리씩 배정하였다.

Table 2. Classification by Treatments

Group Name	Treatments	No of mice
Normal	Unburned	9
Control	Burned but Untreated Group	9
Treatments	Burned and Treated Group	9

2) 화상유발 동물에서의 가미자운고의 처치

가미자운고로 제조한 화상연고를 적용하지 않는 군을 대조군으로 하고 연고 처치군은 예비실험결과 유의한 것으로 추정되는 400 mg/mouse 농도의 화상연고를 적용하였다. 일반적으로 2도 화상은 일주일 정도 지나면 가피(crust)가 형성되고 15~20일 정도면 치유된다고 알려져 있으므로 치료기간 관찰을 위하여 15일 동안 이틀에 한 번씩 연고를 도포하여가며 매번 도포시마다 상처의 길이를 재어 치유 현상을 관찰하였고 완치단계에서 치료 전후 피부조직의 변화를 관찰하기 위하여 정상 피부와 화상부위의 피부를 떼어

내어 병리 조직학적 관찰을 실시하였다.

3) 조직학적 검사 (Histochemical study)

피부조직 적출 즉시 10 % neutral buffered formalin에 고정시킨 다음, 흐르는 물에 수세하고 알콜에 담가 농도를 순차적으로 증가시킨 다음 탈수를 하였다. 탈수가 끝난 조직을 파라핀블록을 만들어서 박절기(Lipshaw Model-45, USA)를 이용하여 5 μm 두께로 연속절편을 제작하였고 Hematoxylin & Eosin (H&E)과 Masson's Trichrome 염색을 실시하여 광학 현미경(BH-2, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) 화상부위 크기 측정

화상부위는 가로 세로의 길이를 곱하여 화상면적을 곱하여 구하였다. 대조군과 처리군의 각 동물의 화상부위 크기를 날짜별로 구하여 평균하였다

5) 전혈 채취 및 혈액학적 분석

실험동물 mouse를 urethane으로 마취시킨 후 회복하여 복대동맥에서 혈액 10 ml을 채취하였다. 전혈의 채취는 EDTA 항응고제가 들어있는 tube를 이용하여 채취하였다. 채취한 전혈은 자동혈구계산기를 이용하여 혈액 기본치인 백혈구수(white blood cells, WBC), 적혈구수(red blood cells, RBC), 혈색소량(hemoglobin, Hb), 적혈구용적(hematocrit, HCT) 및 혈소판수(platelet, PLT)를 측정하였다. 나머지 혈액은 tube (Axygen Scientific, INC., USA)에 넣고 3000 rpm에서 5분간 원심분리 (Hanil Science Industrial co., LTD, Korea) 하여 혈청을 얻었다.

6) Western blot analysis

안정화 된 mouse의 각 조직을 각 조건에 맞게 처리한 후 시간에 맞게 샘플을 모은다. 샘플을 모을 때는 plate에 붙어있는 세포뿐만 아니라 붙어있지 않은 세포까지 튜브에 다 모은 후 원심분리(2,000 RPM, 5min)로 cell down 한 후 그 상층액을 버리고, 차가

은 PBS(phosphate buffered saline)로 2번 washing 하여 cell pellet만 남긴다. 각 시간별로 모아진 세포는 protein lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하고, 단백질의 정량은 bradford(bio-rad protein assay kit) 시약으로 하였으며, SDS-PAGE gel에 동량의 단백질을 loading하여 분리한 후, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1 % BAS+1 % skim milk가 섞인 PBST(1×PBS in 0.1 % Tween-20)로 상온에서 1시간 동안 blocking 한 후, 여러 가지 1차 항체를 4°C에서 overnight(O/N)으로 반응시킨 후, PBST로 washing 후 HRP-conjugated 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. 역시 PBST를 사용하여 washing 과정을 거친 다음에 Electrochemiluminescence detection system(Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 이용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다.

3. 통계처리

실험결과와 통계처리는 SPSS 프로그램을 사용하였고, 실험결과와 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 Mean(평균) ± S.D.(표준편차)로 요약하였으며, Student t-test 혹은 ANOVA로 분석하였다. 각 군간의 차이는 사후검정을 시행하였으며, 각 실험은 3회씩 반복처리되었다. p-value는 각각 0.1, 0.01, 0.001 수준에서 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 2도 화상 유발 모델의 조직학적 확인

화상 모델을 이용하여 화상의 모델을 구축하였다. 정상군(Fig. 1A)은 상피층과 진피층들의 서로 잘 경계되어 있고, 기저층에 의한 결합이 잘 이루어진 형태로 관찰되었다. 화상유발후의 화상유도군(Fig. 1B)은 상피층 세포들이 위축되고 핵은 응축된 형태로 관찰되

었다. 진피층은 열손상에 의한 단백질 변성으로 인한 염색이 되었으나, 진피층 이하의 부위는 수포의 모양 등이 잘 유지되고 있어 2도 화상을 확인할 수 있었다.

