

# 皮膚 創傷 동물모델에서 黑蔘 열수 추출물 경구 투여의 효과

김태령 · 김영준 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학교실

## Effects of Oral Administered Hot Water Extracts of Korean Black Ginseng on Wound Healing in Mice

Tae-Ryeong Kim, K.M.D., Young-Jun Kim, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.

Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

RECEIVED December 15, 2021  
ACCEPTED December 23, 2021

### CORRESPONDING TO

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

TEL (054) 281-0055

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2022 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** This study aims to evaluate the wound healing effects of oral administered hot water extracts of Korean black ginseng (KBG).

**Methods** 40 C57BL/6 mice were divided into five groups; normal, control, vitamin E 200 mg/kg, KBG 100 mg/kg, KBG 200 mg/kg, each n=8. Skin wounds were made in the back of all mice except normal group using biopsy punches. Wounds were observed on days 7 and 14 after injury. The anti-oxidant and inflammatory protein levels were evaluated using western blotting. Skin tissue was analyzed by hematoxylin & eosin and Masson's trichrome staining method.

**Results** KBG significantly accelerated reducing wound area. KBG significantly decreased myeloperoxidase activity. KBG significantly decreased oxidative stress factors such as NADPH oxidase-4 and p22<sup>phox</sup> and increased antioxidant enzymes including nuclear factor erythroid 2-related factor2, kelch-like ECH-associated protein-1, heme oxygenase-1, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase-1/2. Moreover, KBG significantly decreased inflammation factors including nuclear factor- $\kappa$ B, phosphorylated inhibitor of  $\kappa$ B $\alpha$ , cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 and increased anti-inflammation cytokine such as IL-4 and IL-10. In addition, KBG significantly increased tight junction proteins including claudin-1, claudin-3, claudin-4. In histopathologic, KBG made the epithelium thin and uniform, and accelerated the remodeling of collagen.

**Conclusions** The results suggest that KBG has healing effects on skin wound in mice by anti-inflammatory and antioxidant activity. (*J Korean Med Rehabil* 2022;32(1):1-19)

**Key words** Panax, Wound healing, Wounds and injuries, Anti-inflammatory agents, Antioxidants

## 서론»»»»

인체에서 피부는 형태학적으로 구별되는 여러 층으로 구성되어 외부 환경으로부터 신체를 보호하는 장벽 역할을 하고 있으며, 특히 표피는 항상성을 유지하며 손상 시 빠르게 반응한다<sup>1)</sup>. 피부 상처 치유는 손상된

표피 장벽을 회복하는 것을 목표로 하여 많은 세포들이 관여하는 복잡한 과정이다<sup>2)</sup>. 정상적인 복구 단계를 거치지 못하면 상처는 염증 상태에 남아 흉터가 비후되거나 켈로이드의 비정상적인 형태가 되며 치유에 실패한다<sup>3)</sup>.

黑蔘(Korea black ginseng)은 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer의 뿌리)을 九蒸九曝(찌고 건조하는 것을 9회 반

복)하여 검은 빛이 나도록 炮製한 약물이다<sup>4)</sup>. 人蔘을 9 회에 걸쳐 찌고, 건조하는 동안 인삼사포닌 성분의 화학적 변화로 인해 새로운 성분이 생성되거나 함량에 변화가 나타난다<sup>4,6)</sup>. 이러한 과정을 통해 黑蔘은 白蔘 및 紅蔘에 비해 더 뛰어난 항산화 활성을 보이며, 이러한 선행 연구<sup>7-9)</sup>를 통하여 보고된 黑蔘의 약리작용은 피부 창상의 치유 촉진에 효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 黑蔘이 피부 창상에 미치는 영향을 실험적으로 검증하고자 C57BL/6 mice의 배부에 피부 창상을 유발하여 黑蔘 열수 추출물을 경구 투여한 후 창상 부위의 육안적 및 조직학적 변화를 관찰하였고, 항산화와 염증 관련 인자의 활성을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 약재 黑蔘(Korean black ginseng)은 참한삼(Geumsan, Korea)에서 구입하였다. 黑蔘 100 g에 1 L의 증류수를 넣고 2시간 동안 열탕 추출기로 가열하여 얻은 추출액을 여과 후 감압 증류장치로 농축하였다. 농축 후 동결건조기로 완전히 건조하여 13 g의 분말(Korean black ginseng hot water extract [KBG]; 수율 13%, 수분함량 1.905%M)로 얻었으며 실험에 사용하기 전까지 냉동(-80°C) 보관하였다.

#### 2) 시약

본 실험에 사용된 folin-ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, gallic acid, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), naringin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium phosphate monobasic, diethylene glycol, potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, L-ascorbic acid는 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 1차 항체 rabbit polyclonal antibodies against heme oxygenase-1

(HO-1), superoxide dismutase-1 (SOD-1), inhibitor of  $\kappa$  B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), catalase, glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2)와 goat polyclonal antibodies against interleukin (IL)-4, IL-6, NADPH oxidase-4 (NOX4), kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap-1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-10과 mouse monoclonal antibodies against claudin-1, claudin-3, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65, claudin-4, cyclooxygenase-2 (COX-2), p22<sup>phox</sup>, inducible nitric oxide synthase (iNOS), phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ), histone,  $\beta$ -actin과 2차 항체를 구입하였다. 단백질 정량을 위해 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 BCA protein assay kit를 구입하였다. Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 protease inhibitor cocktail, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)를 구입하였다. Dihydrorhodamine 123과 2',7'-dichlorofluorescein diacetate를 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. ECL western blotting detection reagents과 nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Amersham, UK)에서 구입하였다.

#### 3) 실험기기

본 실험에서는 전자체중계(CAS, Yangju, Korea), 열탕 추출기(DWT-1800T; Daewoong Bio, Hwaseong, Korea), 동결건조기(FD5508; Ilshinbiobase, Dongducheon, Korea), rotary vacuum evaporator (Sunileyela, Seongnam, Korea), vortex mixer (OHAUS, Parsippany, NJ, USA), 냉장고속 원심분리기(Mega17R; Hanil Science Co., Ltd., Daejeon, Korea), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea), tissue grinder (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA), ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan), Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland)을 사용하였다.

#### 4) 동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 받은 7주령 C57BL/6 mice (male, 25~30 g)를 사용하였다. 조명시간 및 명암주기 12 h/day/night, 22±2°C, 습도는 50±20%, 150~300 Lux의 조도가 유지되는 동물실에서 물과 고형사료(NIH-41; Zeigler Bros., Inc., Gardners,

PA, USA)(성분: 나트륨 0.25% 이상, 칼슘 1.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조지방 5.0% 이상, 조단백질 18% 이상, 마그네슘 0.15% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 조회분 8.0% 이하 및 인 0.85% 이상이 함유)를 충분하게 공급하며 일주일간 사육실 환경에 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 본 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(승인번호: DHU2020-033)을 받았다.

## 2. 방법

### 1) 항산화능 측정

#### (1) Total polyphenol 측정

Total polyphenol 측정은 Folin-Denis법<sup>10)</sup>을 이용하였다. 10 µL의 KBG (100 mg/mL)에 790 µL 증류수 및 50 µL Folin-Ciocalteau's phenol reagent를 첨가한 후 150 µL의 20% sodium carbonate를 넣고 혼합하여 2시간 반응시켰다. 파장 765 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (2) Total flavonoid 측정

Total flavonoid 측정은 Lister의 방법<sup>11)</sup>을 이용하였다. 100 µL의 KBG (11.1 mg/mL)에 1 mL의 diethylene glycol 과 1 N NaOH 10 µL를 잘 혼합하여 1시간 동안 37°C에서 차광하여 반응시킨 후 파장 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (3) DPPH 라디칼 소거능 측정

KBG의 항산화능 분석을 위해 DPPH 라디칼 소거능을 활용하였다<sup>12)</sup>. KBG를 농도별로 희석한 용액 100 µL에 100 µL의 60 mM DPPH 용액을 넣고 잘 혼합하여 실온에서 차광하여 30분간 반응 후 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 아래와 같이 계산하여 IC<sub>50</sub>값을 구하였다.

#### DPPH radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>)

$$= \{ (OD_{\text{blank}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{blank}} \} \times 100$$

#### (4) ABTS 라디칼 소거능 측정

KBG의 항산화능 분석을 위해 ABTS 라디칼 소거능을 활용하였다<sup>13)</sup>. 7 mM의 ABTS와 2.45 µmol의 potassium persulfate를 잘 혼합하여 실온상태의 암실에 두었다가 약 16시간 반응시켜 ABTS<sup>+</sup>를 형성시킨 후 파장 415 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 에탄올로

희석하였다. 희석된 용액 95 µL에 KBG를 농도별로 희석한 용액 5 µL를 가하여 15분간 반응시킨 후 파장 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도는 아래의 식으로 계산하여 IC<sub>50</sub>값을 구하였다.

#### ABTS radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>)

$$= \{ (OD_{\text{blank}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{blank}} \} \times 100$$

## 2) 약물 투여 및 군 분류

실험은 아무 처치를 하지 않은 정상군(normal), 창상 유발 후 증류수를 경구 투여한 대조군(control), 창상 유발 후 vitamin E 200 mg/kg 경구 투여한 군(vitamin E), 창상 유발 후 黑蓼 열수추출물 100 mg/kg 경구 투여한 군(KBG100), 창상 유발 후 黑蓼 열수추출물 200 mg/kg 투여한 군(KBG200)으로 각 군당 8마리씩, 총 5군으로 분리하였다. 약물은 창상 유발한 다음 날부터 실험이 종료될 때까지 2주간 일정한 시간에 매일 경구 투여하였다.

