

송엽 에탄올 추출물의 아토피 저해 활성

정다현¹, 김꽃봉우리², 정슬아¹, 김현지¹, 강보경¹, 박시우¹, 김태완³, 안동현^{1*}

Effect of *Pine needle* Ethanol Extracts on the Inhibitory Activity of Atopic Dermatitis

Da-Hyun Jeong¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Seul-A Jung¹, Hyun-Jee Kim¹, Bo-Kyeong Kang¹, Si-Woo Bark¹, Tae-Wan Kim³, and Dong-Hyun Ahn^{1*}

접수: 2012년 10월 17일 / 게재승인: 2013년 4월 22일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The aim of this study was to examine inhibitory effects of *pine needle* ethanol extracts (PNEE) on atopic dermatitis (AD). To determine inflammatory activity PNEE was added to LPS-induced murine peritoneal macrophages for an *in-vitro* test. In addition, anti-AD test was carried out by spreading PNEE on the dorsal skin of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)- induced BALB/c mice. It was confirmed that the nitric oxide (NO) secretion was suppressed when 1~50 µg/mL of PNEE were added to LPS-induced murine peritoneal macrophages. Moreover, levels of TNF-α, IL-6, and IL-1β, were decreased. For the anti-AD test, PNEE alleviated symptoms of the erythema in DNCB-induced mice. Furthermore, the IFN-γ secretion of the group treated with PNEE was increased in splenocytes from DNCB-induced mice compared to the positive control, while IL-4 secretion diminished. Through these results, we can conclude that PNEE can

inhibit AD by modulating the IFN-γ, IL-4 cytokines production and inhibiting inflammation.

Keywords: *Pine needle*, Anti-atopy, Anti-inflammation

1. 서론

아토피 피부염은 외부항원에 지속적으로 노출되어 발병되는 염증질환으로 전 세계적으로 약 10~20%의 인구가 아토피 피부염을 겪고 있다 [1]. 최근 우리나라에서 소아·청소년 아토피 피부염 환자수가 급증하고 있으며, 2008년 국민건강영양조사에 의하면 아토피 피부염은 1~5세 사이의 어린이에서 19.2%로 5명 중 1명이 앓고 있는 것으로 나타났다. 아토피 피부염은 주로 가려움과 염증을 수반하는 만성 염증성 피부질환으로써 [2], 아토피 피부염이 유발되는 원인은 명확하게 밝혀지지 않았으나 유전적 소인, 면역학적 요인 및 환경요인이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다 [3-5]. 아토피 피부염의 발생에 있어 지금까지 보고된 면역학적 특성으로는 혈중 IgE 항체 및 IL-4 cytokine의 분비량이 증가하고 IFN-γ cytokine의 분비량은 감소하는 것으로, 질환 초기에는 항원을 인식한 T 세포가 IL-4, IL-5 및 IL-13 cytokine을 분비하여 [6,7] naive CD4+ T 세포가 Th 2 세포로 분화하도록 조절하고, B 세포의 활성화가 촉진되어 IgE의 생성을 증가시킨다 [8,9]. 또한 IFN-γ 및 IL-12와 같은 Th 1 type의 cytokine을 감소시킨다 [10]. 반면 후기에 발생하는 만성 아토피 피부염의 경우에는 2차적인 미생물의 감염에 의해 IFN-γ cytokine의 발현 수준이 증가하는 것으로, Th 1 세포 면

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824
e-mail: dhahn@pknu.ac.kr

²부경대학교 수산과학연구소

²Institute of Fisheries Sciences/Pukyong National University, 474, Ilgwang-ro, Ilgwang-myeon, Gijang-gun, Busan 619-911, Korea