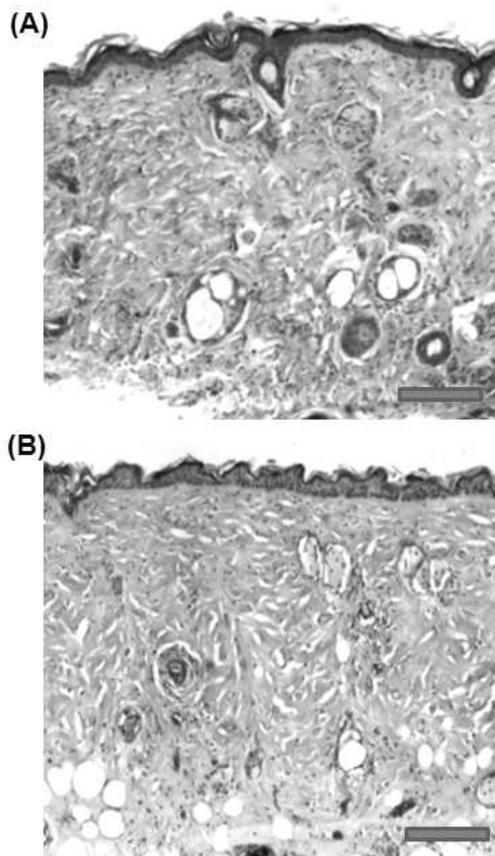


Fig. 1. Histological evaluation of preconditioning.

Hematoxylin and eosin (H&E) stains 12 hours after treatment (scale bar=100 μ m) (A) Normal tissue shows a healthy epidermis and hair follicles. (B) Untreated control of burn-induced tissues shows ablation of the epidermis and coagulation on the upper dermis.

2. 화상 개선효과

화상 모델을 이용하여 가미자운고의 화상 개선효과를 확인하였다. 화상 실험은 Bruen, Min 등의 방법을 응용하였으며, 일반적으로 2도 화상은 일주일 정도 지나면 가피(crust)가 형성되고 15~20일 정도면 치유된다고 알려져 있으므로 치료기간 관찰을 위하여 15일

동안 이틀에 한 번씩 연고를 도포하여가며 매번 도포 시마다 상처의 길이를 재어 치유 현상을 관찰하였고 완치단계에서 치료 전후 피부조직의 변화를 관찰하기 위하여 정상 피부와 화상부위의 피부를 떼어내어 병리 조직학적 관찰을 실시하였다. Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 가미자운고를 도포한 실험군에서 대조군에 비하여 화상치유 효과가 큰 것을 확인할 수 있었으며, 화상유발 15일의 피부 사진을 보면 월등히 개선된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로 인하여 본 실험에 사용된 가미자운고는 화상 개선효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 2 3).

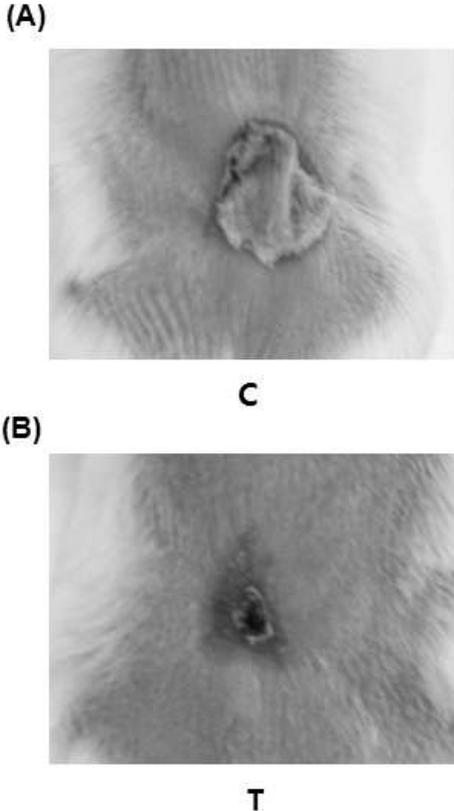


Fig. 2. Morphologic feature of skin of burned mouse back of untreated control group, C (A) and treated with *Gamijaungo* treated group, T (B)

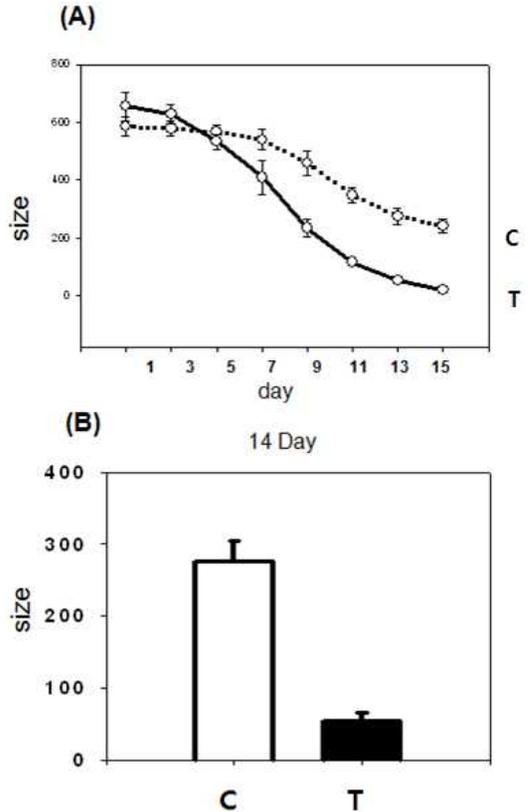


Fig. 3. Size of impaired skin of burned mouse back of untreated control group, C (A) and treated with *Gamijaungo* group, T (B) on the 15th day of experiment.

