

침의 자극이 흰쥐 피부의 화상치유과정에서 TGF- β_1 , TGF- β_3 , EGF와 IL-6 발현에 미치는 영향

장호준, 우봉식¹, 신체수¹, 서윤경¹, 백두진¹, 김남수²

한신의원, ¹한양대학교 의과대학 해부학·세포생물학교실, ²남수침술원

간추림 : 임상에서 사용되는 침을 이용한 자극이 화상 치유에 어떠한 영향을 주는지 알아 보기 위하여, 화상치유과정에서 침 자극후 나타나는 형태학적인 변화와 이때 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 TGF- β_1 과 TGF- β_3 , EGF, IL-6의 발현을 정상치유과정과 비교관찰하였다.

실험동물은 체중 250~300g의 흰쥐를 사용하였다. 아무런 조치도 취하지 않은 정상대조군을 C, 시침만 한 군을 Ca로 표기하였다. 실험군은 12마리를 1조로 하여 화상만 입힌 6마리를 B군, 화상을 입힌 뒤 시침한 6마리를 Ba군으로 나누었다. 흰쥐의 허리부위에 특수 제작된 인두를 사용하여 15~18초 가량 열을 가하여, 가로 15mm, 세로 25mm 크기의 화상을 입혔다. 화상을 입힌 후 직경 0.25mm, 길이 20mm 침을 이용하여, 화상부위와 그 가장자리 5mm 부위에 간격 5~7mm, 깊이 5mm로 시침하였다. Ca군은 20분간 1회 시침하였다. Ba군은 12시간마다 20분씩 총 3회 시침하였고, 화상후 1일, 3일, 7일, 15일과 20일에 실험동물을 희생시켜 허리부위의 피부조직을 얻었다. 조직학적인 변화를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 시행하였고, TGF- β_1 , TGF- β_3 , EGF, IL-6의 발현 정도를 알아보기 위하여 면역조직화학염색을 시행하였다.

1. 육안 소견상 시침한 실험군의 화상부위에서 냄새가 덜 나고, 피부 표면이 깨끗하였다.
2. 시침한 실험군에서 3일부터 7일까지 표피 재생, 피부근육, 육아조직의 형성이 더 뚜렷하였으나, 15일 이후에는 큰 차이가 없었다.
3. TGF- β_1 은 Ba군 근육에서 1일과 3일에 먼저 나타났다가, 7일에 Ba군이 먼저 소실되었다.
4. TGF- β_3 는 B군과 Ba군에서 큰 차이가 없었다.
5. EGF는 B군과 Ba군의 피부밀조직에서 3일부터 발현되나, 7일 이후에는 Ba군에서 먼저 감소하였으며, 근육에서도 7일 이후에 먼저 감소하였다.
6. IL-6의 발현은 B군과 Ba군의 표피, 진피, 피부밀조직과 근육에서 유사하였으나, 근육밀결합조직에서 IL-6의 발현은 3일 이후에 Ba군에서 먼저 감소되었다.

이상의 결과를 바탕으로 침의 자극은 피부에서 세포밖바탕질형성 초기에 필수적인 TGF- β_1 의 생성과 소멸을 촉진시키고, EGF의 소멸을 촉진시킴으로써 화상치유과정을 증진시키는 것으로 결론지을 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 침, 흰쥐, 화상, 피부, 성장인자

서 론

오늘날 현대사회에서 화상은 산업의 발전과 생

활의 변화로 증가하고 있다. 그러나 의학의 많은 발전에도 불구하고 중증화상의 경우는 치료가 어렵고, 신체장애 또는 기능장애를 동반하게 되는 경우가 많으며, 사망률 또한 높은 실정이다. 현재 화상의 치료에는 약물요법, 수액요법, 외과적 절개요법 등 여러 방법이 적용되고 있으며, 최근에는 임

*이 연구는 정통침뜸연구소(이사장: 김남수)의 지원으로 이루어졌음.

교신저자: 백두진 (한양대학교 의과대학 해부학·세포생물학교실)

상에서 화상의 치료를 위해 침술을 사용하고 있는 경우도 있다.

침술이 서양에 알려진 후로는 서양에서도 침술을 여러가지 질병의 치료보조요법으로 사용하고 있다. Papantonio (1988)는 침술로 환자들의 창상치료와 치료후 통증을 감소시키려는 시도가 많아지고 있다고 하였으며, Sumano와 Mateos (1999)는 화상환자들에게 침술을 적용함으로써 통증을 감소시킬 수 있다고 하였다. 침술이 임상에서 화상의 통증감소와 치료에 이용되고 있으나, 침술의 어떤 영향으로 치료에 도움을 주는지는 잘 알려져 있지 않다.

이에 본 저자들은 침의 자극이 창상치유와 화상치유에 관여하는 transforming growth factor (TGF)- β_1 , TGF- β_3 , epidermal growth factor (EGF) 등의 성장인자와 interleukin-6 (IL-6)의 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 13주령된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였고, 먹이와 물은 제한없이 공급하였다.

대조군은 아무런 조치도 취하지 않은 정상대조군 C와 시침만을 1회 시행한 시침대조군 Ca로 나누었고, 실험군은 화상을 입힌 B군과 화상 후 시침한 Ba군으로 나누었다.

화상 유발은 흰쥐 허리부위의 털을 제거한 뒤 알코올로 소독하고, 끝에 구리로된 가열 장치가 장착된 직사각형 모양의 인두(가로 15 mm, 세로 25 mm, 높이 10 mm)를 10분간 가열한 뒤 18 초 동안 열을 가하여, 가로 15 mm, 세로 25 mm 크기의 화상을 입혔다. 동일한 화상정도를 유발하기 위하여 한 마리의 화상유발이 끝나면 30초 동안 인두를 재가열한 뒤, 다음 동물에게 사용하였다. 시침은 동방침구제작소에서 제작한 0.25 mm \times 20 mm의 침을 이용하여 화상부위와 주위 5 mm까지의 피부에 간격

5~7 mm, 깊이 5 mm로, 화상을 입힌 부위와 화상부 주위의 5 mm까지의 피부에 시침하였다.

