한방안이비인후피부과학회지 제23권 제3호(2010년 12월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2010;23(3) : 42-65

화피 추출물이 염증 및 알레르기 반응에 미치는 영향

정지영 · 정현아
대전대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실

Effect of Phellinus igniarius Quel Extract on the Anti-inflammatory, Anti allergy, Anti-oxidant, Anti-wrinkle reaction

Ji-Young Jung · Hyun-A Jung

Objectives : *Betula platyphylla var. japonica* extract *(BPE)* was used to determine the modulation of cytokine secretion, the activation of inflammatory and allergic factor and the inhibition of gene expression. Inflammatory and allergic cytokines as IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF-α, NO and COX-2 were measured to use effectively on improvement or treatment of atopic dermatitis.

Methods : We used NC/Nga mouse induced by atopic dermatitis to observe the effects of *BPE* on the weight, water and feed, blood test, weight of organs, histological change, total IgE and histological change of main organs.

Results : *BPE* is effective on anti-inflammatory and allergic reaction. However, further study is needed to prove which component of *BPE* indicates effective pharmacological action.

Conclusions : The above results suggest that *Phellinus igniarius Quel* extract could be applicable for improvement of several skin functions.

Key words : *Betula platyphylla var. japonica* extract, Anti-oxidant, Anti-inflammation, Anti-allergy, Anti-wrinkle.

Ⅰ. 서 론

樺皮 (*Betula platyphylla var. japonica.*)는 樺木科에 속하는 落葉喬木인 자작나무 및 만주자작나무의 樹皮로 宋代 《開寶本草》에 최초로 수록되었으며, 樺木皮라고도 한다[1].

樺皮는 淸熱, 解毒, 利濕, 消腫, 祛痰, 止咳 등의

교신저자 : 정현아, 대전광역시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 대전한방병원 한방안이비인후과교실(Tel : (042) 229-6815, Fax : (042) 254-3403, E-mail : acua3739@dju.kr)
• 접수 2010/10/18 • 수정 2010/11/24 • 채택 2010/12/09

효능이 있어, 熱毒, 黃疸, 乳癰, 肺風毒, 癰癤, 梅毒, 皮膚發疹, 急性扁桃腺炎, 肺炎, 腎炎, 齒周炎, 外傷感染, 尿路感染, 慢性氣管支炎, 腸炎, 痢疾, 肝炎, 膀胱炎, 泄瀉, 氣喘, 濕疹, 痒疹, 癰癤腫毒 등의 증상을 치료하는 것으로 나타나, 주로 염증성 질환이나 피부질환에 많이 응용된다[2-5]. 또한 《東醫寶鑑》[6]에 기록되어 있는 樺皮가 포함된 처방 중에서 樺皮飮子와 樺皮散은 瘡瘍과 癰疽에 사용되어 이는 樺皮가 주로 피부의 염증 치료에 관련되어 있음을 시사한다.

아토피 피부염 (Atopic dermatitis)은 유전적, 환경적, 면역학적인 원인으로 인해 피부 가장 바깥에 있는 피부 보호벽인 각질층에 이상이 생긴 것으로, 건조한 기후에서 더욱 심해지는 알레르기 질환이다. 아토피 피부염은 다양한 원인이 복잡하게 뒤엉켜 발병하고 완화와 재발을 반복한다. 아토피 소인에 의한 알레르기 질환으로 알레르기 피부염, 알레르기성 비염, 천식, 알레르기성 결막염, 아토피성 두드러기 등이 있으며, 이들 질환은 단독 또는 여러 질환이 동시에 나타날 수 있다. 아토피 피부질환은 정확한 병태생리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않으나 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여하리라고 생각되고 있다. 아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역기능 장애가 IgE의 증가와 관련이 있음이 밝혀지면서 속발성 면역 반응 외에도 원발성 면역 반응이 아토피 피부염의 병인에 관여한다고 주장하는 보고들이 증가하고 있다[7].

기존 연구에 의하면 화피는 면역억제 활성, 연골보호 및 소염진통 효과, 항산화 및 미백 효과, 피부주름 개선 효과가 있어[8-11], 화장품 소재로의 활용 가능성이 있다고 할 수 있다[12].

현재까지 한의학 임상에 다용하는 약물의 아토피 피부염에 대한 면역조절 효과에 대한 실험적 연구들이 진행되고 있으나 화피가 아토피 피부염에 미치는 영향에 대한 연구는 저자가 아직 접하지 못하였다.

이에 본 실험에서는 화피 추출물을 이용하여 아토피 개선 또는 치료의 효능을 입증하기 위해, cytokine 분비 조절, 지질다당류에 의해 활성화된 대식세포, 비만세포에서의 염증 및 알레르기 발생 인자의 활성화 및 유전자 발현 억제를 통하여 염증 및 알레르기성 cytokine인 Interleukin-1 (IL-1 β), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) 와 Tumor necrosis factor-α (TNF-α), Nitric oxide (NO), Cyclooxygenase II (COX-2), Interferon-γ (IFN-γ) 등을 측정하였다. 그리고 화피 추출물이 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga mouse의 체중, 음수 및 사료, 혈액검사, 장기 무게, 조직학적 변화, total IgE 및 주요장기의 조직학적 변화에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

사람의 단구세포인 THP-1 세포주, 림프구 T 세포인 Jurkar T 세포주는 미국 세포주은행 (the American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서, 사람의 호산구인 EoL-1 세포주는 일본의 Riken 세포은행 Tsukuba, Japan), Raw264.7 세포주와 사람의 비만세포는 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였다. 아토피 동물모델인 NC/Nga 마우스는 SLC Japan (Shizuoka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 시약은 본 실험에 사용된 시약 중 MTT 실험은 the cell proliferation kit. (Roche, Penzberg, Germany) 제품, 집먼지진드기 (*Dermatophagoides pteronyssinus ; Dp*)추출물은

연세대학교 의용절지동물소재은행에서 구입하여 사용하였다. 또한, Diethyl pyrocarbonate (DEPC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, trypsin- 0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl- 2H-tetrazo -lim (MTS), 5-(and-6)- choromethyl-2',7'-dichlorodihydrofl -uorescein diacetate,acetylester (CM-H2DCFDA), 2,7-dichl oro-dihydrofl -uorescindiacettate (DCFH-DA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, chloro-form, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopro panol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), EtOH, LPS, magnesium chloride ($MYHYBTl_2$), A23187, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), p-nitrophenyl-N-acetyl-b-glucosa mide, o-phtal-dialdehyde 등은 Sigma 사 (USA) 제품을, Taq polymerase와 Deoxy-nucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 CsA (cyclosporin A)는 중외제약, Dexamethasone은 Sigma 사 (USA) 제품을, RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, USA) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품을, DMED와 RPMI는 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, USA) 제품을, 인간 재조합 MCP-1, IL-2, IL-4, IL-5, HTGF-b1 IL-6, IL-8, TNF-α, histamine kit는 R&D system사 (USA) 및 OptEIA Set (BD Biosciences, SanDiego, CA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland), vacuum pump (EYELA Co. Japan), CO_2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectro-photometer (Shimazu Co., Japan), centrifuge (Hanil Co., Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., USA), flow cytometry (Becton Dickinson Co., USA), ELISA reader (Molecular Devices Co., USA), contrast fluorescence microscope (Nikon Co., Japan) 등을 사용하였다.

2) 검액 추출

동우제약 (대전)에서 구입하여 건조한 화피 (*Betula platyphylla var. japonica*)를 분쇄한 후에 100% 에탄올을 시료 30 g 당 추출용매 500 ㎖의 비로 혼합하여 70℃에서 1 일 정도 서서히 교반하면서 추출하였다. 추출용액을 회수한 후 감압농축을 하면서 에탄올 용매를 완전히 제거하여 최종 화피 추출물 (*BPE*) 10 g를 얻었다.

3) 실험동물

생후 4 주된 수컷 Nc/Nga (SLC, Japan) mouse를 구입하여 1 주일간 동물 사육실 환경에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물의 사육은 Wire cage (mouse/rat) clean rack (THREE SHINE, Daejeon)을 사용하였으며, 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 12 회/hrs, 조명주기 12 시간 (09:00~21:00) 주기로 밤낮을 유지하였다. 이때 조도는 150~300 Lux로 조절되었다. 사료는 퓨리나 (mouse 전용사료)를 (주)중앙실험동물로부터 공급받아 사용하였으며, 음수는 정수된 물을 공급하였다. 사료와 음수는 자유로이 섭취하도록 하였다. NC/Nga mouse는 자발적 아토피

성 피부염 유발 모델로 잘 알려져 있으므로, IgE와 Th2 cytokine 생성에 필수적인 STAT6 knockout NC/Nga mouse를 만들어 실험하였다.

본 연구에서의 모든 동물실험에 대한 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 수행되었다.

2. 실험방법

1) 세포실험

① 세포독성 평가

Raw264.7 세포주 (ATCC CCL-93), 사람의 림프구 T세포 (Jurkat T cells)를 이용해 MTT법으로 세포독성을 평가하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 미리 배양한 Raw264.7 세포주를 96 well plate에 5×10^5 cells/㎖ 농도로 seeding하고 5% CO_2 incubator에서 24 시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FCS를 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 첨가하고 24 시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 MTT용액을 1 ㎍/㎖ 농도로 가하여 37℃에서 3 시간 반응시켰다. 미반응된 MTT를 제거하고 ethanol 100 ㎕를 가해 형성된 반응물을 용해시키고, ELISA reader로 550 ㎚에서의 흡광도를 측정해 세포독성을 확인하였다. Jurkat T cells의 세포독성은 각각 림프구 T 세포를 2×10^3 cells/㎖ 농도로 96 well plate에 130 ㎕씩 분주하고, 일정농도 1 ㎎/㎖ 로 조정한 시료를 well plate에 14.5 ㎕씩 첨가한 다음 37℃, 5% CO_2 배양기에서 72 시간 동안 배양하였다. 72 시간 배양 후 인산 생리식염수에 5 ㎎/㎖ 농도로 제조한 MTT 용액을 한 well 당 14.5 ㎕씩 첨가하여 MTT가 생존 암세포의 효소 작용에 의해 환원되도록 4 시간 더 배양하였다. 배양 후 각 well당 DMSO 108.5 ㎕를 첨가해 생성된 formazan 결정을 용해시키고 ELISA reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Blank로서는 각 시료에 세포 대신에 배지만을 넣은 후 동일하게 실험하여 측정하였다.

세포독성 (%)=

$$(1-\frac{\text{시료의흡광도}-\textit{blank}\text{의흡광도}}{\text{대조구의흡광도}})\times 100$$

② NO 생성량 평가

Raw264.7 세포주 (ATCC CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 nitric oxide (NO) 형성 억제력 실험을 실시하였다. 10% fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 DMEM으로 미리 배양한 Raw264.7 세포주를 96 well plate에 1×10^5 cells/㎖의 농도로 seeding하여 5% CO_2 incubator에서 24 시간 배양하였다. 배지를 제거하고 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포 배양액을 교체한 후, 배지에 희석한 시료를 가해 15 분간 처리하였다.

