창상을 유발한 흰쥐에서 金銀花 추출물의 치료 효과

원제훈* · 우창훈†

동국대학교 경주한의원 한방재활의학과*, 대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실†

The Effect of *Lonicera japonica* Extract in Wound-induced Rats

Je-Hoon Won, K.M.D.*, Chang-Hoon Woo, K.M.D.†

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Gyeongju Oriental Medicine Clinic*,
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University†

Objectives This study is carried out to investigate the effects of *Lonicera japonica* in wound-induced rats.

Methods Rats were divided into 5 groups; normal (Nor), control (Veh), positive comparison (PC), *Lonicera japonica* 100 mg/kg (LL), *Lonicera japonica* 200 mg/kg (LH), each n=8. Total polyphenol and flavonoid were quantified. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging activation were measured. Reactive oxygen species (ROS) was measured in serum. Antioxidant factors and inflammatory factors were measured in skin tissue, and also hydroxyproline content. Skin tissue was analyzed by Hematoxylin & Eosin and Masson's trichrome staining method.

Results Total polyphenol and flavonoid were 32.86 ± 0.14 mg/g and 67.17 ± 0.57 mg/g. The IC₅₀ values of DPPH and ABTS free radical scavenging activation were 26.69 ± 1.50 µg/mL and 49.33 ± 4.52 µg/mL. ROS was significantly lower in LL and LH groups. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) was significantly higher in LH group and higher in LL group but not significant. Superoxide dismutase 1 (SOD-1), catalase, and heme oxygenase 1 (HO-1) were significantly higher in LL and LH groups. Nuclear factor kappa-B p65 (NF-κBp65), phosphorylated iκBα (p-iκBα), cyclooxygenase 2 (COX-2), and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were significantly lower in LL and LH groups. Hydroxyproline was significantly higher in LL and LH groups. The histopathologic analysis showed that skin tissue had recovered further more in LL and LH groups than in Veh group.

Conclusions These results suggest that *Lonicera japonica* has the anti-oxidant, anti-inflammatory and healing effects in wound-induced rats. (*J Korean Med Rehabil* 2020; 30(1):47-61)

RECEIVED December 12, 2019

ACCEPTED December 30, 2019

CORRESPONDING TO

Chang-Hoon Woo, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Daegu Haany University Pohang Korean Medicine Hospital, 411, Saecheonneon-daero, Nam-gu, Pohang 37685, Korea

TEL (054) 281-7901

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Lonicera japonica*, Antioxidants, Inflammation, Wound healing

서론»»»»

인체에서 가장 큰 기관인 피부는 외부의 여러 유해한 자극으로부터 인체 내부를 보호하고 체액의 손실을 방지하며 유해물질이 유입되는 것을 막아 생명 유지에 중

요한 역할을 한다¹⁾.

사회문화의 변화에 따라 피부에 대한 사람들의 인식이 변화였으며 피부 관리와 미용에 대한 관심이 증가하였다. 상해로 인한 피부 손상과 수술 후에 발생하는 수술흔에 대해서도 단순히 치료만 하는 것이 아니라 회복

이후에 남은 흉터를 최소화하기 위한 관리의 필요성이 커지고 있으며 이에 따라 더 나은 창상 치료 및 관리 방법을 찾기 위한 노력도 늘어나는 추세이다²⁾.

피부 손상과 창상 치료에 대한 최근의 한의학적 연구 동향을 보면 Kwon 등³⁾의 楡根皮, 三七根, 龍腦 복합 좌욕제, Kim⁴⁾의 當歸飲子, Bak 등⁵⁾의 當歸鬚散, Jung 등⁶⁾의 桂枝茯苓丸 등 처방 및 복합제를 이용한 연구가 있었고, Han 등⁷⁾과 Hong 등⁸⁾의 黃芪 단일 본초 및 약침을 이용한 연구가 있었으며, Kim 등⁹⁾의 慈雲膏와 항생제를 병용한 연구, Song 등¹⁰⁾의 중합가시광선을 이용한 연구가 있으나 아직 그 수가 부족하며 더 많은 한의학적 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서 금은화(金銀花, *Lonicera japonica* flos)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속한 다년생 半常綠木質藤本인 인동 덩굴(*Lonicera japonica* thunb)의 꽃으로서 清熱解毒, 涼散風熱, 涼血止痢하는 효능을 가지고 있어 熱毒瘡癰을 치료하는 要藥이 된다¹¹⁾. 금은화에 관한 최근의 연구들을 살펴보면 Yun 등¹²⁾, Lee 등¹³⁾, Yun과 Lee¹⁴⁾, Kang 등¹⁵⁾의 연구에서는 금은화 추출물이 염증 매개 물질을 억제하여 항염증 효과가 있음을 밝히고 있으며 Seo와 Choi¹⁶⁾, Cha 등¹⁷⁾의 연구에서는 금은화 추출물이 산화적 스트레스를 억제하는 항산화 효과를 가지고 있음을 보여주고 있다. 이와 같은 사실에 근거하여 본 저자는 清熱解毒의 효능을 가진 금은화가 창상 부위의 염증을 조절하고 창상을 치유하는 데 효과가 있을 것으로 판단하였으며 이를 실험적으로 검증하고자 하였다.

이에 본 연구에서 흰쥐의 등에 인위적으로 창상을 유발하고 금은화 추출물을 경구투여한 후 항산화 효능을 평가하고, western blot 분석을 실시하여 창상이 유발된 피부 조직의 항산화 관련 인자와 염증 관련 인자의 활성을 측정하였으며, 창상 부위를 조직학적으로 분석하였다. 이상의 연구를 통해 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 약재

금은화(金銀花, *Lonicera japonica* flos, China)는 웅기 한약국(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 금은화 200 g을 분쇄하여 50% 에탄올(에탄올 1 L, 물 1 L)에 24시간 냉침 후 여과지(Whatman No.2; GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, Sunil Eyela Co. Ltd, Seongnam, Korea)를 사용하여 50°C에서 감압농축한 후 동결건조하여 분말 44.3 g을 얻었으며(수율 22.15%) -20°C에서 보관하여 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 흰쥐로 4주령 수컷 40마리를 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입하였고 1주일 동안 실험실 환경에 적응한 후 사용하였다. 사육실 환경은 conventional system으로 온도와 습도는 각각 22±2°C, 50±5%로 설정하고 명암주기(light-dark cycle)는 12시간으로 조절하였다. 사료는 고형사료(Samyang, Seoul, Korea)(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가)를 사용하였으며 물과 함께 충분히 공급하였다. 실험은 동물관리 규정을 준수하였으며 대한한의대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DHU2018-053)을 얻어 시행하였다.