- ① 정상군(normal): 창상을 유발하지 않은 군
- ② 대조군(control): 창상을 유발한 후 증류수를 경구 투여한 군
- ③ vitamin E 200 mg/kg 투여군(vitamin E): 창상을 유발한 후 vitamin E 200 mg/kg 경구 투여한 군
- ④ KBG 100 mg/kg 투여군(KBG100): 창상을 유발한 후 KBG 100 mg/kg 경구 투여한 군
- ⑤ KBG 200 mg/kg 투여군(KBG200): 창상을 유발한 후 KBG 200 mg/kg 경구 투여한 군

## 3) 창상 유발

정상군을 제외한 실험동물을 마취한 후 등 부위를 제모하여 직경 8 mm의 피혁용 편치(biopsy punch)로 원형 결손창을 1개 만들어 창상을 유발하였다. 창상 부위는 silicon plate (ALLforLAB, Seoul, Korea)를 이용하여 창상 외 부위와 구분하였다.

## 4) 상처 부위의 육안적 관찰 및 손상 면적 측정

KBG의 상처 치유 진행 과정을 확인하기 위해 창상 유발 후 약물 투여 0, 7, 14일째에 디지털카메라를 사용해 상처 부위를 일정한 거리에서 촬영하여 상처의 변화를 관찰하였다. 상처 부위 면적은 타원의 넓이(S) 공식

으로 계산하여 구한 후 각 군당 유발 첫날 대비(%)로 나타내었다.

$$S = ab\pi$$

(a=horizontal radius, b=vertical radius)

### 5) 체중 측정

모든 실험동물의 체중은 전자체중계를 이용하여 1회/1일 일정한 시간, 동일 조건에서 측정하였다.

### 6) 혈청 분리 및 조직 채취

실험동물은 약물투여 14일째에 24시간 절식한 후 isoflurane을 사용하여 흡입 마취하였다. 마취한 실험동물의 심장에서 혈액을 채혈하고 채혈한 혈액을 원심 분리기를 사용하여 10분 동안 4,000 rpm으로 원심 분리하였다. 실험동물 배부의 상처부위를 적출하여 분석 전까지 냉동(-80°C) 보관하였다.

### 7) 혈청 내 aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 측정

혈청 내 AST, ALT 수치를 측정하였다. AST, ALT assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

### 8) 혈청 내 myeloperoxidase (MPO) 활성 측정

혈청을 사용하여 MPO 활성을 측정하였다. 혈청 내의 MPO 활성을 측정하기 위하여 myeloperoxidase colorimetric activity assay kit (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

### 9) Western blotting

피부 조직에 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), protease inhibitor cocktail, 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1.5 M sucrose, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>와 5 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 구성된 buffer A를 첨가하여 tissue grinder를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄한 조직을 ice 위에서 30분간 정치시킨 후 10% NP-40 용액을 첨가하여 2분간 4°C 및 12,000 rpm으로 원심 분리시켜 세포질을 포함한 상층액을 분리하였다. 세포질을 분리하고 10% NP-40 용액이 포함된 buffer A로 2번 washing한 후, 0.3 mM NaCl,

1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mM hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid, 10% glycerol, 50 mM KCl로 구성된 buffer C를 넣고 재부유시킨 뒤에 10분 간격으로 3번 vortex하였다. 마지막 vortex 후 10분간 4°C 및 12,000 rpm으로 원심 분리시켜 핵이 포함되어 있는 상층액을 분리하여 냉동 (-80°C) 보관하였다. 피부 조직 내 세포질에서 NOX4, p22<sup>phox</sup>, Keap-1, SOD-1, catalase, GPx-1/2, p-IκBα, IκBα, HO-1, COX-2, iNOS, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-4, claudin-1, claudin-3, claudin-4, β-actin 및 핵의 Nrf2, NF-κB, histone 단백질의 발현량 측정을 위해서 단백질 10 μg을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시켰다. 이동시킨 membrane에 각각 1차 항체를 4°C에서 overnight한 다음 phosphate buffered saline with tween 20 (PBS-T)로 6번 세척하고, 각각 2차 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응 후 PBS-T로 6번 세척하였다. 그리고 ECL 용액과 Sensi-Q2000 Chemidoc을 사용하여 웨스턴 밴드를 촬영한 후 밴드를 정량하여 실험군 간에 발현량을 비교하였다.

### 10) 조직학적 관찰

부검 후 피부 조직을 절단하여 10% formalin 용액 (10% EDTA 포함)에 넣어 탈회(decalcification)시켰다. 탈회 유무를 radiographic technique으로 확인하고 paraffin wax에 조직을 넣고 고정한 다음 coronal section을 실시하였다. 7 μm의 두께로 절단하여 hematoxylin & eosin (H&E) 및 Masson's trichrome 염색을 실시하여 피부 조직의 상태를 확인하였다.

### 11) 통계 처리

모든 수치는 mean±standard deviation 및 mean±standard error of the mean으로 표기하였다. SPSS program for windows version 25 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 통해 One-way analysis of variance로 검정한 후 각 자료의 통계적 유의성은 least significant difference로 검증하였고, 유의수준은 p<0.05에서 판정하였다.

## 결과»»»»

### 1. 항산화능 평가

#### 1) Total polyphenol 및 total flavonoid

KBG의 total polyphenol 및 total flavonoid 함량을 측정할 결과, total polyphenol 함량은  $31.08 \pm 0.12$  mg/g으로 측정되었으며, total flavonoid 함량은  $12.02 \pm 0.07$  mg/g이었다(Table I).

#### 2) DPPH 라디칼 소거능

KBG의 항산화능 분석을 위해 DPPH 자유 라디칼 소거능을 측정하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. KBG는  $94.09 \pm 0.70$  µg/mL, 대조군인 L-ascorbic acid는  $1.44 \pm 0.02$  µg/mL이었다(Fig. 1).

#### 3) ABTS 라디칼 소거능

KBG의 항산화능 분석을 위해 ABTS 자유 라디칼 소거능을 측정하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. KBG는  $110.33 \pm 0.40$  µg/mL, 대조군인 L-ascorbic acid는  $3.27 \pm 0.03$  µg/mL이

다(Fig. 2).

### 2. 상처 부위의 육안적 관찰 및 손상 면적

각 군당 유발 첫날 상처 면적 100%를 대비로 나타낸 결과, 7일째에 상처 면적은 대조군 32.05%, Vitamin E군 44.41%, KBG100군 43.57%, KBG200군 56.11%로 모든 군이 유의하게 회복되었으며, 14일째에 상처 면적은 대조군 63.09%, Vitamin E군 77.11%, KBG100군 83.04%, KBG200군 89.18%로 모든 군이 유의하게 회복되었다(Fig. 3).

### 3. 체중 변화

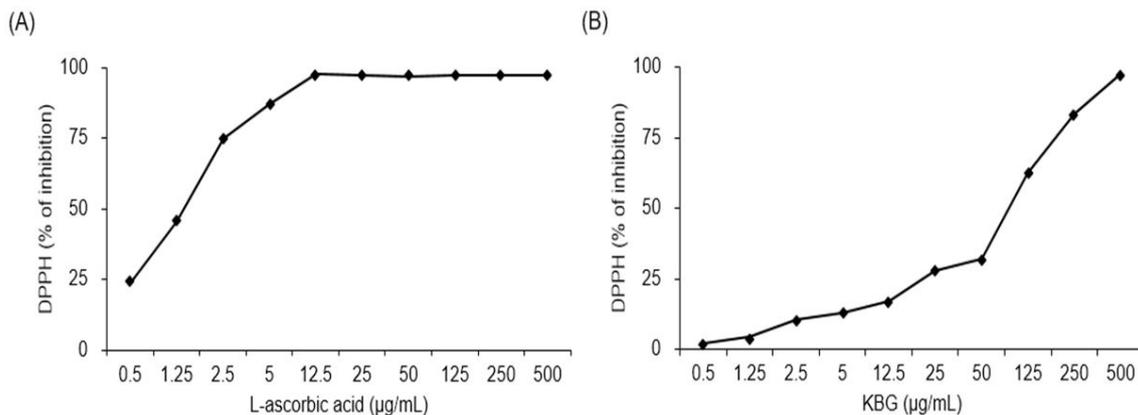
실험기간 동안 측정된 체중 변화는 정상군  $1.57 \pm 0.32$  g, 대조군  $0.53 \pm 0.16$  g, Vitamin E군  $0.73 \pm 0.18$  g, KBG100군  $0.90 \pm 0.25$  g, KBG200군  $0.97 \pm 0.18$  g으로 증가하였다(Table II).

**Table I.** Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of KBG

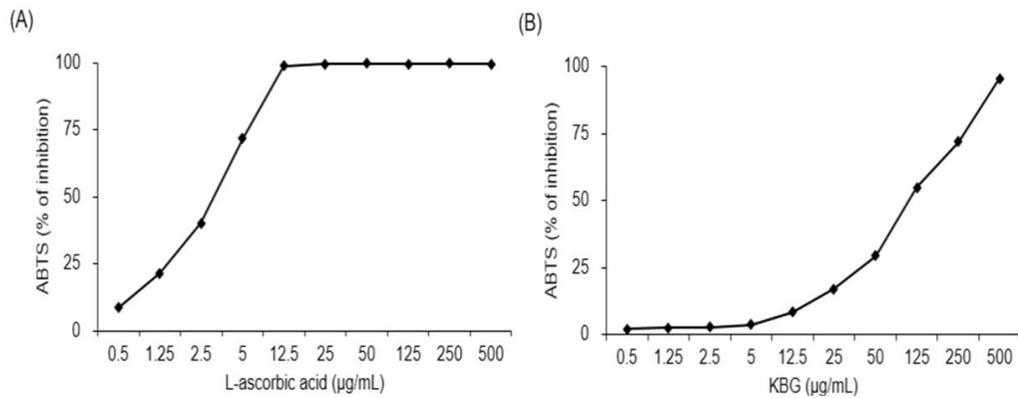
Sample name	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
KBG	$31.08 \pm 0.12$	$12.02 \pm 0.07$

All values are mean±standard error of the mean of triplicate experiments.