³안동대학교 식품생명공학과

³Department of Food and Technology, Andong University, Gyeongbuk 760-740, Korea

역반응이 증가하게 된다. IFN- γ cytokine은 대식세포 및 NK 세포를 활성화시키고, 활성화된 대식세포는 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 와 같은 cytokine을 분비하여 각질세포의 자멸사를 촉진시키는 등 만성적인 염증을 유발한다 [11,12]. 최근에는 면역학적 기전뿐만 아니라 피부장벽의 손상도 아토피 피부염 악화의 주요한 요인으로 대두되고 있다. 표피 중에서도 가장 바깥에 존재하는 각질층은 각질 형성세포로부터 형성되며, 분화된 각질 세포와 그를 둘러싼 지질층으로 구성되어 있다 [13]. 이러한 피부장벽은 과도한 세안이나 목욕 등의 생활 습관이나 건조한 대기, 오염물질 등의 환경적 요인 및 각질 형성세포의 지질합성능력 저하 등과 같은 내인성 질환 등으로 인해 쉽게 손상 [14]되어 아토피 피부염을 유발하는 것이다.

아토피 피부염 치료제로 염증 반응과 cytokine 생산을 억제하는 스테로이드제가 주로 이용되고 있으나, 장기간 투여 할 경우 피부의 위축이나 성장 지연 가능성 등 여러 가지 부작용을 초래하여 최근에는 비스테로이드제의 사용이 증가하고 있다. 그러나 비스테로이드제 역시 홍반, 가려움, 부종, 짓무름 및 태선화 등의 증상과 면역력 약화 등의 다양한 부작용을 가지고 있어 근본적인 아토피 피부염의 치료가 어려운 실정이다 [15,16]. 따라서 안전성이 입증된 천연물로부터 치료효과가 높고 부작용이 적은 새로운 물질을 찾고자하는 연구가 많이 이루어지고 있다. 현재까지 보고된 항아토피 소재로는 황금열수 추출물 [17], 두충추출물 [18], 천년초추출물 [19], 김치추출물 [20], 어성초추출물 [21] 및 비파엽과 삼백초 추출물 [22] 등이 있다.

한편, 송엽(*pine needle*)은 국내에 자생하는 상록침엽교목인 소나무(*Pinus densiflora*)의 잎으로 바늘과 닮았다고 해서 침엽으로 표현하고 있으며 예로부터 신선한 잎을 따서 그대로 쓰여 왔으며 차를 만들어 신경통, 관절염, 팔다리마비, 동맥경화증 등의 치료에 사용되었던 기록이 전해져 오고 있다 [23]. 송엽에는 비타민 C와 K, 카로틴, 플라보노이드, 안토시안, 탄닌 및 정유 등이 함유되어 있으며 다양한 종류의 terpene 화합물이 포함되어 있는 것으로 보고되었다 [24]. 최근 송엽의 면역활성 [25], 항당뇨 효과 [26], 송엽 증류액의 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성 [27], 지질저해 및 항산화 효과와 항균효과 [28] 등 많은 연구들이 보고되면서 송엽은 다양한 약리 활성을 가진 천연 식물로 인정되고 있다.

따라서 본 연구에서는 아토피 피부염을 유발한 마우스 대식세포 및 비장세포의 cytokine 분비량 및 세포증식능을 측정하여 송엽의 에탄올 추출물의 아토피 저해 효과를 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 실험에 사용한 송엽 (*Pine needle*)은 울진에서 자생하는 금강송으로부터 채취된 것으로 (주)솔나라에서 공급받아 사용하였다. 시료에 10배 양의 70% 에탄올을 가하여 실온에서

10시간 교반하여 추출하였다. 원심분리 및 여과한 후, rotary evaporator (RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan) 로 농축하여 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

2.2. 실험동물

생후 6주령의 암컷 BALB/c 마우스 및 생후 4주령의 수컷 BALB/c 마우스를 사용하였다. 마우스는 오리엔트바이오 (Orient Co., Seongnam, Korea) 로부터 구입하여 온도 20±2°C, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 예비사육한 후 실험에 사용하였다.

2.3. pH 및 색도

송엽 에탄올 추출물의 pH는 5 mg/mL의 농도로 pH meter (HM-30V, Toa, Kobe, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 색도는 색차계 (JC801 Color technosystem Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 0.5 mg/mL 농도의 송엽 에탄올 추출물을 액체 cell에 10 mL씩 넣고, 명도 (Lightness, L*), 적색도 (Redness, a*), 황색도 (Yellowness, b*) 값을 측정하였다. 이때 사용한 표준 백판 값은 L* = 93.73, a* = -0.12, b* = 0.11이었다.