3) 시약

본 실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), diethylene glycol, 2,2'-azino-bis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), gallic acid, naringin은 Sigma Aldrich Co. Ltd (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) reagents kit는 ASAN (Hwaseong, Korea)에서 구입하였다. Blood urea nitrogen (BUN) assay kit는 ASAN에서 구입하였고, creatinine assay kit는 Biosystems S.A. Ltd. (Barcelona, Spain)에서 구입하였다. Hydroxyproline assay kit는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. 25 mM

2',7'-dichlorofluorescein diacetate는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagents는 GE Healthcare에서 구입하였다. Phosphorylation of nuclear factor kappa-B (NF- κ B), cyclooxygenase 2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), superoxide dismutase (SOD), catalase, heme oxygenase 1 (HO-1), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), phosphorylated κ B α (p- κ B α)와 κ B α , histone, β -actin는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체인 rabbit IgG antibody, mouse IgG antibody는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다. 단백질을 정량하기 위한 bicinchoninic acid protein assay kit는 Thermo Fischer Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4) 기기

본 실험에서는 전자체중계(CAS, Yangju, Korea), vortex mixer, deep-freezer (Sanyo Co., Osaka, Japan), Infinite M200 pro 흡광도 측정기(Tecan, Männedorf, Switzerland), BX-51 형광현미경(Olympus Co., Tokyo, Japan), 냉장 초고속 원심분리기(Labogene, Seoul, Korea), tissue grinder (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA), 생화학자동 분석기 Hitachi-720 (Hitachi Medical Co., Chiba, Japan) 등의 기기를 사용하였다.

2. 방법

1) 창상 유발 및 약물 투여

실험동물을 난괴법으로 각 군별 8마리씩 5개의 군으로 나누었다. 정상군을 제외한 나머지 군에서 실험동물을 마취하고 등 부위를 제모한 후 피혁용 펀치(biopsy punch 8 mm)를 사용하여 좌우대칭의 원형 결손창을 2개 만들어 창상을 유발하였다. 습윤 드레싱제를 사용하여 창상을 덮어주었으며 각 케이지에 한 마리씩 수용하였다. 약물투여군은 경구투여용 존대를 이용하여 금은화 추출물을 경구투여하였으며 양성대조군은 상처치료제로서 인지도가 높은 20 mg/g의 후시딘산나트륨이 함유된 연고를 도포하였다. 약물 처치는 3주간 매일 같은 시간에 1회

실시하였다.

- (1) 정상군(Nor군): 창상을 유발하지 않고 아무런 처치를 하지 않음.
- (2) 대조군(Veh군): 창상 유발 후 아무런 처치를 하지 않음.
- (3) 양성대조군(PC군): 창상 유발 후 상처치료용 연고를 도포
- (4) 저농도투여군(LL군): 창상 유발 후 금은화 추출물 100 mg/kg 경구투여
- (5) 고농도투여군(LH군): 창상 유발 후 금은화 추출물 200 mg/kg 경구투여

2) 항산화능 측정

(1) Polyphenol 총 함량

Polyphenol 총 함량은 Folin-Denis법¹⁸⁾을 이용하여 측정하였다. 시료 25 μ L (1 mg/mL)와 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 그 후 10% sodium carbonate 500 μ L를 더하여 30°C의 인큐베이터에서 90분 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였으며, gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 polyphenol의 총 함량을 구하였다.

(2) Flavonoid 총 함량

Flavonoid 총 함량은 Davis법을 변형한 방법¹⁹⁾에 따라 측정하였다. 시료 300 μ L와 diethylene glycol 600 μ L를 잘 혼합한 후 이 혼합물에 1 N NaOH 6 μ L를 가하여 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, naringin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 flavonoid의 총 함량을 구하였다.

(3) DPPH free radical 소거능

DPPH free radical 소거능 측정은 DPPH법²⁰⁾을 이용하였다. 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ L와 0.2 mM DPPH 용액 100 μ L를 잘 혼합하고 37°C의 암소 상태에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 군과 시료를 첨가한 군의 흡광도 차를 IC₅₀ 값으로 나타내었고 다음의 식을 이용하여 산출하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH free radical 소거능(%)

$$= \{1 - (\text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무첨가군의 흡광도})\} \times 100$$

(4) ABTS free radical 소거능

ABTS free radical 소거능 측정은 Re 등의 방법²¹⁾을 이용하였다. 농도별로 희석한 시료에 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM의 potassium persulphate를 혼합하고 실온의 암소 상태에서 16시간 이상 방치하여 ABTS를 형성한 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 (± 0.02)이 되도록 100% 에탄올로 희석하였다. 이렇게 희석된 용액 900 μ L에 시료 100 μ L를 가하고 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 군과 시료를 첨가한 군의 흡광도 차를 IC₅₀ 값으로 나타내었고 다음의 식을 이용하여 산출하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

ABTS free radical 소거능 (%)

$$= \{1 - (\text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무첨가군의 흡광도})\} \times 100$$

3) 조직 채취 및 혈청 분석

실험동물의 상처부위를 근막 위까지 절개하여 상처 조직 절편을 얻었다. 실험동물을 12시간 동안 절식시킨 후 복대정맥에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었고 혈청은 -80°C에서 보관 후 분석에 사용하였다. 간기능 손상 지표인 AST와 ALT, 신기능 손상 지표인 BUN과 creatinine을 각각 측정 프로토콜에 따라 측정하여 분석하였다.

4) 혈청 내 reactive oxygen species (ROS) 측정

ROS의 측정은 Kooy의 방법²²⁾을 이용하였다. 혈청과 25 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate를 혼합한 후 0분부터 매 10분마다 530 nm의 emission 파장과 485 nm의 excitation 파장을 이용하여 형광 광도계로 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

5) 피부 조직 western blot 분석

피부의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M dithiothreitol (DTT), protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder로 조직을 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다.