Ca군은 20분간 1회 시침하였고, Ba군은 아침 9시, 저녁 9시, 익일 아침 9시에 20분씩 총 3회 시침하였다.

화상 후 1일, 3일, 7일, 15일과 20일에 실험동물을 희생시켰다. 화상부위와 주변의 정상피부를 10 mm 포함하여 떼어낸 후, 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 고정시킨 후 6 μ m의 파라핀절편을 만들었다.

2. 염 색

조직학적인 변화를 알아보기 위하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 시행하였고, TGF- β_1 , TGF- β_3 , EGF, IL-6의 발현 정도를 알아보기 위하여 면역조직화학염색을 시행하였다.

면역조직화학염색을 위해 탈파라핀 및 함수과정을 거친 후 phosphate buffered saline (PBS) 용액에 세척하고, 3% H₂O₂용액에 5분간 반응시킨 후 0.4% pepsin용액 (Sigma, USA)을 37°C에서 40분간 적용하였다. 일차항체는 rabbit anti-human TGF- β_1 (Santa Cruz, USA)을 1:30, rabbit anti-human TGF- β_3 (Santa Cruz)를 1:80, goat anti-rat EGF (Chemicon, USA)를 1:100, IL-6 (Santa Cruz)를 1:10으로 희석하여 37°C에서 90분간 반응시켰으며, PBS로 세척하고 각각의 일차항체에 맞는 이차항체 biotinylated goat anti-rabbit IgG, biotinylated horse anti-mouse IgG, biotinylated rabbit anti-goat IgG (Vector lab., USA)를 실온에서 40분간 반응시킨 뒤 PBS로 세척하였다. ABC (avidin-biotin complex, Vector) 반응액으로 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 발색은 DAB 검색시료 (Vector)를 이용하였으며, 1% methyl green으로 대조염색 후 탈수, 청명 후 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다. 면역조직화학 반응이 확실한지 확인하기위해 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하였다.

면역조직화학염색의 판독은 화상부위와 화상주변부에서 염색이 균일하게 잘 된 부위를 기준으로 하여 음성 반응(-), 경미한 염색상을 보인 경우 미

약한 양성반응(±), 약한 염색상을 보인 경우 정도의 양성반응(+), 중등도의 염색상을 보인 경우 중등도의 양성반응(++), 강한 염색상을 보인 경우 강한 양성반응(+++)으로 등급을 정하여 서로 비교하였고, Table 1과 2, 3, 4에 정리하였다.

결 과

1. 육안 소견

모든 실험군에서 화상 후 시침을 한 Ba군에서 화상만을 입힌 B군보다 냄새가 덜 나고 피부 표면이 깨끗하였다.

2. H-E 염색 소견

정상대조군인 C군과 시침만 한 Ca군은 조직의 각 층이 잘 유지되었다(Figs. 1, 2).

화상을 입은 B군에서는 표피가 떨어져 나가고, 진피층에 부종이 생기고, 근육이 파괴되는 양상을 보였다. 화상 후 1일에는 B군과 Ba군의 차이가 없었으나, 3일에는 Ba군의 표피의 재생과 근육, 육아조직의 형성이 B군보다 증가하였다(Figs. 3, 4). 특히 Ba군에서 화상 부위와 인접한 정상 근육이 판상으로 화상 부위로 뻗어 나아가는 변화가 뚜렷하였다. 이러한 양상은 7일에도 비슷하였고, 15일과 20일에는 B군과 Ba군 두 군 사이에 큰 차이가 없었다.

3. TGF-β₁면역조직화학 염색 소견

C군의 표피와 근육은 음성반응(-)을, 진피는 미약한 양성(±), 피부밑조직은 정도의 양성반응(+)을 나타내었다.

Ca군은 표피와 근육에서는 음성반응(-)을 나타내었고, 진피와 피부밑조직에서는 중등도의 양성반응(++)을 나타내었다.

B군의 1일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피에서는 음성반응(-), 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±)으로, 근육과 근육밑결합조직에서는 정도의 양성반응(+)으로 나타났다(Fig. 5). 3일째 표피와 진피에서는 음성반응(-)으로 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 정도의 양성반응(+), 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(+)으로 나타났다. 7일째 표피와 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직은 정도의 양성반응(+)으로, 근육에서는 중등도의 양성반응(++), 근육밑결합조직에서는 정도의 양성반응(+)으로 나타났다(Fig. 7). 15일째 표피와 진피에서는 정도의 양성반응(+), 피부밑조직에서는 음성반응(-)으로, 근육과 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다. 20일째 표피에서는 정도의 양성반응(+)으로, 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직에서는 음성반응(-)으로, 근육에서는 미약한 양성반응(±), 근육밑결합조직에서는 정도의 양성반응(+)으로 나타났다.