Lipopolysaccharide를 0.5 ㎍/㎖의 농도로 가하여 16 시간 배양한 후, 상층액을 100 ㎕씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100 ㎕씩 가해 상온에서 15 분간 반응시켜 ELISA reader로 540 ㎚에서의 흡광도를 측정하였다.

③ TNF-α, IL-2 생성량 평가

Jurkat T cells 0.5% FBS가 든 1640 배지 (Life Technologies Inc.)에 2.0×10^6 cells/㎖로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 16 시간 배양하였다. 배양 후 *BPE* 최종 농도 0.1 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖을 처리한 후 1 시간 뒤 집먼지진드기 추출액 (house dust mite extract, *Dermatophagoides pteronyssinus ; Dp*) 1.0 ㎍/㎖를 각각 24 시간 동안 처리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 TNF-α, IL-2의 양을 측정하였다.

④ IL-4, IL-5 생성량 평가

Jurkat T cells 0.5% FBS가 든 1640 배지

(Life Technologies Inc.)에 2.0×10^6 cells/㎖로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 16 시간 배양하였다. 배양 후 ***BPE*** 최종 농도 0.1 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖을 처리한 후 1 시간 뒤 집먼지진드기 추출액 1.0 ㎍/㎖를 각각 24 시간 동안 처리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 IL-4, IL-5의 양을 측정하였다.

⑤ IL-6, IL-8 생성량 평가

사람의 호산구인 EoL-1 cells 0.5% FBS가 든 1640 배지 (Life Technologies Inc.)에 2.0×10^6 cells/㎖로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 16 시간 배양하였다. 배양 후 ***BPE*** 최종 농도 0.1 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖을 처리한 후 1 시간 뒤 집먼지진드기 추출액 1.0 ㎍/㎖를 각각 24 시간 동안 처리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 IL-6, IL-8의 양을 측정하였다.

⑥ IFN-γ 분비량 평가

Jurkat T cells 0.5% FBS가 든 1640 배지 (Life Technologies Inc.)에 2.0×10^6 cells/㎖로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 16 시간 배양하였다. 배양 후 ***BPE*** 최종 농도 0.1 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖을 처리한 후 1 시간 뒤 집먼지진드기 추출액 1.0 ㎍/㎖를 각각 24 시간 동안 처리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 IFN-γ의 분비량을 측정하였다.

⑦ Raw264.7 cells에서 TNF-α, COX-2, IL-1β, IL-6 유전자 발현 평가

Monolayer를 형성한 생쥐의 대식세포 Raw264.7 세포주를 배양용기에서 떼어내어 1×10^5 cells/㎖의 농도로 희석시킨 후 6 well dish에 넣어 90% 정도 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고 ethanol로 희석한 ***BPE*** 를 가하여 16 시간 동안 처리한 후, 아래의 방법으로 세포로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR를 수행하였다. 이때 대조군으로는 ethanol을 사용하였다.

㉮ Total RNA 분리

세포로부터 total RNA를 분리하는 과정은 guanidinium thiocyanate - phenol chloroform법에 준하여 실시하였다. 즉 시료를 처리한 배지를 제거한 후 PBS로 1 회 세척하고, Easy blue (Intron, Korea) 1 ㎖을 가하여 세포를 용해시킨 후, micropipet으로 잘 섞고 eppendrof tube로 옮겼다. Chloroform 200 ㎕을 가하여 1 분간 세차게 흔든 후 4℃에서 15 분간 방치하고 원심분리 (14,000 rpm, 15 분, 4℃)하고, 상층액 400 ㎕를 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. Isopropanol을 동량을 가하여 -20℃에서 1 시간 방치시킨 후 원심분리 (13,000 rpm, 25 분, 4℃)하여 상층액을 제거하고 침전물을 cold 80% ethanol로 1 회 세척한 후, DEPC처리된 이온교환수 30 ㎕을 가하여 녹였다. 이 중 일부를 취하여 spectrophotometer로 260 ㎚과 280 ㎚에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

㉯ RT-PCR

분리한 total RNA 4 ㎍를 eppendrof tube에 넣고 random hexamer (10 pmol/20 ㎕)를 첨가하여 65℃에서 5 분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차구조를 풀었다. 여기에 반응액 (1 × buffer, 100 uM dNTPs, 200 unit RTase)을 가하여 37℃에서 1 시간 반응시킨 후, 65℃에서 10 분간 처리하여 reverse transcription 반응을 종료시켰다.

Polymerase chain reaction은 상기한 RT 반응액을 PCR tube에 가하여 PCR machine에서 94℃/0.5 min, 58℃/min, 72℃/min 의 조건으로 각각 24 회 증폭하였다. 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 1과 같다. RT-PCR 결과는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에서 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였다(Table 1).

Table 1. Nucleotide Sequence of the Primers

Primer		Sequence
IL-6	Sense Anti-sense	5'-atg aag ttc ctc tct gca ag -3' 5'-cac tag gtt tgc cga gta ga -3'
TNF-α	Sense Anti-sense	5'-cgg act ccg caa agt cta ag -3' 5'-acg gca tgg atc tca aag ac -3'
G3PDH	Sense Anti-sense	5'-acc aca gtc cat gcc atc ac -3' 5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta -3'
IL-1β	Sense Anti-sense	5'-atg aag ttc ctc tct gca ag -3'' 5'-cac tag gtt tgc cga gta ga -3'
COX-2	Sense Anti-sense	5'-cgg act ccg caa agt cta ag -3' 5'-acg gca tgg atc tca aag ac -3'
G3PDH	Sense Anti-sense	5'-acc aca gtc cat gcc atc ac -3' 5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta -3'

Table 2. Nucleotide Sequence of the Primers

Primer		Sequence
IL-6	Sense Anti-sense	5'-gaag acc ttg gca ctg ctt tc-3' 5'-atc ttt ggc tgc aac aaa cc-3'
IL-8	Sense Anti-sense	5'-aca ggc ttg tca ctc ggg gt-3' 5'-tct tcc tct cac ata ctg ac-3'
IL-4	Sense Anti-sense	5'-gaag acc ttg gca ctg ctt tc-3' 5'-atc ttt ggc tgc aac aaa cc-3'
TNF-α	Sense Anti-sense	5'-aca ggc ttg tca ctc ggg gt-3' 5'-tct tcc tct cac ata ctg ac-3'

⑧ HMC-1 cells에서 TNF-α, IL-4, IL-6, IL-8 유전자 발현 평가

Monolayer를 형성한 사람 비만세포인 HMC-1 세포를 배양 용기에서 떼어내고, 1×10^5 cells/㎖의 농도로 희석시킨 후 6 well dish에 넣어 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 세포 배양 배지를 혈청이 첨가되지 않은 IMDM으로 세포 배양액을 교체하고, ethanol로 희석한 실험물질을 가하여 16 시간 동안 처리하였다. 이때 대조군으로는 ethanol을 사용하였으며, 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 2와 같다(Table 2).

⑨ MAPK Western Blotting

㉮ Cell culture

Raw264.7 cells, HMC-1 cells를 culture하여 100 ㎜ dish에 seeding했다. seeding한 다음날 약 16 시간 경과 후에 serum free media로 change하고 37 ℃, 5% CO_2 incubator에서 약 24 시간 starvation했다. 배양 media는 aspiration한 후 fresh serum free media를 넣고 *BPE*를 농도별로 처리해주고 LPS 또는 PMA+23187 로 activation 시킨 후 20~30 분 배양했다. 다시 media를 aspiration한 후 PBS로 2 회 washing했다.

㉰ Western blots analysis

Dish에 Proprep 100 ㎕를 넣고 15 분 동안 ice에서 incubation하여 cell을 lysis시킨 다음에 scraper로 긁어 1.5 ㎖ tube에 모아 harvest하고, 12000 rpm, 4℃로 20 분 centrifuge했다. BCATM Protein assay reagent (Pierce Co.)를 이용해 정량한 다음 50 ㎍을 loading buffer와 함께 loading 하여 SDS-PAGE 전기영동 후 NC membrane에 transfer했다. Transfer가 끝난 membrane을 5% skim milk (blocking buffer) 10 ㎖에 30 분 동안 blocking했다. 0.1% Tween 20-PBS로 5 분 동안씩 3 회 washing했다. Skim milk buffer로 1st antibody를 1000 : 1로 희석하여 2 시간 동안 상온에서 shaker incubation했다. 0.1% Tween 20-PBS로 5 분씩 3 회 washing하고 secondary antibody를 skim milk buffer에 1000 : 1로 희석하여 1 시간 상온에서 shaker incubation했다. 다시 0.1% Tween 20-PBS로 5 분씩 5 회~10 회 washing하고 WESTZOL (INTRON)을 이용하여 detection했다. 암실에서 Sol. A 1 ㎖ + Sol. B 1 ㎖를 섞은 후 membrane에 골고루 적신 후 시간을 달리하며 detection했다.

2) 동물실험

① 관등평가

각 실험동물에 대하여 mouse용 제모기를 이용하여 실험동물의 등 부분을 깨끗하게 제모한 다음, 피부의 과도한 자극을 피하고 미세한 상처가 치유되도록 하기 위하여 하루 정도 지난 다음 1.0%의 DNCB (150 ㎕/dorsal area in AOO) 1 회 처리한 다음, 4 일 후 자연회복을 막기 위하여 0.2~0.5%의 농도로 1 주일에 2~3 회씩 6 주 동안 처리하여 관등평가를 통하여 충분히 아토피를 유발시킨 다음 시험물질을 처리하였다. DNCB 처리를 종료한 1 일 뒤에 1 일 2 회, 5 일간 약물 용액을 등 부위에 국소 도포하였다. 150 ㎕의 시험물질은 1 × PBS에 각각의 농도에 맞게 희석하여 충분히 도포하였다. 정상 대조군, AOO (acetone : olive oil = 3 : 1), DNCB (Dinitrochlorobenzene), DXT (dexamethasone), 저용량 화피 투여군과 고용량 화피 투여군 각각 나누어 각각 9 마리씩 공시하였다.

NC/Nga mouse의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하였다. 육안평가 결과는 다음의 5 가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 산출하였다. 평가항목은 홍반, 가려움과 피부 건조, 부종과 혈종, 짓무름, 그리고 태선화로 구분하였다. 이 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3)으로 채점된다. 따라서 최소 0 점에서, 최고 15 점 사이의 점수를 얻을 수 있다. 일반적으로 DNCB를 이용해 피부염을 유발할 경우, 약 12~13 점이면 피부염이 최고조에 달했다고 판단할 수 있다. 관등평가는 일주일에 2 번 일정하게 실시하였으며, 관등평가에 의한 피부염의 scoring은 실험 유경험자 2 인 이상이 각각 실시하여 cross-check하도록 하였다. 특히 약물 처치가 종료된 다음에는 사진을 찍어 참고자료로 활용하도록 하였다. 결과 처리는 약물 처리전의 score와 처리 후의 score를 비교하여 감소한 비율을 구한 다음, vehicle 용액을 처리한 대조군의 감소 비율과 비교하여 유의성을 검증하였다.