아이스 위에서 20분 동안 정치시키고 2분간 원심분리 (12,000 rpm)하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40이 더해진 buffer A에 2회 세척하고 100 mL의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 다음 10분 간격으로 vortex를 3회 시행하였다. 4°C 환경에서 10분간 원심분리(12,000 rpm)한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 분리하여 -80°C에서 냉동 보관하였다. 피부 조직 세포질의 β -actin, histone, Nrf2, SOD, catalase, HO-1, NF- κ B, p-ikBa, COX-2, TNF- α 의 발현을 측정하기 위해 10 mg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동한 후 nitrocellulose membrane으로 acrylamide gel을 이동시켰다. Membrane에 각각의 1차 항체를 처리한 후 4°C에서 overnight시킨 다음 phosphate buffered saline with tween 20 (PBS-T)로 6분 간격으로 5회 씻어내고 각각에 상응하는 2차 항체(PBS-T로 1 : 3,000 희석)를 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 PBS-T로 6분 간격으로 5회 세척하였다. 그리고 ECL 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Co., Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

6) 피부 조직의 hydroxyproline 측정

조직 10 mg 당 100 μ L의 dH₂O를 첨가하고 유리비드로 균질화하였다. 균질액 100 μ L에 10 N 농축 NaOH 100 μ L를 첨가하였다. 뚜껑이 단단히 조여졌는지 확인하고 120°C에서 1시간 가열한 후 뚜껑을 열기 전에 잠시 식힌 다음, 10 N 농축 HCl 100 μ L를 넣어 잔여 NaOH를 중화시켰다. Centrifuge에서 5분간 원심분리하여 가수분해 후에 잔류할 수 있는 불용품을 펠렛으로 만들고 상층액을 모은 뒤 각 well에 100 μ L의 산화 시약 믹스를 넣고 실온에서 20분 동안 배양시켰다. Dimethylamine borane 농축 용액 50 μ L를 각 반응 용기에 넣고 내용물을 완전히 혼합하여 마이크로 플레이트 필름으로 플레이트를 밀봉하고 인큐베이터에서 45분 동안 배양하였다. OD 560 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 및 시료 판독 값에서 blank의 평균 흡광도 값을 빼고 각 표준에 대해 보정된 흡광도 값을 최종 hydroxyproline의 양

으로 표시하였다. Hydroxyproline 농도는 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Hydrolyzed hydroxyproline concentration} = \frac{B}{V} \times D$$

B = 표준곡선으로부터 계산된 샘플 내의 가수분해된 hydroxyproline의 양 (μg), V = well에 첨가된 샘플 부피 (μL), D = 표본이 표준곡선 범위에 맞게 희석된 표본 희석 계수.

7) 조직병리학적 분석

창상 유발 후 21일째에 실험동물로부터 채취한 창상 부위의 피부 조직에 대한 조직병리학적 분석을 시행하기 위해 조직을 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정시킨 후 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 mm 두께의 조직절편을 제작하여 polylysine으로 코팅된 slide에 부착하였다. 조직 절편은 xylene을 사용하여 paraffin을 제거하고 증류수와 알코올로 10분간 함수시킨 후 세척하였다. 이후에 Hematoxylin & Eosin (H&E) 및 Masson's trichrome 염색을 시행한 뒤 광학현미경 위에서 피부 조직의 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

3. 통계처리

모든 결과의 수치는 평균과 표준편차로 나타냈으며 IBM사의 SPSS 버전 22.0 (Armonk, NY, USA)을 사용하여 일원분산분석(One-way analysis of variance)을 시행하여 각 군 사이의 통계적 유의성을 5% 수준에서 검증하였고 Tukey Multiple Comparison test를 시행하여 사후 검증하였다.

결과»»»»

1. 항산화 효능 평가

1) Polyphenol 및 flavonoid 총 함량

시료에 함유된 polyphenol과 flavonoid의 총 함량을 측정된 결과 각각 32.86±0.14 mg/g, 67.17±0.57 mg/g으로 나타났다(Table I).

2) DPPH 및 ABTS free radical 소거능

DPPH free radical 소거능 측정 결과 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.52±0.10 μg/mL, 금은화의 IC₅₀ 값은 26.69±1.50 μg/mL로 나타났으며, ABTS free radical 소거능 측정 결과, L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.45±0.11 μg/mL, 금은화의 IC₅₀ 값은 49.33±4.52 μg/mL로 나타났다(Table II).

2. 혈청 내 간기능 손상 지표

1) AST

혈청 내 AST를 측정한 결과 Nor군 124.43±2.86, Veh군 141.80±1.44, PC군 129.54±2.48, LL군 139.74±7.64, LH군 122.71±9.77로 나타났다. LH군은 Veh군에 비하여 유의하게 낮았다(p<0.05)(Fig. 1).

2) ALT

혈청 내 ALT를 측정한 결과 Nor군 45.40±3.55, Veh

Table I. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
<i>Lonicera japonica</i>	32.86±0.14	67.17±0.57

Data are expressed mean±standard error.

Table II. DPPH, ABTS Radical Scavenging Activity

Sample	Radical scavenging activity (IC ₅₀)	
	DPPH free radical (μg/mL)	ABTS free radical (μg/mL)
L-ascorbic acid	1.52±0.10	3.45±0.11
<i>Lonicera japonica</i>	26.69±1.50	49.33±4.52

Data are expressed mean±standard error.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

Fig. 1. AST and ALT level in serum. Nor: normal rats, Veh: no-treatment rats, PC: positive control, LL: rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, LH: rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, All data are expressed means±standard error, n=8 rats per group. Significance: *p<0.05 vs. Veh.

Fig. 2. BUN and creatinine level in serum. Nor: normal rats, Veh: no-treatment rats, PC: positive control, LL: rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, LH: rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg, BUN: blood urea nitrogen. All data are expressed means±standard error, n=8 rats per group.

군 50.32 ± 2.28 , PC군 50.10 ± 5.72 , LL군 50.48 ± 1.92 , LH군 48.52 ± 5.95 로 나타났다(Fig. 1).

3. 혈청 내 신 기능 손상 지표

1) BUN

혈청 내 BUN을 측정한 결과 Nor군 10.61 ± 0.45 , Veh군 12.09 ± 0.31 , PC군 11.07 ± 0.77 , LL군 12.23 ± 0.76 , LH군 11.26 ± 0.51 로 나타났다(Fig. 2).