3. 화상 조직학적 개선효과

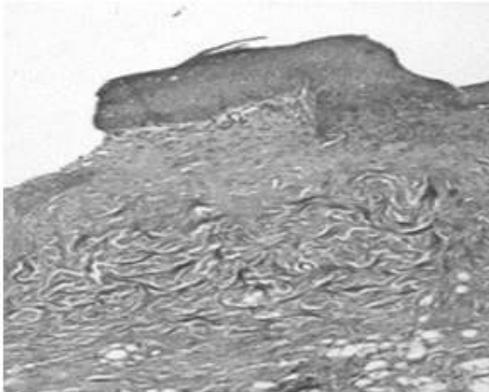
구축된 화상 모델을 이용하여 가미자운고가 화상후의 변화된 피부조직에 미치는 조직학적 개선효과를 확인하였다. 가미자운고 처리군(Fig. 4B)에서는 비처리군(Fig. 4A)에서 많이 손상되었던 상피층의 형성을 볼 수 있었고, 상피층 전반에 걸친 기저세포들의 분열이 왕성하였고, 상피 표면부의 케라틴 형성도 관찰되었다.

4. 백혈구 수치에 미치는 영향

화상 모델의 가미자운고에 의한 혈액학적 변화 중

백혈구의 수치 변화를 관찰하였다. 정상군에 비해서 1일, 8일, 15일 모두 화상유도군에서 유의하게 백혈구 수치가 증가하였고, 가미자운고 처리군에서는 치료 8일째와 15일째 증가된 백혈구 수치가 유의하게 감소하였다. 특히 15일째의 경우 정상수준에 가까운 백혈구 수치를 보여주었다(Fig. 5).

(A)



(B)

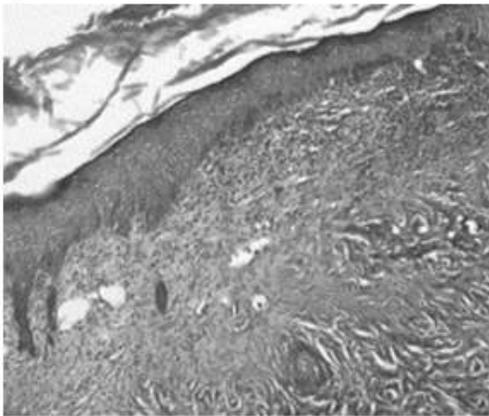


Fig. 4. Histological skin features of untreated and treated sites on the burn-induced lesions in mice.

Photomicrographs of the sites from untreated (A) and Gamijaungo-treated skin on the 15th day after treatment (B) in mice. Lesional skin was harvested and examined by histology. Representative sections stained with either Masson's trichrome staining are shown (original magnification $\times 5$).

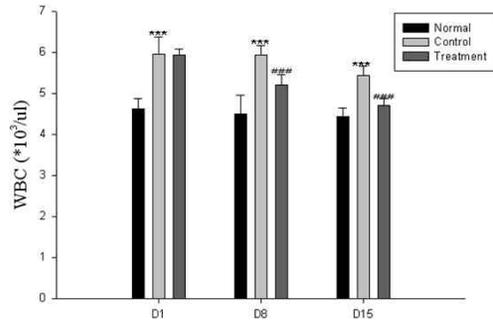


Fig. 5. Hematologic changes of White Blood Cell in the burn-induced mice.

Values are expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm S.D.), and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey HSD test. A criterion of significance was accepted and marked as $P < 0.1$ (* or #), 0.01 (** or ##) and 0.001 (***) or (###). The mark of star is Normal group (N) versus Untreated control group (C) and the mark of pound is untreated control group (C) versus Treated group (T).

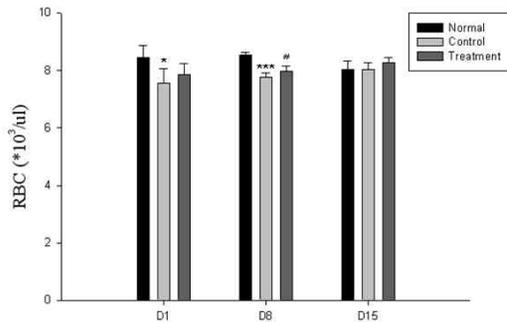


Fig. 6. Hematologic changes of Red Blood Cell in the burn-induced mice.

Values are expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm S.D.), and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey HSD test. A criterion of significance was accepted and marked as $P < 0.1$ (* or #), 0.01 (** or ##) and 0.001 (***) or (###). The mark of star is Normal group (N) versus Untreated control group (C) and the mark of pound is untreated control group (C) versus Treated group (T).

5. 적혈구 수치에 미치는 영향

화상 모델의 가미자운고에 의한 혈액학적 변화 중 적혈구의 수치 변화를 관찰하였다. 정상군에 비해 화상유도군에서 1일, 8일에는 유의하게 적혈구 수치가

감소하였으나 15일에서는 변화가 없었다. 가미자운고에 의해서 치료 8일째에 $p < 0.1$ 의 수준에서 유의한 증가를 보였으나 1일째와 15일째에는 변화가 없었다 (Fig. 6).

6. 헤모글로빈 수치에 미치는 영향

화상 모델의 가미자운고에 의한 혈액학적 변화 중 헤모글로빈의 수치 변화를 관찰하였다. 정상군에 비해서 1일, 8일, 15일 모두 화상유도군에서 유의하게 헤모글로빈이 변화하였으나 15일째는 1일과 8일과는 반대로 헤모글로빈 수치가 증가하였다. 가미자운고 처리군에서는 치료 1일째와 8일째 헤모글로빈 수치가 비치료군에 비해 유의하게 증가하였다. 15일째는 헤모글로빈 수치가 정상군보다 유의한 증가를 보여주었으나 비치료군에 비해서는 유의한 증가를 보여주지 못했다(Fig. 7).