② 채혈 및 혈액학적 검사

혈액학적 검사는 부검 시에 ether로 마취한 후 복대정맥으로부터 채혈한 시료에 대하여 혈액학적인 검사는 혈액자동분석기 (ADVIA-210, Bayer, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 자세한 사항은 진단검사의학적인 방법에 준하여 시행하였다.

③ 조직 염색 및 관찰 방법

실험동물의 피부조직은 등 주변의 환부를 중심으로 1.5×1.5 ㎠ 넓이로 생검하여 10% 포름알데히드 용액에 고정하여 실험하였고, 모든 실험의 처

리과정은 일반적인 진단병리학적인 표준작업지침에 준하여 시행하였다. 피부조직의 판독기준은 피부의 전반적인 상태, 표피의 두께, 비만세포의 침윤과 탈과립화, 호산구의 침윤을 중심으로 관찰하였다. 이를 위해 haematoxylin-eosin (H&E) 염색을 이용하여 조직을 염색하였고, 광학현미경 상에서 약 200 배의 배율로 관찰하였다. 한편 mast cell의 침윤 정도를 평가하기 위하여 조직절편을 acidic toluidine blue (pH 4.0)로 염색하여 × 1,000 배율 하에 20 개 시야의 high power fields에서 계수하였으며 cells/HPF로 계산하여 mean±SEM으로 제시하였다.

④ ELISA

측정시료는 매주 1 회씩 미정맥을 이용하여 전혈을 채혈하였으며, 채혈한 시료는 원심분리기를 이용하여 혈청을 얻은 다음 -20℃에 보관한 후 ELISA 시료로 사용하였다. 피부염을 유발한 다음, 약 2 주 간격으로 미정맥에서 혈액을 채취하여 혈중의 IgE를 정량하였다. 보통 질환이 유도되어 임상적 점수가 6~7 점을 넘어가면 혈중 IgE 농도가 10 ㎍/㎖을 넘어가므로, 혈액을 약 200~500 배 희석하여 측정할 수 있다. 따라서 채취하는 혈액량은 50 ㎕정도면 충분하다. 구체적인 방법은 다음과 같다. Capture Ab를 coating buffer에 250 배 희석한 다음 ELISA용 96 well plate에 50 ㎕씩 가하였다 (4℃에서 overnight incubation). PBS buffer로 각 well에 대하여 5 번 씻어낸 후, 각 well을 100 ㎕의 assay diluent로 상온에서 1 시간 동안 blocking한 다음, blocking하는 동안 standard solution (100/50/25/12.5/6.3/3.2/1.6 ng/㎖, 4.15 ㎕ IgE standard solution in 200 ㎕ assay diluent)과 sample solution (sample 2 ㎕ in 1 ㎖ assay diluent)을 제조하였다. 각각의 well에 standard solution을 50 ㎕ 가하고 wrap으로 씌운 다음 상온에서 2 시간 incubation하였다. Incubation이 모두 끝난 다음 각각의 well을 PBS buffer로 5 번 세척한 후, 각 well에 working detector (detection Ab+Av-HRP in assay diluent) 50 ㎕를 가한 다음, 다시 wrap으로 씌우고 상온에서 1 시간 동안 incubation한 시료를 PBS buffer로 5 번 세척한 후 각각의 well에 TMB 기질을 50 ㎕씩 가한 다음 상온에서 30 분 방치하였다. 반응이 끝난 각각의 well에 25 ㎕의 stop solution을 가하여 반응을 중단시킨 후 450 ㎚에서 흡광도를 측정하여 결과 값을 구하였다. 결과의 정확성을 기하기 위하여 위와 같은 방법으로 각각 2 번 실시하였다. 결과 처리는 약물 처리 전의 혈중 IgE 농도와 처리 후의 혈중 IgE 농도를 비교하여 감소한 비율을 구한 다음, vehicle을 처리한 대조군의 감소 비율과 비교하여 유의성을 검증하였다.

⑤ 통계학적 분석

시험결과는 백분율 또는 측정값으로 표현하였다. 이 외 동물실험 혈액검사와 Mast cell의 변화는 mean±SEM으로 표시하였고, 집단 간의 차이는 ANOVA (one-way analysis of variance)에 이어 Dunnett's multiple-range test를 이용하여 $p<0.05$의 수준에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포실험

1) 세포 독성

Raw264.7 세포주 (ATCC CCL-93)에서 1, 10㎍/㎖에서 각각 약 90, 75% 이상, Jurkat T cells에서는 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 100, 85% 생존율을 보여 처리하지 않은 군에 비하여 세포 생존율이 감소하지 않아서 세포에 대한 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(Fig. 1).

2) NO 생성량에 미치는 효과

LPS에 의해 활성화된 macrophage로부터 NO 분비 측정한 결과 10, 25, 50 ppm에서 각각 5, 25, 70%의 억제를 보였다(Fig. 2).

3) TNF-α , IL-2 생성량에 미치는 효과

Jurkat T cells에서 집먼지진드기에 의해 자극된 IL-2 분비는 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 21.9, 43.9% 억제를 보였고, TNF-α의 분비는 0.1, 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 40.6, 43.4, 48.6%로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4) IL-4, IL-5 생성량에 미치는 효과

Jurkat T cells에서 집먼지진드기에 의해 자극된 IL-4의 분비는 0.1, 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 80.5, 89, 89.5% 억제를 보였고, IL-5의 분비는 10 ㎍/㎖에서 55.7%로 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

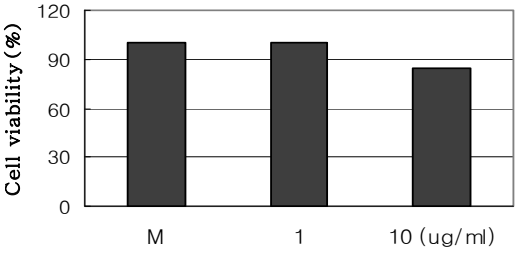


Fig. 1. Cytotoxic effects of *BPE* on Jurkat T cells

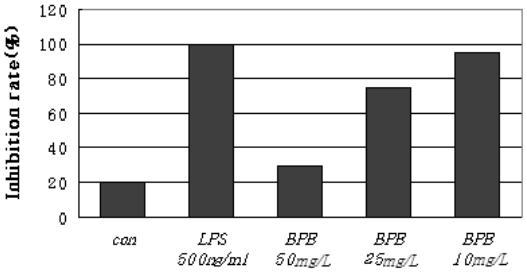


Fig. 2. Dose-dependent effects of *BPE* on NO stimulated by LPS in macrophage

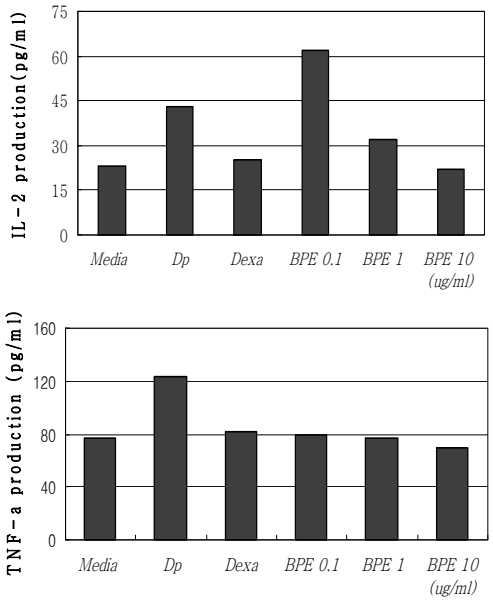


Fig. 3. Dose-dependent effects of *BPE* on IL-2 and TNF-α release by house dust mite (*Dp*) in Jurkat T cells

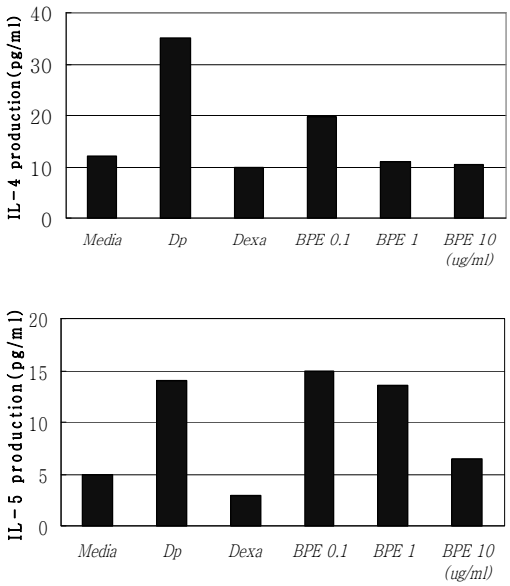


Fig. 4. Dose-dependent effects of *BPE* on IL-4 and IL-5 release by house dust mite (*Dp*) in Jurkat T cells

5) IL-6, IL-8 생성량에 미치는 효과

EoL-1 cells에서 집먼지진드기에 의해 자극된 염증성 cytokine IL-6의 분비는 0.1, 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 60, 80, 95% 억제를 보였고, IL-8의 분비는 0.1, 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 80, 85, 83%로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

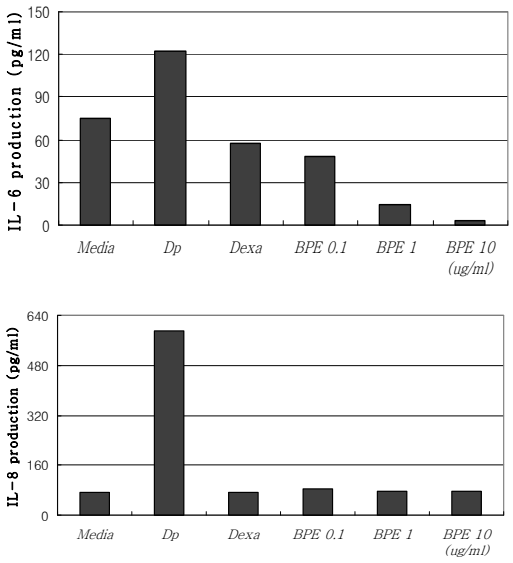


Fig. 5. Dose-dependent effects of *BPE* on IL-6 and IL-8 release by house dust mite (*Dp*) in EoL-1 cells

6) IFN-γ 분비량에 미치는 효과

Jurkat T cells에서 집먼지진드기에 의해 자극된 IFN-γ의 분비가 0.1, 1, 10 ㎍/㎖에서 각각 709, 420, 350% 증가를 보였다. 특히 IFN-γ의 분비는 농도에 비례하여 나타나지 않고 10 ㎍/㎖ 농도일 때가 억제가 최대 되는 것으로 보였다(Fig. 6).