2) Creatinine

혈청 내 creatinine을 측정한 결과 Nor군 0.50 ± 0.06 , Veh군 0.78 ± 0.03 , PC군 0.73 ± 0.17 , LL군 0.71 ± 0.15 , LH군 0.47 ± 0.14 로 나타났다(Fig. 2).

4. 혈청 내 ROS

혈청 내 ROS를 측정한 결과 Nor군 $2,790.8 \pm 208.6$, Veh군 $4,497.1 \pm 719.1$, PC군 $3,425.7 \pm 561.8$, LL군 $2,909.7 \pm 437.4$, LH군 $28,45.1 \pm 491.0$ 으로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 낮게 측정되었으나 유의성은 없었고, LL군과 LH군은 Veh군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$)(Fig. 3).

5. 항산화 관련 인자 western blot 분석

1) Nrf2

Nrf2 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.6 , Veh군 0.49 ± 0.05 , PC군 0.74 ± 0.11 , LL군 0.58 ± 0.08 , LH군 0.80 ± 0.07 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 높았고($p < 0.05$), LL군은 Veh군에 비하여 높게 측정되었으나 유의성은 없었으며, LH군은 Veh군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$)(Fig. 4).

Fig. 3. ROS in serum. Nor: normal rats. Veh: no-treatment rats, PC: positive control, LL: rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, LH: rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg, ROS: reactive oxygen species. All data are expressed means $\pm$ standard error, n=8 rats per group. Significance: *p<0.05.

2) SOD-1

SOD-1 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.01 , Veh군 0.58 ± 0.07 , PC군 0.73 ± 0.07 , LL군 0.88 ± 0.09 , LH군 0.96 ± 0.05 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 높았으며 ($p<0.05$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.01$, $p<0.001$)(Fig. 4).

3) Catalase

Catalase 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.11 , Veh군 0.49 ± 0.04 , PC군 0.61 ± 0.12 , LL군 0.81 ± 0.06 , LH군 0.99 ± 0.07 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 높게 측정되었으나 유의성은 없었고, LL군과 LH군은 Veh군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.01$, $p<0.001$)(Fig. 4).

Fig. 4. Antioxidant factor western blot analysis. Nor: normal rats. Veh: no-treatment rats, PC: positive control, LL: rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, LH: rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg, Nrf2: nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, SOD-1: superoxide dismutase 1, HO-1: heme oxygenase 1. All data are expressed means $\pm$ standard error, n=8 rats per group. Significance: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Veh.

4) HO-1

HO-1 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.02 , Veh군 0.47 ± 0.10 , PC군 0.86 ± 0.14 , LL군 0.80 ± 0.17 , LH군 1.02 ± 0.16 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 4).

6. 염증 관련 인자 western blot 분석

1) NF- κ Bp65

NF- κ Bp65 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.11 , Veh군 2.00 ± 0.19 , PC군 1.44 ± 0.08 , LL군 1.49 ± 0.13 , LH군 1.38 ± 0.17 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 낮았으며 ($p < 0.05$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 5).

2) p- κ B α

p- κ B α 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.02 , Veh군 1.76 ± 0.12 , PC군 1.13 ± 0.13 , LL군 1.35 ± 0.17 , LH군 1.22 ± 0.24 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 낮았으며 ($p < 0.01$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$)(Fig. 5).

3) COX-2

COX-2 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.08 , Veh군 2.15 ± 0.21 , PC군 1.44 ± 0.19 , LL군 1.56 ± 0.17 , LH군 1.37 ± 0.25 로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 낮았으며 ($p < 0.05$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 5).

4) TNF- α

TNF- α 분석 결과 Nor군 1.00 ± 0.08 , Veh군 1.70 ± 0.10 ,

Fig. 5. Inflammation factor western blot analysis. Nor: normal rats. Veh: no-treatment rats, PC: positive control, LL: rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, LH: rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg, NF- κ Bp65: nuclear factor kappa-B p65, p- κ B α : phosphorylated κ B α , COX-2: cyclooxygenase 2, TNF- α : tumor necrosis factor alpha. All data are expressed means $\pm$ standard error, n=8 rats per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Veh.

Fig. 6. Hydroxyproline content in skin tissue. Nor: normal rats. Veh: no-treatment rats, PC: positive control, LL: rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, LH: rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg. All data are expressed means±standard error, n=8 rats per group. Significance: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Veh.

PC군 1.14 ± 0.11 , LL군 1.29 ± 0.15 , LH군 1.16 ± 0.06 으로 나타났다. PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 낮았으며 ($p < 0.001$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 5).

7. 피부 조직의 hydroxyproline

피부 조직의 hydroxyproline의 양을 측정한 결과 Nor군 0.84 ± 0.05 , Veh군 0.43 ± 0.10 , PC군 0.78 ± 0.13 , LL군 0.82 ± 0.05 , LH군 1.08 ± 0.08 로 나타났다. Nor군에 비하여 Veh군이 현저히 낮게 나타났으며, PC군은 Veh군에 비하여 유의하게 높았고($p < 0.05$), LL군과 LH군도 Veh군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 6).

8. 조직병리학적 분석

창상 유발 후 21일째에 실험동물로부터 채취한 창상 부위의 피부 조직에 대해 H&E 염색과 Masson's trichrome 염색을 실시한 후 광학현미경을 통해 관찰하였다. 양성대조군과 LL 투여군, LH 투여군은 대조군에 비해 각질층과 표피층의 두께가 얇아진 것을 관찰할 수 있었다. 또한 진피층에서 피부부속기관과 조직의 재형성이 대조군에 비하여 활발하게 일어난 것을 관찰할 수 있었다(Figs. 7, 8).

Fig. 7. Skin H&E staining histology ($\times 100$). (A) normal rats, (B) no-treatment rats, (C) positive control, (D) rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, (E) rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg. Black arrows indicate epidermal layers.

Fig. 8. Skin Masson's trichrome staining histology ($\times 100$). (A) normal rats, (B) no-treatment rats, (C) positive control, (D) rats treated with *Lonicera japonica* 100 mg/kg, (E) rats treated with *Lonicera japonica* 200 mg/kg. Black arrows indicate epidermal layers.