Ba군의 1일째 표피와 진피에서는 음성반응(-), 피부밑조직에서는 정도의 양성반응(+)으로, 근육

Table 1. Immunoreactivities of TGF-β₁ in the burn wound of rat

	Control		1st D		3rd D		7th D		15th D		20th D	
	C	Ca	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba
Epi	-	-	±	-	-	±	±	±	+	+	+	+
Der	±	++	-	-	-	-	±	±	+	+	±	±
SC	+	++	±	+	±	-	+	+	-	±	-	-
M	-	-	+	++	+	++	++	+	±	±	±	-
CM	+	++	+	+	±	+	+	+	±	±	+	+

Abbreviations

C : normal control; Ca : acupuncture treatment; B : burn treatment; Ba : acupuncture treatment after burn treatment; D : day
 Epi : epidermis; Der : dermis; SC : subcutaneous tissue; M : muscle; CT : connective tissue below muscle
 - : negative immunoreactivity, ± : trace immunoreactivity; + : mild immunoreactivity; ++ : moderate immunoreactivity
 +++ : strong immunoreactivity

에서는 중등도의 양성반응(++)로 나타났으며, 근육밀결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났으며(Fig. 6). 3일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피와 피부밀조직에서는 음성반응(-), 근육에서는 중등도의 양성반응(++)로 나타났으며, 근육밀결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났으며. 7일째 표피와 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밀조직과 근육, 근육밀결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났으며(Fig. 8). 15일째 표피와 진피에서는 경도의 양성반응(+), 피부밀조직, 근육과 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났으며. 20일째 표피에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났으며, 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밀조직, 근육에서는 음성반응(-)으로 나타났으며, 근육밀결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났으며(Table 1).

4. TGF-β₃면역조직화학 염색 소견

C군의 표피와 근육은 경도의 양성반응(+)을, 진피와 피부밀조직, 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)을 나타내었다.

Ca군은 표피와 진피에서는 경도의 양성반응(+), 근육에서는 음성반응(-), 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)을 나타냈다.

B군의 1일째 표피와 진피에서는 음성반응(-), 피부밀조직에서는 미약한 양성반응(±)으로, 근육과 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났으며. 3일째 표피와 진피에서는 음성반응(-), 피부밀조직에서는 경도의 양성반응(+), 근육과 근육밀

결합조직에서는 중등도의 양성반응(++)으로 나타났으며. 7일째 표피와 진피에서는 음성반응(-), 피부밀조직에서는 경도의 양성반응(+), 근육에서는 중등도의 양성반응(++)으로, 근육밀결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났으며. 15일째 표피와 진피에서는 경도의 양성반응(+), 피부밀조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 음성반응(-), 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났으며. 20일째 표피에서는 중등도의 양성반응(++)으로, 진피에서는 경도의 양성반응(+), 피부밀조직과 근육에서는 음성반응(-)으로, 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났으며.

Ba군의 1일째 표피와 진피에서는 음성반응(-), 피부밀조직에서는 미약한 양성반응(±)으로, 근육에서는 경도의 양성반응(+), 근육밀결합조직에서는 중등도의 양성반응(++)으로 나타났으며. 3일째 표피에서는 음성반응(-), 진피에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 중등도의 양성반응(++)로 나타났으며. 7일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피에서는 음성반응(-), 피부밀조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 중등도의 양성반응(++)으로, 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났으며. 15일째 표피와 진피에서는 경도의 양성반응(+), 피부밀조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 음성반응(-), 근육밀결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났으며. 20일째 표피에서는 중등도의 양성반응(++)으로, 진피에서는

Table 2. Immunoreactivities of TGF-β₃ in the burn wound of rat

	Control		1st D		3rd D		7th D		15th D		20th D	
	C	Ca	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba
Epi	+	+	-	-	-	-	-	±	+	+	++	++
Der	±	+	-	-	-	±	-	-	+	+	+	+
SC	±	+	±	±	+	±	+	±	±	±	-	-
M	+	-	-	+	++	++	++	++	-	-	-	±
CM	±	±	-	++	++	±	+	±	±	±	±	±

Abbreviations

C : normal control; Ca : acupuncture treatment; B : burn treatment; Ba : acupuncture treatment after burn treatment; D : day
 Epi : epidermis; Der : dermis; SC : subcutaneous tissue; M : muscle; CT : connective tissue below muscle
 - : negative immunoreactivity; ± : trace immunoreactivity; + : mild immunoreactivity; ++ : moderate immunoreactivity
 +++ : strong immunoreactivity

경도의 양성반응(+), 피부밑조직은 음성반응(-), 근육과 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다(Table 2).

5. EGF 면역조직화학염색 소견

C군의 표피에서는 음성반응(-), 진피에서는 미약한 양성반응(±)으로, 피부밑조직과 근육, 근육밑결합조직에서도 음성반응(-)으로 관찰되었다.

Ca군은 표피와 진피는 미약한 양성반응(±)으로, 피부밑조직과 근육에서는 음성반응(-)으로, 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다.

B군의 1일째 표피와 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직과 근육에서는 음성반응(-)으로, 근육밑결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났다. 3일째 표피와 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직에서는 경도의 양성반응(+), 근육과 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다. 7일째 표피와 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직에서는 경도의 양성반응(+), 근육에서는 음성반응(-), 근육밑결합조직에서는 중등도의 양성반응(++)으로 나타났다(Fig. 9). 15일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피에서는 음성반응(-), 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 음성반응(-), 근육밑결합조직에서는 중등도의 양성반응(++)으로 나타났다. 20일째 표피에서는 중등도의 양성반응(++)으로, 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑

조직과 근육, 근육밑결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다.

Ba군의 1일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피와 근육에서는 음성반응(-), 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다. 3일째 표피와 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직에서는 경도의 양성반응(+), 근육에서는 음성반응(-), 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다. 7일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피에서는 음성반응(-), 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 음성반응(-)으로, 근육밑결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났다(Fig. 10). 15일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피에서는 음성반응(-), 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 음성반응(-)으로, 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다. 20일째 표피에서는 경도의 양성반응(+)으로, 진피에서는 미약한 양성반응(±), 피부밑조직과 근육에서는 음성반응(-), 근육밑결합조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 나타났다(Table 3).

6. IL-6 면역조직화학염색 소견

C군의 표피는 미약한 양성반응(±)으로, 진피와 피부밑조직에서는 음성반응(-)으로, 근육은 강한 양성(+++), 근육밑결합조직은 음성반응(-)으로 나타났다.

