

수종의 한약 복합 추출물의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구

김진만 · 오한철 · 송성필 · 김남권 · 황충연*

원광대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과

Study on the Anti-microbial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Several Herb-Extract

Jin-Man Kim, Han-cheol Oh, Seong-pil Song, Nam-Kwen Kim, Chung-Yeon Hwang*

Department of Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Herbal mixture water extract of (*Chrysanthemum morifolium*, *Portulaca oleracea*, *Sanguisorba officinalis*, *Sophora flavescens*, *Phellodendron amurense*, *Cnidium monnieri*) which exhibit several beneficial effects including acne and skin diseases, was tested for anti-microbial activity and anti-inflammation effects. The herbal mixture extract showed antimicrobial activity against *Stapylococcus epidermis*, and *Propionibacterium acne*. The growth of *Stapylococcus epidermis*, and *Propionibacterium acne* was inhibited completely by addition of 1.0% of the extract. Also in the present study we examined the mixture extract on compound 48/80 induced allergy and LPS induced cyclooxygenase-2(COX-2) gene expression in RAW 264.7 macrophage. The results indicated the ear swelling and histamine release induced by compound 48/80 were dose-dependently reduced, ranging 28-60% and 48-72%, respectively. Furthermore the extract inhibited the expression of LPS-induced COX-2 proteins and mRNAs without an appreciable cytotoxic effects on RAW 264.7 cells. The LPS-induced cytokine gene expression including IL-1 β , TNF- α , and IL-6 were dose-dependently suppressed by the mixture extract. Based on these results, it is concluded that the herbal mixture water extract can be applied to the acne and skin diseases therapy.

Key words : anti-microbial activity, anti-inflammation effect, skin disease, herbal mixture extract

서론

黃帝內經 <素問 通評虛實論>¹⁾에 '邪氣盛即實, 正氣奪即虛', <素問 刺法論>¹⁾에 '正氣內存 邪不可干', <素問 評熱病論>¹⁾에 '邪氣所湊 其氣必虛'라 하여 正氣는 장부의 기능활동을 정상적으로 유지케 함으로써 病邪에 대해 抗病力을, 邪氣는 인체의 질병을 발병케 하는 각종의 발병요인을 말하는 것으로 이러한 正邪間의 相爭으로 면역을 설명할 수 있다²⁾. 炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이다³⁾. 炎症의 局所症狀은 發赤, 發熱, 疼痛, 腫脹을 특징으로 하는데 한의학에서는 炎症을 대개 火와 熱

의 개념으로 보고 있다⁴⁾.

甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子로 구성된 본 처방은 瀉火解毒 清熱燥濕 疏散風熱의 효능이 있어⁵⁾ 洗浴時 물에 타서 사용하는 처방이다⁶⁾.

免疫이란 다양한 體液性 인자들과 세포들로 구성된 免疫系가 力動的 相互作用을 통하여 개체를 방어하고 유지하는 일련의 生命現象이라 할 수 있다⁷⁾. 염증은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 炎症반응은 면역계를 동원하는 생체의 방어와 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐 아니라 많은 질병의 병리작용에 관련되어 있는 대단히 중요한 과정이다. 炎症을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다⁷⁾.

피부상재균 중 피부에 炎症을 유발할 수 있는 균주로서 *Stapylococcus aureus*와 병원성이 낮지만 친지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭주위에서 발견되는 *Malassezia furfur*, 여드

* 교신저자 : 황충연, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주한방병원
· E-mail : hwangida@wonkwang.ac.kr, · Tel : 062-670-6434
· 접수 : 2005/12/22 · 수정 : 2006/01/12 · 채택 : 2006/02/07

를 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis* 등을 들 수 있다⁸⁾. 따라서 피부염증이나 여드름의 치료 및 예방을 위해서 원인균에 대한 항균작용을 하는 약제가 일반적으로 사용되고 있다.

한약물의 항균작용에 관한 연구로는 홍 은 淸上防風湯加味로, 노 는 苦蔘추출물로 *P. acnes*에 대한 항균효과를, 조 는 淸上防風湯 및 구성약물로 *S. aureus*에 대한 항균효과를, 김 은 大蒜으로 *C. albicans*에 대한 항균효과를, 박 은 94종의 한약추출물로 6종의 균주에 미치는 항균효과를 연구하였다⁹⁾.

항알레르기에 대한 연구로는 이 등의 消風散加味の 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구, 정 등의 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 대한 실험적 연구, 양 등의 葛根湯과 加味葛根湯의 항알레르기 및 消炎, 解熱, 鎮痛作用에 대한 실험적 연구 노 등의 數種의 韓藥 추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향 등이 있다¹⁰⁾.

저자는 瀉火解毒 淸熱燥濕 疏散風熱의 효능이 있어⁵⁾ 피부 질환에 多用하는 甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子 등의 복합추출물(S1)을 이용하여 여드름 및 여러 염증성 피부질환의 원인균으로 알려진 *S. aureus*, *M. furfur*, *P. acnes*, *S. epidermis*에 대한 항균력을 평가하고, 이와 더불어 피부질환의 면역학적인 원인으로 생각되는 아낙필라시에 위의 한약재들이 미치는 영향을 알아보기 위해 Compound48/80에 의한 비만세포의 부유량과 히스타민의 방출량을 비교하고 Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)반응을 유도하여 항알레르기 효과를 검증하고 Cyclooxygenase-2 활성에 미치는 영향 및 염증을 일으키는 주요한 Cytokine으로 알려진 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 유전자 발현도 억제 효과를 살펴보고 세포독성 정도를 평가한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Staphylococcus epidermis* KCTC 1917, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Malassezia furfur* KCTC 7743, *Propionibacterium acnes* KCTC 3320으로서 한국유전자은행에서 분양받아 사용하였다.

2. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 Sprague-Dawley계 흰쥐 및 ICR계 생쥐를 실험에 사용할 때까지 온도 22±2℃, 상대습도 55±5%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

3. 시약 및 배지

Compound 48/80, Anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-Human serum albumin(HSA), Metrizamide, 및 O-phthalaldehyde(OPA)는 Sigma사 제품을 사용하였다. α -minimal essential medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL사 제품을 사용하였다.

항균성 실험에 사용된 배지 중 Nutrient broth, Yeast-malt broth는 Difco(USA)에서 Actinomyces broth는 BBL(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 시약은 Duksan(korea)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiments

Strains	Media
<i>Staphylococcus epidermis</i> KCTC 1917	Nutrient broth
<i>Malassezia furfur</i> KCTC 7743	Yeast-malt broth
<i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3320	Actinomyces broth
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	Nutrient broth

Table 2. Composition of Nutrient broth(NB).

Components	contents
Beef extracts	3.0g
Peptone	5.0g
Distilled water	1L
pH	6.8±0.2

Table 3. Composition of Yeast-malt broth(YMB).

Components	contents
Yeast extracts	3.0g
Malt extracts	3.0g
Peptone	5.0g
Dextrose	10.0g
Olive oil	1%
Distilled water	1L
pH	6.2±0.2

Table 4. Composition of actinomyces broth.

Components	contents
Potassium phosphate	15.0g
Ammonium sulfate	1.0g
Magnesium sulfate	0.2g
Calcium chloride	0.01g
Infusion broth	25.0g
Dextrose	5.0g
L-cysteine · HCl	1.0g
Pancreatic digest of casein	4.0g
Yeast extract	5.0g
Soluble starch	10.0g
Distilled water	1L
pH	6.9±0.2

4. 사용 원료

샘플 조성은 다음과 같다. 甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子(이하 S1) (각 50g)

Table 5. Prescription of Herb-med.

Herb	Scientific Name	Dose (g)
甘菊	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	50 g
馬齒莧	<i>Portulaca oleracea</i>	50 g
生地榆	<i>Sanguisorba officinalis</i>	50 g
苦蔘	<i>Sophora flavescens</i>	50 g
黃柏	<i>Phellodendron amurense</i>	50 g
蛇床子	<i>Cnidium monnieri</i>	50 g
총계		300 g

5. 추출 및 샘플 제조

본 실험에 사용된 한약재는 원광대학교 광주한방병원에서 구입하였으며 건조된 상태였다.

샘플의 제조는 중탕가열을 통한 열수 추출법을 사용하였으

며 이때의 추출 조건은 90℃, 90분이었다. 추출된 물질은 원심분리기(Hanil, Korea)를 이용 8,000rpm에서 10분 동안 2회 행하여 이물질 제거하였으며 0.45 μ m 여과지(ADVANTEC, U.S.A.)로 필터한 후 rotary evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였다. 그 후 농축액을 동결건조기(Ilshin, Korea)를 이용 분말을 회수, 4℃ 냉장고에 보관하면서 실험을 행하였다. 실험에 사용 시 샘플내의 미생물을 완전 제거하기 위해 autoclave(121℃, 15분)에서 멸균을 행하였다.

6. Agar diffusion법에 의한 S1의 항균활성 측정

항균활성 검사는 Agar diffusion법을 이용하였으며 사용된 방법은 다음과 같다. 각기 균이 성장할 수 있는 고체 배지를 제조하고 그 위에 미생물 배양액 100 μ l를 도말하였다. 10분 동안 배지의 표면을 건조한 후, 배지위에 직경 10mm의 paper disk를 올려놓고 추출 샘플을 10%, 1%(w/v)로 희석한 용액 50 μ l씩을 적용하였다. 37℃로 고정된 배양조에서 보관하면서 paper disk 주위에서 미생물이 성장하지 않는 clear zone의 직경을 확인하여 항균활성을 비교하였다.