고찰»»»

창상은 피부의 표층을 이루는 외피와 그 아래에 존재하는 진피가 손상되어 조직의 연속성이 상실되는 것을 말하며 창상의 치유는 세포의 재생, 분화, 증식을 통해 이 파괴된 연속성을 회복하는 것을 의미한다²³⁾. 창상 치유는 외과적인 절개나 화상으로 인해 피부가 손상받았을 때 유해물질로부터 신체를 보호하기 위한 필수적인 작용이며 상처가 생긴 직후부터 시작되는데 초기의 염증 반응, 육아조직 형성 및 기질 합성 등의 과정을 통하여 이루어진다²³⁾.

창상 치유 단계는 나누는 기준에 따라 조금씩 차이가 있지만 대개 염증 단계(inflammation phase), 증식 단계(proliferation phase) 및 성숙 단계(remodeling phase)로 구분할 수 있다²⁴⁾. 각 단계는 뚜렷한 구분 없이 중첩되면서 연속적으로 진행된다. 염증 단계에는 손상받은 부위에 염증 세포가 유입되면서 염증 반응이 일어나고 상처치유 과정의 일환으로 지혈 반응이 일어난다. 증식 단계에는 조직 손상 부위의 가장자리부터 새로운 혈관이 형성되기 시작하고 섬유아세포에 의해 콜라겐의 합성이 일어나 새로운 결합조직으로 손상받은 부분을 채워 육아조직을 형성하게 된다. 창상을 입은 지 7일 이후부터는 창상 주변부가 수축하기 시작하는데 상처의 가장자리로부터 상피세포의 이주가 일어나 손상된 부분을 덮는다. 그 이후 진행되는 성숙 단계에는 섬유아세포는 점차 감소하고 육아조직이 교원질 섬유로 가득 찬 조직으로 바뀌면서 반흔을 형성한다²⁵⁾.

피부 손상과 창상 치료에 대한 한의학적 연구동향을 살펴보면, Kwon 등³⁾은 楡根皮, 三七根, 龍腦 등으로 구성된 복합 좌욕제를 도포하여 창상 치유 및 동통 감소 효과를 확인하였고, Kim⁴⁾은 當歸飮子가 혈관 신생을 촉진하고 창상 유합에 걸리는 시간을 단축시킨다는 결과를 보고하였다. Bak 등⁵⁾은 Wistar rat의 창상 치유에 있어서 當歸鬚散 주정 추출물과 테라마이신을 병용하는 것이 단독 치료보다 더 유의함을 보고하였고, Jung 등⁶⁾은 창상 유발 흰쥐에게 桂枝茯苓丸을 경구투여하여 창상 치유 효과를 확인하였다. Han 등⁷⁾은 창상 유발 흰쥐에 黃芪 추출물을 도포하여 상처 재생 효과 및 염증 반응 억제 효과를 보고하였고, Hong 등⁸⁾은 ICR mouse에 창상을 유발한 후 창상 주변에 黃芪 약침을 주입하

여 창상 회복을 촉진시키고 반흔 면적을 감소시키는 효과를 확인하였다. Kim 등⁹⁾은 慈雲膏와 Gentamicin을 병용하여 창상 감염의 원인균인 *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*에 대한 항균력과 창상 치유 효과를 보고하였고, Song 등¹⁰⁾은 3000-3002번 탄소봉을 이용한 중합가시광선이 epidermal growth factor와 transforming growth factor β 1의 발현에 영향을 주어 창상의 치유를 촉진하는 효과가 있음을 보고하였다.

한의학적으로 금은화는 熱毒瘡癰을 치료하는 要藥이 되고 邪熱을 宣散하므로 風熱表證을 治하는 효과가 우수하다고 하였으며¹¹⁾, 清熱解毒하고 涼散風熱하는 대표적인 약으로 清血, 利尿, 殺菌 작용이 있어 熱性病, 身熱無汗, 化膿性疾患, 急性性淋疾, 梅毒, 痢疾, 膿瘍, 癰疽, 疥癬腫毒惡瘡, 咽喉腫痛에 사용한다고 하였다²⁶⁾. 상기 내용으로 볼 때 금은화는 염증성 질환, 감염성 질환, 열성 질환, 피부 질환에 사용할 수 있음을 알 수 있다.

또한 금은화의 최근 연구동향에 의하면 Yun 등¹²⁾과 Lee 등¹³⁾의 연구에서 금은화가 생쥐의 RAW 264.7 대식세포에서 lipopolysaccharide로 유도된 염증 관련 인자들의 발현을 억제한다고 하였고, Yun과 Lee¹⁴⁾는 금은화 추출액이 RAW 264.7 대식세포에서 nitric oxide와 prostaglandin E2 생성을 억제한다고 하였다. Kang 등¹⁵⁾은 금은화가 type I interferon을 억제하는 기전에 관하여 보고하였으며, Seo와 Choi¹⁶⁾는 금은화가 hydrogen peroxide로 산화적 스트레스가 유도된 HaCaT 피부각질 세포에서 세포 보호 효과가 있음을 밝혔다, Cha 등¹⁷⁾의 연구에서는 dextran sulfate sodium으로 궤양성 대장염을 유도한 생쥐에서 금은화가 항염증, 항산화 효과가 있음을 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 금은화의 清熱解毒 효능과 상당 부분 부합하며 깊이 있는 연구가 진행되었다고 판단할 수 있다²⁶⁾.

본 저자는 이상의 사실을 근거로 하여 금은화가 창상 부위의 염증을 조절하고 상처를 치유하는 데 효과가 있을 것으로 생각하고 이를 실험적으로 검증하고자 하였다.

먼저 금은화의 항산화능을 알아보기 위하여 polyphenol 및 flavonoid의 총 함량과 DPPH 및 ABTS free radical 소거능을 측정하였다. Polyphenol 화합물은 flavonoid, catechin, isoflavone, anthocyanin, tannin 등으로 식물계에 폭넓게 분포되어 있으며 polyphenol 화합물이 가지고 있는 히드록실기(-OH)의 강한 결합력으로 인해

활성산소를 제거하고 지질과산화에 의해 발생하는 인체의 순환장애와 노화 등을 억제하는 항산화 기능을 갖고 있다²⁷⁾. 그 중에서 flavonoid는 식물이 자외선으로부터 자신을 보호하기 위해 만들어내는 대표적인 항산화 물질 중 하나로 활성산소를 제거하는 작용이 강하여 항염, 항바이러스, 항암 등의 효과가 있다²⁷⁾. DPPH 및 ABTS free radical 소거능은 polyphenol 화합물의 농도가 높을수록 증가하므로 polyphenol 화합물의 총 함량을 측정하는 것과 더불어 항산화능을 평가하기에 좋은 지표가 된다²⁸⁾. 그리고 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid는 강력한 항산화 비타민으로 항산화 효과를 비교하는 기준으로 사용된다²⁹⁾. 본 연구에서도 적합할 것으로 생각되어 양성대조군으로 설정하였다.