Ca군은 표피는 경도의 양성반응(+), 진피와 피

Table 3. Immunoreactivities of EGF in the burn wound of rat

	Control		1st D		3rd D		7th D		15th D		20th D	
	C	Ca	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba
Epi	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	++	+
Der	±	±	±	-	±	±	±	-	-	-	±	±
SC	-	-	-	-	+	+	+	±	±	±	-	-
M	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
CM	-	±	+	±	±	±	++	+	++	±	-	±

Abbreviations

C : normal control; Ca : acupuncture treatment; B : burn treatment; Ba : acupuncture treatment after burn treatment; D : day
 Epi: epidermis; Der : dermis; SC : subcutaneous tissue; M : muscle; CM : connective tissue below muscle
 - : negative immunoreactivity; ± : trace immunoreactivity; + : mild immunoreactivity; ++ : moderate immunoreactivity
 +++ : strong immunoreactivity

부밑조직에서는 음성반응(-), 근육에서는 강한 양성반응(+++)을 나타내었고, 근육밀결합조직은 음성반응(-)으로 나타났다.

B군의 1일째 표피는 미약한 양성반응(±), 진피는 음성반응(-), 피부밑조직은 미약한 양성반응(±), 근육에서는 중등도의 양성반응(++)으로, 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다. 3일째 표피는 미약한 양성반응(±), 진피와 피부밑조직에서는 음성반응(-), 근육과 근육밀결합조직에서는 중등도의 양성반응(++)으로 나타났다. 7일째 표피는 미약한 양성반응(±), 진피는 음성반응(-), 피부밑조직은 미약한 양성반응(±), 근육과 근육밀결합조직은 중등도의 양성반응(++)으로 나타났다. 15일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피는 음성반응(-)으로, 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로, 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다. 20일째 표피에서는 미약한 양성반응(±), 진피에서는 음성반응(-)으로, 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±), 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로, 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다.

B군의 1일째 표피와 진피 및 피부밑조직에서는 음성반응(-), 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로 근육밀결합조직에서는 경도의 양성반응(+)으로 나타났다. 3일째 표피에서는 미약한 양성반응(±)으로 진피는 음성반응(-), 피부밑조직은 미약한 양성(±)으로 나타났고, 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로, 근육밀결합조직에서는 미약한 양

성반응(±)으로 나타났다(Fig. 12). 7일째 표피에서는 미약한 양성반응(±)으로 진피는 음성반응(-), 피부밑조직은 미약한 양성반응(±)으로 나타났고, 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로, 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다. 15일째 표피에서는 경도의 양성반응(+)으로, 진피와 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다. 20일째 표피에서는 미약한 양성반응(±)으로, 진피와 피부밑조직에서는 미약한 양성반응(±)으로 근육에서는 강한 양성반응(+++)으로 근육밀결합조직에서는 음성반응(-)으로 나타났다(Table 4).

고 찰

일반적으로 창상은 염증(1단계), 증식 및 조직형성(2단계), 조직 재성형(3단계)의 과정을 거치면서 치유되며, 이러한 과정에는 여러 종류의 성장인자(growth factor, GF)가 관여한다. 성장인자는 피부 및 기타 부위에서 생산되어 세포 증식에 관여하는데, amphiregulin, EGF, TGF-β, fibroblast GF, keratinocyte GF, nerve GF, platelet-derived GF, insulin-like GF, vascular endothelial GF, interleukin, tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등은 피부 기능에 중요한 역할을 한다.

Falabella와 Falanga (2001)는 창상치유과정의 1단

Table 4. Immunoreactivities of IL-6 in the burn wound of rat

	Control		1st D		3rd D		7th D		15th D		20th D	
	C	Ca	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba	B	Ba
Epi	±	+	±	-	±	±	±	±	±	+	±	±
Der	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±
SC	-	-	±	-	-	±	±	±	-	±	±	±
M	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
CM	-	-	-	+	++	±	++	-	-	-	-	-

Abbreviations

C : normal control; Ca : acupuncture treatment; B : burn treatment; Ba : acupuncture treatment after burn treatment; D : day
 Epi : epidermis; Der : dermis; SC : subcutaneous tissue; M : muscle; CM : connective tissue below muscle
 - : negative immunoreactivity; ± : trace immunoreactivity; + : mild immunoreactivity, ++ : moderate immunoreactivity
 +++ : strong immunoreactivity

계 시작에 혈소판이 필수적인 역할을 하고, fibronectin과 TGF- β 같은 매개인자들을 분비하며, 창상치유의 2번째 단계인 증식 및 조직형성과정에서는 각질세포의 이동과 integrin이 중요한 역할을 한다고 하였다. 화상 후 몇 시간뒤에 상피 재생이 시작되고, 1~2일 후 상처 가장자리와 상처내에 있는 표피세포들이 증식하기 시작하여 손상된 표피와, 바닥막을 대체하는데, 이를 촉진시키는 것이 TGF- β 와 EGF라고 하였다.

한편 진피 심층부에 심한 화상이나 손상을 받은 후에는 과형성반흔(hypertrophic scarring)이 종종 생기며 이는 세포밖바탕질에 교원질과 여러 단백질이 과잉 분포하기 때문이다(Ghahary 1995), 특히 화상후 창상 치유가 잘 되지 않는 것은 IL-6가 증가하고, IL-1과 TNF가 감소하며, 염증세포들의 침윤이 감소하기 때문이라고 한다(Pejnovic 등 1995).