2.4. 대식 세포 분리 및 배양

Mishell 등 [29]의 방법을 약간 변형하여 마우스 복강 대식세포를 분리하였다. 생후 6주령의 암컷 BALB/c 마우스에 3% thioglycollate를 복강주사하여 대식세포의 생성을 유도하고, 4일 후 RPMI 1640 배지로 복강을 세척하였다. 회수한 복강 세척액은 4°C, 1800 rpm에서 5분간 원심분리 (UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)한 후, RBC lysis buffer (Trisbuffered ammonium chloride; 0.87% NH₄Cl, pH 7.2) 에 10분간 정치시켜 적혈구를 제거하였다. 그 후, 10% FBS (Fetal bovine serum)-RPMI 1640 배지를 첨가하여 5×10⁵ 및 5×10⁶ cell/mL 농도로 희석하고 이를 well plate에 분주하여 37°C, CO₂ incubator (MCO-15 AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 4시간 배양하였다. 배양 후, RPMI 1640 배지로 3회 세척하여 비부착세포를 제거하고 10% FBS-RPMI 1640 배지를 첨가하였다. 그 후, PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.2), LPS (Lipopolysacchride, 5 µg/mL), 송엽 70% 에탄올 추출물을 첨가하여 37°C, CO₂ incubator (MCO-15 AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 12 및 24시간 동안 배양하였다.

2.5. 대식 세포의 nitric oxide 분비량 측정

대식세포로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 griess 반응을 이용하여 측정하였다. 각 microplate에 24시간 배양한 대식세포 상층액을 넣고, 동량의 griess 시약 (1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader기 (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

2.6. 대식 세포의 cytokine 분비량 측정

세포 배양액 내의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine의 분비량을 ELISA-kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA) 를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 PBST (0.01 M PBS, pH 7.2, 0.05% Tween 20)로 세척하여 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정했던 것과 동일한 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF- α , IL-6 detection antibody와 streptavidin-horse-radish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 β 의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1 β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD (o-phenylenediamine) 및 H₂O₂를 첨가한 phosphate citrate buffer (pH 5.0) 을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후, microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. 아토피 피부염 유발 및 시료 처리

Ahn 등 [30]의 방법을 약간 변형하여 아토피 피부염을 유발하였다. 생후 4주령의 수컷 BALB/c 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후, 미세상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 24시간 후 1% DNCB (dinitrochlorobenzene) 용액 (acetone: olive oil = 3:1) 을 일주일에 3번 마우스의 귀 뒤쪽과 등 부위에 도포하고, 일주일 후 부터는 0.3% DNCB 용액을 하루에 한 번 동일한 부위에 고르게 도포하였다. 시료는 0.3% DNCB 용액과 12시간 간격으로 하루에 한 번 2주 동안 마우스의 귀 뒤쪽과 등 부위에 고르게 도포하였다.

2.8. 비장 세포 분리 및 배양

Mishell 등 [29]의 방법을 약간 변형하여 비장 세포를 분리하였다. 아토피 피부염을 유발시킨 생후 4주령의 수컷 BALB/c 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장은 RPMI 1640 배지로 세척한 후, tissue grinder로 균질화하여 세포를 유리시켰다. 세포 현탁액을 4°C, 1800 rpm에서 5분간 원심분리한 후, RBC lysis buffer에 10분간 정치시켜 적혈구를 제거하였다. 그 후, 10% FBS-RPMI 1640 배지를 첨가하여 2 \times 10⁶ cell/mL 농도로 희석된 비장 세포 현탁액을 37°C, CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양하였다.