금은화 추출물의 polyphenol 및 flavonoid의 총 함량은 각각 32.86 ± 0.14 mg/g, 67.17 ± 0.57 mg/g으로 나타났으며(Table I), Free radical 소거능 측정 결과 DPPH의 경우 IC₅₀ 값 26.69 ± 1.50 µg/mL, ABTS의 경우 IC₅₀ 값 49.33 ± 4.52 µg/mL로 측정되었다(Table II). 이를 통해금은화 추출물이 항산화 작용이 있음을 알 수 있다.

금은화 추출물의 안전성을 확인하기 위해 혈청 내 간독성 및 신 독성 지표를 측정하였다. 측정 결과 AST는 LL군에서 139.74 ± 7.64 , LH군에서 122.71 ± 9.77 로 측정되었고 ALT는 LL군에서 50.48 ± 1.92 , LH군에서 48.52 ± 5.95 로 측정되었다(Fig. 1). BUN은 LL군에서 12.23 ± 0.76 , LH군에서 11.26 ± 0.51 로 측정되었고 creatinine은 LL군에서 0.71 ± 0.15 , LH군 0.47 ± 0.14 로 측정되었다(Fig. 2). 이 수치들은 Nor군과 Veh군 및 PC군과의 큰 차이를 보이지 않았고 정상 범위에 있어 금은화 추출물이 간 독성 및 신 독성을 일으키지 않았음을 확인하였다.

이어 혈청 내 산화적 스트레스에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 ROS를 측정하였다. 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS는 산소의 정상적인 대사의 부산물로 생성되는데 여러 원인에 의해 ROS 생성이 증가하고 산화적 스트레스가 지속되면 지질, DNA, 단백질 등의 손상이 가속화되어 세포사멸, 노화 등을 촉진한다³⁰⁾.

혈청 내 ROS를 측정한 결과 Veh군($4,497.1 \pm 719.1$)에 비하여 LL군($2,909.7 \pm 437.4$), LH군($2,845.1 \pm 491.0$)에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$). 상기 결과로 보았을 때 금은화 추출물이 혈청에서 ROS의 생성을 감소시켜 산화적 스트레스를 억제하는 효과

가 있다는 것을 알 수 있다(Fig. 3).

항산화 관련 인자의 발현 정도를 측정하기 위하여 western blot 분석을 실시하였다. Nrf2는 세포질에 존재하는 단백질로, 세포 내 산화적 스트레스가 증가하면 활성화되어 항산화 유전자를 작동시키는 신호 단백질(signaling protein)로 작용한다. 이 작용으로 인해 세포의 항염증, 약물대사 등과 관련된 200여 개의 유전자가 작동되어 SOD-1과 HO-1 같은 단백질이 발현되고 세포 보호 효과를 나타낸다³¹⁾. SOD-1은 항산화 효소로서 세포에 유해한 활성산소를 산소나 과산화수소로 전환시키고 다시 catalase에 의해 무해한 물과 산소로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 역할을 하며 노화 억제에 밀접한 관계가 있다³²⁾. Catalase는 산소를 접하는 거의 모든 생명체에 존재하는 효소로 SOD-1에 의해 전환된 과산화수소를 분해하는 역할을 하는데 이는 SOD-1의 작용과 더불어 ROS에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 아주 중요한 기전이다³³⁾. HO-1은 heme의 대사과정을 조절하는 효소로 heme을 분해하여 biliverdin, CO, free iron 등의 물질을 생성하는데 관여하며 다양한 스트레스성 자극에 반응하여 세포보호 작용을 하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

분석 결과 Nrf2는 Veh군(0.49 ± 0.05)에 비하여 LL군(0.58 ± 0.08)에서 높게 측정되었으나 통계적 유의성은 없었고, LH군(0.80 ± 0.07)에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$)(Fig. 4). SOD-1은 Veh군(0.58 ± 0.07)에 비하여 LL군(0.88 ± 0.09), LH군(0.96 ± 0.05)에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 4). Catalase는 Veh군(0.49 ± 0.04)에 비하여 LL군(0.81 ± 0.06), LH군(0.99 ± 0.07)에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 4). HO-1은 Veh군(0.47 ± 0.10)에 비하여 LL군(0.80 ± 0.17), LH군(1.02 ± 0.16)에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 4). 이상의 분석 결과로 볼 때 금은화 추출물이 항산화 관련 인자들의 활성을 증가시켜 창상 부위에서 항산화 및 세포보호 효과가 있을 것으로 생각된다.

염증 관련 인자의 발현 정도를 측정하기 위하여 western blot 분석을 실시하였다. NF-κBp65는 DNA 전사, cytokine의 생성, 세포 생존을 조절하는 단백질 복합체로 면역반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다³⁵⁾.

NF- κ B는 안정 시에서는 ikB α 라는 억제단백질과 결합되어 불활성 상태로 세포질에 머물고 있지만 세포 밖으로부터 유해 자극을 받게 되면 ikB α 가 p-ikB α 로 유리되어 NF- κ B가 염증 관련 인자들을 활성화시키는 전사인자가 된다. 이 과정은 ikB α 의 인산화에 의존하므로 이를 억제함으로써 염증 기전을 조절할 수 있게 된다³⁵). COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환시키는 효소로 COX-1과 COX-2의 두가지 형태로 존재한다. 그중 COX-2는 다른 효소와는 달리 오직 염증반응의 일환으로만 생성되는데, COX-2를 차단함으로써 prostaglandin 생성을 억제하고 염증 반응을 줄일 수 있다³⁶). TNF- α 는 염증반응에 관여하는 cytokine으로 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성되며 면역 세포들의 작용을 조절하는 역할을 하고 있다. 또한 TNF- α 는 내인성 발열원으로 작용하며 세포자멸사, 염증반응을 일으키는 등의 작용을 한다³⁷).