TGF- β 는 염증기동안 혈소판에서 분비되며(Assoian 등 1983; Falabella와 Falanga 2001), 그 외 단핵구와 대포식세포, 림프구 등 다양한 세포들에서도 분비되는 인자로, 세포밖바탕질 형성 초기에 필수적이고, 진피에 있는 섬유모세포의 강력한 화학선택물질(chemoattractant)로 작용하여 섬유결합소(fibronectin) 생산을 자극하고, 세포밖바탕질의 형성을 촉진시키며, 각질세포의 이동을 촉진시키는 성장인자로(Postletthwaite 등 1987; Gailit 등 1994), TGF- β_1 와 TGF- β_2 , TGF- β_3 의 3가지 이형이 있다(Frank 등 1996).

Adzick와 Lorenz(1994)는 흉이 없이 치유되는 태아의 창상은 cytokine, TGF- β 등이 비교적 적은 반면, 섬유화가 특징적인 성인의 창상은 TGF- β 의 과다와 관련이 있다고 하였다. TGF- β_1 은 과형성 반흔의 진피에서만 나타나고(Ghahary 등 1995; Ghahary 등 1993), TGF- β_1 mRNA 역시 화상 범위가 클수록 더 증가한다고 하였다(Nishimura 등 2000). TGF- β_2 도 TGF- β_1 과 같이 피부반흔(cutaneous scarring)을 초래하는 반면, TGF- β_3 는 피부반흔을 억제하는 인자(anti-scarring agent)이며, anti-TGF- β_1 , anti-TGF- β_2 를 투여했을 때도 같은 현상을 나타낸다고 하였다(Shah 등 1995). Theoret 등(2002)는 TGF- β_1 은 창상 초기에 최고치 도달하여 14일까지 높은

수준을 유지하지만, TGF- β_3 는 후기에 나타나며, 육아조직이 형성되는 창상은 정상적으로 치유되는 창상보다 fibrogenic TGF- β_1 이 높고, antifibrotic TGF- β_3 는 낮은 경향을 보인다고 하였다. Watelet 등(2002)은 코결동굴 수술후 코 분비물에서 TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 수술 1주째 증가하였다가 2~3주째는 감소해 정상 수준으로 된다고 하였다. 본 실험에서 TGF- β_1 의 발현은 대조군보다는 실험군의 근육층에 뚜렷하였으며, Watelet 등(2002)과 Theoret 등(2002)이 보고한 바와 같이 화상 치유 초기에 나타났다가 7일 이후 소실되어 가는 양상을 나타내었다. Ghahary 등(1995)은 근육층에서 TGF- β_1 이 소실되는 것은 창상이 과형성 반흔 없이 치유되고 있다는 것을 시사한다고 하였다. 본 실험에서는 TGF- β_1 은 B군보다 Ba군의 근육에서 1일, 3일에 강하게 발현하였다가 7일 이후에는 먼저 소실되기 시작하였다. 이는 침의 자극으로 TGF- β_1 의 출현과 소실이 자극되어 과형성 반흔없이 회복되는 과정이 촉진된 것으로 생각되었다. 한편 TGF- β_3 는 B군과 Ba군 사이에 큰 차이가 없어, 이는 침의 자극이 화상치유과정 후기에 작용하는 TGF- β_3 (Theoret 등 2002)보다는 초기에 작용하는 TGF- β_1 에 더 영향을 준 것이라고 생각되었다.

EGF는 활성화된 큰포식세포와 피부의 각질세포에서 주로 생산되는 성장인자로, 젖, 소변, 침, 땀 등의 체액과 혈소판에 많이 분포되어 있고(Schultz 등 1991), 태아의 성장과 분화, 위산 분비의 억제, 각질세포의 이동과 각질화를 자극하며(Burbach 등 2001), 피부, 각막, 소화기계통의 창상 치유에 관여하며, 태아섬유모세포에 의한 수축을 억제하는 것으로 알려져 있다. Watelet 등(2002)은 EGF가 코결동굴 수술 1주후에 정상 수준으로 감소하여 3주동안 유지된다고 하였는데, 본 실험에서도 EGF는 B군과 Ba군 모두 3일에 피부밑조직에서 발현하였다가 7일 이후에는 Ba군에서 먼저 감소하기 시작하였고, 근육층에서는 7일 이후부터 Ba군에서 먼저 감소하기 시작하였다. 이는 화상이 치유되면서 조절되는 과정에 침의 자극이 영향을 주어 Ba군에서 EGF가 먼저 감소된 것으로 생각되었다.

IL-6은 cytokine의 하나로 각질세포, 상피세포,

섬유모세포, 진피의 혈관내피세포 등 정상 피부에서 관찰되는 세포에서 생산되며, 질병이 있는 경우에는 피부에 침윤된 염증세포에서도 생산되고, 국소 및 전신적인 염증, 종양의 성장과 자가면역질환에 중요한 역할을 한다고 하였다 (Paquet 1996). Ueyama 등(1992)은 화상 후 6시간이 지나면 IL-6 수치가 최고에 도달하며, 이러한 IL-6의 증가가 화상치료를 방해하는 한 원인이라고 하였다. Yamada 등(1996)은 화상 초기에는 cytokine의 현저한 증가가 없으나, 화상으로 인한 패혈증 혹은 사망한 경우 TNF α , IL-6, IL-8 등이 증가한 바, 이들의 수치가 병의 경중을 잘 반영한다고 볼 수 있다고 하였고, Chai 등(2000)과 Ford 등(1989)은 광범위한 화상 상처의 감염과 패혈증이 있는 경우, IL-6, IL-8와 TNF- α 의 수치가 높았다가, 감염부위를 외과적으로 절개한 뒤 환자의 상태가 호전되면 이들의 수치가 낮아진다고 하였다. 화상 부위에서 분비되던 TNF, IL-1, IL-6들은 창상 13일째 감소하고 이는 치유되고 있다는 것을 의미하는 것으로, 치유되지 않는 궤양의 경우에서 TNF- α , IL-1, IL-6들의 수치가 높은 것은 궤양 치유가 지연되는 것이 성장인자의 부족에 의한 것 보다는 염증 매개인들이 많이 분포하기 때문일 것이라고 하였다 (Tregrove 등 2000). 본 실험에서는 B군과 Ba군 모두 근육에서 IL-6 면역반응이 큰 차이 없이 중등도 또는 강하게 관찰되었고, 근육밀결합조직에서는 3일 이후에 B군보다 Ba군에서 IL-6가 먼저 감소되었다. 이는 침의 자극이 근육밀결합조직의 IL-6의 발현에는 영향을 거의 미치지 않는 것으로 생각되었다.