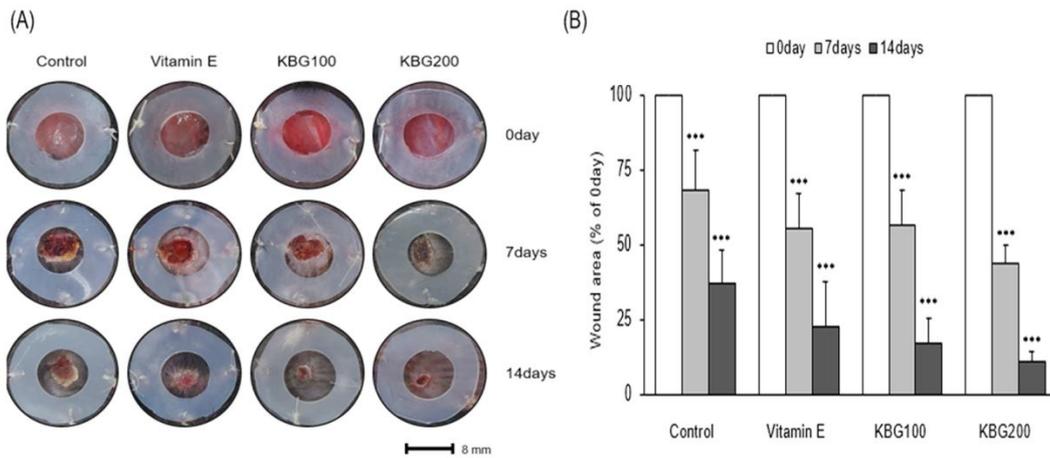
KBG: Korean black ginseng hot water extract.



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of KBG. (A) L-ascorbic acid, (B) KBG. All values are mean±standard error of the mean of triplicate experiments. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, KBG: Korean black ginseng hot water extract.



**Fig. 2.** ABTS radical scavenging activity of KBG. (A) L-ascorbic acid, (B) KBG. All values are mean±standard error of the mean of triplicate experiments. ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), KBG: Korean black ginseng hot water extract.



**Fig. 3.** The wound healing effect of KBG on skin in mice. (A) Macroscopic appearance of wound, (B) percentages of wound area. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), \*\*\*p<0.001 vs. 0 day of each group. Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

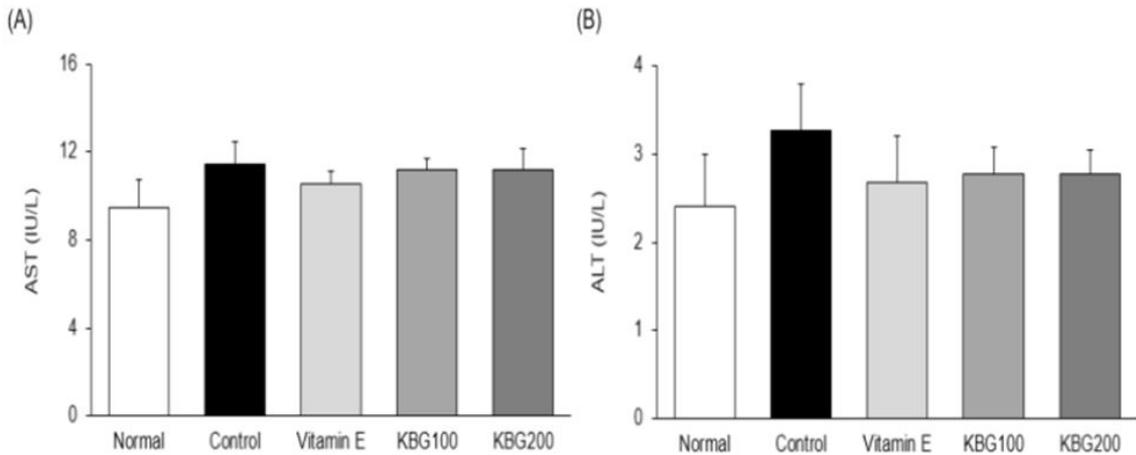
**Table II.** Changes of Body Weight with KBG for 2 Weeks

Variables	Initial (g)	Final (g)	Change (g)
Normal	21.55±1.03	23.13±1.29	1.57±0.32
Control	21.72±0.39	22.25 <sup>##</sup> ±0.51	0.53 <sup>##</sup> ±0.16
Vitamin E	21.63±0.61	22.35±0.34	0.73±0.18
KBG100	21.48±0.52	22.38±0.39	0.90±0.25
KBG200	21.86±0.45	22.83±0.45	0.97±0.18

All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group.

KBG: Korean black ginseng hot water extract, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>##</sup>p<0.01 vs. Normal.



**Fig. 4.** The level of serum AST (A) and ALT (B) in mice with KBG. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, KBG: Korean black ginseng hot water extract, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

#### 4. 혈청 내 AST 및 ALT

AST 측정 결과, 정상군 9.49±1.26 IU/L, 대조군 11.45±1.01 IU/L, Vitamin E군 10.55±0.59 IU/L, KBG100군 11.18±0.54 IU/L, KBG200군 11.16±1.00 IU/L로 나타났다(Fig. 4A).

ALT 측정 결과, 정상군 2.40±0.60 IU/L, 대조군 3.27±0.52 IU/L, Vitamin E군 2.68±0.53 IU/L, KBG100군 2.77±0.31 IU/L, KBG200군 2.77±0.27 IU/L로 나타났다(Fig. 4B).

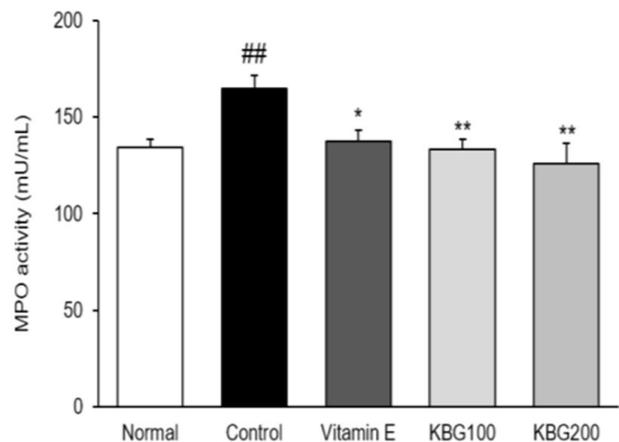
#### 5. 혈청 내 MPO 활성

혈청에서 MPO activity를 측정한 결과, Vitamin E군에서 137.81±5.75 mU/mL로 유의하게 감소하였고(p<0.05), KBG100군에서 133.21±5.68 mU/mL, KBG200군에서 125.93±10.63 mU/mL로 유의하게 감소하였다(p<0.01) (Fig. 5).

#### 6. 피부 조직 내 oxidative stress 관련 단백질

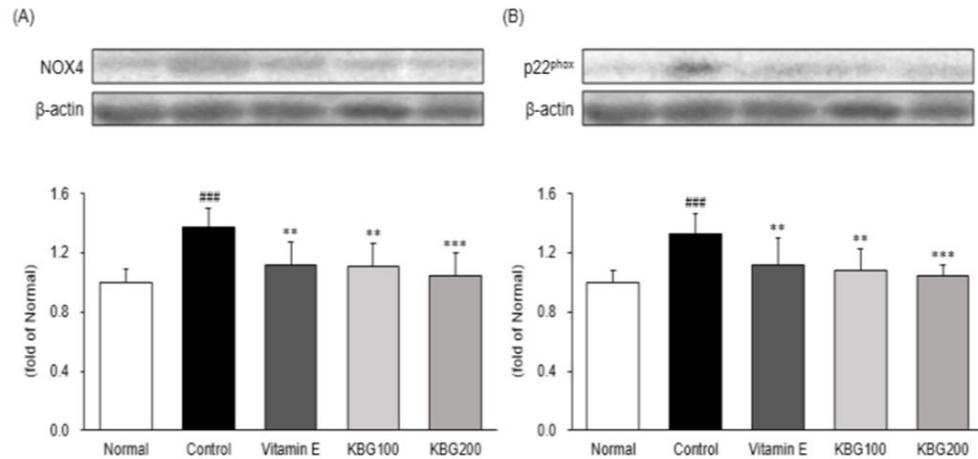
NOX4 측정 결과, Vitamin E군에서 1.12±0.15, KBG100군에서 1.11±0.15로 유의하게 감소하였고(p<0.01), KBG200군에서 1.05±0.15로 유의하게 감소하였다(p<0.001)(Fig. 6A).

p22<sup>phox</sup> 측정 결과, Vitamin E군에서 1.12±0.18, KBG100

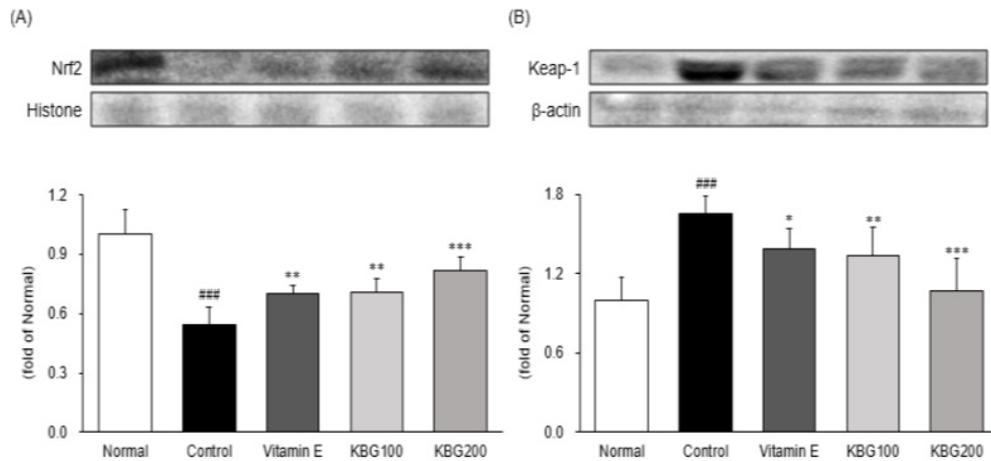


**Fig. 5.** The effect of KBG on serum MPO activity in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), ##p<0.01 vs. Normal and \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, MPO: myeloperoxidase, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

군에서 1.08±0.15로 유의하게 감소하였고(p<0.01), KBG200군에서 1.05±0.07로 유의하게 감소하였다(p<0.001)(Fig. 6B).