7) Raw264.7 cells에서 TNF-α, COX-2, IL-1β, IL-6 유전자 발현에 미치는 효과

LPS에 의해 활성화된 Raw264.7 cells에서 IL-1β, TNF-α, IL-6, COX-2 등에 대해 모든 농도에서 유전자 발현 억제를 확인하였다(Fig. 7).

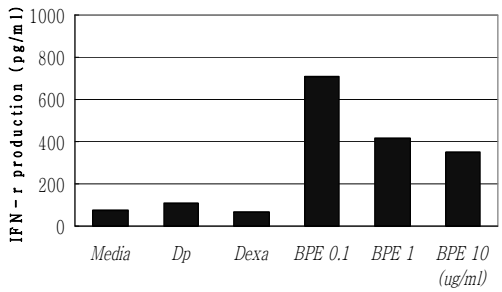


Fig. 6. Dose-dependent effects of *BPE* on IFN-γ release by house dust mite (*Dp*) in Jurkat T cells

8) HMC-1 cells에서 TNF-α, COX-2, IL-4, IL-6, IL-8 유전자 발현에 미치는 효과

비면역적인 자극인 calcium ionophore A23187에 의해 활성화된 HMC-1에서 COX-2 만이 모든 농도에서 유전자 발현을 억제하는 것으로 확인하였다(Fig. 8).

9) MAPK Western blotting

MAPK의 단백질 인산화 효소인 p38, ERK의 활성이 1, 0.1% 농도에서 감소되었다(Fig. 9).

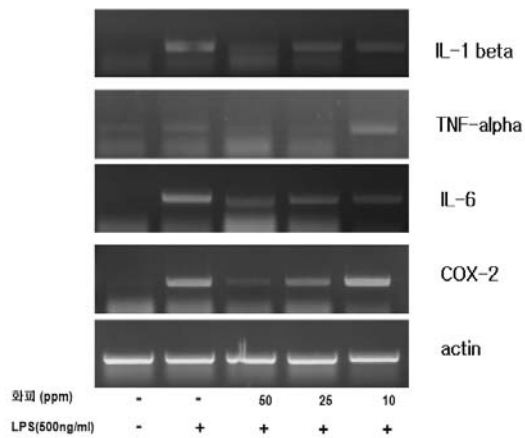


Fig. 7. The effects of *BPE* on RT-PCR in mouse Raw264.7 macrophage cells

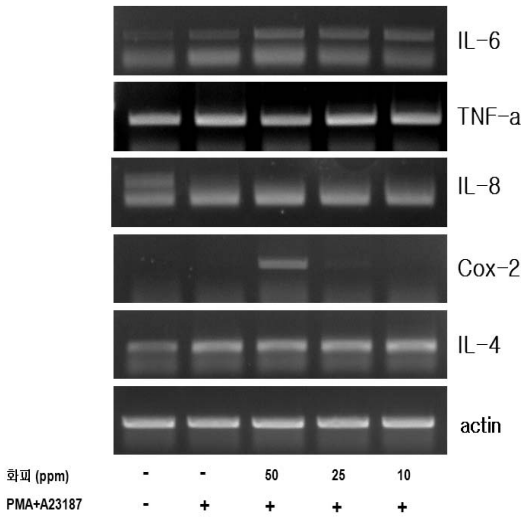


Fig. 8. The effects of *BPE* on RT-PCR in Human mast cells-1

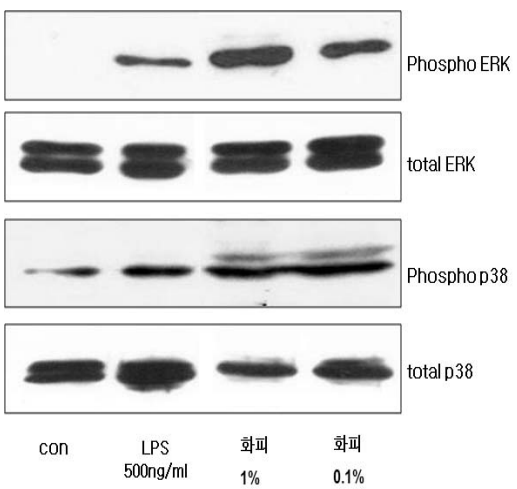


Fig. 9. The effects of *BPE* on MAPK Kinase Western blotting in Raw264.7 cells and Human mast cells-1

2. 동물실험

1) 체중에 미치는 영향

정상 대조군을 포함하여 **AOO, DXT, DNCB**와 시험물질과의 비교에 있어서 전 시험기간에 일부 실험군에서 변화가 관찰되었다. 가장 큰 변화로는 9 주와 14 주에 있어서 변화가 관찰된바, 즉 9 주째에 **DNCB** 처리에서의 변화는 시험물질 투여 전으로 관등평가 등을 볼 때 아토피 피부염에 의한 것으로, 통계적으로 유의성은 관찰되지 않았으나 감소하는 경향이 관찰되었다. 이는 아토피 피부염 등 발현에 의한 스트레스 등으로 음수 및 식이섭취량의 감소에 기인한 체중감소로 생각된다. 마지막 14 주째에서 **DXT** 단독처치에서 체중이 감소하는 경향을 보였다. 음수 및 사료섭취량의 변화에 있어서 체중 감소에 직접적인 영향을 준만큼의 변화는 아닌 것으로 보아 현재는 어떤 결론을 내리기는 어렵다고 생각된다. 시험물질 처치에서는 그 어떤 유의한 변화도 관찰되지 않아 시험물질에 의한 체중에 미치는 효과는 없는 것으로 나타났다 **(Fig. 10)**.

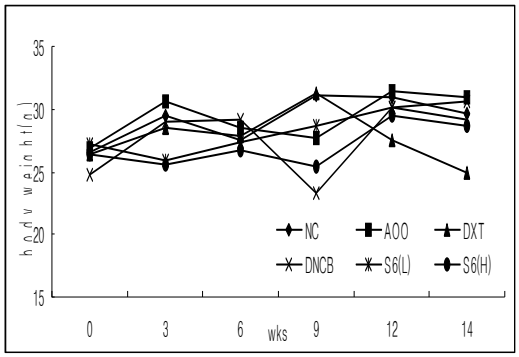


Fig. 10. The effects of dorsal administration of *BPE* for the mean body weight in DNCB-treated NC/Nga mice

※ AOO (acetone : olive oil = 3 : 1), DNCB (Dinitrochlorobenzene), DXT (dexamethasone)

2) 음수 및 사료에 미치는 영향

정상 대조군을 포함하여 **AOO, DXT, DNCB**와 시험물질과의 비교에 있어서 전 시험기간에 일부 실험군에서 변화가 관찰된 바, 특히 9 주째에 **DXT** 투여군에서 사료의 섭취량이 현저하게 감소하는 경향을 보였으나, 이는 아토피 피부염에 의한

스트레스 등으로 인한 것으로 각 개체간의 편차로 통계적인 유의성은 관찰되지 않았으나 감소하는 경향을 보였다. 다른 실험군에서도 일부 변화가 관찰되나 정상범위 내에서의 변화로 시험물질에 기인한 변화는 관찰되지 않았다.

음수의 섭취량에 있어서는 6 주째에 일시적으로 감소하는 경향을 보였다가 회복하는 경향을 보였다. 이러한 변화 또한 시험물질에 의한 변화로 보기는 어려운 것으로 생각되며, 앞서 언급한 체중의 증가와의 상관관계를 볼 때 정상적인 사료와 음수의 섭취량에 해당되는 것으로 나타났다(Fig. 11, 12).

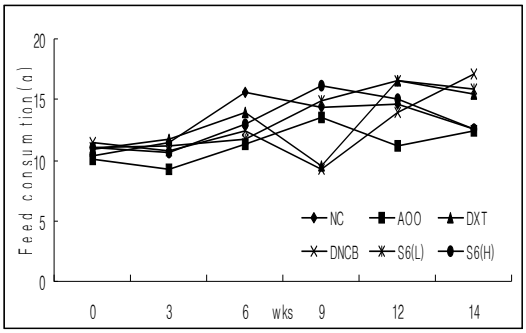


Fig. 11. The effects of dorsal administration of *BPE* for the dietary rate in DNCB-treated NC/Nga mice

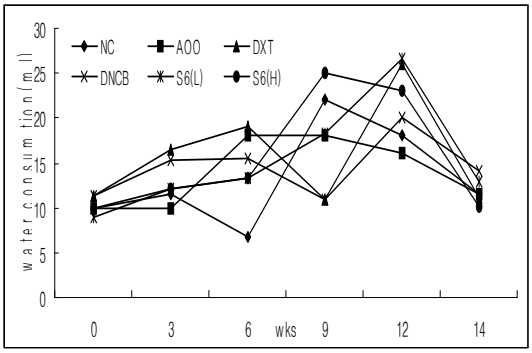


Fig. 12. The effects of dorsal administration of *BPE* for the water rate in DNCB-treated NC/Nga mice

3) 관등평가에 미치는 영향

정상 대조군과 AOO 처리군에서는 정상적인 경향이 관찰된 반면, DNCB 단독 처치군과 시험물질을 포함한 모든 군에 있어서 시험물질 처치 전까지인 10 주까지 10~11 점까지 증가한 반면 시험물질 처치 후부터 DXT군을 포함하여 시험물질 처치군 모두 감소한바, 특히 시험물질 처치군에서는 DNCB 처치군과의 비교에서 저용량의 경우 1.4 배로 42.9%, 고용량의 경우 1.3 배로 31.1%로 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 특히 용량의 변화에 있어서는 고용량에서 보다 저용량에서 억제하는 경향을 보이나 용량 간에 있어서 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 13, 14).