7. 균에 대한 S1의 성장억제효과

한약 추출 분말을 함유한 배지(1.0%, 0.5%, 0.1%, w/v)를 제조한 후 여드름 균인 *Propionibacterium acnes*와 피부에 염증을 일으키는 주요균인 *Staphylococcus aureus* 배양액을 액체 배지에 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/ml가 되게 첨가한 후 37℃에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 증류수로 적정 희석하여 600nm에서 OD값을 측정하여 균의 성장을 확인하였다.

8. 귀 부종 반응 실험 방법

Compound 48/80 비투여군(control), Compound 48/80 투여군(C48/80), 그리고 S1 투여군은 S1 100mg/ml 도포군, S1 10mg/ml 도포군, S1 1mg/ml 도포군으로 균을 나누어서 각 군당 생쥐 3마리씩 사용하였다.

Compound 48/80을 0.5%의 비율로 생리식염수에 무균적으로 희석하였다. S1을 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml의 농도로 희석하여 생쥐의 귀 등쪽면과 안쪽면 모두 약간 흘러내릴 정도로 충분한 양을 발라주었다. 한약제 도포 40분 후, ether로 마취한 생쥐의 양쪽 귀 등쪽면에 microsyringe를 사용하여 희석한 Compound 48/80을 20 μ l씩(100 μ g/site) 각각 피내주사를 실시하였다. control군은 Compound 48/80 대신에 생리식염수를 20 μ l 피내주사하였다. 주사 40분 후 다시 ether로 마취하여 digimatic micrometer(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 귀 두께를 측정하였다.

9. Alcian blue-NFR 염색 방법

귀 두께 측정 후 바로 귀를 절단하여 10% paraformaldehyde에 귀조직을 담아서 4℃에 보관하였다. 24시간 후 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% ethanol에 차례로 귀조직을 담아서 탈수를 하였다. xylene 처리 후 파라핀에 조직을 담아서 24시간 동안 52℃ incubator에 보관하여 잔여 xylene이 모두 증발하도록 하였

다. 귀조직을 임베딩 틀에 고정하여 파라핀이 충분히 굳은 후에 조직을 8 μ m로 절편하여 슬라이드 글라스에 붙여서 37℃에서 24시간 동안 두어 조직이 슬라이드 글라스에 완전히 접착되도록 하였다. 슬라이드 글라스를 xylene에 담겨 파라핀을 녹인 후, 100%, 95%, 90%, 70%, 50%, 30%의 ethanol로 재수화시켜 염색을 실시하였다. 먼저 alcian blue로 40분 염색 후 증류수로 세척하고 NFR(nuclear fast red)로 2분 염색하여 증류수로 세척 후 커버글라스를 덮어서 현미경으로 관찰하였다.

10. 흰쥐 복강 비만세포(Rat Peritoneal Mast Cells, RPMC)의 분리

Kanemoto 등¹¹⁾의 방법에 따라 분리하였다. 즉 흰쥐를 ether로 마취시킨 후 Tyrode buffer B (137mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 2.7mM KCl, 0.3mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5.6mM dextrose, 0.1% bovine serum albumin) 20ml를 복강 내에 주입하고 복벽을 마사지 하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 pasteur pipette로 복강 세척액을 채취하여 원심분리 (150 \times g, 10분)하였다. 상층액을 제거한 후 비만세포 부유액을 Tyrode buffer B에 재부유시켰다. 세포 부유액 중 비만세포는 Yurt 등¹²⁾의 방법으로 정제하였다. 즉 Tyrode buffer B 1ml에 재부유시킨 비만세포 부유액을 22.5% metrizamide(0.225g/ml)(density 1.120g/ml; Sigma) 2ml에 가하여 원심분리(400 \times g, 15분)하였다. 완충액과 metrizamide의 접촉면에 남아있는 세포는 수집하여 제거하고, Tyrode buffer B 1ml에 재부유시킨 후 이 과정을 반복하여 비만세포는 toluidine blue 염색으로 확인시 순도 95%가 되도록 하였다.

11. 복강 비만세포(RPMC)에서의 히스타민 유리실험

비만세포 현탁액(1×10^6 cells/ml)은 Compound 48/80을 처리하기 전 안정을 위해서 37℃에서 10분간 안정화시킨 후, S1을 0.01, 0.1, 1mg/ml 처리 후 20분간 배양하고, compound 48/80(5 μ g/ml)처리 후 15분 배양하였다. 히스타민 유리반응은 튜브를 얼음에 넣어서 반응을 중지하고, 4℃, 400 \times g 5분동안 원심분리하여 상층액과 pellet으로 분리하였다.

히스타민은 Shore 등¹³⁾방법에 따라 정량하였다. 즉 에펜돌프 튜브에 시료 500 μ l를 취하여 0.1M HCl 450 μ l와 60% 과염소산 용액 50 μ l를 혼합한 후 원심분리 400 \times g, 20분간 하였다. 그 상층액을 800 μ l를 취해 5M NaOH 용액 500 μ l, 증류수 3ml, n-butanol 10ml 및 NaCl 1.2g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리 500 \times g, 10분간 하였다. Butanol층 8ml를 취해 0.1M HCl 3ml, n-heptane 10ml를 가하여 진탕 후 원심분리 500 \times g, 10분간 하였다. 여기에서 얻어진 수층 2ml에 1M NaOH 용액 400 μ l와 1% o-phthalaldehyde 용액 100 μ l를 가하고 37℃ 항온수조에서 3분간 반응시켰다. 3M HCl 용액 200 μ l를 가한 다음 $\lambda_{ex} = 353\text{nm}$, $\lambda_{em} = 438\text{nm}$ 에서 spectrofluorometer로 상대형광강도를 측정하여 정량하였다.

히스타민 방출 억제율은 다음의 방식으로 계산한다.

$$\% \text{ inhibition} = \left\{ \frac{(\text{S1이 처리 안된 비만세포의 히스타민 유리 측정값} - \text{S1이 처리된 비만세포의 히스타민 유리 측정값})}{\text{S1이 처리 안된 비만세포의 히스타민 유리 측정값}} \right\} \times 100$$

12. Rat에서의 Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA, 수동 피부 과민) 실험.

Kawabata 등¹⁴⁾의 방법에 따라 실험하였다. 즉 ICR계 생쥐의 등쪽 털을 제모 후, anti-DNP IgE 100ng을 생쥐의 등에 3부위에 피내주사하여 감작시켰다. 주사한 부위는 유성펜으로 표시하였다. 48시간 후에 anti-DNP IgE로 감작시킨 비만 세포를 DNP-HSA로 탈감작시키기 1 시간 전에 S1을 1, 10, 100mg/ml 피부에 도포하여 처리하였다. 꼬리 정맥에 DNP-HSA(1mg/ml in PBS)와 Evan blue(4%) 16mg을 1:1(200ul)로 혼합하여 주사하여 항원 항체 반응을 야기시키고, 30분 후에 치사시켰다. Evans Blue로 염색된 처음 표시한 피부 부위 적출하여 1M KOH 1ml를 가하여 37℃로 20시간 incubation시켜 조직을 완전히 용해하였다. 1.2N H₃PO₄ 0.7ml를 가하여 용액을 중화시킨 후 3.3ml의 acetone을 가하고 교반하여 조직을 침전시켰다.

Refrigerated centrifuge로 2℃에서 400xg에서 25분간 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 Katayama 등¹⁵⁾의 방법에 따라 spectrofluorometer로 620nm에서 흡광도를 측정함으로써 조직내의 Evans Blue의 양을 정량하였다.

13. 세포배양

1) 항염증실험

대식세포주인 RAW 264.7(monocyte)는 Korean Cell Line Bank(KCLB)로 구입하였다. 세포 배양은 10% FBS와 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM 배지를 사용하며, 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2) 세포독성실험

생쥐 섬유모세포의 일종인 L929 세포주를 사용하였다. 세포 배양은 10% FBS와 100unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM 배지를 사용하며, 37℃, 5% CO₂로 조정된 배양기 내에서 배양하며, 배양액은 3일마다 교환한다. 배양된 세포는 1× trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구 계측기(Hemocytometer)로 세포수를 계산한다. 세포독성 시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5×10³ cell/well이 되도록 세포 부유액을 120μl씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용하였다.

14. Western Blot of COX-2

RAW 264.7(1×10⁶ cell)를 60mm plate에서 배양한 후 LPS(1μg/ml)를 처리한 후 S1 50, 100, 200ppm을 24시간 처리한다. 24시간 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 lysis bufer(RIPA buffer에 protease inhibitors(10μg/ml Leupeptin, 1 mM AEBSF, 10μg/ml, Aprotinin, 10μg/ml Pepstatin A)와 phosphatase inhibitor (Na₃VO₄) 처리하고, cell scraper로 세포를 모은 후, 얼음에서 30분간 반응 후, 4℃, 12000rpm에서 원심분리하여, 상층액을 따서 BCA 방법으로 단백질 정량을 한다. 10% SDS-PAGE gel에 각 샘플 30μg의 단백질을 전기영동한다. 전기영동 후 NC membrane에 transfer한다. transfer된 NC membrane에 primary antibody COX-2 (No-160116, Cayman Chem.)로 12시간 incubation한다. secondary Ab (1:2000)로 1시간 30 분-2 시간 동안 incubation 한

다. ECL 방법으로 COX-2 band를 detection하였다.