**Fig. 6.** Effects of KBG on NOX4 (A) and p22<sup>phox</sup> (B) in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*</sup>p<0.001 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, NOX4: NADPH oxidase-4, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.



**Fig. 7.** Effects of KBG on Nrf2 (A) and Keap-1 (B) in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, and <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Keap-1: kelch-like ECH-associated protein-1, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

## 7. 피부 조직 내 antioxidant 관련 단백질

### 1) Nrf2 및 Keap-1

Nrf2 측정 결과, Vitamin E군에서 0.70±0.04, KBG100군에서 0.71±0.06으로 유의하게 증가하였고(p<0.01), KBG200

군에서 0.82±0.07로 유의하게 증가하였다(p<0.001)(Fig. 7A).

Keap-1 측정 결과, Vitamin E군에서 1.38±0.16으로 유의하게 감소하였고(p<0.05), KBG100군에서 1.34±0.21로 유의하게 감소하였으며(p<0.01), KBG200군에서 1.07±0.24로 유의하게 감소하였다(p<0.001)(Fig. 7B).

## 2) HO-1, SOD-1, Catalase 및 GPx-1/2

HO-1 측정 결과, Vitamin E군에서  $0.74 \pm 0.10$ , KBG100군에서  $0.71 \pm 0.11$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $0.79 \pm 0.07$ 로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ )(Fig. 8A).

SOD-1 측정 결과, KBG100군에서  $0.76 \pm 0.11$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), Vitamin E군에서  $0.80 \pm 0.09$ 로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $0.86 \pm 0.08$ 로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ )(Fig. 8B).

Catalase 측정 결과, KBG100군에서  $0.84 \pm 0.08$ 로 증가 경향이 있었고, Vitamin E군에서  $0.88 \pm 0.08$ 로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), KBG200군에서는  $0.91 \pm 0.11$

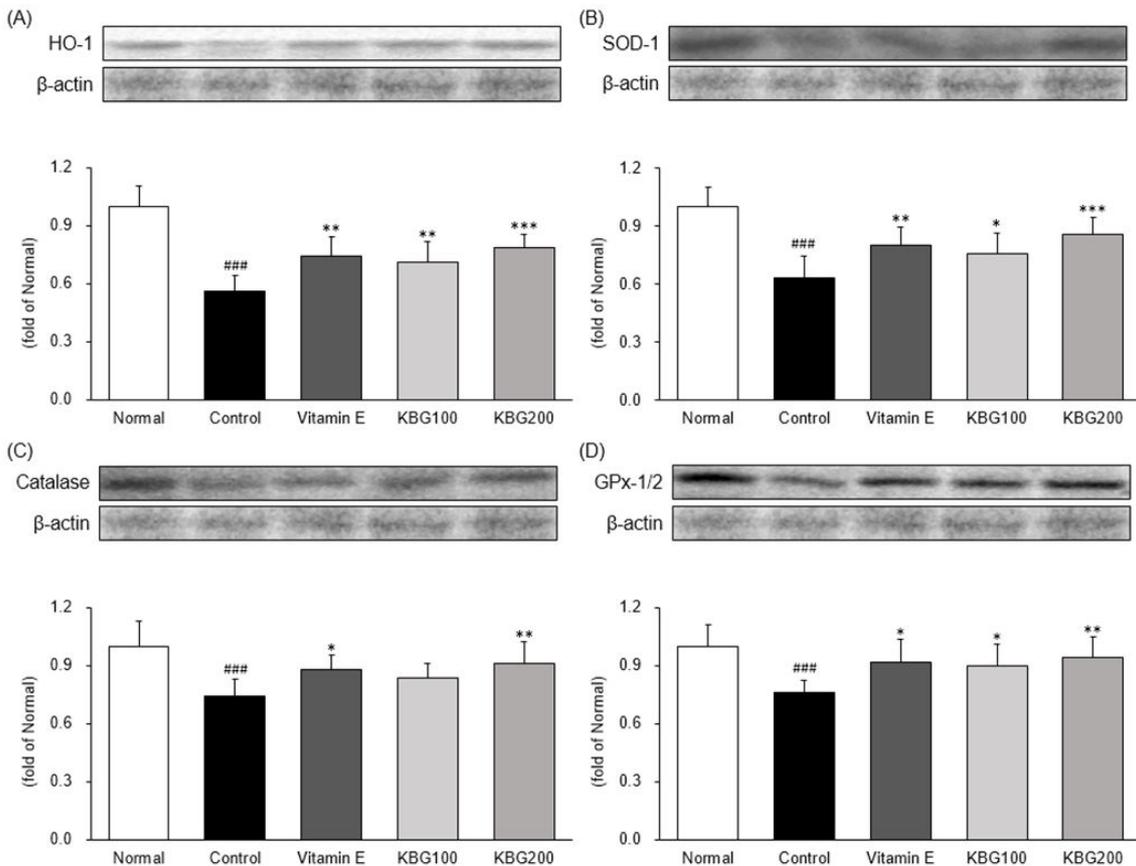
로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ )(Fig. 8C).

GPx-1/2 측정 결과, Vitamin E군에서  $0.91 \pm 0.12$ , KBG100군에서  $0.90 \pm 0.12$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), KBG200군에서  $0.94 \pm 0.11$ 로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ )(Fig. 8D).

## 8. 피부 조직 내 inflammation 관련 단백질

### 1) NF- $\kappa$ B 및 p-I $\kappa$ B $\alpha$

NF- $\kappa$ B 측정 결과, KBG100군에서  $1.19 \pm 0.15$ 로 유의하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), Vitamin E군에서  $1.09 \pm 0.15$ 로 유의하게 감소하였으며( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $1.08 \pm 0.11$ 로 유의하게 감소하였다( $p < 0.001$ )(Fig. 9A).



**Fig. 8.** Effects of KBG on HO-1 (A), SOD-1 (B), catalase (C), and GPx-1/2 (D) in mice. All data are expressed mean $\pm$ standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, HO-1: heme oxygenase-1, SOD-1: superoxide dismutase-1, GPx-1/2: catalase, glutathione peroxidase-1/2, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

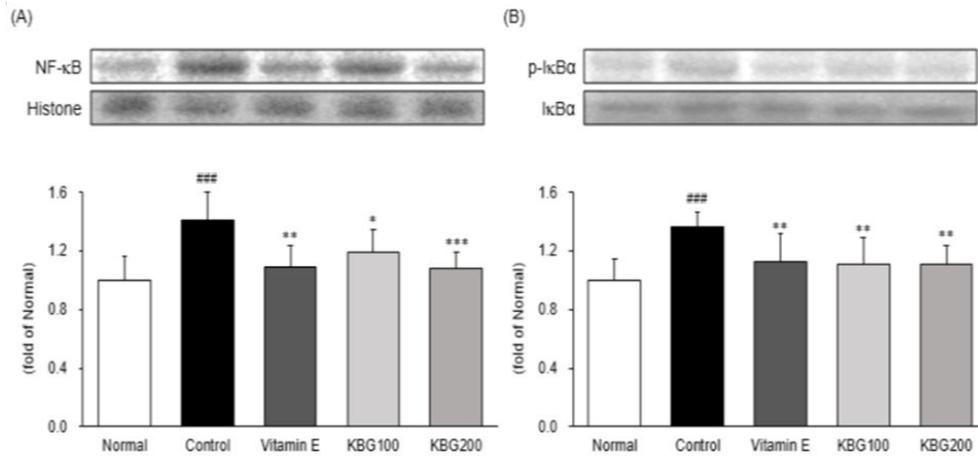
p-IκBα 측정 결과, Vitamin E군에서 1.13±0.19, KBG100군에서 1.11±0.18, KBG200군에서 1.11±0.13으로 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 9B).

## 2) COX-2 및 iNOS

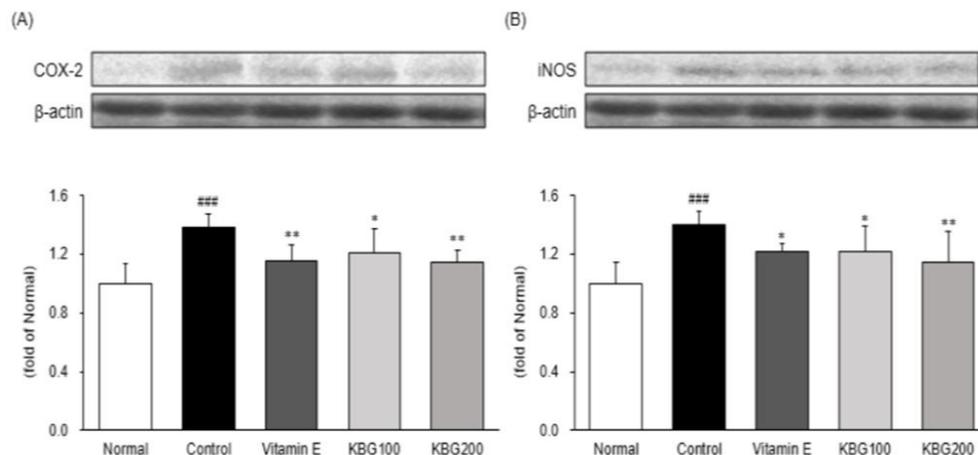
COX-2 측정 결과, KBG100군에서 1.21±0.17로 유의

하게 감소하였고(p<0.05), Vitamin E군에서 1.16±0.11, KBG200군에서 1.14±0.08로 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 10A).

iNOS 측정 결과, Vitamin E군에서 1.22±0.06, KBG100군에서 1.22±0.17로 유의하게 감소하였고(p<0.05), KBG200군에서 1.15±0.21로 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 10B).