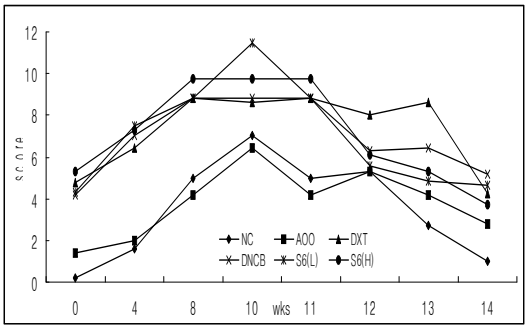
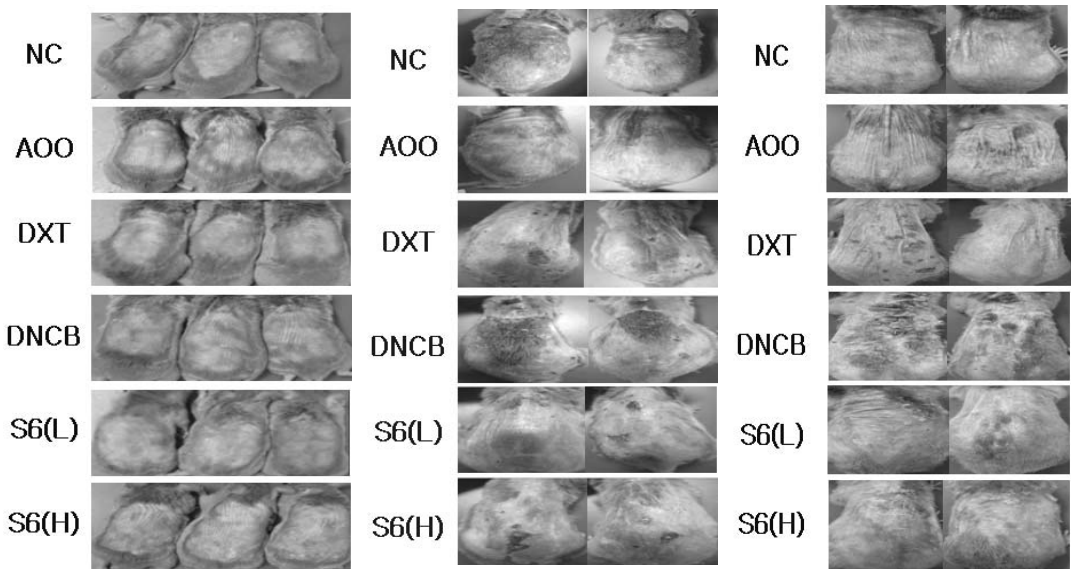


Fig. 13. The effects of dorsal administration of *BPE* for the skin severity score in DNCB-treated NC/Nga mice

4) 일반 혈액에 미치는 영향

총 백혈구수의 경우 저농도 처리군에서 유의하게 감소되었다. 이러한 결과는 호산구의 변화에서도 저농도군에 비해 고농도군에서 유의하게 억제되는 것으로 관찰되었다. 한편 호중구에서는 용량의존적인 변화가 관찰되지 않았다 ($p<0.05$). 그 외의 지표인 적혈구계를 포함한 혈소판 등에서는 시험물질에 의한 어떠한 변화도 관찰되지 않았다 (Table 3).



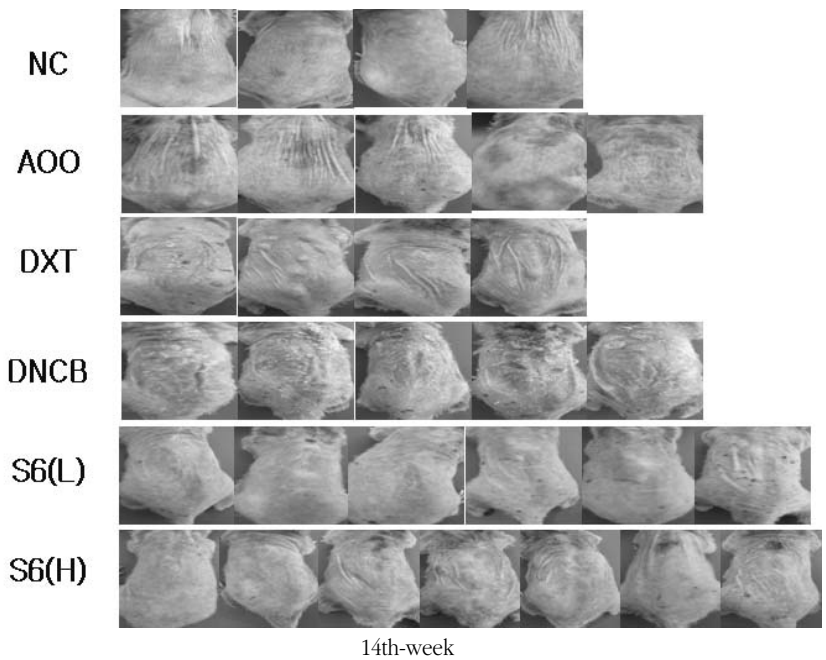


Fig. 14. The effects of dorsal administration of *BPE* for the skin severity score in DNCB- treated NC/Nga mice

Table 3. The Effects of Dorsal Administration of *BPE* for Clinical Blood Chemistry in DNCB-treated NC/Nga Mice

	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	WBC						PLT
							Neut (%)	Lymph (%)	Mono (%)	Eos (%)	Baso (%)	Total	
NC	8.66 ±2.08	10.23 ±7.32	47.13 ±10.75	54.53 ±1.15	10.77 ±6.81	19.90 ±12.83	26.87 ±12.74	61.50 ±18.40	1.17 ±0.57	8.57 ±7.67	0.13 ±0.06	2.56 ±1.26	1241.00 ±264.46
AOO	8.47 ±0.41	13.23 ±0.72	203.23 ±267.24	58.90 ±1.18	15.60 ±0.26	26.50 ±0.26	34.63 ±4.05	60.33 ±4.79	0.20 ±0.10	2.73 ±1.30	0.17 ±0.21	1.12 ±0.84	1411.67 ±356.74
DXT	8.43 ±0.43	12.56 ±0.78	48.50 ±2.76	57.58 ±1.44	14.90 ±0.33	25.88 ±0.51	59.02 ±23.13	25.10 ±24.98	1.14 ±0.46	9.52 ±7.49	0.18 ±0.29	1.53 ±1.18	1125.80 ±133.74
DNCB	10.09 ±1.27	13.17 ±2.06	51.33 ±5.65	51.17 ±5.25	13.17 ±2.22	25.63 ±1.77	18.80 ±7.75	73.67 ±12.05	0.90 ±0.30	2.33 ±2.14	0.03 ±0.06	3.21 ±0.85	1567.33 ±260.01
S6(L)	8.68 ±0.71	12.70 ±1.16	48.38 ±4.03	55.73 ±1.17	14.60 ±0.22	26.23 ±0.36	25.35 ±19.27	60.03 ±24.93	2.50 ±2.60	8.70 ±7.10	0.10 ±0.08	1.95 ±1.73*	1351.50 ±261.01
S6(H)	7.90 ±3.29	11.70 ±4.77	44.53 ±16.03	58.48 ±6.71	14.90 ±0.33	25.68 ±2.18	28.03 ±9.36	62.70 ±14.18	0.78 ±0.36	4.13 ±2.63	0.65 ±1.30*	3.65 ±2.01	1228.00 ±116.18

* : $p<0.05$ by one-way ANOVA.

5) 장기 무게에 미치는 영향

부검 후 관련된 주요 장기 무게 중 간장에서는 고농도의 투여군에서 감소하는 경향을 보였으나, 용량 의존적변화로 보기는 어렵고, 정상범위 내에서의 변화로 시험물질에 의한 변화로 해석하기는 어렵다고 생각된다($p<0.05$). 그 외 신장, 비장 및 흉선 모두에서 시험물질의 투여군에서 시험물질로 인한 유의한 변화가 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 없는 것으로 관찰되었다(Table 4).

Table 4. The Effects of Dorsal Administration of *BPE* for the Mean Organ Weight in DNCB-treated NC/Nga Mice

Group	Liver	Spleen	Thymus	Kidney
NC	1.7034	0.1212	0.0166	0.2393
AOO	1.8712	0.2545	0.0203	0.4398
DXT	1.8208	0.0615	0.0088	0.2431
DNCB	1.8642	0.2159	0.0097	0.2450
S6(L)	1.8741	0.2124	0.0141	0.2473
S6(H)	1.6985	0.2635	0.0112	0.2396

6) 조직학적 변화에 미치는 영향

아토피 피부염 부위에 대하여 다양한 정도의 erythema, edema, excoriation, dryness와 같은 육안병변과 함께 epidermal hyperplasia, dermal inflammatory cell infiltration 및 mast cell infiltration 등과 같은 조직병리학적 소견이 확인되어 시험물질의 효능 평가에 적합한 피부염이 유도되었다. 만성 아토피 피부염증 부위를 haematoxylin-eosin 염색을 통하여 조직을 관찰한 결과, 정상 대조군을 포함한 정상 대조군과 AOO 처리군에 있어서는 정상조직에 가까운 소견이 관찰된 반면, dermatitis 유발군인 DNCB 처치군에서는 아토피 피부 염증 부위에 상피증식 (epidermal hyperplasia)과 함께 진피 (dermis)의 염증세포의 침윤 (inflammatory cell infiltration)이 확인되었다. 특히 상피층의 두께 (epidermal thickness)와 mast cell의 수를 측정해 본 결과 dermatitis 유발군의 epidermal thickness는 0.526 ㎜로 정상 대조군의 0.07 ㎜의 8 배 이상, mast cell 수는 55.6 개로 정상대조군 29.6 보다 1.8 배로 87.8% 증가하였다. 이러한 조직의 비후 및

mast cell의 증가는 AOO 처리군과 양성 약물대조군인 DXT 처리군의 경우에 있어서 정상 대조군과의 비교에서 유의한 차이가 발견되지 않았다. 반면 시험물질처치군의 경우 dermatitis 유발군인 DNCB 처리군과의 비교에서는 epidermal thickness의 경우 저용량에 있어서는 1.8 배로 억제를 보인 반면 고용량처치군의 경우 2.6 배로 유의한 억제를 보였다. 한편 mast cell수의 비교에서는 저용량에서는 1.6 배로 61.1% 억제를 고용량처치군의 경우 1.7 배로 71.6%의 억제 효과를 보였다. 이로써 양성약물 대조군인 DXT 처치군과 시험물질 처치군과의 비교에서 상피층의 두께나 mast cell 수 모두에 있어서 유의한 억제효과 ($p<0.05$)를 보였으며, 시험물질의 용량에 따른 차이에 있어서는 저용량보다는 고용량에서 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었다(Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17).

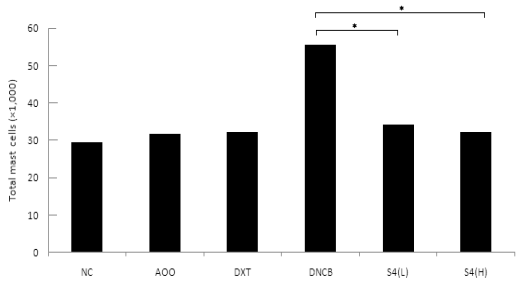


Fig. 15. The effects of dorsal administration of *BPE* for mast cell analysis in DNCB-treated NC/Nga Mice

* : $p<0.05$ by one-way ANOVA.