7. 혈소판 수치에 미치는 영향

화상 모델의 가미자운고에 의한 혈액학적 변화 중 혈소판의 수치 변화를 관찰하였다. 정상군에 비해서 8일, 15일에서 화상유도군에서 유의하게 혈소판이 감소하였고, 가미자운고 처리군은 치료 8일과 15일째 혈소판 수치가 비치료군에 비해 유의하게 증가하였다. 1일째는 변화가 없었다(Fig. 8).

8. 헤마토크리트 수치에 미치는 영향

화상 모델의 가미자운고에 의한 혈액학적 변화 중 헤마토크리트의 수치 변화를 관찰하였다. 정상군에 비해서 1일, 8일, 15일 모두에서 정상군과 화상유도군, 가미자운고 처리군에서 모두 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 9).

9. 혈관신생관련 단백질 발현에 미치는 영향

대표적인 혈관신생 단백질인 VEGF와 VEGF의 신

생에 관련된 생존관련 단백질인 PI3K 및 그 하위기에 pAkt 발현의 경우 가미자운고 처리군이 비치료군에 비해 유의하게 세 단백질의 발현을 증가시켰다 (Fig. 10).

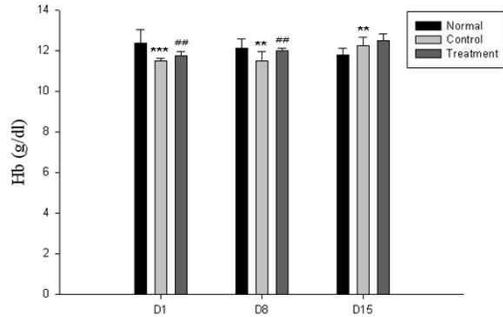


Fig. 7. Hematologic changes of Hemoglobin in the burn-induced mice.

Values are expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm S.D.), and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey HSD test. A criterion of significance was accepted and marked as $P < 0.1$ (* or #), 0.01 (** or ##) and 0.001 (***) or (###). The mark of star is Normal group (N) versus Untreated control group (C) and the mark of pound is untreated control group (C) versus Treated group (T).

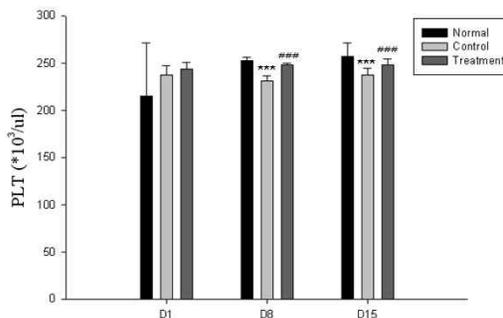


Fig. 8. Hematologic changes of Platelet in the burn-induced mice.

Values are expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm S.D.), and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey HSD test. A criterion of significance was accepted and marked as $P < 0.1$ (* or #), 0.01 (** or ##) and 0.001 (***) or (###). The mark of star is Normal group (N) versus Untreated control group (C) and the mark of pound is untreated control group (C) versus Treated group (T).

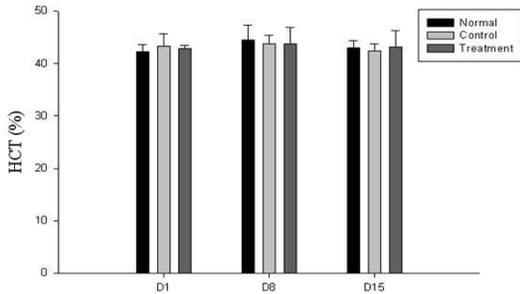


Fig. 9. Hematologic changes of hematocrit in the burn-induced mice.

Values are expressed as mean±standard deviation (mean±S.D.), and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey HSD test. A criterion of significance was accepted and marked as P<0.1(* or #), 0.01(** or ##) and 0.001(*** or ###). The mark of star is Normal group (N) versus Untreated control group (C) and the mark of pound is untreated control group (C) versus Treated group (T).

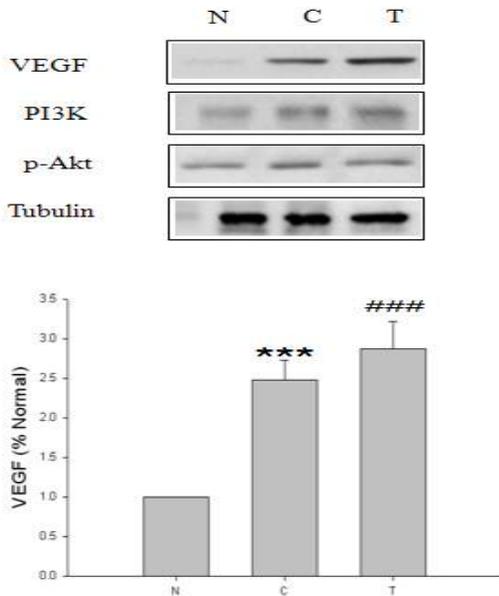


Fig. 10. Effects of Gamijaungo on VEGF, PI3K and pAkt protein expression (A) and the inhibitory percentage of VEGF, PI3K and pAkt expression (B).

Values are expressed as mean±standard deviation (mean±S.D.), and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey HSD test. A criterion of significance was accepted and marked as P<0.1(* or #), 0.01(** or ##) and 0.001(*** or ###). The mark of star is Normal group (N) versus Untreated control group (C) and the mark of pound is untreated control group (C) versus Treated group (T).