**Fig. 9.** Effects of KBG on NF-κB (A) and p-IκBα (B) in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, NF-κB: nuclear factor-κB, p-IκBα: phosphorylated inhibitor of κBα, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.



**Fig. 10.** Effects of KBG on COX-2 (A) and iNOS (B) in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, COX-2: cyclooxygenase-2, iNOS: inducible nitric oxide synthase, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

### 3) TNF- $\alpha$ 및 IL-6

TNF- $\alpha$  측정 결과, Vitamin E군에서  $1.19 \pm 0.17$ , KBG100군에서  $1.15 \pm 0.16$ 으로 유의하게 감소하였고( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $1.05 \pm 0.17$ 로 유의하게 감소하였다( $p < 0.001$ ) (Fig. 11A).

IL-6 측정 결과, Vitamin E군에서  $1.09 \pm 0.18$ , KBG100군에서  $1.13 \pm 0.18$ 로 유의하게 감소하였고( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $1.02 \pm 0.12$ 으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.001$ ) (Fig. 11B).

## 9. 피부 조직 내 anti-inflammatory 관련 단백질

IL-4 측정 결과, Vitamin E군에서  $0.90 \pm 0.07$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.01$ ), KBG100군에서  $0.92 \pm 0.09$ , KBG200군에서  $0.92 \pm 0.04$ 로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ) (Fig. 12A).

IL-10 측정 결과, Vitamin E군에서  $0.83 \pm 0.15$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), KBG100군에서  $0.92 \pm 0.14$ 로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $1.00 \pm 0.10$ 로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ). KBG200군의 IL-10

발현은 대조군 대비 44.93% 증가하였고 정상군 수준으로 나타났다(Fig. 12B).

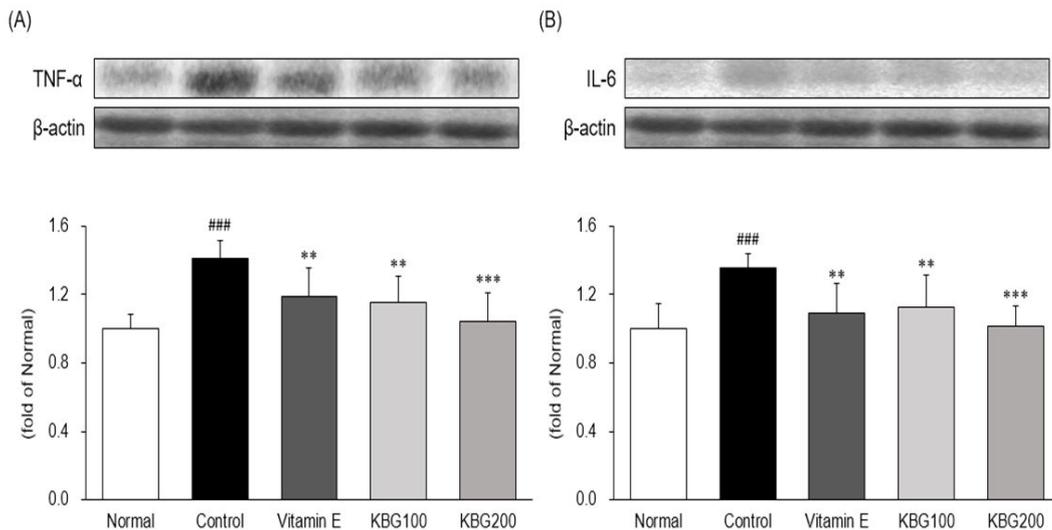
## 10. 피부 조직 내 tight junction 단백질

Claudin-1 측정 결과, Vitamin E군에서  $0.82 \pm 0.09$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), KBG100군에서  $0.87 \pm 0.13$ , KBG200군에서  $0.89 \pm 0.09$ 로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ) (Fig. 13A).

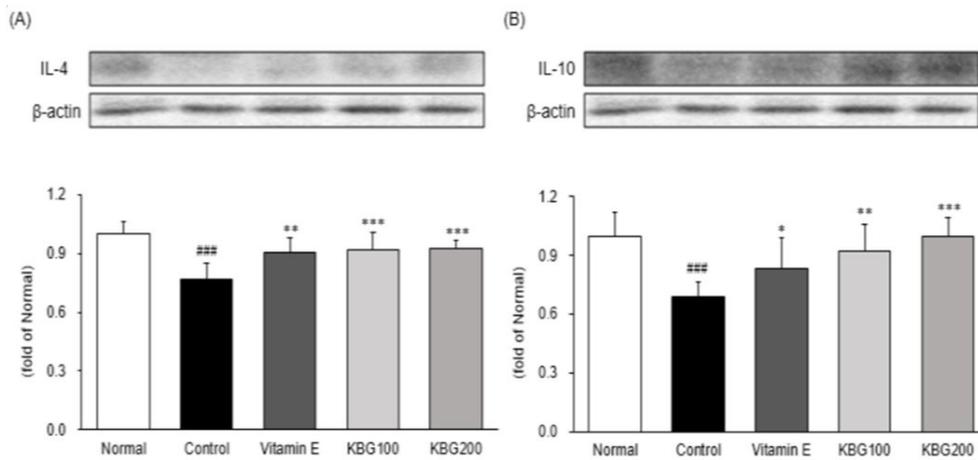
Claudin-3 측정 결과, Vitamin E군에서  $0.88 \pm 0.16$ , KBG100군에서  $0.86 \pm 0.13$ 으로 유의하게 증가하였고( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $0.91 \pm 0.06$ 으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ) (Fig. 13B).

Claudin-4 측정 결과, KBG100군에서  $0.81 \pm 0.07$ 로 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), Vitamin E군에서  $0.84 \pm 0.12$ 로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), KBG200군에서  $0.94 \pm 0.10$ 으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ) (Fig. 13C).

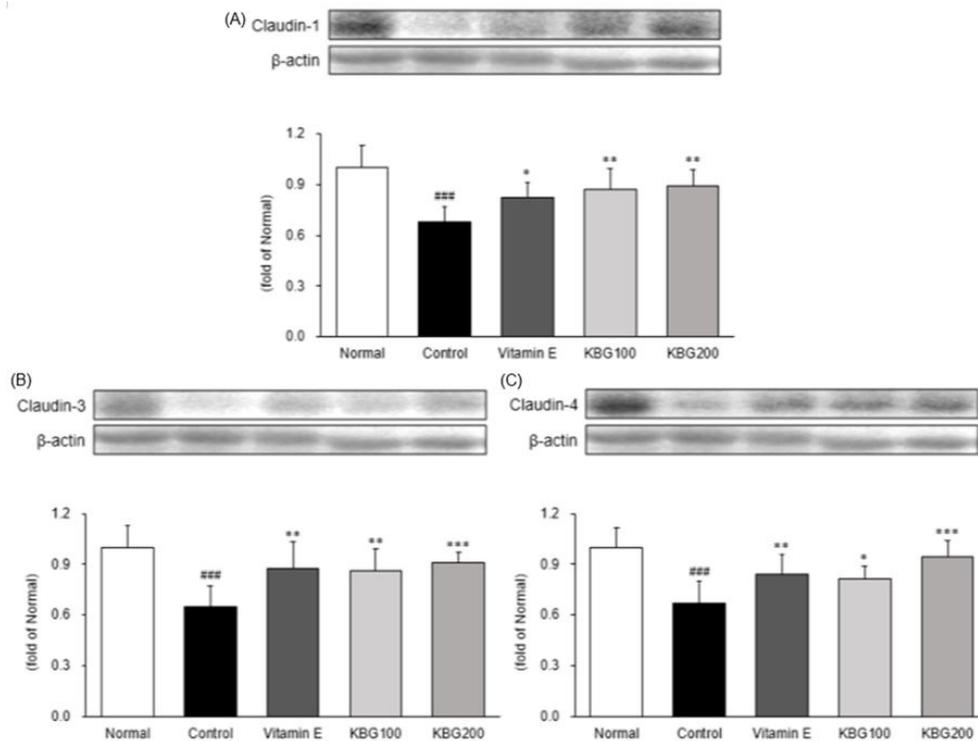
위의 tight junction 단백질을 측정된 결과를 보았을 때 대조군과 비교하여 KBG200군에서 발현 증가율이 claudin-1 30.88%, claudin-3 40.00%, claudin-4 40.30%로 정상군 수준까지 증가하였다.



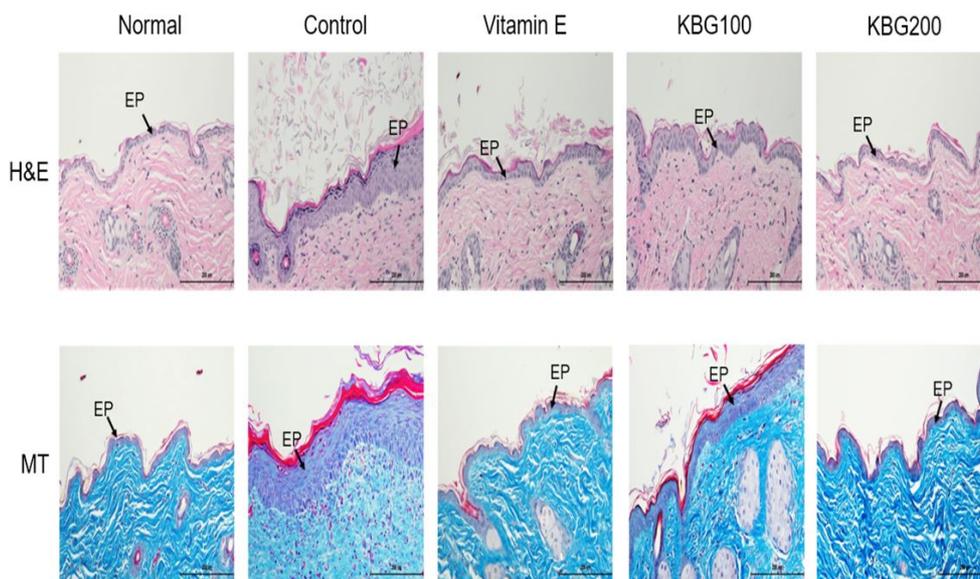
**Fig. 11.** Effects of KBG on TNF- $\alpha$  (A) and IL-6 (B) in mice. All data are expressed mean $\pm$ standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup> $p < 0.001$  vs. Normal and <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6: interleukin-6, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.