2.9. 비장 세포 배양액의 cytokine 분비량 측정

비장 세포 배양액의 IFN- γ 및 IL-4 cytokine 분비량을 대식 세포 배양액의 cytokine 분비량 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

2.10. 혈청의 total IgE 함량 측정

실험 종료일에 eye bleeding으로 채혈한 후, 이를 4°C, 10,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였으며, 마우스 혈청 내 total IgE의 함량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 먼저, ELISA microplate에 anti-mouse IgE를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 PBST로 세척하고 2% BSA (Bovine serum albumin) 용액으로 blocking 하였다. 이를 PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 1/30로 희석한 혈청을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척하고 희석한 biotinylated anti-mouse IgE streptavidin-horse-radish peroxidase conjugate를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 및 H₂O₂를 첨가한 phosphate citrate buffer를 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 반응을 종료시키기 위해 각 microplate에 2 N H₂SO₄를 넣은 후, microplate reader기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.11. 비장 세포의 증식능 측정

비장 세포 현탁액을 2 \times 10⁶ cell/mL 농도로 well plate에 분주한 후, 37°C, CO₂ incubator에서 72시간 배양하였다. 배양 후, MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, 5 mg/mL) 시약을 첨가하고 2시간 재 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 이를 4°C, 2000 rpm에서 10분간 원심 분리 한 후, 상층액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비장 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation Index (\%)} = (\text{Sample의 흡광도} / \text{Control의 흡광도}) \times 100$$

2.12. 통계 처리

모든 실험에 대한 통계 처리는 SAS program (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 one way ANOVA법으로 분산분석을 실시하였으며, 조사 항목들 간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. pH 및 색도

최근 건강지향적인 소비자의 욕구로 인해 다양한 생리활성을 지니는 천연물을 식품 산업에 적용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다. 천연물의 pH는 가공식품 제조 시 품질에 영향을 미치는 중요한 요인으로 효모 및 효소의 활성 [31], 단백질의 용해도 및 추출 수율 [32]에 관여한다. 또한 천연물은 chlorophyll, carotenoid 및 flavonoid 등 다양한 색소성분을

Table 1. pH and color value of *Pine needle* ethanol extracts

	pH	Color		
		L*	a*	b*
<i>Pine needle</i> ethanol extract	5.46±0.00	70.41±0.03	-11.30±0.00	83.19±0.15

다량 함유하고 있어 식품에 첨가 시 식품자체의 색 뿐만 아니라 저장 및 가공 중 최종제품의 품질에 영향을 미칠 수 있다 [33]. 따라서 송엽 에탄올 추출물의 pH 및 색도를 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 송엽 에탄올 추출물의 pH는 5.46의 값으로 약산성을 나타냈으며 색도는 명도, 적색도 및 황색도가 각각 70.41, -11.30 및 83.19로 명도, 황색도가 높고 적색도가 아주 낮은 것으로 나타났다.

3.2. 대식 세포의 nitric oxide 분비량

대식세포는 박테리아와 같은 항원의 침입에 의한 초기 면역 반응을 담당하는 세포로서, 이러한 박테리아를 사멸시키기 위해 여러 가지 물질을 분비한다. 이 중 nitric oxide (NO)는 생체 내에서 NO synthase (NOS)라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼로써 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등의 생물학적 과정에 영향을 미치며 내피세포의 증식억제 및 종양 세포에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질이다 [34]. 하지만 LPS에 의해 많은 양의 NO가 생성되고, 이에 의한 세포독성으로 조직의 파괴 및 면역 체계의 이상으로 나타나는 염증 반응 및 종양 발생 등에 관여하게 된다 [35]. 따라서 송엽 에탄올 추출물이 LPS로 염증이 유도된 마우스 대식세포의 NO 분비능에 미치는 영향을 알아보기 위해 대식세포 배양액의 NO₂⁻ 농도를 측정하였다 (Fig. 1). LPS 처리 후 NO 분비량은 정상 세포에 비해 4배 이상 증가되었으며, 송엽 에탄올 추출물을 처리하였을 경우, NO 생성량이 LPS 처리구보다 유의적으로 감소함을 확인하였다. 특히 50 µg/mL 농도에서 현저히 낮은 NO 분비량을 보였으며, 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하여 약 50% 이상의 높은 NO 분비 저

해능을 보임을 확인하였다. 유사한 결과로, Yen 등 [36]은 솔잎 에틸 아세트산 추출물 50 µg/mL 농도에서 86%의 높은 NO 합성 저해율을 보고한 바 있다. 따라서 송엽 에탄올 추출물 처리가 NO 분비량을 저해함으로써 항염증에 효과가 있을 것으로 사료된다.