IV. 고찰

인류가 불을 발견한 이래 인간은 항상 火傷의 위험 속에서 살고 있다. 경미한 화상은 별 문제 없이 저절로 치유되기도 하지만 2도 이상의 화상에서는 반흔 조직으로 인해 신체기능 뿐만 아니라 미관상으로도 부정적인 영향을 초래하며 항상 노출해야 하는 안면 부 화상은 심한 기능장애와 추한 모습 때문에 어느 질병보다 잔인한 후유증으로 크나 큰 고통을 안고 산다²⁸⁾.

피부는 외부의 감염 또는 물리, 화학적 자극으로부터 1차적인 보호장벽으로 작용한다. 따라서 화상에 의한 피부의 손상은 다양한 염증반응과 더불어 면역기능의 불균형을 유발하게 된다²⁹⁾. 피부의 손상은 Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 및 Interleukin-6 등의 염증매개인자의 함량변화를 통한 염증반응의 조절과 더불어, 염증부위에 백혈구의 침윤, 특히 단핵구 및 대식세포의 침윤을 발생시키는데, 이것은 chemotactic cytokine의 국소적 생성 때문인 것으로 보고되고 있다³⁰⁾. 또한 호중구의 침윤은 hydrogen peroxide의 생성을 가져오고, 이는 혈관의 투과성을 증대시키므로 호중구의 침윤 증가가 피부화상의 과정에 밀접한 관련성을 가지고 있다고 볼 수 있다³¹⁾.

VEGF는 혈관의 투과성을 증가시켜서 염증관련 매개체 및 염증세포를 포함한 혈장단백 등이 혈관 외로 이동하는 것을 돕는다. 그래서 VEGF는 혈관신생에 관련된 중요한 타겟 분자로 작용할 수 있고, PI3K 역시 중요한 신호전달 효소로서 Tyrosine kinase 수용체, GPCR 혹은 사이토카인 수용체의 활성화에 의해 궁극적으로 세포의 성장, 분화, 생존, 증식, 이동 및 사이토카인 생성 등에 관여한다. 이 기전은 생체 내에서 다양한 역할을 하게 되는데, 세포의 이동, 혈관 투과성, 세포의 생존 및 증식에 관여 된다⁹⁻¹²⁾.

열화상의 경우 화상의 깊이에 따른 분류를 보통 사용하는데, 1도 화상의 경우 피부의 표피층에만 손상된

상태로 통증이 있고 피부가 붉게 변하지만 수포는 생기지 않는다. 저온의 열에 오랫동안 노출되거나, 열원에 짧은 시간동안 노출되었을 경우에 발생한다. 단지 표피의 일부 세포만 파괴되기 때문에 대개 흉터가 남지 않고 수일 내에 회복된다. 2도 화상의 경우 피부의 진피층의 일부가 손상된 화상으로 심한 통증과 수포가 형성되는 것이 특징이다. 수포는 감염이나 체액손실을 유발하지 않기 때문에 현장에서 터트려서는 안된다. 감염 등의 합병증이 발생하지 않으면 일반적으로 2~3주 내에 치유된다. 3도 화상은 표피나 진피의 완전한 파괴를 일으키고 진피 아래의 피하지방층까지 손상된 화상이다. 3도 화상을 입은 부분은 건조되어 피부가 마른 가죽처럼 되면서 색깔이 갈색 또는 흰색으로 변한다. 말초신경과 혈관이 파괴되기 때문에 3도 화상을 입은 부분은 감각이 마비되지만, 3도 화상보다 깊지 않은 주변부위에서 심한 통증을 느낄 수 있다^{2,32)}.

한의학 문헌에서 화상은 “燙火傷”이라 하여 《葛洪肘後備急方》과 南齊《劉涓子鬼遺方》에서 화상에 대하여 최초로 언급되었고³³⁾, 燒傷, 湯火瘡, 水火燙傷, 등으로도 불리운다. 화상의 치료는 당대 孫思邈의 《備急千金要方》³⁴⁾에서 화상의 辨證論治에 일정한 경험이 축적되어 “火瘡用梔子, 黃芩, 白薇煎湯以淋瘡, 會溜去火熱毒”라 하였고, 王燾의 《外臺秘要》에는 의용하는 약을 발라 瘡面을 보호하여 愈습하도록 하였다. 明代 의가들은 辨證論治에 일정한 경험이 있어 가벼운 경우와 중한 경우를 구분하여 치료에 임하였다. 王肯堂의 《證治準繩》에는 破傷風과 燒傷의 관계에 대해 제시하였고 陳實功의 《外科正宗》과 汪機의 《外科理例》에서는 화상에 대한 증상기록이 자세하게 나와 있다. 또한 외치법의 충실한 발전 외에 “火毒內攻”으로 다종변증이 발생하는 것을 주의하였다. 清代에는 온병학설의 영향으로 화상의 원인병기, 예후 판단과 치료방법에서 진일보가 있었다. 陳士鐸의 《外科秘錄》에서 심한 화상은 주요 사망원인이 火毒內攻이고 중증화상에서 內外同治의 중요성을 제시하

였고 吳謙의 《醫宗金鑑》에서는 증상 치료원칙 예후에 대해 논하면서 水疱를 터트리는 외치법과 二便을 通利 시켜 열독을 제거하는 방법의 중요성을 제시하였다³⁵⁾.