분석 결과 NF- κ Bp65는 Veh군(2.00 ± 0.19)에 비하여 LL군(1.49 ± 0.13), LH군(1.38 ± 0.17)에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 5). p-ikB α 는 Veh군(1.76 ± 0.12)에 비하여 LL군(1.35 ± 0.17), LH군(1.22 ± 0.24)에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$)(Fig. 5). COX-2는 Veh군(2.15 ± 0.21)에 비하여 LL군(1.56 ± 0.17), LH군(1.37 ± 0.25)에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 5). TNF- α 는 Veh군(1.70 ± 0.10)에 비하여 LL군(1.29 ± 0.15), LH군(1.16 ± 0.06)에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 5). 이상의 분석 결과로 볼 때 금은화 추출물이 염증 관련 인자의 활성을 억제하여 창상 부위에서 항염증 효과를 보일 것으로 생각된다.

창상 부위 조직 내의 콜라겐 양을 확인하기 위하여 hydroxyproline의 농도를 측정하였다. 콜라겐은 결합조직의 세포 외 공간을 채우는 주요 구조 단백질로 세포와 세포 사이의 가교 역할을 하며 세포의 증식과 기능을 조절한다. 물리적 손상, 화상, 수술 등으로 피부에 결손이 생기면 회복 과정에서 콜라겐이 그 결손 부위를 매우게 된다³⁸). Hydroxyproline은 콜라겐의 주요 구성성분으로 콜라겐 구조의 안정성을 유지하는데 있어 중요한 역할을 한다³⁹).

측정 결과 Veh군(0.43 ± 0.10)에 비하여 LL군(0.82 ± 0.05),

LH군(1.08 ± 0.08)으로 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.01$, $p < 0.001$)(Fig. 6). 이상의 측정 결과로 볼 때 금은화 추출물이 hydroxyproline의 합성을 촉진하여 조직의 콜라겐 생성을 증가시키고 손상된 피부 조직을 회복시키는 효과가 있을 것으로 생각된다.

창상 부위의 회복 정도를 확인하기 위해 피부 조직에 H&E 및 Masson's trichrome 염색을 실시하고 광학현미경으로 관찰하여 병리조직학적 분석을 시행하였다. 피부 조직의 분석 결과 Veh군은 각질층과 표피층이 매우 두껍게 형성된 반면에 LL군과 LH군에서는 각질층과 표피층의 두께가 얇아진 것을 관찰할 수 있었다. 또한 피부부속기관과 조직의 재형성이 Veh군에 비하여 활발하게 일어난 것을 확인할 수 있었다(Figs. 7, 8).

후시딘산나트륨은 진균 *fusidium coccineum*의 발효에 의하여 얻어진 항생물질로써 특히 포도상구균에 대하여 높은 항균력을 보인다. 또한 부작용이 적고 상처 부위에 도포되어 조직을 보호하는 작용이 있어 피부 손상 치료에 널리 사용되고 있다⁴⁰). 본 연구에서도 효과를 비교하기 위하여 양성대조군으로 설정하였다. 비교 결과 혈청 내 ROS 측정에서는 PC군에 비하여 금은화 투여군이 근소하게 낮게 측정되었다. 항산화 관련 인자 western blot 분석에서는 PC군에 비하여 금은화 투여군이 비슷하거나 높은 활성을 보였는데 LH군에서 그 차이가 커지는 것을 확인하였다. 염증 관련 인자 western blot 분석에서는 PC군에 비하여 금은화 투여군이 비슷하거나 근소하게 낮은 활성을 보였다. 창상 조직의 hydroxyproline 측정 결과에서는 PC군에 비하여 금은화 투여군이 비슷하거나 높게 측정되었는데 LH군에서 그 차이가 현저하였다. 창상 부위의 병리조직학적 분석에서는 PC군과 금은화 투여군이 비슷한 정도의 회복을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 금은화는 양성대조군 약물인 후시딘산나트륨과 비교하여 항산화, 항염증 효과 및 창상 치료 효과가 비슷하거나 조금 우수하다고 할 수 있다. 그러나 금은화는 경구투여를 하고, 후시딘산나트륨은 도포하여 약물 처치 방법이 상이하고 약물 투여 용량 역시 동일하게 조절하지 못했기 때문에 정확한 비교를 통한 결과라고 할 수는 없다. 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 금은화의 polyphenol 및 flavonoid의 총 함량을 측정하고 free radical 소거능을 측정하여 항

산화능을 확인하였고 혈청 내 ROS를 측정하여 금은화가 산화적 스트레스 억제 작용이 있음을 확인하였다. 또한 항산화 및 염증 관련 인자의 western blot 분석을 통해 금은화가 창상을 입은 피부 조직에서 항산화 관련 인자를 활성화시키고 염증 관련 인자의 활성을 억제함을 확인하였다. 그리고 창상 부위 피부 조직의 hydroxyproline의 농도를 측정하여 결합조직의 회복 정도를 확인하였으며 창상 부위를 병리조직학적으로 분석하여 금은화가 창상 치유 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 양성대조군과의 면밀한 비교가 부족했고 추출방식에 따른 금은화의 약리성분, 수율 등에 대한 선행 연구가 없다는 점에서 한계가 있다. 그럼에도 불구하고 본 연구를 통해 금은화가 창상 치료에 있어 항산화 및 항염증, 상처 치유 효과가 있음을 확인하였기에 향후 금은화에 대한 추가적 실험 및 임상 연구가 진행된다면 피부 손상 및 창상 치료 약물로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

결론»»»»

금은화가 창상을 유발한 흰쥐에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구에서 polyphenol 및 flavonoid의 총 함량과 free radical 소거능을 측정하고 혈청 내 ROS를 측정하였다. Western blot 분석을 통해 항산화 및 염증 관련 인자 활성을 측정하였으며, hydroxyproline의 농도를 측정하고 창상 부위에 대해 병리조직학적 분석을 시행하였다. 이상의 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Polyphenol의 총 함량은 32.86 ± 0.14 mg/g, flavonoid의 총 함량은 67.17 ± 0.57 mg/g으로 나타났다.
2. DPPH free radical 소거능은 IC_{50} 값이 26.69 ± 1.50 μ g/mL로 나타났으며, ABTS free radical 소거능은 IC_{50} 값이 49.33 ± 4.52 μ g/mL로 나타났다.
3. 금은화 투여군에서 간 독성 및 신 독성은 나타나지 않았다.
4. 혈청 내 ROS는 모든 금은화 투여군에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다.
5. Nrf2는 LH군에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었고 LL군에서 높게 측정되었으나 통계적

유의성은 없었다. SOD-1과 catalase, HO-1은 모든 금은화 투여군에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다.