15. S1 처리농도 및 시간별 처리

추출한 한약물을 처리 당일 FBS가 첨가되지 않은 DMEM와 FBS가 첨가된DMEM에 희석하여 처리농도별로 사용한다. 처리 농도는 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm로 처리하고, 처리시간은 24시간으로 실시하였다.

16. 역전사중합연쇄반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

역전사중합연쇄반응은 역전사 kit(promega, Madison USA)와 중합연쇄반응 kit(Pre-mix, 한국생공, 대덕)를 이용하여 실시하였다. 즉 rapid guanidium isothiocyanate 방법으로 마우스 대식세포주로부터 추출한 0.5 μg의 total RNA를 역전사반응액 (0.1 μg; oligo (dT)15, reverse transcription buffer, 5mM MgCl₂, 1 mM dNTP mixture, 10 unit; rRNase ribonuclease inhibitor, 10 units; AMV reverse transcriptase)과 혼합하여 42℃에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 μl(0.01 μl), cytokine 혹은 β-actin primers 각각 1 μl(25 pg), 그리고 중합연쇄반응액 (Premix, 한국생공, 대덕; 1 unit; thermostable DNA polymerase, 0.25 mM dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) 17 μl을 혼합한 후 Perkin elmer (GeneAmp PCR system 2400)를 이용하여 95℃에서 30 초, 62℃에서 30초, 72℃에서 30 초 동안 30회 반복 실시하여 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. Cytokines의 mRNA/β-actin mRNA 양은 ethidium bromide로 염색한 band density를 Fluor-STM Imager (Bio-Rad, Munchen, Germany)로 측정하여 정량하였다. 이때 사용한 cytokines을 암호화하는 유전자들과 β-actin 유전자의 oligonucleotide는 Table 6에 나타났다.

Table 6. Primer sequence used for detection of cytokine gene expression.

Cytokine	oligonucleotide sequence
mTNF-α	5'-CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3'
	5'-TTG ACC TCA GCC CTG AGT TG-3'
mIL-1β	5'-GAT ACA AAC TGA TGA AGC TCG TCA-3'
	5'-GAG ATA GTG TTT GTC CAC ATC CTG A-3'
mIL-6	5'-GAA ATG AGA AAA GAG TTG TGC-3'
	5'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT-3'
β-actin	5'-CTG AAG TCA CCC ATT GAA CAT GGC-3'
	5'-CAC AGC AGT AAT CTC CTT CTG CAT-3'

17. MTT 정량

Mosmann¹⁶⁾의 방법에 따라 배양한 세포주를 각각 5×10³ cell/ml이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm 농도의 S1이 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200μg/ml 가 포함된 배양액을 well 당 200μl씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100μl/well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate Reader로 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

18. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA (Analysis of Variance) 방법을 사용하였으며, 유의수준 $p < 0.05$ 의 범위내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 나타낸다.

결 과

1. Agar diffusion법에 의한 항균성 검사

여드름 균 및 염증 세균에 대한 S1의 항균력을 측정하기 위해 한천평판법(agar diffusion method)을 사용하였다. 지수성장기의 중간단계에서 있는 미생물 배양액 100 μ l를 한천배지에 도말하고 10분 동안 표면을 건조시켰다. 그 후 paper disk를 위치시키고 S1 추출물 1%, 10% 용액 50 μ l를 각각 흡수시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 12~24시간 배양 후, 그 저지환을 측정하였다. 피부상재균인 *S. epidermis* (KCTC 1917), *S. aureus* (KCTC 1928), *M. furfur* (KCTC 7743), *P. acnes* (KCTC 3320)를 이용하여 항균활성 검증 결과 Fig. 1.과 같다. S1을 1% 첨가하였을 시 *S. epidermis*, *P. acnes*등 2균에 대해서는 10~11mm정도의 항균 활성을 보였지만 *M. furfur*에 대한 항균성은 관찰되지 않았다. 10% 첨가시 저지환의 크기가 증가하였으며 14~15mm정도로 높은 항균활성을 나타내었다. 그렇지만 고농도에서도 *M. furfur*에 대한 저지환이 관찰되지 않았으며 이로부터 S1추출물이 이 균에 대해서는 항균효과가 없다는 것을 알 수 있었다. 피부 염증 세균인 *S. aureus*의 경우 10% 농도 첨가 시 저지환의 크기는 11mm로 관찰되었는데 이는 S1 추출물이 이 균에 대해 높은 항균효과를 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다. 각 균주에 대한 저지환의 직경을 측정하여 Table 7에 나타내었다.

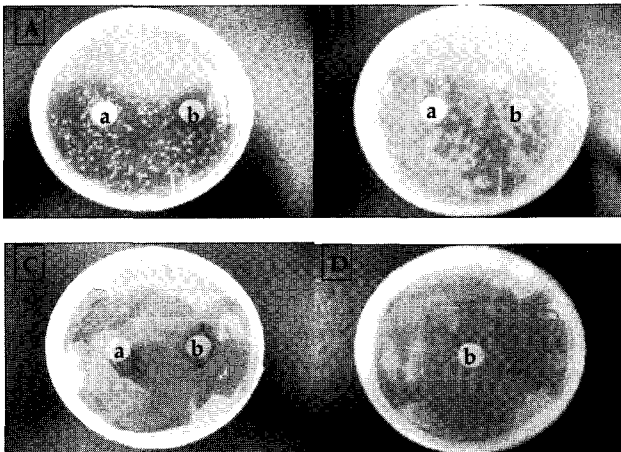


Fig. 1. Antimicrobial activity of S1 extracts against various microbials. A: *S. epidermis*, B: *M. furfur*, C: *P. acnes*, D: *S. aureus*. a. 1% S1 extracts, b. 10% S1 extracts.

Table 7. Antimicrobial activity of 10% S1 extracts against various microbials.

Strains	Clear zone
<i>S. epidermis</i>	15 \pm 0.4
<i>M. furfur</i>	
<i>P. acnes</i>	14 \pm 0.3
<i>S. aureus</i>	11 \pm 0.3

2. S1이 P.acnes의 성장에 미치는 영향

일반적으로 *P. acnes*가 여드름을 유발하는 대표적인 균이라고 알려져 있으며 다양한 물질들을 사용하여 여드름의 치료 및 예방에 적용하고 있지만 항균활성에 대한 객관적인 자료들이 미비한 실정이다. 본 실험에서 S1을 이용하여 agar diffusion법을 통해 S1의 *P. acnes*에 대한 항균활성을 실험한 결과 항균활성이 나타났으므로 이를 직접 배양배지에 적용 균의 성장에 미치는 S1의 영향을 알아보려고 하였다.

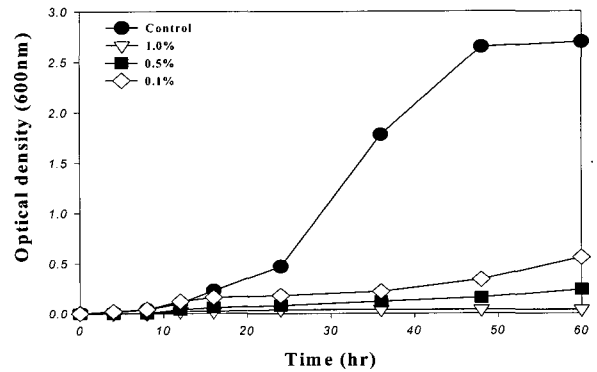


Fig. 2. Effects of S1 extracts for *P. acnes* growth with various concentration.

Fig. 2는 S1이 *P. acnes*의 성장에 미치는 영향을 시간대별로 OD값을 측정 조사한 것이다. S1을 0.1%~1.0%(w/v)까지 *P. acnes* 배양배지에 첨가하여 1×10^5 cfu/ml가 되게 균을 접종하였다. S1을 함유하고 있지 않은 배지의 경우 균의 유도기는 14시간이었으며 그 후 급격한 균체량의 증가를 나타내는 대수 증식기에 들어갔다. 48시간이 지난 후 균은 정지기에 들어감을 관찰할 수 있었다. 그렇지만 S1 0.1%(w/v)를 첨가한 배지의 경우 38시간까지 유도기에 있었으며 점차적인 균체량 증가를 보였다. 그 후로 균체 증가속도가 빨라짐을 확인 할 수 있었다. 이 농도 조건에서 S1은 *P. acnes*의 균 성장 억제보다는 성장을 다소 늦추어 주는 역할을 한다고 생각된다. 0.5% S1 추출물 첨가 배지 또한 균의 성장이 관찰되었지만 60시간 배양 후 OD값이 0.2정도로서 S1을 첨가하지 않는 배양배지의 12시간 정도와 동일한 균체량이 관찰되었다. 이는 0.5% 첨가 조건에서 S1은 *P. acnes*의 성장을 상당부분 저해하고 있다는 것을 말해준다. 그렇지만 이 농도 역시 균의 성장을 완전히 억제하지는 못하였다. S1 1.0%를 함유한 배지의 경우 60시간 배양 동안 균의 성장이 전혀 관찰되지 않았다. 이는 S1이 *P. acnes*의 성장 억제력이 있으며 1.0%이상의 첨가 시 가장 효과적이라는 것을 보여준다.