화상의 治法은 肌膚에만 국한된 輕症에는 외용약을 통한 外治法을 사용하고, 傷處死肉하여 不作痛하거나, 不潰하고, 煩燥, 作嘔, 口乾, 便秘, 神昏 등이 병발하는 重症에는 내복약을 併用한다³⁶⁾. 실험에 쓰인 加味紫雲膏는 紫草, 當歸, 黃柏, 甘草, 黃芩, 金銀花로 이루어져있고 80% 에탄올의 추출물을 마셀린과 함께 섞어 부착성을 높인 후 사용하였고 외용약을 통한 화상치료의 효과를 살펴보았다. 加味紫雲膏를 구성하는 약재의 효능을 살펴보면 紫草는 性은 寒無毒하고 味는 甘하여 心, 肝經으로 들어가고 涼血活血 解毒透疹하여 癩疹 瘡瘍 濕疹 水火湯傷을 치료한다²³⁾. 또한 Naphthoquinone유도체인 acetylshikonin(C18H18O6) shikonin(C16H16O5) 등이 함유되어 있어서 세살을 빨리 듣게 하고 모세혈관 투과성을 억제하여 항염증 작용이 있다고 하였다³⁷⁾. 當歸는 性은 溫無毒하고 味는 甘辛하다. 補血活血하며 또한 行氣止痛하는 效能이 있어 心肝脾 三經에 작용한다. 모든 血症을 治療하여 破惡血 養新血하고 癰疽瘡瘍 跌打損傷을 치료한다. 外用으로는 腫瘍期の 散瘀消腫과 潰瘍期の 排膿生肌 및 外傷의 瘀腫疼痛에 작용한다²³⁾. 약리학적으로는 항균작용³⁸⁾, 소염작용, 진통작용, 혈액 및 조혈계통에 대한 작용, 면역계에 대한 작용, 심혈관계에 대한 작용이 있다³⁹⁾. 黃柏은 性은 寒無毒하고 味는 苦하다. 濕熱을 清熱燥濕시키는 효능이 있어 瘡毒을 치료한다²³⁾. 또한 약리학적으로 항균작용이 우수하다⁴⁰⁾. 甘草는 性은 平無毒하고 味는 甘하다. 和中緩急하고 潤肺 解毒하는 效能이 있다. 生用시 癰疽瘡瘍을 治療한다²³⁾. 또한 감초에서 추출하는 글리시리진(glycyrrhizin)이라는 성분이 중증 화상 유도 동물에서 antimicrobial peptides 단백질 생산 능력 강화를 통해 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) 감염의 예방을 하고 이를 통해 화상의 회복을 돕는다는 보고²¹⁾와 전신의 염증

기전의 조절을 통해 염증반응을 억제한다는 보고²²⁾ 등을 통해 화상의 회복에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 黃芩은 性은 寒無毒하고 味는 苦하다. 苦味는 燥濕하고 寒性은 清熱하여 肺經의 熱을 瀉하는데 우수하다²³⁾. 약리작용으로는 항염증작용, 항암작용, 접착성 피부과민반응 억제, 항류마티즘작용, 간 기능보호효과, 항산화효과, 항균효과, 항고지혈효과, 심근 허혈-재 관류 손상 억제효과, 항불안효과 등이 보고되고 있다⁴¹⁾. 金銀花는 性은 寒無毒하고 味는 甘하다. 清熱解毒, 涼散風熱하여 癰腫疔瘡 熱毒血痢 溫病發熱을 치료한다²³⁾. 약리작용으로는 항균작용, 세포성장 촉진작용, Human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase activity 저해작용, 항염증작용, 항산화작용, 항암작용, 과산화지질생성 억제작용이 보고되고 있다^{42,43)}.

이상의 본초의 主治와 效能으로 볼 때 加味紫雲膏는 清熱涼血 祛瘀止痛 養血生肌 排膿療瘡하는 외용약으로 火傷으로 인한 초기 염증단계 뿐만 아니라 創傷治癒의 모든 단계에 유효할 것으로 사료된다.

실험결과 화상이 유발된 실험동물의 경우 조직학적 관찰에서 일반적으로 많은 경우인 2도 화상을 확인할 수 있었으며, 가미자운고의 도포 치료 15일째 조직학적으로 상피조직의 재생과 진피층의 회복을 관찰할 수 있었고, 그 사이 2차적인 감염 등은 발생하지 않았다. 또한 화상부위의 외관적인 양상 또한 회복추세를 뚜렷이 보여주었고, 화상의 가로세로의 직경 또한 비치료군에 비해 유의하게 감소함을 보여주었다. 혈액학적 변화의 경우 염증반응의 진행과 관련된 백혈구의 수치가 화상 정상군에 비해서 1일, 8일, 15일 모두 화상유도군에서 유의하게 백혈구 수치가 증가하였고, 가미자운고 처리군에서 8일째와 15일째 증가된 백혈구 수치가 유의하게 감소하였다. 특히 15일째의 경우 정상수준에 가까운 백혈구수치를 보여주었다(Fig. 5). 혈소판의 경우 정상군에 비해서 8일, 15일에서 화상 유도군에서 유의하게 혈소판이 감소하였고, 가미자운고 처리군은 치료 8일과 15일째 혈소판 수치가 비치

료군에 비해 유의하게 증가하였다. 1일째는 변화가 없었다(Fig. 8). 그러나 적혈구 및 헤모글로빈은 일부 변화를 관찰하였으나 뚜렷한 경향성을 발견하지 못하였으며, 헤마토크리트는 유의한 변화를 일체 보이지 않았다. VEGF와 PI3K 및 그 하위기전에 pAkt 발현의 경우 가미자운고 처리군이 비치료군에 비해 유의하게 세 단백질의 발현을 증가시켰다(Fig. 10).