**Fig. 12.** Effects of KBG on IL-4 (A) and IL-10 (B) in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, and <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, IL: interleukin, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.



**Fig. 13.** Effects of KBG on claudin-1 (A), claudin-3 (B), and claudin-4 (C) in mice. All data are expressed mean±standard deviation, n=8 mice per group. Statistical significance: tested with the one-way analysis of variance (least significant difference), <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal and <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, and <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs. Control. KBG: Korean black ginseng hot water extract, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.



**Fig. 14.** Histopathological findings of skin tissue section on KBG in mice. H&E, MT: x200, scale bar 200  $\mu$ m. H&E: hematoxylin & eosin, MT: Masson's trichrome, EP: epidermis, Normal: not wound-induced mice with a normal diet, Control: wound-induced mice administered with distilled water, Vitamin E: wound-induced mice administered with vitamin E 200 mg/kg body weight, KBG100: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 100 mg/kg body weight, KBG200: wound-induced mice administered with Korean black ginseng hot water extract 200 mg/kg body weight.

## 11. 조직학적 변화

피부 조직을 H&E 염색 후 관찰한 결과, 대조군에서 피부의 상피층(epidermis)이 두껍게 일어났으며 교원질 증착이 나타났다. 반면 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군 모두에서 피부의 상피층이 일정하고 얇게 형성되었다(Fig. 14).

피부 조직에서 Masson's trichrome 염색을 실시하여 피부 조직의 상태를 관찰한 결과, 대조군에 비하여 Vitamin E군, KBG100군 및 KBG200군에서 피부의 상피층의 두께가 얇고 일정하게 형성되었으며, KBG200군에서 다른 군에 비하여 교원질이 신속하고 일정하게 재형성되었다(Fig. 14).

## 고찰»»»»

상처의 치유는 염증, 새로운 조직 형성, 재형성의 단계를 거쳐 이루어지는데 손상 후 24-48시간 동안 섬유소가 응고되고, 저산소 상태에서 박테리아, 호중구, 혈소판 등의 세포들이 이동하고 모여 염증화가 이루어지

며, 손상 후 2-10일 동안은 새로운 혈관이 형성되고, 상피세포 이동으로 재생피화가 이루어지고, 마지막으로 손상 후 2-3주부터 1년 이상 동안 콜라겐이 이동하여 재형성되고, 상처 표면은 수축되는 과정을 거친다<sup>14)</sup>. 특히 초기 염증 단계에서 새로운 조직들이 형성되는 단계로의 전환이 지연되면 만성 염증 상태로 이어져 상처 유합이 늦어지므로 상처 치유가 성공적으로 이루어지기 위해서는 항염증 작용이 필요하다<sup>15)</sup>. 그리고 이러한 치유 과정에서 다양한 활성산소종이 생성되는데<sup>16)</sup> 항산화 활성은 활성산소종으로부터 세포를 보호하고 상처 치유를 촉진한다<sup>17)</sup>.

人蔘은 약간 따뜻한 성질과 달고, 약간 쓴맛을 가져 인체의 元氣를 크게 補하고, 탈진 상태를 회복시키고, 정신을 안정시키는 효능이 있다<sup>18)</sup>. 人蔘의 생리활성 작용은 피부 창상 치유를 촉진시킬 것으로 생각되며, 人蔘을 9차례 찌고 건조하는 과정을 거친 黑蔘에서 항산화 효과가 향상되므로<sup>7-9)</sup>, 치유 촉진에 양호한 효과가 있을 것으로 기대되어 본 연구에서는 항산화 및 염증 관련 인자를 측정하여 피부 창상 동물모델에서 黑蔘 열수 추출물의 상처 치유 효과를 확인하였다.

먼저 黑蔘 열수 추출물의 항산화 효과 확인을 위하여

total polyphenol 및 total flavonoid를 측정하였다(Table I). Polyphenol은 여러 phenol고리를 포함하는 화합물로 분자의 구조적인 영향으로 다양한 작용 기전으로 항산화 활성을 가진다<sup>9)</sup>. 이 중 flavonoid는 식물에서 가장 크고 다양한 phenol 화합물을 포함하고 있어 reactive oxygen species를 제거하는 작용이 강하다<sup>20)</sup>. 다양한 flavonoid를 포함한 polyphenol의 항산화 작용 및 항염증 작용의 효과로 이를 포함한 식물을 이용하여 상처 치료에 적용한다<sup>21)</sup>.

항산화능 측정법 중 DPPH 라디칼 소거능 측정은 비교적 안정적인 free radical인 DPPH를 이용하여 시료 용액과의 반응에 의해 감소하는 정도를 측정하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다<sup>22)</sup>. 그리고 ABTS 라디칼 소거능 측정법은 ABTS 용액과 potassium persulfate의 반응으로 생성된 free radical이 시료 용액과의 반응으로 감소하는 정도를 측정하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다<sup>13)</sup>. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 측정에서 黑蓼의 농도에 의존적으로 증가하는 소거 활성에서 항산화능을 확인하였다(Figs. 1, 2).

黑蓼 열수 추출물의 피부 창상에 대한 치료 효과를 육안적으로 관찰한 결과 KBG200군에서 월등하게 빠른 치유 속도를 보였다. 보다 객관적으로 평가하고자 손상 면적을 측정하였으며, 기존에 손상된 면적 대비 7일째 및 14일째 측정값에서 대조군, Vitamin E군, KBG100군, KBG200군이 유의하게 감소하였고, 특히 KBG200군에서 피부 창상에 대한 치유를 촉진하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

한편 黑蓼 열수 추출물의 생체 내 안전성을 확인하고자 체중 변화 및 혈청 내 AST, ALT 검사를 하였으며, 그 결과 黑蓼 열수 추출물은 유의미한 체중 변화가 없었으며(Table II), 간에 대한 약물 독성이 나타나지 않았다(Fig. 4).

黑蓼 열수 추출물의 염증 억제 효과를 확인하고자 혈청 내 MPO 활성을 측정하였다. MPO는 호중구 내에 존재하여 염증의 바이오마커로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 피부 손상 시 상처 부위로 호중구가 집중되어 파괴된 조직 제거 및 식세포 작용을 하며<sup>24)</sup>, 호중구에서 hypochlorous acid의 생산을 촉진하여 강력한 살균작용을 한다<sup>25)</sup>. MPO 활성을 측정한 결과, KBG100군, KBG200군에서 유의하게 낮음을 확인하였으며 특히 KBG200군에서 염증 작용을 억제하였다(Fig. 5).

또한 피부 조직 내 oxidative stress 관련 단백질을 측정하였다. Oxidative stress는 활성산소종과 항산화 활성의 불균형으로 나타나며 상처 치유를 지연시켜 만성화된 염증에서 나타난다<sup>26)</sup>. 활성산소종은 침입한 박테리아를 제거하고, 세포의 증식과 이동 등 세포 기능을 억제 및 조직 파괴를 유도하지만 과도하면 세포를 손상시키고 상처 치유를 지연시킨다<sup>27)</sup>. NOX는 산화 환원 신호 전달에서 중요하게 매개하는 막 결합 복합체(membrane-bound complex)로 세포막을 가로질러 산소를 superoxide anion radical ( $O_2^-$ )로 환원시키며, NOX4의 활성화에는 p22<sup>phox</sup>가 필요하다<sup>28)</sup>. NOX4는 상처 치유 중 저산소 상태에서 혈관 신생에 필요하며<sup>29,30)</sup>, 또한 호중구 및 대식세포의 이동을 유발하여 식균작용을 유도한다<sup>31)</sup>. 피부조직 내 NOX4 및 p22<sup>phox</sup> 발현량은 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 유의하게 낮음을 확인하였으며, 특히 KBG200군에서 NOX4 및 p22<sup>phox</sup>가 낮아 활성산소종 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 6).

그리고 피부 조직 내 항산화 유전자 발현에 대하여 Nrf2 및 Keap-1을 측정하였다. Nrf2는 세포에서 항산화 관련 유전자 전사 조절을 포함하여 다양한 세포보호 유전자의 발현을 유도하는 전사인자로, Keap-1이 길항제로 작용하여 Nrf2와 결합하여 복합체를 이룬다<sup>32,33)</sup>. 세포질 내 Nrf2/Keap-1의 복합체는 산화적 스트레스 상태에서 분해되고, Nrf2는 핵 내로 전위되어 항산화 유전자 전사를 조절하여 세포 보호 작용을 한다<sup>32,33)</sup>. 조직 손상 시 Nrf2는 활성화되고, 다른 전사 인자와 시너지 작용을 하여 상처 회복을 촉진한다<sup>33)</sup>. Keap-1 수준의 감소는 Nrf2를 핵으로 전위하여 유전자 발현을 조절할 수 있게 한다<sup>34)</sup>. 피부 조직 내 Nrf2는 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, Keap-1은 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 유의하게 감소함을 확인하였으며, 특히 KBG200군에서 항산화 관련 유전자 발현을 유도함을 확인하였다(Fig. 7).