3. S1이 S. aureus의 성장에 미치는 영향

*S. aureus*는 아토피 피부염에서 흔히 집락을 형성하고 아토피 피부염의 중증도와 관계가 있다고 보고되고 있으므로 일반적으로 화학적인 살균제뿐만 아니라 항생제를 사용하여 그 균체수를 줄이거나 사멸시키는데 초점이 맞추어져 있다. 그렇지만 대부분 항생제에 대한 내성과 화학적 살균제의 세포독성 때문에 새로운

형태의 항 미생물제가 필요한 실정이다. 그러므로 본 실험에서 S1을 이용하여 상기 균에 대한 항균 효과를 알아보고자 하였다.

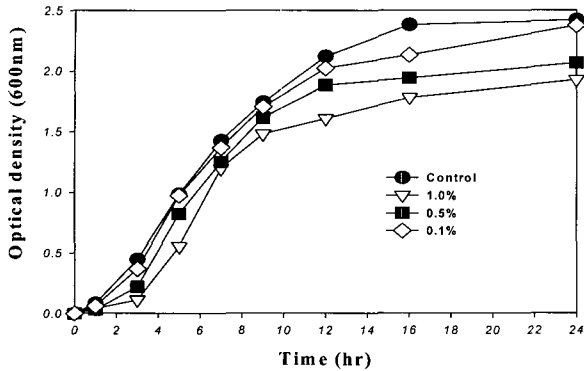


Fig. 3. Effects of S1 extracts for *S. aureus* growth with various concentration.

Fig. 3은 S1이 *S. aureus*의 성장에 미치는 영향을 시간대별로 OD값을 측정하여 조사한 것이다. *S. aureus*는 실험에 사용한 다른 미생물에 비해 성장속도가 빠르다는 것을 알 수 있으며 1×10^6 cfu/ml 접종시 1시간 유도기를 거쳐 12시간 후 까지 대수 증식기를 나타냈다. S1이 0.1%~1.0% 첨가된 배지의 경우 특이적인 저해능이 관찰되지 않았지만 S1의 첨가 농도가 증가할수록 대수 증식기에서의 균체량이 감소함을 볼 수 있었다. 이는 S1이 *S. aureus*의 성장에 영향을 미치고 있지만 효과를 나타내기 위해서는 보다 높은 농도 처리가 필요하다는 것을 말해주고 있다.

4. 귀 부종 반응 실험 결과

생리식염수를 투여한 control군이 0.145 ± 0.008 mm, Compound 48/80만 투여한 C48/80군이 0.405 ± 0.073 mm의 귀두께를 나타내었다. Compound 48/80에 의해 유발된 귀부종에 대한 S1의 농도별 억제효과를 digimatic micrometer로 측정한 결과, S1 100mg/ml 도포군이 0.249 ± 0.050 mm, S1 10mg/ml 도포군이 0.259 ± 0.092 mm, S1 1mg/ml 도포군이 0.332 ± 0.076 mm를 각각 나타내었다(Table 8, Fig. 4). 귀부종에 대한 농도별 억제효과를 백분율로 환산하면 S1 100mg/ml가 60.00%, S1 10mg/ml가 56.15%, S1 1mg/ml가 28.08%의 억제효과를 각각 나타내었다(Table 8).

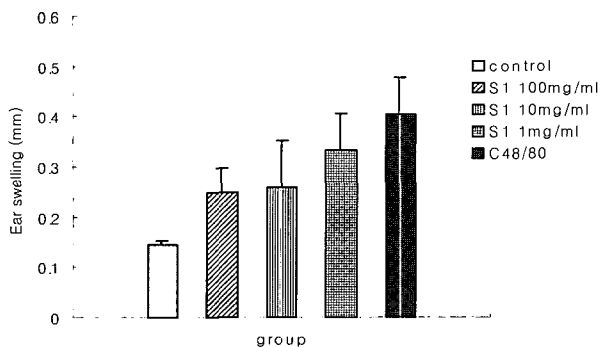
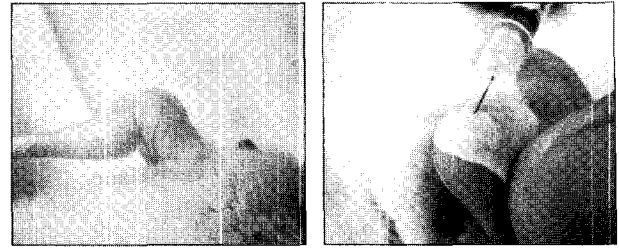


Fig. 4. Effect of S1 on compound 48/80 induced ear swelling response in mice.



귀부종 실험 : 마우스 귀에 S1 도포 (왼쪽) 마우스 귀 등면에 compound 48/80을 주사 (오른쪽)

Table 8. Effect of topical application of S1 on ear swelling response in mice.

	control	S1 100mg/ml	S1 10mg/ml	S1 1mg/ml	C48/80
귀두께(mm)	0.145 ± 0.008	0.249 ± 0.050	0.259 ± 0.092	0.332 ± 0.076	0.405 ± 0.073
억제율(%)	-	60.00	56.15	28.08	-

5. 귀조직 염색 결과

모든 생쥐의 귀를 주사부위에서 절제하여 조직검사를 실시한 결과, control군에 비하여 C48/80군의 비만세포의 수가 다소 많았으며 S1 100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml 도포군에서는 C48/80군에 비하여 비만세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 alcian blue에 의해 염색되는 비만세포 세포질의 과립이 S1 도포군에서 더 크게 관찰되는 것으로 보아 S1이 compound 48/80에 의해 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하였다고 생각된다(Fig. 5).

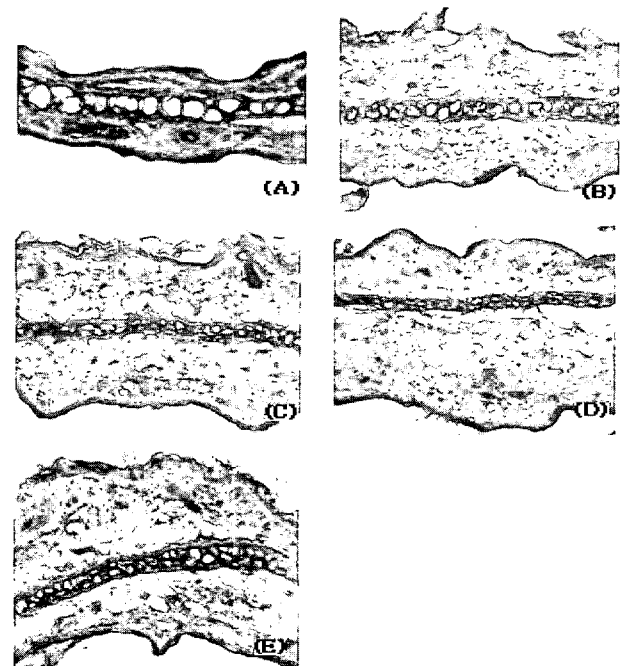


Fig. 5. The photographs of alcian blue and nuclear fast red stained ear tissue undergone ear swelling response by normal saline in S1 untreated mice (A) and compound 48/80 in S1 100mg/ml treated mice (B), S1 10mg/ml treated mice (C), S1 1mg/ml treated mice (D) and S1 untreated mice (E).

6. 비만세포의 히스타민 유리에 미치는 S1의 효과

흰쥐의 복강 비만세포에 미치는 S1의 효과를 검토하기 위하여 compound 48/80을 투여하기 20분 전에 S1을 0.01, 0.1, 1mg/

ml의 농도로 처리하였다. Table 9에서와 같이 S1은 비만세포에서 compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다. 농도별 히스타민 억제율은 0.01, 0.1mg/ml에서는 13%, 48%의 억제 효과를 나타내었으며, 1mg/ml에서는 72%의 억제율이 나타내었다(Fig. 6).

Table 9. Effects S1 on compound 48/80-induced histamine release from RPMC.

S1 treatment (mg/ml)	Compound 48/80 (5µg/ml)	Amount of histamine (µg/ml)
None (saline)	+	0.419±0.034
0.01	+	0.368±0.027
0.1	+	0.218±0.018
1	+	0.119±0.012

Each datum represents the mean±S.E. of three independent experiments.

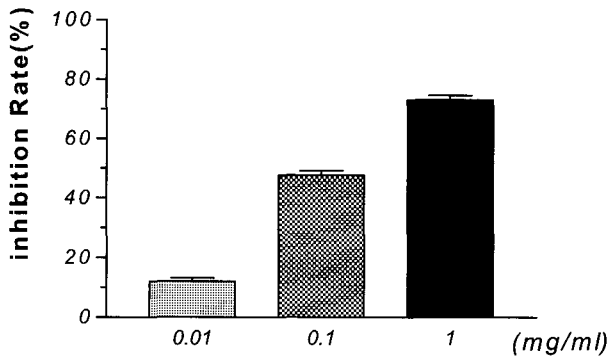


Fig. 6. The effect of S1 on compound 48/80-mediated histamine release from RPMC. Each data point represents the mean±S.E. of three experiment.