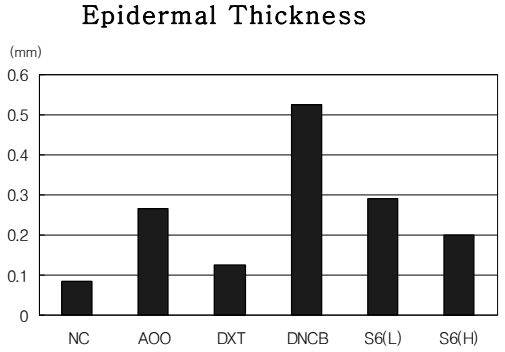
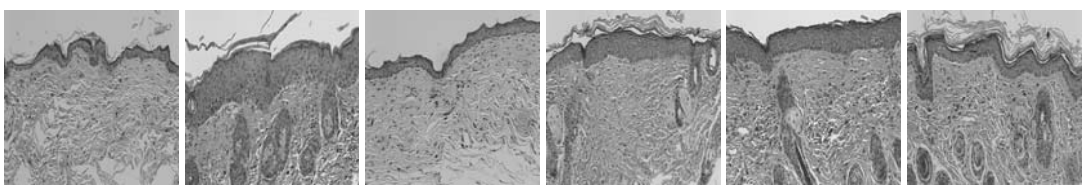


Fig. 17. The effects of dorsal administration of *BPE* for epidermal thickness in DNCB-treated NC/Nga mice

7) Total IgE에 미치는 영향

혈청 내 면역학적 지표인 IgE 용량을 ELISA를 통하여 측정하였다. 아토피성 피부염 모델인 DNCB 처치군에서는 서서히 증가하여 최종 농도 201.8 ㎍/㎖로 정상 대조군 97.9 ㎍/㎖에 비하여 유의하게 증가하여 2 배 즉 약 61%의 증가를 보였다 ($p<0.05$).

한편 AOO 처치군과 양성약물 대조군인 DXT 처치군의 경우 정상 대조군과의 비교에서 각 개체별 편차가 커 통계적 유의성은 관찰되지 않았으나 증가되는 경향을 보인 반면, DNCB 처치군과의 비교에서는 역시 억제되는 경향을 보이나 개체차이로 역시 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 시험물질 처치군의 경우에 있어서도 시험물질 처치군에서 일부 억제되는 경향은 보이나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 18).



NC AOO DXT DNCB S6(L) S6(H)

Fig. 16. The effects of dorsal administration of *BPE* for histological analysis in DNCB-treated NC/Nga mice

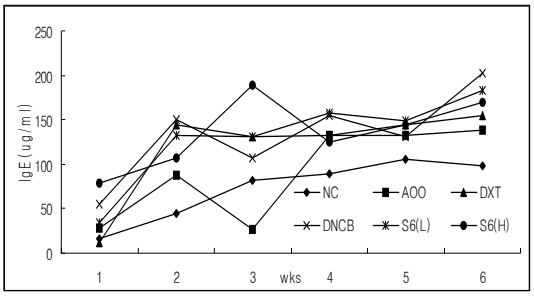


Fig. 18. The effects of dorsal administration of *BPE* for IgE in NCB-treated NC/Nga mice

8) 주요 장기의 조직학적 변화에 미치는 영향

간장에서 정상 대조군은 간소엽의 중앙에 중심정맥이 위치하고, 간세포들이 간소엽의 가장 자리를 향해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보였으며, 문맥과 간소엽의 경계가 잘 이루어진 정상적인 구조를 보였으나 각 실험군의 일부 개체에서 미약하게 지방변성과 공포변성이 관찰되었다.

그 외에 핵의 변화, 글리코겐 침착, 세포질내 봉입체, 색소침착, 간세포의 비대나 위축, 괴사를 포함하여 섬유화 등은 정상군을 포함하여 시험물질 투여군 모두 관찰되지 않았다.

신장을 포함한 비뇨생식기계에 미치는 영향에서는 신장조직은 정상군을 포함한 모든 시험군에 있어서 원위 및 근위세뇨관을 포함하여 사구체에서 여러 가지 변화는 관찰되지 않았다.

비장은 정상 대조군과 시험물질 처치군 모두에 있어서 splenic zone에서 T세포와 B세포의 충실도와 감소상태 기능항진과 괴사, 경색 그리고 macrophages의 정도 등을 관찰한 결과 정상 대조군 및 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

Ⅳ. 고 찰

樺皮 (*Betula platyphylla var. japonica*)는 樺木科에 속하는 落葉喬木인 자작나무 및 만주자작나무의 樹皮로 樺木皮, 白樺皮라고도 하며, 宋代 ≪開寶本草≫에 黃疸을 치료한다고 최초로 수록되었다[2]. 《本草綱目》에 樺皮는 性은 平, 味는 苦 無毒하며, 黃疸 乳癰 肺風瘡 小兒의 瘡疹을 다스리며, 肺風毒, 身痒에 복용한다고 하였다[13].

자작나무는 외피에 betulin, triterpenes, 내피에 diarylheptanoid와 arylbutanoids와 같은 phenol 잎에 dammarane-type의 triterpenes, 근피에 dammarane type triterpene caffeates와 p-caumarates의 성분이 포함되어 있으며, 이 추출물은 간 손상 시에 강한 억제 작용이 있음이 밝혀졌다. 특히 항산화 기능 및 elastase 억제효과가 측정되어 피부주름을 완화시킨다고 보고된 바 있다[5].

樺皮는 淸熱, 解毒, 利濕 등의 작용이 있어서[2] 화피는 濕熱의 증상이 있는 아토피 피부염을 치료하는 처방에 가미하여 임상에서 많이 사용되어지고 있다.

아토피 (atopy)는 그리스어인 a-topos가 어원으로서 "특이한", "이상한" 또는 "비정상적인 반응" 등의 뜻을 가지고 있는데, 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역물질 (IgE)을 쉽게 형성함으로써 천식, 고초열, 알레르기성 비염, 아토피 피부염 등을 잘 일으키는 유전적 경향을 말한다[14,15].

서양의학에서는 알레르기에 의한 아토피 피부염은 아토피성 피부염, 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴측부 습진 등을 말한다. 소아습진에서부터 소년기, 사춘기, 성인에 걸쳐서 각각의 특징적인 증상을 나타내는 질환으로 면역학적 특성과 특이한 혈관 반응 및 병원균에 감염이 잘 되는 경향을 보인다. 유아에서는 국한성 홍반, 인설, 구진 또는 수포성 반이나 전형적인 태선화 피부염에까지 이르는 임상적 및 조직학적 진행과정을 보여주는 임상범주의 질환이다[16].

한의학적으로는 奶癬의 범주에 속한다. 奶癬은 母體의 濕熱이 內蘊한 상태에서 胎兒에 遺傳되어 生後에 발생되어서 胎癬, 胎熱이라 하였으며 또 哺

乳期에 많이 나타나서 奶癬, 奶腥瘡, 乳癬이라 하였다. 이외 발생되는 부위에 따라서 다양한 병명으로 표현하였다. 발생원인은 胎兒가 胎中에 있을 때 母親이 魚腥肥甘 및 辛辣한 음식물을 過食하여 발행되거나 母體의 濕熱이 內蘊한데 胎兒에 遺傳되어 생후에 嬰兒의 稟性이 不耐하고 다시 營養 및 調理가 마땅치 못해 濕熱이 肌膚로 外溢하여 발생한다. 濕이 偏盛하면 脂水가 浸淫하여 濕斂을 이루고 熱이 偏盛하면 紅斑이 퍼져 乾斂을 형성한다. 특징은 주로 嬰兒의 頭頸, 顔面 및 全身의 肌膚에 粟疹이 일어나 片을 만들고 痂皮가 나타나며 乾燥 및 瘙痒感이 매우 심하고 頭面部에 脂油의 분비로 두터운 痂皮를 형성한다[16,17].

아토피 피부염의 원인은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 유전적인 요소와 면역기능의 불균형 및 환경적인 요인이 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 바로는 면역학적으로 T림프구의 활성화, cytokine 체계의 이상, 세포매개성 면역의 감소, IgE의 증가 등이 아토피 피부염의 병리상태에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다[18]. 이외 건조한 피부로 인한 장벽기능 이상, 정상인에 비해 쉽게 피부 가려움증을 느끼는 특성, 세균, 바이러스, 곰팡이 등에 의한 감염, 정서적 요인, 환경적 요인 등이 서로 복합적으로 작용하여 일어나는 것으로 본다[16].

알레르기에 의한 아토피 피부염의 대부분은 IgE 항체와 비만세포와 연관된 면역 기전에 의해 발생되는데 특정 알레르겐에 대한 즉시형 면역 반응보다는 T세포 이상에 의한 지연형 면역반응이 관여한다. 항원이 유입되면 많은 cytokine과 비만세포를 활성화시킨다. 면역 및 염증반응을 조절하고 세포의 증식과 분화기능에 있어서 비교적 분자량이 큰 단백질인 cytokine이 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다. 비만세포에서 유리되는 cytokine 중에서 특히 IL-8은 호중구를 알레르기 자극부위로 유주시키고 또한 활성화를 일으켜 조직손상을 일으킨다. 또한 면역반응에 관여하는 중요한 매개체 중 하나인 TNF-α는 다형핵상 및 단핵상 세표의 침윤을 유도하는 것으로 알려져 있다[16].

아토피 피부염 환자에서 세포 매개성 면역장애는 약 80%까지 발생하는 것으로 알려져 있으며, 바이러스 및 피부 사상균 등에 의한 피부 감염증에 대하여 감수성이 증가되고 접촉 알레르겐에 대한 감수성은 감소되는 경향을 보인다. 과거에는 T세포 성숙 결핍설, CD8+ 억제 T세포의 수적 감소 등이 보고된 바 있으나 최근엔 CD4+ T세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다. 즉, B세포로부터 면역글로불린 E의 생성을 유도 또는 촉진하는 IL-4, IL-5와 증폭시키는 IL-6 등을 분비하는 T세포는 CD4+ T세포 중 Th2 세포인데 아토피 질환자들의 피부에서 Th1 세포에 비하여 Th2 세포가 높게 존재하는 것이 밝혀졌다. 이러한 cytokine들은 비만세포, 대식세포, 호염구 등의 면역세포를 자극하여 histamine, leukotrien, PG, NO 등의 분비를 촉진하게 되고 이들 염증 매개물질이 피부의 염증반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

아토피 피부질환에서 나타나는 또 다른 특징은 피부 세포의 세포막을 형성하는 지질 중 γ-linolenic acid의 결핍이 보고된 점이다. γ-linolenic acid의 결핍은 필수 지방산의 생합성 경로에서 δ-6-desaturase의 기능 결손에 의하여 linoleic acid로 부터 γ-linolenic acid로 합성 장애로 인하여 일어나는 현상으로서, 이후 PG 등의 합성을 조절하지 못해 염증 매개 물질의 생성이 높아지게 된다. 또한, γ-linolenic acid의 결핍으로 피부 지질막의 구조에 이상이 발생하여 과도한 수분 유출 등이 일어남으로써 피부 장벽이 허물어지는 결과를 초래하며 이때 세균 등의 2차 감염이 일어난다.