이 연구의 제한점으로는 혈액투과성에 관련된 단핵구나 대식세포에 대한 혈액학적 자료가 없이 백혈구의 수치만을 보았다는 것과, 염증매개인자인 TNF- α , Interleukin 1 및 6 등의 발현에 대한 자료가 없다는 점이다.

대부분의 화상 관련 기전연구로는 염증매개인자나 면역관련인자에 대한 분자생물학적 연구가 이루어졌으나, 혈관신생 및 성장관련 인자에 대한 연구는 부족하였다. 인슐린에 의해 유도된 혈관신생에 있어서의 세포 및 분자생물학적 연구가 이루어졌으나 이 또한 간단한 Wound healing assay로 이루어졌다⁴⁴⁾. 이러한 의미에서 화상모델에서 화상개선효과의 외형적인 변화, 조직학적 관찰 및 혈액학적 변화와 더불어, 화상 상처의 마지막 반응단계인 조직의 상처수축과 혈관생성에 대한 분자생물학적 기전을 본점에 큰 의의를 부여 할 수 있다.

결론적으로 加味紫雲膏는 화상조직의 회복을 현저히 촉진시켰으며, 혈액학적 개선효과 또한 보여주었다. 그 기전에 대한 연구로는 VEGF의 발현과 하위 기전인 PI3K 및 Akt 단백질의 발현을 촉진시킴으로 보아 보통 생존 경로인 PI3K-Akt Pathway의 증진에 의한 혈관생성이 촉진되어 상처회복에 기여한 것으로 보여지지만 구체적인 매커니즘에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

가미자운고가 2도 화상조직 회복에 관여하는 바를

알아보기 위하여 실험동물 27마리를 정상군, 화상유도군, 가미자운고 처리군의 세 군으로 설정하고, 2도 화상 처리한 mouse를 15일 동안 이틀에 한 번씩 가미자운고를 도포하면서 병리 조직학적 관찰과 혈액학적 변화를 관찰 하였고, 혈관신생단백질의 발현에 미치는 영향을 확인한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가미자운고 처리군이 비처리군에 비하여 화상치유 효과가 큰 것을 확인할 수 있었다.
2. 가미자운고가 화상후의 변화된 피부조직에 미치는 조직학적 개선효과의 경우 가미자운고 처리군이 비처리군에 비해 상피층의 형성을 통한 회복과 상피층 전반에 걸친 기저세포들의 분열을 관찰할 수 있었다.
3. 정상군에 비해서 모든 화상유도군에서 유의하게 백혈구 수치가 증가하였고, 가미자운고 처리군에서는 비처리군에 비해 백혈구 수치가 유의하게 감소하였다.
4. 화상 모델의 혈소판의 수치 변화를 보면 정상군에 비해서 화상유도군에서 유의하게 혈소판이 감소하였고, 가미자운고 처리군에서는 혈소판 수치가 비처리군에 비해 유의하게 증가하였다.
5. VEGF와 PI3K 및 그 하위기전에 pAkt 발현의 경우 가미자운고 처리군이 비처리군에 비해 유의하게 세 단백질의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과 가미자운고는 화상조직의 회복을 현저히 촉진시켰으며, 혈액학적 개선효과 또한 보여주었다. VEGF의 발현과 하위 기전인 PI3K 및 Akt 단백질의 발현을 촉진시킴으로 보아 PI3K-Akt Pathway의 증진에 의한 혈관생성이 촉진되어 상처회복에 기여한 것으로 보인다. 이 연구결과를 바탕으로 기존 한의학적인 화상치료에 대한 개념과 분자생물학적 기전을 밝힘으로써 한약제제의 활성화에 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임.

References

1. Kang YH. Encyclopedia of Life Science. Seoul:Academic books, 2009.
2. Kang JS. Plastic Surgery. Seoul:Kunja Publisher, 2004:471-538.
3. Cho SH, Choi SI. A Clinical Review of 1420 Burn Cases. Journal of the Korean Surgical Society. 1998;54(3):305-12.
4. Greenhalgy DG. The role of growth factors in wound healing. J Trauma. 1996;41(1):159.
5. Htherill JR, Till GO, Bruner LH, Ward PA. Thermal injury, Intravascular Hemolysis and Toxic Oxygen Products. J Clin Invest. 1986;78:629-36.
6. Choi BJ. Advanced in wound care. Seoul:Korea medical book, 2002:43-91.
7. Kaufman T, Nathan P, Levin M, Hebda PA, Eichenlaub EH, Korel B. Drug-loaded synthetic dressings: effect on contraction, epithelization, and collagen synthesis of deep second-degree experimental burns, Ann. Plast. Surg. 1985;14:420-7.
8. Cho AR. Effect of Silver sulfadiazine on the Skin Cell Proliferation and Wound Healing Process in Hairless Mouse 2nd degree Burn Model. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2002;32(2):113-7.
9. Lee KS, Park SJ, Kim SR, Min KH, Lee KY, Coe YH, Hong SH, Kim JS, Hong SJ, Lee