이상의 결과에서 침의 자극이 피부에서 세포외바탕질 형성 초기에 필수적인 TGF- β_1 의 생성과 소멸을 촉진시키고, EGF의 소멸을 촉진시킴으로써 화상치유과정을 증진시키는 것으로 결론지을 수 있었다.

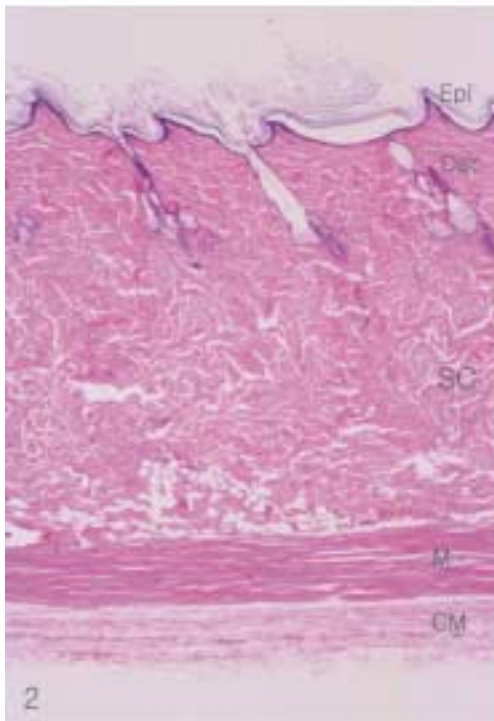
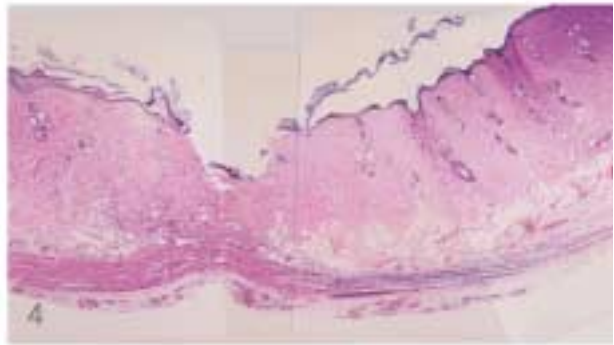
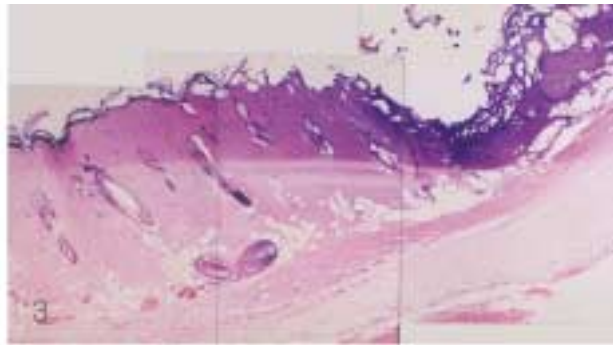
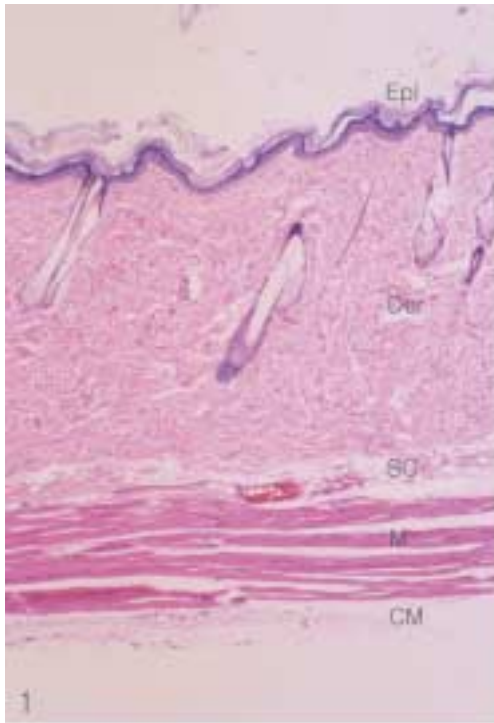
참 고 문 헌

- Adzick NS, Lorenz HP : Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. *The biology of scarless fetal wound repair.* Ann Surg 220 : 10-18, 1994.
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB : Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 258 : 7155-7160, 1983.
- Burbach GJ, Ansel JC, Armstrong CA : Cytokines in the skin in *The biology of the skin* edited by The Parthenon Publishing Group, p. 34-36, 2001.
- Chai J, Sheng Z, Yang H, Diao L, Li L : Successful treatment of invasive burn wound infection with sepsis in patients with major burns. *Chin Med J (Engl)* 113 : 1142-1146, 2000.
- Falabella AF, Falanga V : Wound healing in *The biology of the skin* edited by The Parthenon Publishing Group, p. 281-297, 2001.
- Ford HR, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre L, Simmons RL : Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* 124 : 1422-1428, 1989.
- Frank S, Madlener M, Werner S : Transforming growth factors beta 1, beta 2, and beta 3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271 : 10188-10193, 1996.
- Gailit J, Welch MP, Clark RA : TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 103 : 221-227, 1994.
- Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Gong Y, Tredget EE : Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med* 122 : 465-473, 1993.
- Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE : Immunolocalization of TGF-beta 1 in human hypertrophic scar and dermal tissues. *Cytokine* 7 : 184-190, 1995.
- Nishimura T, Nishiura T, deSerres S, Nakagawa T, Meyer AA : Transforming growth factor beta 1 and splenocyte apoptotic cell death after burn injuries. *J Burn Care Rehabil* 21 : 128-134, 2000.
- Papantonio C : Alternative medicine and wound healing. *Osteotomy/Wound Management* 44 : 44-46, 1988.
- Paquet P : Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* 109 : 308-317, 1996.
- Pejnovic N, Lilic D, Zunic G, Colic M, Kataranovski M, Dujic A : Aberrant levels of cytokines within the healing