7. 수동 피부 아나필락시(PCA) 반응에 대한 S1의 효과.

PCA 반응에 미치는 S1의 효과를 검토하기 위하여 DNP-HSA와 Evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 S1을 1, 10, 100mg/ml의 농도로 피부에 도포하여 처리하였다. Table 10에서와 같이 수동 피부 아나필락시 반응은 S1 농도 의존적으로 억제 되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다.

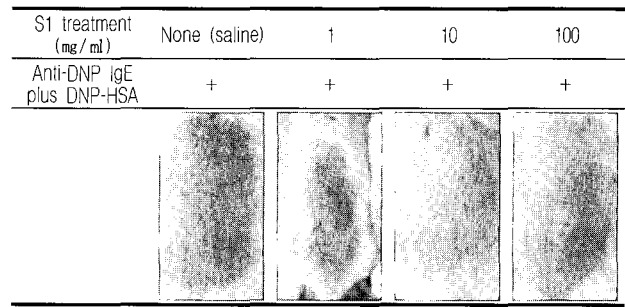
Table 10. Effect of S1 on the 48 hr PCA.

S1 treatment (mg/ml)	Anti-DNP IgE plus DNP-HSA	Amount of dye (µg/site)
None (saline)	+	3.419±0.304
1	+	2.568±0.297
10	+	1.918±0.138
100	+	0.819±0.082

Each datum represents the mean±S.E. of three independent experiments.



마우스 등쪽 피부에 anti-DNP IgE 피내주사 마우스 꼬리 정맥에 DNP-HSA + Evan blue 주사 DNP-HSA + Evan blue 주사 후 상태



8. RAW 264.7 세포에서 COX-2의 발현에 대한 S1의 효과

LPS(1µg/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1×106 cell)의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 S1을 50, 100, 200ppm 농도로 24시간 처리하여 COX-2 발현 정도를 Western Blot 수행하여 분석하였다. LPS 단독 처리군에 비해 S1을 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig 7.에서 같이 50ppm, 100ppm을 처리한 군에서 35, 50% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 200ppm에서는 60% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났었다.

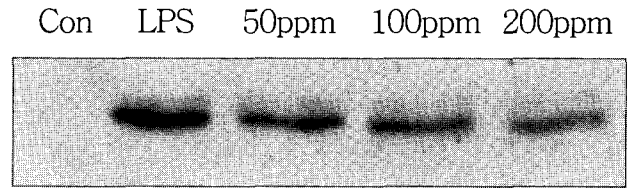


Fig. 7. Effects on COX-2 expression from LPS-induced RAW 264.7 cells(Western blot). The same amount of protein(30µg) was loaded in each lane.

9. RAW 264.7 세포에서 염증성 Cytokines 발현도에 대한 S1의 효과.

염증반응의 중요한 cytokine들인 IL-1β, TNF-α, IL-6의 발현도를 분석하기 위해서 마우스 대식세포주 RAW 264.7에 S1을 50, 100, 200ppm으로 LPS(0.1µg/ml)로 자극하기 30분 전에 처리하고 20시간 배양하였다. 배양후 RNA를 분리한 후 이를 이용하여 cDNA를 합성하여 LPS에 의해 생성된 cytokine의 측정하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 IL-1β은 House keeping gene인 β-actin의 양과 비교 측정시 Table 11. 에서 같이 S1을 50, 100, 200ppm의 처리하였을때 각각 93%, 86%, 81%로 나타나 S1 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. TNF-α은 House keeping gene인 β-actin의 양과 비교 측정시 Table 12. 에서 같이 S1을 50, 100, 200ppm의 처리하였을 때 각각 92%, 87%, 74%로 나타나 S1 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. IL-6은 House keeping gene인 β-actin의 양과 비교 측정시 Table 13에서 같이 S1을 50, 100, 200ppm의 처리하였을 때 각각 80%, 76%, 69%로 나타나 S1 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 8).

Table 11. The Effect of S1 against the IL-1β Gene Expression.

LPS(0.1µg/ml)	+	+	+	+
S1 ppm	0	50	100	200
IL-1β/β-actin(%)	100	93	86	81

Table 12. The Effect of S1 against the TNF- α Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
S1 ppm	0	50	100	200
TNF- α / β -actin(%)	100	92	87	74

Table 13. The Effect of S1 against the IL-6 Gene Expression.

LPS(0.1 μ g/ml)	+	+	+	+
S1 ppm	0	50	100	200
IL-6/ β -actin(%)	100	80	76	69

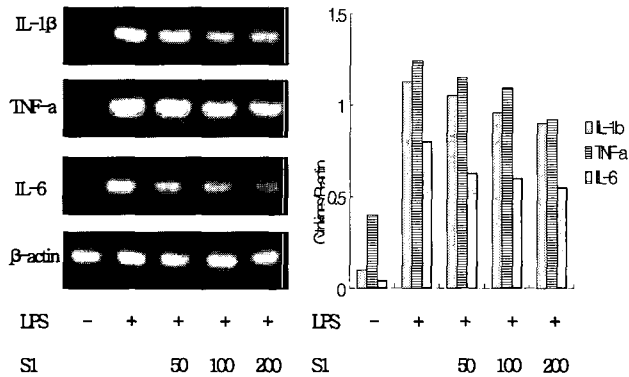


Fig. 8. LPS-induced expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA is inhibited by S1 in RAW 264.7 cells.

10. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

MTT 정량방법을 이용하여 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000ppm 농도의 S1 을 포함한 배양액에서 L929 세포를 24시간 배양 후 세포증식률을 측정하여 대조군과 비교하였다(Fig. 9). S1 이 1, 10ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 2, 6%로 증가되었고, 50ppm에서는 12% 증가됨을 확인하였다. 500ppm과 1000ppm에서는 세포생존률 대조군에 비해 11, 23%이하로 감소하였다. 이는 S1이 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다.

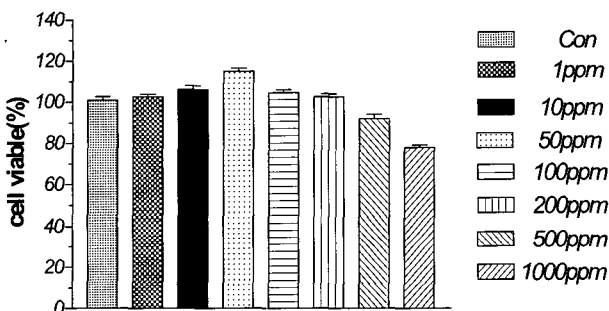


Fig. 9. Cell viability as assessed by the MTT assay for L929 cell line pretreated for 24h with S1. The data are presented as the arithmetic mean percent of the control \pm S.D.

고찰

免疫이란 다양한 體液性 인자들과 세포들로 구성된 免疫系가 力動的 相互作用을 통하여 개체를 방어하고 유지하는 일련의 生命現象이라 할 수있다¹⁷⁾.

炎症은 “균의 감염, 열, 외상, 항원, 항체반응 등 생체조직의 기질 변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어기전”이라고 정의하고 있으며 염증이라는 용어가 “불같은 상태”라는 어원에서 유래한 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생된다. 이러한 염증을 병리조직학적으로 볼때에는 혈관투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할수 있다¹⁸⁾.

한의학에서 면역는 黃帝內經 <素問 通評虛實論>¹⁾에 ‘邪氣盛即實, 正氣奪即虛’, <素問 刺法論>¹⁾에 ‘正氣存內, 邪不可干’, <素問 通熱病論>¹⁾에 ‘邪氣所湊 其氣必虛’라 하여 正氣는 장부조직 기관의 기능활동을 정상적으로 유지케 함으로써 病邪에 대해 항병력을 갖는 저항력을, 邪氣는 인체를 발병케 하는 각종의 發病要因을 말하는 것으로 이러한 正邪間的 相爭으로 설명할 수 있다²⁾.

炎症反應은 正邪鬪爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 현상중의 하나로, 疾病의 發生 및 進行은 正邪抗爭의 과정이다³⁾. 또한 <諸病源候論>¹⁹⁾에 ‘漆有毒, 人有稟性畏毒, 但見漆, 便中其毒, 亦有性者耐者, 終日燒者, 境不爲害也’라 하였고 <證治要訣>²⁰⁾에 ‘有人一 不可食 鷄肉及 獐魚等物 才食即丹隨發’이라 하여 알레르기반응과 유사한 내용이 언급되어 있다.

한의학에서 여드름과 관련되어 최초로 기록된 내용으로는 黃帝內經 <素問·生氣通天論>²¹⁾에서 ‘汗出見濕 內生痤癩...勞汗當風 寒薄爲皴 鬱乃痲’라 하여 痤癩라는 명칭을 사용한 이래, 巢²²⁾는 ‘面瘡者 爲面上有風熱氣生瘡 頭如米大 亦如穀大 白色者是’라하여 처음으로 病名, 原因, 症狀를 구체적으로 언급하였고, 吳는 ‘肺風粉刺 面鼻疙瘩 亦腫脹 破出粉汁或結屑’이라 하여 증상에 대하여 자세하게 언급하였다. 이후 瘰癧, 面瘡, 痤癩, 面生瘡, 黥黥, 粉刺, 面腫, 面熱, 肺風粉刺등 다양한 명칭으로 표현되면서 안면부에 발생하는 기미, 주근깨, 딸피, 뾰루라지, 딸기코 등과 혼용되어 사용되었다²³⁾.