상기와 같이 현재까지 알려진 아토피 피부염의

병인, 기전, 증상 등을 감안하여 아토피 피부염에 대한 치료제가 개발되고 있으며, 그 결과 천연 또는 합성의 면역억제제, 항히스타민제제, 스테로이드 제제 등 다수가 개발되어 있다. 예를 들면, 면역억제제로는 cyclosporin A, FK506 (tacrolimus)와 SDZ ASM981 (pimecrolimus)이 각광받고 있다. 반면 기존의 아토피 피부염에 대한 치료제로 사용되는 스테로이드제제와 항히스타민제 등은 증상을 일시적으로 완화해주는 효과는 있으나 장기간 복용하거나 바르면 피부약화, 전신 호르몬증상, 중독성 불면, 불안, 식욕감퇴 등의 부작용이 있을 수 있다. 외용 또는 경구용 스테로이드 호르몬제의 장기 사용 환자들에 있어서 피부가 엷어지는 현상 및 골다공증의 유발, 어린이의 경우 성장 저해 등 그에 따른 국소 및 전신 부작용으로 인하여 임상적으로 문제가 된다. 따라서 이러한 부작용이 없으며 항균, 보습, 항염 효능이 우수한 치료제 개발이 요구되고 있다[19,20].

아직까지 정확하게 규명되지 않았으나, 아토피 피부염의 원인 중에서 흡입 항원에 대한 노출 증가, 실내외 공기오염의 증가 등 환경적인 변화에 의한 것도 있을 것으로 추측된다. 성인 환자의 50% 이상이 집먼지진드기 항원에 대한 알레르기 피부반응 검사에서 양성이 나타나며, 소아 호흡기 알레르기 환자의 70% 이상이 같은 양상을 나타낸다[21,22].

집먼지진드기는 먼지진드기과 (Pyroglyhidae)에 속하는 종으로 *Dermatopha goides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides micro ceras, Euroglyphus mayneii* 등이 중요한 알레르겐으로 지목받고 있으며, 전 세계적으로 지역에 따라서 우점종에 차이가 있다. 우리나라에서도 수종이 존재하나 *D. pteronyssinus*와 *D. farinae* 두 종이 가장 많이 서식하며, 지역에 따라 차이가 있어서 이러한 분포도는 아토피성 질환의 발병과 연관성이 클 것으로 추측된다[21,22].

알레르겐으로 집먼지진드기에서 30 여개의 항원이 보고되었다. *D. pteronyssinus* 의 다양한 알레르겐 중 Group I (Der p I)는 cysteine proteinase이며, Group Ⅱ (Der p Ⅱ)는 생식기계통에서 분비되는 물질로 추정되고 있다. 또한 집먼지진드기는 알레르기에 주된 작용을 하는 호산구 및 염증에 관련된 단핵구 세포에 대해 염증성 cytokine인 MCP-1, IL-6, 및 IL-8 등을 분비하는 것으로 알려져 있다[23,24].

BPE 가 알레르기 반응과 연관된 효능 실험으로 집먼지진드기에 의해 유도된 Jurkat T cell에서 IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α의 분비가 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었고 (Figure 3, 4), 특히 IL-4과 IL-5는 10 ㎍/㎖ 농도일 때가 억제능이 최대가 되는 것을 확인하였다. 본 실험법을 활용한 연구로 이 등[24]은 Th2의 면역반응에 대한 어성초 (*H. cordata*) 분획물 (HcFs)의 억제효과를 보고하였다. HcFs은 Jurkat T cell과 HMC-1에서 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 calcium ionophore (Ca)에 대한 IL-4, IL-5의 발현을 억제시켰다. TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine)생성을 유도하는 IL-4와 TNF-α는 피부 섬유아세포인 CCD-986나 세포에서 HcFs에 의해 억제되었다. 특히 에탄올 추출물은 TARC에 의해 유도되는 세포 이동을 억제시켰다. 이러한 연구는 세포이동 뿐만 아니라 Th2 cytokine과 TARC의 생성을 down-regulation 함으로써 Th2에 의해 매개되는 알레르기성 염증 반응의 자생식물학적인 치료에서 HcFs가 매우 유용함을 나타내고 있다고 사료된다[25].

또한 *BPE* 는 Jurkat T cells에서 집먼지진드기에 의해 자극된 IFN-γ의 분비는 농도에 비례하여 나타나지 않고, 10 ㎍/㎖ 농도일 때가 최대 로 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 6). 비면역적인 알레르기 반응 자극에 많이 활용되는 calcium ionophore A23187에 의해 자극된 HMC-1에서 COX-2의 유

전자 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 8).

Mast cell에 대한 천연물의 효과를 연구한 실험으로 김 등[26]은 stem cell factor (SCF)에 의해 유도되는 HMC-1 세포의 이동에 대한 어성초추출물의 억제효과를 보고하였다. SCF는 100 ng/㎖의 농도에서 최대점을 갖는 전형적인 화주성 종모형 곡선을 나타내었다. 어성초추출물 중에서 HC-1과 HC-3는 NF-kB의 활성을 억제함으로서 SCF에 대한 HMC-1 세포의 유주능을 감소시키기 때문에, mast cell에 의해 유발되는 염증질환을 치료하는데 있어서 유용한 소재로 활용될 수 있다고 하였다[25,26].

염증 (inflammation)은 전통적으로 "균의 감염, 열, 외상, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전"라고 정의되지만, 현재에는 염증을 신체 국소에서 일어나는 상해에 대한 생체조직의 방어반응으로 인식되고 있다. 즉, 각종 유해한 자극에 응답하여, 자극에 대한 상해를 제거하여 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이 염증반응이다. 염증이라는 용어가 "불 같은 상태"라는 어원에서 유래된 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창 등과 같은 징후가 나타난다[27,28].

수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이 변화는 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체 내에 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, NO, PG, 염증을 유발시키는 여러 cytokines 등이 있다[29].

NO는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 Ⅰ형, Ⅱ형, Ⅲ형의 3 종류가 있는데, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 Ⅰ형이나 Ⅲ형과 달리 Ⅱ형은 inducible NOS (iNOS)로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 LPS나 calcium ionophore에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion (O_2-)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite (ONOO-)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다[30-34].

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증반응을 주요 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류 (histamine, serotonin 등)와 kinin류 (bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 PG과 IL류 등의 4군으로 분류된다[27,35].

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1β, IL-6, TNF-α는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 특히 염증반응에 관여하는 세포 중에서 대식세포는 각종 cytokine을 분비하여 대식세포의 유주, T세포의 활성화와 증식억제, 혈관신생작용 등을 나타내어 염증반응을 조절한다고 인식되고 있는데, 이들 cytokine 중 염증반응의 초기 단계에 작용하는 것으로는 IL-1β와 TNF-α가 가장 잘 알려져 있다. 이들은 arachidonic acid를 유주시키고, COX를 활성화시킴으로써 PG의 생성을 유발시키는 것으로 보고되고 있다[36,37].

PG는 arachidonic acid에서 유래하여 염증과

면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. PG는 세균의 감염에서 유래한 lipopolysaccharide 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 COX-2 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈수 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다[38].

COX는 Ⅰ형과 Ⅱ형의 2가지 isoform이 존재한다. Ⅰ형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 Ⅱ형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다[39,40].

BPE 가 염증 반응과 연관된 효능 실험으로 LPS에 의해 활성화된 macrophage로 부터 분비된 NO를 측정한 결과 70% 정도의 억제효과를 나타냈다(Fig. 2). 또한 IL-1β, TNF-α, IL-6, COX-2 등에 대한 유전자의 발현도 모두 억제하였다(Fig. 7). 집먼지진드기에 의해 유도된 염증성 cytokine IL-6, IL-8에서도 농도에 따라 뚜렷한 억제 효과를 보였다(Fig. 5).

MAPK (mitogen activated protein kinase)경로는 여러 가지 세포 외부의 자극에 의해 활성화되어 세포의 특정 기질의 인산화에 통해 세포 내 여러 가지 반응이 일어나도록 전환하는데, MAPK의 subfamily에는 JNK, ERK 그리고 p38 등이 있다. SAPK와 p38 kinase는 MAP kinase군에 속하는 단백질 인산화 효소로서, 이 중 SAPK는 c-Jun의 N-말단 부위를 인산화 시킬 수 있기 때문에 JNK라고도 불리며, 여러 isoform들이 존재한다. JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 kinase들은 IL-1β 및 TNF-α 등의 inflammatory cytokine들이나 여러 스트레스성 자극, X-선, 자외선, 그 외 염색체 손상물질 등에 의해 활성화되어 염증반응, apoptosis, 세포분화 등 다양한 생물학적 반응을 유도한다. 또 다른 MAP kinase인 extracellular signal-regulated kinase (ERK)는 특히 세포의 성장이나 분화를 촉진하는 신호전달 과정에 관여한다[41-43].

BPE 가 염증 반응과 관련된 MAP kinase의 활성 Western blot 실험에서는 LPS의 자극에 의해 활성화된 MAPK의 family에 속한 p38, ERK 의 활성이 전반적으로 감소되었다 (Fig. 9).

NC/Nga mouse는 자발적 아토피성 피부염 유발 모델로 잘 알려져 있다. 그 분자적 원인을 JAK3 kinase의 과인산화로 IgE의 생성이 항진되어 나타난 결과로 보고 된 바 있다[46]. 최근엔 IgE와 Th2 cytokine 생성에 필수적인 STAT6 knockout NC/Nga mouse를 만들어 시험한 결과 피부염이 여전히 자발적으로 유도되어 흔히 예상한 기전 이외에 다른 기전으로 피부염이 유도되는 것으로 예상되고 있다[44]. 이러한 장점에도 불구하고 자발적인 피부염 유도 비율이 낮고, 유도된 피부염의 severity에도 차이가 심해 평가를 위해 신뢰할 만한 모델 수준은 되지 못하고 있는 것이 사실이다. 이에 일본에서는 hapten 형성 물질인 picryl chloride (1-chloro 2,4,6-trinitro benzene)을 이용하여 피부염을 인위적으로 유도하여 이러한 문제를 해결하고 있다. 그러나 picryl chloride의 경우 국내 반입이 금지되어 이용할 수 없음에 여기에선 구조적으로 picryl chloride와 유사하여 같은 기전으로 작용하는 DNCB (Picryl chloride, 1-chloro 2,4-dinitrobenzene)을 이용하여 시험을 진행하여 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 이 모델에 의하면 아토피성 피부염의 주된 증상들 가려움, IgE 증가, 피부염증 등을 모두 관찰할 수 있었고, 더 나아가 아토피성 피부염의 치료제로 잘 알려진 국소 스테

로이드나 경구용 사이클로스포린에 의해 증상이 완전히 치유되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이에 아토피성 피부염 치료제의 효능을 평가하기 위한 *in vivo* model로 NC/Nga mouse model을 도입하였다[44].