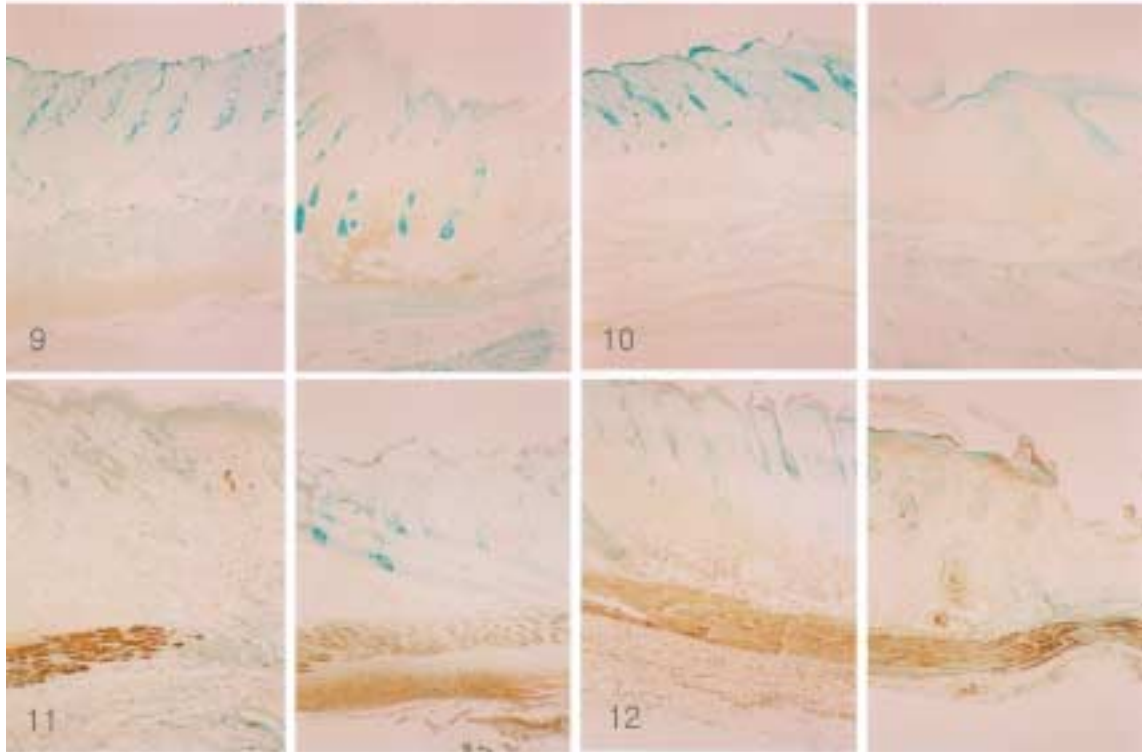
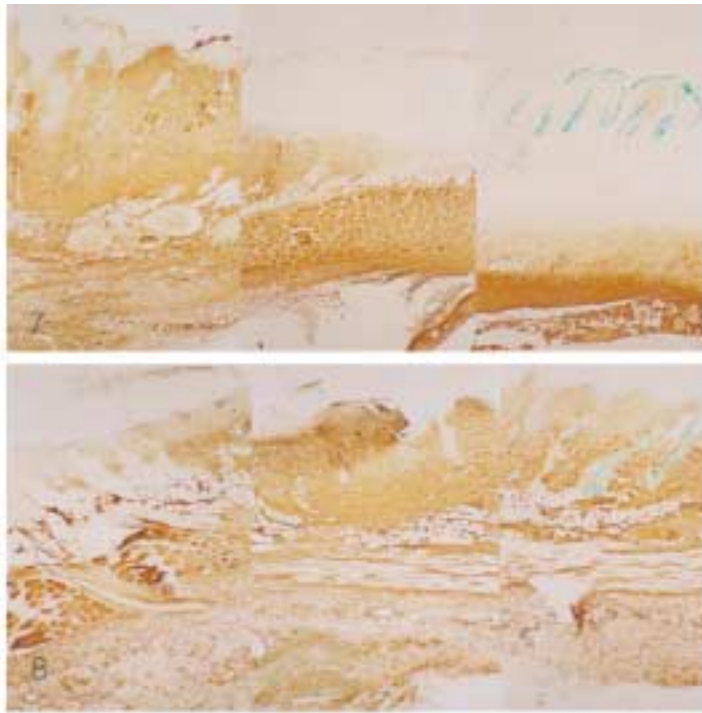
- wound after burn injury. *Arch Surg* 130 : 999-1006, 1995.
- Postletthwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH : Stimulation of the chemotactic migration of fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Exp Med* 165 : 251-256, 1987.
- Schultz G, Rotatori DS, Clark W : EGF and TGF- α in wound healing and repair. *Journal of Cellular Biochemistry* 45 : 346-352, 1991.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW : Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 108 : 985-1002, 1995.
- Sumano H, Mateos G : The use of acupuncture-like electrical stimulation for wound healing of lesions unresponsive to conventional treatment. *Am J Acupunt* 27 : 5-14, 1999.
- Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR : Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta 1 and beta 3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 31 : 266-273, 2002.
- Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC : Mitogenic activity and cytokine level in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 8 : 13-25, 2000.
- Ueyama M, Maruyama I, Osame M, Sawada Y : Marked increase in plasma interleukin-6 in burn patients. *J Lab Clin Med* 120 : 693-698, 1992.
- Watelet JB, Gevaert P, Bachert C, Holtappels G, van Cauwenberge P : Secretion of TGF- β 1, TGF- β 2, EGF and ODGF into nasal fluid after sinus surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 259 : 234-238, 2002.
- Yamada Y, Endo S, Inada K : Plasma cytokine levels in patients with severe burn injury with reference to the relationship between infection and prognosis. *Burns* 2 : 587-593, 1996.