여드름의 발병원인을 살펴보면 巢¹⁹⁾는 風熱氣로 孫²⁴⁾은 風毒熱로 宋太宗²⁵⁾은 由內熱外虛 風濕小乘하거나, 脾氣虛하여 風濕小乘하면 肌肉生熱 濕熱相搏하여 발생한다고 하였고 李²⁶⁾는 風客皮膚하거나 脾肺風濕搏熱하여 生하는 것으로 巢²⁷⁾은 面瘡은 上焦火로 粉刺는 肺火로 面熱은 陽明經風熱로 보았으며 許²⁸⁾는 面熱은 胃熱上薰하거나 或煮食不絶하여, 面腫은 胃風으로 발생한다고 하였다. 이상을 종합해보면 李 등은 風, 濕, 熱 등의 外因으로 許 등은 胃熱, 肺熱, 痰飲, 血熱 등의 內因으로 발생한다고 하였다. 최근의 여러 문헌에서는 肺胃積熱, 血熱血燥, 脾虛痰飲, 腸胃濕熱, 陰虛血瘀 등이 원인이 된다고 하였으며 이외에 過食과 기름진 음식, 지나친 기호식품의 섭취 또한 여드름의 발병원인이라고 하였다.

치료법에 있어서는 淸肺胃, 淸熱解毒, 淸熱涼血滋陰, 健脾化痰, 利濕淸熱 淸熱化濕通腑, 淸熱滋陰, 活血化痰하는 방법을 위주로 하여 淸上防風湯, 升麻黃連湯, 桃紅四物湯, 枇杷淸肺飲, 淸胃散 등의 內服藥과 西施玉容散, 顛倒散 등의 外用藥을 사용하였다²⁵⁻²⁸⁾. 최근 이렇게 다용되는 처방이나 한약제에 대해서 현대의 학적으로 여드름에 효과가 있다는 것을 입증하기 위한 실험적 연구가 활발히 진행되고 있는데 그 연구는 항균과 항염, 항알레

르기 효과가 있는지의 여부에 중점이 맞추어져 있다.

한약제의 항균효과에 관한 연구는 홍 의 淸上防風湯加味, 노 의 苦蔘추출물의 *P. acnes*에 대한 항균효과, 조 의 淸上防風湯 및 구성약물의 *S. aureus*에 대한 항균효과, 김 의 大蘇의 *C. albicans*에 대한 항균효과, 박 의 94종의 한약추출물의 6종의 균주에 대한 항균효과 등이 있었고⁹⁾, 항염효과에 대한 연구는 枳實, 獨活, 蒲公英, 蛇床子, 斑猫, 加味芷貝散, 靈仙除痛陰, 黃芪內托散, 升麻葛根湯加味方, 龍膽瀉肝湯加味方 등 한약제 및 기존처방의 항염증작용에 대한 연구들이 있었고²⁹⁾ 항알레르기 효과에 관한 연구는 이 등의 消風散加味の 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구, 정 등의 메밀 추출물의 항알레르기 반응에 대한 실험적 연구, 양 등의 葛根湯과 加味葛根湯의 항알레르기 및 消炎, 解熱, 鎮痛作用에 대한 실험적 연구, 노 등의 數種의 韓藥 추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향 등이 있었다¹⁰⁾.

저자는 瀉火解毒 淸熱燥濕 疏散風熱의 효능이 있어 內服藥과 外用藥으로 피부과 질환에 多用하는 甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子를 이용하여 항균, 항염, 항알레르기 효과를 평가하기 위해 본 실험을 시행하였다.

黃柏은 苦寒無毒하고 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 淸退虛熱 등의 효능이 있어 瘡瘍腫毒, 濕疹, 火傷 등에 쓰이는 약재⁵⁾로 berberine의 혈압강화작용, 결핵균을 비롯한 일반 병원 미생물에 대한 항균작용, 해열작용, 요도의 염증치료 작용등 여러 약리효과를 나타내는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

馬齒莧은 酸寒無毒하고 大腸 肝 二經에 歸經하며 淸熱解毒, 活血消腫 등의 효능이 있어 熱毒癰腫에 내복이나 외용으로 응용할 수 있으며⁵⁾ 최근 항균력이 있음이 밝혀져 赤白痢 등의 병증을 치료하는데 사용된다⁷⁾.

甘菊은 苦微寒하고 肺 肝經에 歸經하며 消散風熱, 淸肝明目, 淸熱解毒 등의 효능이 있어 感冒風熱, 目赤疼痛, 疔瘡腫毒 등에 쓰이는 약재⁵⁾로 항암효과나 aldose reductase 저해효과, 및 nitric oxide생성 저해효과 등이 보고되어 있다³¹⁾.

地榆는 苦酸微寒無毒하고 肝 胃 大腸에 歸經하며 涼血止血, 瀉火斂瘡하는 효능이 있어 諸出血, 濕疹, 火傷, 癰腫瘡毒 등의 병증을 치유한다⁵⁾. 지금까지는 sanguini H-6의 DNA topoisomerase 저해와 세포독성활성작용 탄닌성분의 고혈압억제, 항산화 효과, 항암효과, 항균효과에 대한 약리작용이 밝혀져 있다³²⁾.

苦蔘은 苦寒無毒하고 心肝胃大腸膀胱에 歸經하며 淸熱燥濕, 去風殺蟲 등의 효능이 있어 陰痒, 黃疸, 皮膚癢痒, 疹癩, 膿疱瘡 등의 병증을 치료한다⁵⁾. 현재까지 알려진 苦蔘의 약리작용을 보면 혈압강화, 혈관수축, 마취작용, 케양치료, 이질치료, 살충효과, 항균작용, 항산화작용 등에 대한 보고가 있다³³⁾.

蛇床子는 辛苦溫無毒하고 腎 脾 二經에 歸經하며 燥濕殺蟲 散寒去風 등의 효능이 있어 濕疹濕瘡, 疥癬癢痒 등의 병증을 치료한다⁵⁾. 蛇床子の 약리작용에 대한 기존의 연구를 보면 收斂性 消炎藥으로 婦人의 陰腫에 쓰이고 鎮痙作用이 있으며 蛇床子에서 분리한 torilin이 수종의 抗腫藥物耐性 암세포에 抗腫作用을 증강시킨다고 보고한바 있다³⁴⁾.

여드름의 병인과 치료에 있어서 세균의 역할의 중요성은 오

랫동안 관심의 대상이 되어왔다. 일반적인 피부 상재균중 피부에 염증을 유발할 수 있는 균주로서 *S. aureus*와 병원성이 낮지만 친지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭주위에서 발견되는 *M. furfur*, 여드름 유발에 관여하는 *P. acnes*, *S. epidermis* 등을 들 수 있다⁸⁾. 그 중에서도 황색 포도상 구균인 *S. aureus*는 그람 양성 구균으로 크기는 0.5-1.2 μ m이며, 포도송이 모양의 불규칙한 배열을 하고, 호기성 및 통상혐기성 조건에서도 잘 성장한다³⁵⁾. 이 균주는 건강인의 비강에서도 40-50% 검출되는 등 사람이 피부와 구강 인후 점막에 상재하는 균의 하나이지만 부상과 찰과상으로 인해 손상된 부위에 침입해 국소적으로 표피에서의 농가진, 모낭에서는 종기 등을 유발시킨다³⁵⁾. *S. aureus*는 특히 화상부위에 침입해 전신적으로 퍼져나가 맹장염, 담낭염, 봉와지열, 골수염의 원인이 되기도 하고 결막염이나 식중독 등의 원인균으로 인체의 여러 염증질환에 작용하는 중요한 미생물중 하나인 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 여드름에 있어서는 3,4기의 중증의 화농성 여드름에서 흔히 이 균이 발견되고 있다³⁶⁾.

모낭은 정상적으로 다양한 미생물총을 함유하고 있다. 가장 흔한 미생물로는 누두하부에는 혐기성 디프테리아균인 *P. acnes*가 있으며, 상부인 말단누두부에는 *M. furfur*가 존재하고 모낭주위의 피부표면에는 호기성인 *S. epidermis*가 존재한다³⁵⁾.

여드름 균으로 잘 알려진 *P. acnes*는 통성 혐기성 그람양성 균으로 피지가 없이는 거의 발육할 수 없는 호지성균이다. 따라서 *P. acnes*는 lipid rich 부위에 한정되어 있으며 피지가 많은 부분이 여드름의 호발부위인 동시에 *P. acnes*이 균수가 많은 부위이기도 하다³⁶⁾. *P. acnes*는 세균성 lipase와 같은 지방분해효소와 화학주성인자를 분비하여 피지를 triglyceride와 free fatty acid로 가수분해하고, free fatty acid는 모낭벽을 파괴하여 모낭 내용물을 진피내로 유출시켜므로 염증반응이 일어나게 된다³⁷⁾. 따라서 여드름을 억제시키고 치료하기 위해서는 피지생성과 염증반응을 억제시키는 노력과 함께 *P. acnes*의 증식을 억제시키는 것이 필요하다. *M. furfur*는 사람 피부의 정상 상재균 중에 속하는 이형태성 호지성 효모균(dimorphic lipophilic yeast)이며 때로는 기회감염을 일으켜 전풍, Malassezia 모낭염, 지루성 피부부의 원인이 된다³⁸⁾.