피부 조직 내 항산화 관련 효소인 HO-1, SOD-1, catalase, GPx-1/2를 측정하였다. 활성산소종의 생산은 Nrf2와 HO-1의 활성화를 통해 조절될 수 있다<sup>35)</sup>. 또한 HO-1은 대식세포의 활성화에 중요한 매개체이며 호중구의 이동을 막아 염증 억제를 유도한다<sup>36)</sup>. 그리고 상처 치유 중 재상피화와 혈관신생에 관여하며, HO-1의 결핍은 상처 치유 지연을 일으킨다<sup>37)</sup>. SOD 또한 과도하게 생성

된 superoxide anion radical ( $O_2^-$ )의 과산화수소( $H_2O_2$ ) 및 물( $H_2O$ )로의 변화를 촉진시킨다<sup>38</sup>). 또한 SOD의 결핍은 허혈로 인한 치유 장애를 일으키며, SOD를 통해 혈관신생으로 상처 치유를 정상화한다<sup>39</sup>). 저농도의 과산화수소는 각질세포에서 vascular endothelial growth factor를 유도하여 혈관신생을 촉진한다<sup>40</sup>). 그러나 과산화수소는 전이금속의 촉매 작용으로 반응성이 높은 hydroxyl radical ( $\bullet OH$ )을 생성하여 세포독성을 가지므로 SOD의 작용으로 생성된 과산화수소는 catalase와 GPx의 발현을 통한 신속한 분해가 필요하다<sup>41</sup>). 항산화 관련 효소인 HO-1, SOD-1, catalase, GPx-1/2 모두 Vitamin E군, KBG200군에서 모두 유의하게 증가하였고, 특히 KBG200군에서 확연히 증가하였다(Fig. 8).

다음으로 피부조직 내 염증 관련 단백질을 분석하였다. 염증성 전사인자인 NF- $\kappa B$  및 p-I $\kappa B\alpha$ 를 측정하였다. NF- $\kappa B$ 는 유도성 전사인자로, 활성화된 상태에서는 다양한 유전자의 전사를 활성화하여 염증성 사이토카인, 케모카인, 접합 분자(adhesion molecule)의 생산을 증가시켜 염증을 조절한다<sup>42</sup>). 이러한 효과로 상처 초기에 염증을 유발하며, 후기에는 항염증 유전자를 유도하여 치유를 마무리한다<sup>43</sup>). 안정 시 대부분의 세포에서 NF- $\kappa B$ 는 I $\kappa B$  (주로 I $\kappa B\alpha$ )와 결합하여 비활성 상태이며, I $\kappa B$ 의 인산화 후 프로테아좀에 의해 분해되면 핵 내로 들어가 활성화된다<sup>44</sup>). NF- $\kappa B$ 의 활성화 신호조절에 대한 경로 중 전형적(classical) 경로에서 NF- $\kappa B$  (p65/p50 heterodimer)는 I $\kappa B\alpha$ 에 우선적으로 조절되며, I $\kappa B\alpha$ 의 인산화(p-I $\kappa B\alpha$ ) 후 분해 및 활성이 이루어진다<sup>45</sup>). 본 연구에서 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 모두 유의하게 감소함을 확인하였으며, 특히 KBG200군에서 염증성 전사인자가 낮게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 9).

그리고 피부 조직 내 염증성 매개인자인 COX-2 및 iNOS를 측정하였다. COX-2는 아라키돈산을 염증성 프로스타글란딘(주로 prostaglandin  $E_2$ )으로 전환하고, 염증성 사이토카인 및 케모카인 생산을 촉진한다<sup>46</sup>). 주로 손상 초기에 증가하여 정점에 이르고, 세포 이동 및 증식을 촉진시켜 재생피화 및 혈관신생의 밑바탕이 될 수 있다<sup>47</sup>). 상처 치유의 초기인 염증 단계에서 iNOS는 염증성 사이토카인과 성장인자의 방출에 의해 발현이 상승하지만 치유 후기의 상처 부위에서 iNOS 활성은 감소한다<sup>48</sup>). iNOS는 nitric oxide (NO)의 합성을 유도하여

상처 치유 초기에 피부 혈관 확장, 혈관신생, 염증 등의 다양한 면역 반응이 나타나고, 낮은 농도의 NO는 세포 증식을 유도하고, 콜라겐 합성, 각질세포의 증식과 재생피화를 일으킨다<sup>49</sup>). 본 연구에서 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 모두 유의하게 감소하는 것을 확인하였고, 특히 KBG200군에서 염증성 매개인자가 낮아 상처 치유를 촉진함을 확인하였다(Fig. 10).

피부 조직에서 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6를 측정하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 치유 과정 중 초기에 상처 조직에서 빠르게 방출되어 염증을 유발한다<sup>50,51</sup>). 낮은 수치의 TNF- $\alpha$ 는 간접적으로 염증을 자극하고 대식세포를 증가시켜 상처 치유를 촉진하지만, 장기간 높은 수치의 TNF- $\alpha$ 는 치유에 방해가 된다<sup>51</sup>). 정상적인 상처 치유 중 재형성 단계에서 IL-6는 상당히 감소한다<sup>52</sup>). 본 연구에서 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 모두 유의하게 감소하는 것을 확인하였고, 특히 KBG200군에서 염증성 사이토카인이 정상군에 가깝게 낮아짐을 확인하여 상처 치유가 촉진되는 것을 알 수 있었다(Fig. 11).

또한 피부 조직에서 항염증 관련 사이토카인 IL-4와 IL-10을 측정하였다. IL-4는 대식세포의 대체적 활성화(alternative activation)를 매개하며, 이는 새로운 혈관의 성장을 촉진하여 상처 치유를 일으킨다<sup>53</sup>). IL-4는 대식세포에서 아르기나아제 활성 촉진을 통해 세포외기질의 재형성을 돕는다<sup>54</sup>). IL-10은 출산 후 태아의 흉터 치유에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 재생 촉진 메커니즘과 효과를 바탕으로 흉터 방지제로서 개발 연구도 이루어지고 있다<sup>55</sup>). IL-10은 T세포, 단핵구, 대식세포를 활성화시키고 염증성 사이토카인 생산을 감소시켜 염증 반응을 조절하고 치유를 촉진하는 것으로 알려져왔다<sup>56</sup>). IL-10은 signal transducer and activator of transcription 3을 의존적으로 염증성 사이토카인 생산과 산화질소 방출을 강하게 억제한다<sup>57</sup>). 본 실험에서 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 모두 유의하게 상승하는 것을 확인하였고, 특히 IL-10의 경우 KBG200군에서 정상군에 가깝게 상승하여 항염증 사이토카인이 촉진됨을 확인하였다(Fig. 12).

피부조직 내 방어막 역할을 하는 밀착 연결 단백질 중 claudin-1, claudin-3, claudin-4를 측정하였다. 밀착 연결 단백질은 세포와 세포 사이의 접합 복합체의 일부로<sup>58</sup>), 피부의 방어막 및 장벽 기능을 하면서 세포 증식,

분화, 이동을 조절하고 있다<sup>59</sup>). 피부 상처로 정상 상피가 파괴되면 상피 세포의 증식 및 이동이 유도되어 밀착 연결 단백질이 재구성되어 새로운 상피층을 형성하게 되며, 이러한 재구성은 일시적인 장벽을 제공하여 상처 치유에 필수적인 역할을 한다<sup>59</sup>). Claudin은 이세포성 밀착 연결 중 주요 막관통 단백질(transmembrane protein)로, 마우스의 피부 상처 실험에서 claudin-1, claudin-3, claudin-4는 상당한 동적 변화를 보였고, 이들 단백질이 상처 치유에 관여함을 알 수 있었다<sup>60</sup>). Claudin-1은 급성 상처 가장자리의 재생 표피에서 증가하며 만성 상처의 경우 상당히 낮게 나타난다<sup>60,61</sup>). Claudin-1의 역할은 피부 각질 세포의 증식을 감소시키며<sup>62</sup>), 이는 급성 상처의 재생피화를 지연시킨다<sup>63</sup>). Claudin-1, claudin-3, claudin-4의 발현량은 Vitamin E군, KBG100군, KBG200군에서 모두 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, 특히 KBG200군에서 정상군 수준의 측정값을 보여 黑蓼 열수 추출물의 표피재생 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 13).

피부 손상 부위 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 H&E, Masson's trichrome 염색을 하여 피부 조직 상태를 확인하였다. Vitamin E군, KBG100군, KBG200군 모두 대조군에 비해 얇고 일정하게 상피층이 형성된 것을 확인할 수 있었고, 특히 KBG200군의 Masson's trichrome 염색에서는 콜라겐이 보다 신속하고 일정하게 재형성되어 피부 상처에 대한 치유를 촉진하였다(Fig. 14).

본 연구는 피부 창상 동물모델을 통하여 黑蓼의 작용을 알아보았다. 그 결과 항산화 효과 및 항염증 효과로 인하여 피부 창상의 치유를 촉진함을 확인하였다. 하지만 본 연구는 黑蓼의 열수추출물을 사용하였으므로 구체적으로 어떠한 특정 인삼사포닌의 작용에 의한 효과인지 확인하기 어렵다는 한계가 있어 본 연구를 토대로 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

이상의 연구 결과를 종합하면 黑蓼 열수 추출물은 항산화 및 항염증 효과가 있어 피부 창상 동물모델에서 유의한 효과가 있음을 실험적으로 확인하였고, 피부의 창상 치료에 활용할 가능성 및 근거가 된다고 판단한다.