Legends for Figures

- Figs. 1, 2.** Normal control group (C) and acupuncture group (Ca) showed well defined epidermis (Epi.), dermis (Der), subcutaneous tissue (SC), muscle (M) and connective tissue below muscle (SM) (H-E stain).
- Figs. 3, 4.** In acupuncture treatment after burn group (Ba), reepithelialization, formation of panniculus carnosus and granulation were more prominent in 3rd day than burn treatment group (B) (H-E stain).
- Fig. 5.** At 1st day in group B, TGF- β_1 was observed weak staining in epidermis and subcutaneous tissue, negative staining in dermis and mild staining in muscle and connective tissue below the muscle.
- Fig. 6.** At 1st day in group Ba, TGF- β_1 was observed negative staining in epidermis and dermis, mild staining in subcutaneous tissue, moderate staining in muscle and mild staining in connective tissue below the muscle.
- Fig. 7.** At 7th day in group B, TGF- β_1 was observed weak staining in epidermis and dermis, mild staining in subcutaneous tissue, moderate staining in muscle, and mild staining in connective tissue below muscle.
- Fig. 8.** At 7th day in group Ba, TGF- β_1 was observed weak staining in epidermis and dermis, mild staining in subcutaneous tissue, muscle and connective tissue below muscle.
- Fig. 9.** At 7th day in group B, EGF was observed weak staining in epidermis and dermis, mild staining in subcutaneous tissue, negative staining in muscle, and moderate staining in connective tissue below muscle.
- Fig. 10.** At 7th day in group Ba, EGF was observed weak staining in epidermis. negative staining in dermis, weak staining in subcutaneous tissue, negative staining in muscle, and mild staining in connective tissue below muscle.
- Fig. 11.** At 3rd day in group B, IL-6 was observed weak staining in epidermis, negative staining in dermis and subcutaneous tissue, moderate staining in muscle and connective tissue below muscle.
- Fig. 12.** At 7th day in group Ba, EGF was observed weak staining in epidermis. negative staining in dermis, weak staining in subcutaneous tissue, strong staining in muscle, and weak staining in connective tissue below muscle.



— 화상치유시 침자극과 TGF- β 및 EGF 발현 —



Abstract

The Effects of Acupuncture on TGF- β_1 , TGF- β_3 , EGF, and IL-6 in the Burn Wound Healing of Rats

Ho Jun Chang, Bong Sik Woo¹, Che Soo Shin¹,
Youn Kyoung Seo¹, Doo Jin Paik¹, Nam Soo Kim²

*Hanshin Clinic, ¹Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University,
²Namsoo Acupuncture Clinic, Seoul, Korea*

The present study was performed to examine whether acupuncture can regulate the expression of cytokines that play important roles in wound healing and morphological changes in the burn wound healing of rats, such as transforming growth factor (TGF)- β_1 , TGF- β_3 , epidermal growth factor (EGF), and interleukin-6 (IL-6).

Sprague-Dawley rats weighing 250~300 g were divided into two control groups and two experimental groups. Among the control groups, no-treatment group was classified as C and acupunctured group as Ca. Among the experimental groups, burned group (n = 6) was classified as B and acupunctured group after burn (n = 6) as Ba. The lumbar area of rats was burned 15 × 25 mm in size for 15~18 seconds with special small iron adapter and acupunctured at 5~7 mm in diameter and 1 cm in depth using 0.25 mm × 50 mm acupuncture needle for 20 minutes in wound area. Rats in group Ca were acupunctured once. Rats in group Ba were acupunctured every 12 hours 3 times. Rats were sacrificed at days 1, 3, 7, 15 and 20 after burn treatment. Morphological changes were examined by hematoxylin-eosin staining methods. The expression profiles of TGF- β_1 , TGF- β_3 , EGF and IL-6 were detected by immunohistochemical staining methods.

The results we obtained were as follows:

1. In gross observation, the burn wounds were less odorous and cleaner in the acupunctured group (Ba) compared with those of no-acupuncture group (B).
2. Reepithelialization and formation of panniculus carnosus and granulation tissue were more prominent at days 3 and 7 in the acupunctured group Ba than group B. However, this difference was disappear at day 15.
3. In the muscle of group B, TGF- β_1 was observed after day 7. However, in group Ba, TGF- β_1 was observed as early as days 1 and 3 and rapidly turnover at day 7.
4. For TGF- β_3 , both B and Ba groups showed similar results.
5. At day 3, EGF was observed in the subcutaneous tissue in both B and Ba groups. However, in day 7, EGF was rapidly decreased in Ba group compared with that of B.
6. For IL-6, both B and Ba groups showed similar results in epidermis, dermis, subcutaneous tissue and muscle. But, at day 3, IL-6 was rapidly decreased in the connective tissue under the muscle in Ba group compared with that of B.

These results suggest that acupuncture may improve the wound healing in the early stage by increasing the TGF- β_1 that is essential for the formation of extracellular matrix and by decreasing EGF.

Key words : Acupuncture, Rat, Burn, Skin, Growth factor