본 연구에서는 甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子(이하 S1)를 이용하여 여드름 및 피부에 염증을 유발할 수 있는 이 네가지 균주들에 대한 저해 작용 및 생육 특성을 파악하고자 하였다. *S. epidermis* (KCTC 1917), *S. aureus* (KCTC 1928), *M. furfur* (KCTC 7743), *P. acnes* (KCTC 3320)를 이용하여 항균활성 검증결과 S1을 1% 첨가시 *S. epidermis*, *P. acnes*에서 10~11mm 정도의 저해환을 나타냈으며 *M. furfur*에 대한 항균성은 관찰되지 않았다. S1을 10% 첨가시 *S. epidermis* 및 *P. acnes*에 대한 저해환의 크기가 증가하였으며 14~15mm 정도로 높은 항균활성을 나타내었다. 그렇지만 고농도에서도 *M. furfur*에 대한 저해환이 관찰되지 않았으며 이로부터 S1이 이 균에 대해서는 항균효과가 없다는 것을 알 수 있었다. 피부 염증 세균인 *S. aureus*의 경우 10% 농도 첨가시 저해환의 크기는 11mm로 관찰되었는데 이는 S1이 이 균에 대해 비교적 높은 항균효과를 나타낸다는 것을 의

미한다. 이는 S1이 진균보다는 세균에 더 효과적이라는 것을 말해주고 있다. 또한 피부 여드름을 유발하는 대표적인 균주인 *P. acnes*의 성장을 0.1%(w/v) 정도의 농도에서도 억제한다는 것은 S1이 세균성 여드름 균에 높은 항균성을 가지고 있다는 것을 말해주며 S1을 세균성 여드름 병변에 적용 시 효과를 기대할 수 있으리라 생각된다. 아토피 피부염에서 대표적인 균주로 알려져 있는 *S. aureus*의 경우 S1을 고농도 처리 시에만 최대 균체량을 낮추어 준다는 것으로 미루어 보아 이 균에 대한 항균성을 가지고는 있지만 상대적으로 항균효과가 낮다는 것을 말해주고 있으며 *S. aureus*에 S1을 적용하기 위해서는 고농도 처리가 효과적이라고 생각된다. 본 실험에서 얻어진 결론을 바탕으로 보았을 시 S1은 여드름 및 피부 염증 세균의 성장 억제물질로 적용 가능하다고 생각되지만 *P. acnes*를 제외한 균에 대해서는 그 항균성이 미미하므로 보다 높은 농도의 적용이 필요함을 알 수 있었다. 또한 고농도에서 항균성이 있는 것으로 보아 추출하는 방법 및 용매를 변경함으로써 효과를 높일 수 있을 것이라 생각된다.

알레르기는 I-V형으로 분류된다³⁹⁾. 특히 제1형 알레르기는 비만세포와 Ig E항체가 중요한 역할을 하며 대부분 알레르기 질환은 제 1형으로 알레르기를 유발하는 알레르겐에 의하여 여러 가지 병적인 증상이 나타난다. 비만세포에 항원이 접촉되면 세포 표면 IgE 수용체의 상호결합이 일어나며, 이를 통해 비만세포 활성화가 일어난다. 이러한 세포 활성화로 인해 비만세포 내에 이미 형성되어 있었거나 도는 새로 합성되는 여러 종류의 매개체들이 세포밖으로 방출된다⁴⁰⁾ 이때 비만세포로부터 방출되는 매개체에는 histamine, proteases, leukotrienes, prostaglandins 그리고 여러 종류의 cytokine등이 포함된다⁴¹⁾. 특히 histamin은 즉시형 알레르기 반응을 주도하며 비만세포로부터 생성되는 cytokine으로 interleukins-1,3,4,5,6,10,13,16, TNF- α , nerve growth factor, 그리고 lymphotactin등이 포함된다⁴²⁾. 이들은 Th-2형 면역반응 활성화, 염증매개, 세포성장촉진 및 세포주화반응매개 등 많은 역할을 수행하는데, GI tract에서는 체액분비촉진, 장동 운동증가와 Airway에서는 기관지 협착, 체액분비의 촉진과, 혈관에서는 모세혈관 확장과 투과성 증대가 되고 또한 2차적으로 chemokines, 염증세포의 삼출, 호산구에 의한 조직손상이 발생하여 각종 질병을 일으킨다. 이러한 병태로 인해 알레르기성 피부질환은 피부의 만성 재발성 염증성 질환으로 아토피 소인을 갖는 사람에게 많이 발생하여 임상증상으로 강한 소양감, 발적 및 백관부종, 피진의 형태도 습윤성, 건조성병변 및 태선화 병변 등으로 다양하게 나타난다⁴³⁾.

본 실험에서는 마우스 귀 피내조직에 비만세포의 탈과립을 유도하여 히스타민을 방출시키는 물질인 compound 48/80을 주사하여 히스타민에 의한 즉시형 과민반응을 인위적으로 유발시켜서 S1의 국소 도포에 의한 귀부종의 감소 효과와 조직검사를 통한 비만세포의 탈과립 정도를 알아보았다. Fig. 5에서 control 군에 비하여 C48/80군의 비만세포의 수가 다소 많았으며 S1 100 mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml 도포군에서는 C48/80군에 비하여 비만세포의 수가 감소하는 경향을 보였다. 또한 alcian blue에 의해 염색되는 비만세포 세포질의 과립이 S1 도포군에서 더 크게 관

찰되는 것으로 보아 S1이 compound 48/80에 의해 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하였다고 생각된다. 이렇게 볼 때 물질 S1은 피부에서 세포막의 유동성을 안정화시켜 비만세포의 탈과립을 조절하는 작용이 있을 것으로 생각된다.

또한 본 실험에서는 S1이 즉시형 알레르기 반응의 조절에 미치는 효과를 검토하기 위하여 in vivo 실험으로 비면역학적 자극제인 Compound 48/80에 의한 IgE 매개 수동 피부 아나필락시에 대한 효과를 실험하였다. 또 in vitro 실험으로 Compound 48/80에 의해 유도되는 복강비만세포로부터 히스타민 유리 조절에 미치는 효과를 실험하였다. S1은 비만세포로부터 Compound 48/80에 의한 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 6) 또한 PCA 반응에 미치는 S1의 효과는 Table 9에서와 같이 S1의 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내었다. 그러므로 S1은 히스타민 유리 억제와 PCA 반응에 효과를 나타냄으로써 비만 세포 매개 즉시형 알레르기 반응을 억제하는 성분이 함유되어 있을 것으로 생각된다.

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intercellular messenger이다. PG은 세포의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX)효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 관련이 가장 깊은 것으로 알려져 있다. 오래전부터 발열, 발적, 동통 등을 치료하는데 널리 사용되어온 aspirin이 이러한 PG을 합성하는데 핵심적인 작용을 하는 COX의 작용을 억제시키기 때문인 것에서 알 수 있듯이 염증 억제를 위해 COX의 활성을 억제시키고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. 이중 I형인 COX-1은 위장관보호, 신장의 혈류조절, 혈소판응집 등 우리몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는, 대부분의 정상적인 조직에서 발생하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 따라서 항염증제와 항암제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쓰고 있다⁴⁴⁾.

이에 LPS(1 μ g/ml)를 사용하여 대식세포주인 RAW 264.7(1 $\times 10^6$ cell)의 COX-2 활성을 유도한 실험에서 COX-2는 LPS 단독 처리군에 비해 S1 처리군에서 S1농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Fig 7에서 같이 50ppm, 100ppm을 처리한 군에서 35, 50% 정도 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였고, 200ppm에서는 60% 정도의 COX-2 발현 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이런 결과로 S1은 임상적으로도 염증질환의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

염증반응은 생체 손상에 대한 국소반응으로 알레르기 유발

물질, 미생물 감염과 같은 외부 충격에 대한 개체 보호 목적의 생체 방어기작이다. 여기에는 여러 종류의 염증세포와 염증성 cytokine 및 mediator 들이 관여한다. 이러한 cytokine 및 mediator 들의 증 작용점과 작용기작의 연구는 염증반응의 전반적인 이해와 항염증 의약품 개발에 필수적이라 할 수 있다. 특히 IL-1 β , TNF- α , IL-6는 염증을 일으키는 주요한 cytokine으로 보고되고 있으며, 염증반응의 정도를 나타내는 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다⁴⁵⁾. 또한 이들 cytokine 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- κ B element는 cytokine 유전자 발현에 중요한 역할을 한다⁴⁶⁾. 마우스 대식세포주인 RAW 264.7에서 LPS(Lipopolysaccharide)에 유도된 NF- κ B의 활성화에 의해 생성되는 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현도를 측정하기 위해서 본 연구에서는 RT-PCR 방법을 이용하여 S1에 대한 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 유전자 발현도 억제 효과를 확인한 결과 IL-1 β 는 S1을 50, 100, 200ppm의 처리시 LPS에 비해 93%, 86%, 81%로 나타나 S1 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 11), TNF- α 에서는 50, 100, 200ppm의 처리시 LPS에 비해 92%, 87%, 74%로 나타나 S1 농도 의존적으로 억제되었으며(Table 12), IL-6에서도 50, 100, 200ppm의 처리시 LPS에 비해 80%, 76%, 69%로 나타나 S1 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Table 13). S1이 LPS에 의해 생성된 cytokine들을 농도 의존적으로 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