- YC. Inhibition of VEGF blocks TGF- β 1 production through a PI3K/Akt signaling pathway. *Eur Respir J*. 2008;31:523-31.
10. Lee KS, Park SJ, Kim SR, Park SJ, Lee HK, Park HS, Min KH, Jin SM, Lee YC. Phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) reduces vascular endothelial growth factor expression in allergen-induced airway inflammation. *Mol Pharmacol*. 2006;69:1829-39.
 11. Lee KS, Park SJ, Kim SR, Min KH, Jin SM, Puri KD, Lee YC. Phosphoinositide 3-kinase- δ inhibitor reduces vascular permeability in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:403-9.
 12. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem*. 1999;274:10002-7.
 13. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341:738-46.
 14. Hassam W, Zhang R, Lin M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and α -smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res*. 2000;300:97-109.
 15. Shisudomyoung. Hanbang Chiryō Backhaw. Seoul:Dongnam Publisher. 1991:412-31.
 16. Yeo EJ, Han JK, Kim YH. Effects of Atopy Cream-combined with Jawoongo Ointment on the Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mouse. *J Korean Oriental Pediatrics*. 2009;23(1):37-72.
 17. Yeo EJ, Han JK, Kim YH. Topical Application of Atopy cream-Jawoongo ointment(A-J) of Ointment Inhibits Biostir mite antigen cream induced Atopy Dermatitis by Local Action in NC/Nga Mice. *Oriental medicine of Daejeon University*. 2008;17(2):185-98.
 18. Eo KJ, Ko WS, Kim YK. The effects of Jowoongo on the artificial wound on rat skin. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 1998;11(1):54-68.
 19. Lee YT. The effects of jawoongo mixture on wound healing. *Dong-Eui university Dong-Eui Papers*. 1998;28(1):547-58.
 20. Kim SK, Choi HY, Ji SY, Lee SG. 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(4):137-60.
 21. Yoshida T, Yoshida S, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Pivotal advance:glycyrrhizin restores the impaired production of beta-defensins in tissues surrounding the burn area and improves the resistance of burn mice to *Pseudomonas aeruginosa* wound infection. *J Leukoc Biol*. 2010;87(1):35-41.
 22. Takei M, Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F. Glycyrrhizin inhibits the manifestations of anti-inflammatory responses that appear in association with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions. *Cytokine*. 2006;35(5-6):295-301.
 23. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee. *Bonchohak*. Seoul:Yeongrimsa,

- 1995:178-9, 182-3, 196-9, 540-1, 578-80.
24. Ji KY. A Study on Histological Recuperative Effect of Burn Remedies. Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology. 2002;16(4): 774-81.
 25. Ministry of Health & Welfare. Preparation of soft hydrogel for wound healing. 2001.
 26. Min DH, Kim DK, Lim JP, Yang JH. Transdermal Drug Deliver & Therapeutic Effect of the Preparations of Lithospermi Radix and Gardeniae Fructus Extract on the Burn & Wound Healing. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2005;35:255-63.
 27. Bruen KJ, Campbell CA, Schooler WG, deSerres S, Cairns BA, Hultman CS, Meyer AA, Randell SH. Real-time monitoring of keratin 5 expression during burn re-epithelialization 1. Journal of Surgical Research. 2004;120:12-20.
 28. Lee HJ, Ahn DH, Yu TH, Park HS. Psychological Responses in Burn Patients. Journal of Korean Neuropsychiatric Association. 1998;37(6):1158-66.
 29. Alexander JW. Mechanism of immunological suppression in burn injury. J. Trauma. 1990;30:70.
 30. Schall T. The cytokine Handbook. New York, Academic Press. 1999.
 31. Herberston BM, Lee YM, Cho HG, Cho OJ, Repine JE. Alveolar type 2 cell abnormalities and peroxide formation in lungs of rats given IL-1 intratracheally. Inflammation. 2000;24(4): 289-303.
 32. Korean Dermatological Association Dermatology Textbook Editing Board. Textbook of Dermatology. Seoul:Ryomoongak, 1994:114-5.
 33. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Surgery in Chinese Medicine. Beijing:People's medical publishing house. 1999:414
 34. Son SM. Bigeupcheongeumyobang. Seoul: Daesung publisher. 1984:459.
 35. National Oriental Medical School Dermatology & Surgery Textbook Editing Board. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Busan:Sun Wo Publisher. 2007:263-70.
 36. Yu MK, Jeong DH, Sim SH, Park SY, Kim JH, Choi JH. A Literature Study on the External Treatment of a Burn. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2003; 16(3):38-67.
 37. Science encyclopedia publisher. Component and the use of herbs. Seoul:Ilwolbooks 1999:593-5.
 38. Min KA. Study on the antimicrobial effect of angelica gigas. Catholic University Graduate School, 1996.
 39. Kim HC. Herbal medical pharmacology. Seoul:Jipmoondang. 2001:422-7.
 40. Park WY, Jang DS, Cho HR. Screening of Antimicrobial Activity for Medicinal Herb Extracts. J. Korean Soc. Food Nutr. 1992;21(1):91-6.
 41. Kim YH, Park YS. Effect of Scutellaria baicalensis Water Extract on Antioxidative Activity and Epidermal Thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis Animal Model. J. Korean Soc. Food Nutr. 2006;35(5):543-8.
 42. Lee GT, Choi BT, Lee YT, Ko WS, Lee GT. The Effects of Jawoongo plus Flos Lonicerae on The Artificial Wound on Rats. J. Korean

Med, 1999;20(1):132-41.

43. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park SJ, Kwon YG, Beon SH. Effect of Lonicerae Flos-Skin on Contact Hypersensitivity induced by Repeat Elicitation of DNCB. The Korea Journal of Herbology, 2006;21(1):9-15.
44. Liu Y, Petreaca M, Martins-Green M. Cell and molecular mechanism of insulin-induced angiogenesis. J Cell Mol Med, 2009;13(11-12):4492-504.