6. NF- κ Bp65, p-ikBa, COX-2, TNF- α 는 모든 금은화 투여군에서 낮게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다.
7. Hydroxyproline은 모든 금은화 투여군에서 높게 측정되었으며 통계적 유의성이 있었다.
8. 병리조직학적 분석 결과 모든 금은화 투여군에서 각질층과 표피층의 두께가 얇아졌고 진피층에서 피부부속기관과 조직의 재형성이 활발하게 일어났다.

이상의 결과로 보아 금은화는 창상을 유발한 흰쥐에서 항산화 및 항염증 효과가 있으며 또한 창상 조직의 회복을 촉진하는 작용이 있으므로 이를 통해 금은화가 피부 손상 및 창상 치료에 효과가 있을 것으로 생각되며 향후 추가적인 연구를 통해 임상에서 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

References»»»»

1. Korean Dermatological Association. Dermatology. Seoul:Medbook. 2014;1-25, 53-74.
2. Kim GM, Chang BS, Lee JC. Study on the recognition rate of skin aging -focused on the women live in Daejeon city-. Journal of Investigative Cosmetology. 2009;5(2):101-6.
3. 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 Oriental Obstetrics & Gynecology. 2010;23(1):30-41.
4. Kim BH. Effects of Danggwieumja on the healing of full-thickness skin injury in rat. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2011;25(5):887-93.
5. Bak JW, Sim BY, Kim DH. The effects of Danggwisusan on restoration ability in wound induced animal models. Kor J Herbology. 2014;29(5):55-63.
6. Jung H, Lee EJ, Oh MS. The effects of Gyejibokryeonghwan (桂枝茯苓丸) for wound healing after skin suture. J Korean Med Rehabil. 2016;26(2):29-50.
7. Han DO, Kim GH, Choi YB, Shim IS, Lee HJ, Lee YG, Kim JH, Chang GT, Hahm DH. Healing effects

- of astragali radix extracts on experimental open wounds in rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2005;19(1):92-7.
8. Hong CH, Kang KH, Yoon HJ, Yoon HM, Song CH, Kim CH. Effect of astragali radix pharmacocupuncture for wound healing of full-thickness skin wound in mouse. *J Korean Med Ophtalmol Otolaryngol Dermatol*. 2018;31(1):22-31.
9. 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*. *Kor J Herbology*. 2004; 19(4):137-60.
10. Song JC, Lee JS, Chung SH, Kim SS, Shin HD. Effects of full spectrum visible ray therapy by carbon electrodes on the cutaneous wound healing of rat. *J Korean Med Rehabil*. 2002;12(2):101-31.
11. The Korean Medicine Society for Herbology. *Herbology*. Seoul:Yeongrim. 1999: 514-515, 2016:242-3.
12. Yun YG, Kim GM, Lee SJ, Ryu SH, Jang SI. Inhibitory effect of aqueous extract from *Lonicera japonica* flower on LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *Kor J Herbology*. 2007;22(3):117-25.
13. Lee DE, Lee JR, Kim YW, Kwon YK, Byun SH, Shin SW, Suh SI, Kwon TK, Byun JS, Kim SC. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α , IL-1 β and COX-2 expression by flower and whole plant of *Lonicera japonica*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2005;19(2):481-9.
14. Yun KJ, Lee EY. Effects of hot aqueous and ethanol extract from *Lonicera japonica* flos on NO and PGE₂ in macrophage. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2012;29(1):67-74.
15. Kang YG, Ryu IH, Kim SB, Choi CM, Seo YJ, Cho HB. A study on the inhibitory effect and mechanism of *Lonicera japonica* on type I Interferon. *J Korean Obstet Gynecol*. 2013;26(2):17-32.
16. Seo SH, Choi MO. Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on human keratinocyte, HaCaT cells. *Kor J Herbology*. 2013;28(4):57-62.
17. Cha HY, Jeong AR, Cheon JH, Ahn SH, Park SY, Kim KB. The anti-oxidative and anti-inflammatory effect of *Lonicera Japonica* on ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *J Pediatr Korean Med*. 2015;29(3):54-64.
18. Folin O, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem*. 1915;22:305-8.
19. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colormetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002;10(3):178-82.
20. Blois MS. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-200.
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7.
22. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res*. 1997;27(3):245-54.
23. Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons. *Plastic surgery=Textbook of plastic surgery*. Paju:Koonja Publishing. 2009:83-9, 453-62.
24. Harper D, Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery*. 2014;32(9):445-50.
25. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37:1528-42.
26. Park JY, Back YD, Kim MR, Roh SS. The study on chemical components and korean medical effect of *Lonicera japonica*. *The Journal of Jehan Oriental Medical Academy*. 2013;11(1):1-14.
27. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis, and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(1):7313-52.
28. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(7): 1043-8.
29. Pohanka M, Pejchal J, Snopkova S, Havlickova K, Karasova JZ, Bostik P, Pikula J. Ascorbic acid: an old player with a broad impact on body physiology including oxidative stress suppression and immunomodulation: a review. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(1):35-43.
30. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function-measured and estimated glomerular filtration rate. *The New England Journal of Medicine*. 2006;354(23):2473-83.
31. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-26.
32. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018;54(4):287-93.
33. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*. 2017;398(10):1095-108.

34. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2010; 50:323-54.
35. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-4.
36. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem*. 2007;42:3-27.
37. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103.
38. Oba C, Ohara H, Morifuji M, Ito K, Ichikawa S, Kawahata K, Koga J. Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2013;29(4): 204-11.
39. Gorres KL, Raines RT. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010;45(2):106-24.
40. Schöfer H, Simonsen L. Fusidic acid in dermatology: an updated review. *Eur J Dermatol*. 2010;20(1):6-15.