S1의 안전성을 확인한 실험으로 세포독성평가는 S1이 50ppm농도에서는 세포증식률이 대조군에 비해 6%로 증가되었고, 100ppm에서는 12% 증가됨을 확인하였다(Fig. 9). 500ppm과 1000ppm에서는 세포 생존률 대조군에 비해 11, 23%이하로 감소하였다. 이는 S1이 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성을 유발됨을 알 수 있었다. 좀 더 안전성을 확인하기 위해서는 경구 아급성 독성, 급성 독성 등의 in vivo 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합할 때 瀉火解毒 清熱燥濕 疏散風熱의 효능이 있는 甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子 복합추출물은 항균력과 항염효과, 항알레르기효과를 모두 가지고 있는 것으로 평가되며 여드름이나 각종 다양한 염증성, 알레르기성 피부과 질환에 임상적으로 광범위한 활용가치가 있을 것으로 사료되며 성분 분석 및 작용기전에 대한 연구가 지속되어야 할 것이라고 사료된다.

결 론

甘菊, 馬齒莧, 生地榆, 苦蔘, 黃柏, 蛇床子 복합추출물(S1)의 여드름이나 다양한 피부과 질환의 원인균으로 알려진 *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis*에 대한 항균, 항염 및 항알레르기 효과를 검증한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

S1을 첨가하였을 시 농도 의존적으로 *S. epidermis*, *P. acnes*에서 높은 항균활성을 나타내었고 *M. furfur*, *S. aureus*에서는 항균효과를 보이지 않았다. S1은 귀부종에 대해 농도 의존적

으로 억제효과를 나타내었으며 농도별 히스타민 억제율은 0.01mg/ml에서는 13%, 0.1mg/ml에서는 48%, 1mg/ml에서는 72%의 억제율을 보였다. 수동 피부 아나필락시 반응은 S1 농도 의존적으로 억제 되었으며, 특히 100mg/ml의 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 보였다. COX-2 발현 정도를 분석한 결과 LPS 단독 처리군에 비해 S1 투여군이 S1 농도 의존적으로 억제됨을 보였다. S1에 대한 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 유전자 발현도 억제 효과를 확인한 결과 모두 S1 농도 의존적으로 억제됨을 보였다. MTT 정량에 의한 세포생존률을 측정한 결과 S1이 L929 세포에 500ppm 농도 이상에서 세포 독성이 유발됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2004년 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. 金圭烈. 黃帝內經素問校注滙釋. 서울, 일지사, 上 pp 379, 436-447, 中 pp 284-288, 1998.
2. 鄭遇悅. 韓方病理學. 이리, 서울공판사. pp 5-34, 1983.
3. Kim, E.J., Jin, H.K., Kim, K., Lee, H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.R., Zee, O.P., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.* 61, 903-910, 2001.
4. 신연상. 유백피의 항염 및 조직재생에 대한 실험적 연구. 대한외과과학회지 14(1):129-153, 2001.
5. 신민교. 임상본초학. 영림사. p 400, 405, 785, 1997.
6. 范成玉의 2인. 中藥治愈. 應激. 變態性 頑固濕疹 5例. 四川中醫. 19(10):58-59, 2001.
7. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 서울, pp 161-166, 461-464, 2001.
8. Peter, G. Smith, A.L. Group A Streptococcal infections of the skin and pharynx. *N Engl J Med.* 297, 311-315, 1977.
9. 홍석훈, 노석선. 청상방풍탕가미가 면포에 미치는 영향. 대한안ibi인후과학회지 15(1):315-335, 2002.
10. 최은규, 노석선. 용담사간탕가미방이 염증치료 및 예방에 미치는 영향에 대한 연구. 17(2):39-47, 2004.
11. Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T.K., Kimura, M., Nishimura, M., Kitamura, Y. Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 100, 99-106, 1993.
12. Yurt, R.W., Leid, R.W., Austen, K.F. Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* 252, 518-521, 1977.
13. Shore, P.A., Burkhalter, A., Cohn, V.H. A method for fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol.*

- Exp. Ther. 127, 182-186, 1959.
14. Kawabata, T.T., Babcock, L.S. Measurement of murine ovalbumin-specific IgE by a rat basophil leukemia cell serotonin release assay. *J. Immunol. Method.* 162, 9-15, 1993.
 15. Katayama, S., Shinoya, H., Ohtake, S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 22, 89-101, 1978.
 16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63, 1983.
 17. 이은방 외. 사상자의 항염증작용. *생약학회지* 29(4):384-390, 1998.
 18. 박광균. 구강생화학 12장 면역과 염증. 군자출판사. pp 318-325, 1999.
 19. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 台中, 昭人出版社. pp 10-11, 1982.
 20. 戴思恭. 證治要訣. 傳方. 中醫免疫思想急成就. *중의잡지* 11(25):56, 1884.
 21. 王琦 외. 黃帝內經 素問今釋. 서울, 成輔社. p 14, 1983.
 22. 吳謙 외. 醫宗金鑑. 台北, 大中國圖書公司. p 125, 1981.
 23. 柳志外. 外科 皮膚科의 辨證論治. 부천, 서원당. pp 232-233, 1987.
 24. 李用粹. 證治彙補. 台北, 선풍출판사. p 229, 1977.
 25. 宋太宗命撰. 太平聖惠方 卷四十. 서울, 윤성사. pp 1207-1219, 1979.
 26. 李梴. 醫學入門. 서울, 윤성사. 1983: 405-6, 1983.
 27. 龔延賢. 萬病回春 券下. 서울, 행림서원. 1972: 9-10, 1972.
 28. 許俊. 東醫寶鑑. 서울, 남산당. p 209, 239, 284, 1976.
 29. 흥남두 외. 지실의 항염증 성분연구. *생약학회지*. 1991.
 30. 지형준. 본초에서 건강식품의 개발. *한국식품개발연구원*: 7(3):42, 1994.
 31. Nam, S.H., Choi, J.S., Jang, D.S., Choi, S.U., Yang, M.S. Effects of sesquiterpene lactone isolated from *Chrysanthemum boreale* M. against sarcoma 180 implanted in ICR mice. *J.Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26, 144-147, 1997.
 32. Bastow, K.F., Bori, I.D., Fukushima, Y., Kashiwada, Y., Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I., Lee, K.H. Inhibition of DNA topoisomerases by sanguin H-6, a cytotoxic dimeric ellagitannin from *Sanguisorba officinalis*. *planta Med.* 59, 240-245, 1993.
 33. 朴桶基 외. 薏苡仁和 苦蔘의 抗酸化 作用에 關한 研究. 서울, 대한분초학회지 15(2):57-68, 2000.
 34. 難波恒雄. 和漢藥百科圖鑑(1). 大阪, 保育社. pp 230-231, 1993.
 35. 이건갑 외 6인. 진단미생물학(3판). 서울, 고려의학. pp 322-323, 359-374, 1999.
 36. McGinley, K.J. et al. Regional variations in density of cutaneous propionibacteria: correlation of *Propionibacterium acnes* populations with sebaceous secretion, *J Clin Microbiol.* 12, 672-675, 1980.
 37. 최승만 외 4인. *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색. *대한약학회지* 42, 89-94, 1998.
 38. Faergemann J. *Pityrosporum* species as a cause of allergy and infection. *Allergy* 54, 413-419, 1999.
 39. 康秉秀. 한방임상 알레르기. 서울, 성보사. pp 196-201, 22-23, 61-68, 1988.
 40. Metcalfe, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77, 1033-1079, 1977.
 41. Okayama, Y., Petit-Frere, C., Kassel, O., Semper, A., Quint, D., Tunon-de-Lara, M.J., Bradding, P., Holgate, S.T., Church, M.K.. Ig E-independent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 HUMAN LUNG MAST CELLS. *J.Immunol.* 155, 1796-808, 1995.
 42. Moller, A., Heng, B.M., Grutzkau, A., Lippert, U., Aragane, Y., Schwarz, T., Kruger-Krasagakes, S. Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology.* 93, 289-295, 1998.
 43. Holgate, S.T., Robinson, C., Church, M.K. Allergy, Principles and Practice. 3rd ed, Mosby, St. Louis. pp 135-136, 1988.
 44. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. *분자생물학뉴스.* 13, pp 8-17, 213-347, 2002.
 45. Baeuerle, P.A. The inducible transcription activator NF- κ B Regulation by distinct subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* 1072, 63-70, 1991.
 46. Benjamin, R.V., Shijun, Y., James, J.L. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*. *Infection and Immunity* 63, 3158-3165, 1995.