## 결론»»»»

피부 상처에 黑蓼 열수 추출물의 경구 투여에 대한

치료 효과를 확인하기 위해 피부 창상을 유발한 동물모델에 KBG를 경구 투여한 후 피부 손상 면적, MPO 활성, oxidative stress 관련 단백질, antioxidant 관련 단백질, inflammation 관련 단백질, anti-inflammatory 관련 단백질, tight junction 관련 단백질, 조직학적 변화 등을 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 피부 손상 면적을 측정된 결과, 14일째에 유발 첫 날과 비교하여 대조군 63.09%, Vitamin E군 77.11%, KBG100군 83.04%, KBG200군 89.18%로 상처가 회복되었다.
2. 혈청 내에서 MPO의 활성을 측정된 결과, 대조군 0.33±0.03 mU/mL에 비하여 KBG100군 0.27±0.03 mU/mL와 KBG200군 0.25±0.05 mU/mL에서 유의하게 감소하였다.
3. 피부 조직에서 oxidative stress 관련 단백질 NOX4 및 p22<sup>phox</sup>의 발현을 측정된 결과, 대조군과 비교하여 KBG200군이 NOX4 23.36%, p22<sup>phox</sup> 20.45%로 유의하게 감소하였다.
4. 피부 조직에서 antioxidant 관련 단백질 Nrf2, Keap-1, HO-1, SOD-1, catalase 및 GPx-1/2의 발현을 측정된 결과, 대조군에 비교하여 KBG200군에서 Nrf2 51.85%, HO-1 41.07%, SOD-1 36.51%, catalase 22.97%, GPx-1/2 23.68%로 유의하게 증가하였으며, Keap-1은 35.54%로 유의하게 감소하였다.
5. 피부 조직에서 inflammation 관련 단백질을 측정된 결과, KBG200군이 대조군과 비교하여 NF-κB 23.40%, p-IκBα 18.98%, COX-2 17.39%, iNOS 17.86%, TNF-α 25.53%, IL-6 24.44%로 유의하게 감소하였다.
6. 피부 조직에서 anti-inflammatory 관련 단백질 IL-4 및 IL-10을 측정된 결과, IL-4에서 대조군과 비교하여 모든 KBG 투여군에서 유의하게 증가하였으며, IL-10에서 KBG200군이 대조군과 비교하여 발현 증가율이 44.93%로 정상군 수준까지 증가하였다.
7. 피부 조직에서 tight junction 단백질의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비교하여 KBG200군에서 Claudin-1 30.88%, Claudin-3 40.00%, Claudin-4 40.30%로 증가하였다.
8. 병리조직학적 변화를 관찰한 결과, 모든 KBG 투여군에서 대조군과 비교하여 피부 상피층의 두께

가 얇고 일정하게 형성되었으며, 특히 KBG200군에서 교원질이 다른 군에 비하여 빠르게 형성되었다.

이상의 결과를 볼 때 黑蓼 열수 추출물의 경구 투여는 피부 창상을 유발한 동물모델에서 항염증 관련 단백질의 발현을 증가시켜 염증을 유발하는 단백질을 유의하게 감소시켰으며, 피부 상피층의 두께를 일정하게 형성되게 함으로 피부상처 치료에 효과적일 것으로 생각된다.

## References>>>>

1. Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*. 2011;12(9):565-80.
2. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585-601.
3. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 2012;49(1):35-43.
4. Han ST, Whang WK, Kim IH, Yang BW, Cho SH, Ko SK. Analysis of ginsenosides of black ginseng. *Archives of Pharmacal Research*. 2005;49(6):490-4.
5. Kim SN, Kang SJ. Effects of black ginseng (9 times steaming ginseng) on hypoglycemic action and changes in the composition of ginsenosides on the steaming process. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2009;41(1):77-81.
6. Nam KY, Lee NR, Moon BD, Song GY, Shin HS, Choi JE. Changes of ginsenosides and color from black ginsengs prepared by steaming-drying cycles. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2012;20(1):27-35.
7. Kim HJ, Lee JY, You BR, Kim HR, Choi JE, Nam KY, Moon BD, Kim MR. Antioxidant activities of ethanol extracts from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2011;40(2):156-62.
8. Kim MY, Kwon OJ, Noh JS, Roh SS. Inhibitory activities of water extracts of black ginseng on HCL/ethanol-induced acute gastritis through anti-oxidant effect. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2016;45(9):1249-56.
9. Metwaly AM, Lianlian Z, Luqi H, Dequiang D. Black ginseng and its saponins: preparation, phytochemistry and pharmacological effects. *Molecules*. 2019;24(10):1856.
10. Go YJ, Kim YE, Kim HN, Lee EH, Cho EB, Sultanov A, Kwon SI, Cho YJ. Inhibition effect against elastase, collagenase, hyaluronidase and anti-oxidant activity of thinning green ball apple. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2020;63(1):43-50.
11. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994;64(2):155-61.
12. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-200.
13. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:1231-7.
14. Geoffrey CG, Werner S, Barrandon Y, Longaker TM. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.
15. Li D, Wang A, Liu X, Meisgen F, Grünler J, Botusan IR, Narayanan S, Eriki E, Li X, Blomqvist L, Du L, Pivarcsi A, Sonkoly E, Chowdhury K, Catrina SB, Stähle M, Landén NX. MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(8):3008-26.
16. André-Lévigne D, Modarressi A, Pepper MS, Pittet-Cuénod B. Reactive oxygen species and NOX enzymes are emerging as key players in cutaneous wound repair. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(10):2149.
17. Keller U, Kümin A, Braun S, Werner S. Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2006;11(1):106-11.
18. The Korean Medicine Society for Herbology. *Herbology*. Seoul:Yeongrim. 2007:572-4.
19. Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(2):160.
20. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 2003;23(4):519-34.
21. Shah A, Amini-Nik S. The role of phytochemicals in the inflammatory phase of wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(5):1068.
22. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011;48(4):412-22.
23. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase:

- a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators of Inflammation*. 2008;2008:135625.
24. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(3):514-25.
  25. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.
  26. Utami ND, Nordin A, Katas H, Idrus RBH, Fauzi MB. Molecular action of hydroxytyrosol in wound healing: an in vitro evidence-based review. *Biomolecules*. 2020;10(10):1397.
  27. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez-Perez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*. 2015;6:183-97.
  28. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology*. 2015;12(1):5-23.
  29. Mittal M, Roth M, König P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MAR, Fink L, Hänze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HHHW, Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circulation Research*. 2007;101(3):258-67.
  30. Peshavariya HM, Chan EC, Liu GS, Jiang F, Dusting GJ. Transforming growth factor- $\beta$ 1 requires NADPH oxidase 4 for angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014;18(6):1172-83.
  31. Levigne D, Modarressi A, Krause KH, Pittet-Cuenod B. NADPH oxidase 4 deficiency leads to impaired wound repair and reduced dityrosine-crosslinking, but does not affect myofibroblast formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2016;96:374-84.
  32. Hiebert P, Werner S. Regulation of wound healing by the NRF2 transcription factor-more than cytoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16):3856.
  33. Victor P, Sarada D, Ramkumar KM. Pharmacological activation of Nrf2 promotes wound healing. *European Journal of Pharmacology*. 2020;886:173395.
  34. Rabbani PS, Soares MA, Hameedi SG, Kadle RL, Mubasher A, Kowzun M, Ceradini DJ. Dysregulation of Nrf2/Keap1 redox pathway in diabetes affects multipotency of stromal cells. *Diabetes*. 2019;68(1):141-55.
  35. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(20):3861-85.
  36. Abdalla HB, Napimoga MH, Lopes AH, Maganin AGM, Cunha TM, Dyke TEV, Napimoga JTCN. Activation of PPAR- $\gamma$  induces macrophage polarization and reduces neutrophil migration mediated by heme oxygenase 1. *International Immunopharmacology*. 2020;84:106565.
  37. Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Calzi SL, Lach R, Hock TD, Chen B, Hill-Kapturczak N, Siegal GP, Dulak J, Jozkowicz A, Grant MB, Agarwal A. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(3):605-18.
  38. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 1995;64(1):97-112.
  39. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, Gurtner GC. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(16):10930-8.
  40. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt T, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Molecular Therapy*. 2006;13(1):211-20.
  41. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*. 2008;58(2):165-71.
  42. Liu M, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2:e17023.
  43. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different face of NF- $\kappa$ B. *Cell Death and Differentiation*. 2006;13(5):759-72.
  44. Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-4.
  45. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development*. 2004;18(18):2195-224.
  46. Chen C. Cox-2's new role in inflammation. *Nature Chemical Biology*. 2010;6(6):401-2.
  47. Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Laboratory Investigation*. 2002;82(11):1503-13.
  48. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*. 2002;183(4):406-12.
  49. Shi HP, Most D, Efron DT, Tantry U, Fischel MH, Barbul A. The role of iNOS in wound healing. *Surgery*. 2001;130(2):225-9.
  50. Masae R, Kazuyoshi K, Emi K, Hiromasa T, Keiko I, Yoshimichi I, Ryoko M, Masahiro T. Critical role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic*

- Surgery. 2017;21(1):14-9.
51. Stephan B, Olivera S, Michael GS, Harold B, Marjana CT. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585-601.
  52. Blair ZJ, Andrew WS, Cecilia MP, Mark WF, Fiona MW. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5):101-19.
  53. Delavary BM, Veer WM, Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011;216(7):753-62.
  54. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
  55. King A, Balagi S, Le LD, Crombleholme TM, Keswani SG. Regenerative wound healing: The role of interleukin-10. *Advances in Wound Care*. 2014;3(4):315-23.
  56. Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):683-765.
  57. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(1):23-35.
  58. Shi J, Barakat M, Chen D, Chen L. Bicellular tight junctions and wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12):3862.
  59. Farkas AE, Capaldo CT, Nusrat A. Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1258(1):115-24.
  60. Leonardo TR, Shi J, Chen D, Trivedi HM, Chen L. Differential expression and function of bicellular tight junctions in skin and oral wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(8):2966.
  61. Volksdorf T, Heilmann J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M, Ueck C, Vidal-y-Sy S, Windhorst S, Jucker M, Moll I, Brandner JM. Tight junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing. *The American Journal of Pathology*. 2017;187(6):1301-12.
  62. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;127(3):773-86.
  63. Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008;56(7):687-96.