BPE 가 NC/Nga mouse의 변화와 연관된 실험적인 효능을 보면 음수 및 사료섭취량의 변화에 있어서 체중감소에 직접적인 영향을 줄 만큼의 변화는 아닌 것으로 보아 시험물질에 의한 체중에 미치는 효과는 없는 것으로 생각된다(Fig. 10-12). 관등평가에 미치는 영향에 있어서는 시험물질 처치군에서는 DNCB 처치군과의 비교에서 저용량의 경우 1.4 배, 고용량의 경우 1.3 배로 유의성 있게 감소하였다. 용량의 변화에 있어서는 고용량보다 저용량에서 억제하는 경향을 보여 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 13, 14). 일반 혈액검사에 미치는 영향에서는 총 백혈구는 저농도 처리군에서는 유의하게 감소되었고 호산구의 변화도 유의하게 억제되는 것으로 관찰되었으나 호중구의 변화는 용량의존적인 변화는 관찰되지 않았다 (Table 3). 부검 후 관련된 주요 장기 변화는 간장, 신장, 비장 및 흉선 모두에서 유의한 변화가 관찰되지 않아서 영향이 없는 것으로 관찰되었다(Table 4). 장기의 조직학적 변화는 3 주 동안 반복적으로 시험물질을 처리한 결과 주요 장기에 독성을 미치는 영향은 없는 것으로 생각된다. 양성약물 대조군과 시험물질군과 비교에서 상피층의 두께나 mast cell 숫자에 있어서 용량의 차이에 따라서 유의한 억제 효과를 보였다(Fig. 15, 16, 17). 혈청 내 IgE의 변화는 DNCB 처치군에서는 유의하게 증가하여 2 배 즉 약 61%의 증가를 보였다.

한편 AOO 처치군과 양성약물 대조군 처치군의 경우 정상대조군과의 비교에서 각 개체별 편차가 커 통계적 유의성은 관찰되지 않았으나 증가되는 경향을 보인 반면 DNCB 처치군과의 비교 역시 억제되는 경향을 보이나 개체 차이로 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 시험물질 처치군의 경우에 있어서도 시험물질 처치군에서 일부 억제되는 경향은 보이나 통계적 유의성은 인정되지 않았다 (Fig. 18). 이러한 실험성적들이 혈청 내 IgE 수준의 항진은 아토피 피부염 환자의 70~80%에서 나타난다고 한 보고들을 뒷받침한다고 볼 수 있겠다. 본 동물 실험에서는 관등평가를 포함하여 조직학적 소견 등을 종합하여 볼 때 ***BPE*** 는 효과가 있는 것으로 확인되었으나, 다만 혈청 내의 IgE 수준의 억제 효과는 미약한 것으로 나타났다. 향후 이에 대한 연구는 추후 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Ⅳ. 결 론

화피추출물(***BPE***)를 이용하여 아토피 개선 또는 치료의 효능을 입증하기 위해 cytokine 분비 조절, 지질다당류에 의해 활성화된 대식세포, 비만세포에서의 염증 및 알레르기 발생인자의 활성화 및 유전자 발현 억제를 통하여 염증 및 알레르기성 cytokine인 IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF-α, NO, COX-2 등을 측정하였다. 또 ***BPE*** 가 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga mouse의 체중, 음수 및 사료, 혈액검사, 장기 무게, 조직학적 변화, total IgE 및 주요 장기의 조직학적 변화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었다.

1. Raw264.7 cells, Jurkat T cells 등에서 세포생존율이 감소하지 않아서 세포독성을 나타나지 않는 것을 확인하였다.
2. LPS에 의해 활성화된 Raw264.7 cells에서 염증성 cytokine NO 분비량, IL-1β, TNF-α, IL-6, COX-2 유전자 발현이 억제되었다.
3. 집먼지진드기에 의해 유도된 Jurkat T cells에서 염증성 cytokine IL-2, TNF-α 분비가 억제

되었다.

4. 집먼지진드기에 의해 유도된 EoL-1 cells에서 염증성 cytokine IL-6, IL-8의 분비가 억제되었다.
5. 염증반응에서 MAPK의 p38, ERK의 활성이 감소되었다.
6. 집먼지진드기에 의해 유도된 Jurkat T cells에서 알레르기성 cytokine IL-4, IL-5의 분비는 억제되고, IFN-γ의 생성은 증가되었다.
7. calcium ionophore A23187에 의해 자극된 HMC-1에서 COX-2 유전자 발현이 억제되었다.
8. 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mouse에서 음수 및 사료 섭취량의 변 화가 없어서 체중에 직접적인 영향을 주지 않았고, 주요 장기 변화가 나 타나지 않아서 시험물질에 의한 장기 독성은 없는 것으로 생각된다.
9. 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mouse에서 유의성 있게 관등적인 증 상이 감소되었으며, 상피층 두께, mast cell 숫자에 있어서 용량의 차이에 따라서 유의하게 억제되었다.
10. 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mouse에서 전체 백혈구와 호산구는 유의성 있게 감소되었으나, 혈청 내 IgE의 변화는 유의성이 없었다.

이상의 결과로 보아 ***BPE*** 는 전반적으로 염증 및 알레르기 반응에 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러나 화피의 어떠한 성분이 유효한 약리작용이 나타내는 것에 대해서는 향후 추출물의 분리, 정제 연구와 효능 평가가 추후에 이루어져야 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 완역 중약대사전. 서울:정담. 4950-2.
2. 신민교. 원색임상본초학. 서울:영림출판사. 1989;317.
3. 辛民敎. 臨床本草學. 서울:南山堂. 1986:476-7.
4. 全國韓醫科大學 本草學敎室. 本草學. 서울:永林社. 1994;420-1.
5. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울:신일출판사. 1992;469-71.
6. 허준. 동의보감. 서울:법인문화사. 1999;732, 739,1729,1989.
7. 이기영. 최신알레르기 진료. 서울:한국의학사. 2001;23-52.
8. Han BH and Han YN. Immuno-suppressant activity of cherry bark extract. *Kor J Pharmacog*. 1978;173-5.
9. Kim Yeo-jin, Lee Jae-dong, Lee Yun-ho. 관절염 유발 모델에서 화피가 연골 보호 및 소염 진통에 미치는 영향. 대한침구과학회지. 2007;24(2):73-81.
10. 안봉전, 조영제, 손준호, 박정미, 이진영, 박태순. 화피의 항산화 효과 및 tyrosinase 저해활성. *J Korean Soc Appl Chem*. 2006;49(2):145-8.
11. 이진아, 이원주. 마황근과 화피추출물의 국소도포에 따른 피부주름의 변화에 관한 연구. 대한피부과학회지. 2004;42(1):1396-405.
12. 권오주, 손애량, 김동석, 안봉전. 산벚나무 수피의 화장품활성에 관한 연구. *J Korean Soc Appl Chem*. 2008;51(1):70-8.
13. 樓英. 醫學綱目. 서울:대성문화사. 1986:1081.
14. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 서울:여문각. 2000;161.
15. 김기연, 김광옥, 김현주, 박선희, 박영호, 배정하, 송천영, 오유경, 한경아, 장애섭. 피부과학. 서울:수문사. 2001;225.
16. 盧石善. 原色皮膚科學 서울:아이비씨기획.

2006;11-2, 111-21, 653, 739.
17. 康秉秀. 한방 임상알레르기. 서울:成輔社. 1998;22-3.
18. 안지영, 임이랑, 김준호, 박재훈, 김대기, 이영미. Balb/c 마우스의 아토피피부염에 대한 참소리쟁이 물추출물의 효과. *Kor J Pharmacogn.* 2009;40(3):218-23.
19. Wasik. *Immunopharmacology.* 1990;20: 57-61.
20. Grassberger. *Br J Dermatology.* 1999;41: 264-73.
21. Arlian LG, Platts-Mills TA. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Im munol.* 2001;107(3):406-13.
22. F Riedmann PS. The role of dust mite antigen sensitization and atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:869-72.
23. Ring J, Darsow U. Role of aeroallergens in atopic eczema proof of concept with the atopy patch test. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:49-52.
24. Garcia-Robaina JC, Sanchez I, de la Torre F, Fernandez-Caldas E, Casanovas M. Successful management of mite-allergic asthma with modified extracts of Dermatophagoides pteronyssinus and Dermatopha goides farinae in a double-blind placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(5):1026-32.
25. Lee JS, Kim IS, Ryu JS, Yun CY. House dust mite, Dermatophagoides pteronissinus increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human monocytic THP-1 cell. *Cytokine.* 2008;42:365-71.
26. Lee JS, Kim IS, Ryu JS, Yun CY, House dust mite, Dermatophagoides pteronissinus increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human eosinophilic leukemia EoL cells. *Animal Cells and Systems.* 2009; 13:391-7.
27. 박광균. 구강생화학. 서울:군자출판사. 1999; 318-25.
28. 약품생화학분과위원회편. 분자약품생화학. 서울:동명사. 2003;59-71.
29. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1995; 71-104.
30. 김륭규, 신경민, 천상국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태. 넙취정유의 murine macrophage Raw264.7 세포에서의 *in vitro* 항암효과. 약학회지. 2002;46(5):343-9.
31. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW and Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophage by two β -carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. *European J Pharmacol.* 2000; 406:301-9.
32. Kim EJ, Jin HK, Kim K, Lee HY, Lee SY, Lee KR, Zee OP, Han JW and Lee HW. Suppression by a sesquiterpene lactone from Carpesium divaricantum of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor-κB activation. *Biochem Pharmarol.* 2001;61:903-10.
33. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact.* 2001;137:43-58.
34. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A. Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in Raw

264.7 macrophages. *Pharm Res.* 2001;18:151-6.

35. Nodengele M.M., Bellone C.J., Lechner A.J. and Matuschak G.M. Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1β and TNF-α gene transcription in Raw 264.7 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278:1289-96.
36. 정해영역, Toshio Hirano편저. 생명과학과 분자의학을 위한 분자생물학. 서울:월드사이언스. 2002;73-85.
37. Feldman M, Taylor P, Paleolog E, Brennan FM, Maini RN. Anti-TNF-α therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease, analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease. *Transplant Proc.* 1998;30:4126-7.
38. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. 약학회지. 1998:42(6):558-66.
39. 서영준. 발암과정에 있어서 cyclooxigenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암 예방. 분자세포생물학뉴스. 2001;13:8-17.
40. 문태철. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998;42:214-9.
41. 현미선, 우원홍, 허정무, 김동호, 문연자. Berberine에 의한 HepG2 세포의 사멸과정에서 활성기산소와 p38 MAP kinase의 역할에 관한 연구. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2008;51(2):129-35.
42. 안재연, 이응룡, 김장용, 조상구. 다양한 세포기능 조절 기작으로서의 단백질 인산화. *Cancer Prev Res.* 2006;11:1-8.
43. Chun JH, SW Kang, J Varani, J Lin, GJ Fisher, and JJ Voorhees. Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin *in vitro*. *J Invest Dermatol.* 2000;115:177-82.
44. J Immunol. 1999 Jan 15;162(2):1056-63.