3.3. 대식 세포의 cytokine 분비량

TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine은 활성화된 대식세포에서 분비되는 대표적인 항염증성 cytokine으로 초기 면역반응에 있어 중요한 역할을 한다. 종양괴사인자인 TNF- α 는 체내에서 대식세포나 림프구 등 백혈구에 의해 생성되어지는 cytokine으로 여러 급성 또는 만성 염증 질환의 발생 및 진행에 중요한 역할을 한다 [37]. IL-6는 B세포의 분화를 촉진하여 항체 생산을 증가시키는 반면, 체내에서 과잉 생성 될 경우 악성 종양이나 자가 면역질환 및 감염성 질환 등의 여러 가지 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 IL-1 β 는 NO를 생성하게 하는 매개물질이며, T세포의 활성화, B세포의 성숙 및 NK cell을 활성화시키는 cytokine이다 [38,39]. 따라서 송엽 에탄올 추출물을 마우스 대식세포에 첨가하여 배양한 후, TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine의 분비량을 측정하였다(Fig. 2~4). TNF- α 의 경우 1~10 µg/mL 농도에서 유의적으로 증가하였으나, 50 µg/mL 농도에서 현저히 낮은 분비량을 보였으며 PBS만을 처리한 군과 유의적인 차이가 없었다. 이는 porcine peripheral blood mononuclear cell에 CLA를 처리한 뒤 TNF- α 분비량을 측정된 결과 [40]와 유사하다. IL-6 및 IL-1 β 의 경우, 송엽 에탄올 추출물 첨가에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과는 송화 에탄올 추출물 [41] 및 송엽 에탄올 추출물 [42]을 첨가하여 처리한 후 분비량을 측

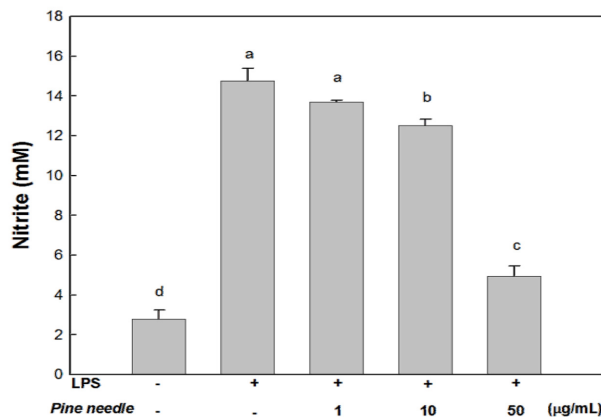


Fig. 1. Inhibitory effects of *pine needle* ethanol extracts on the secretion of NO in peritoneal macrophages. ^{a-d}means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

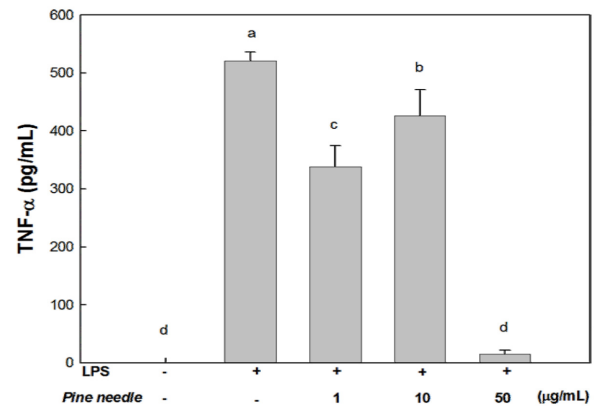


Fig. 2. Inhibitory effects of *pine needle* ethanol extracts on the secretion of TNF- α in peritoneal macrophages. ^{a-d}means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

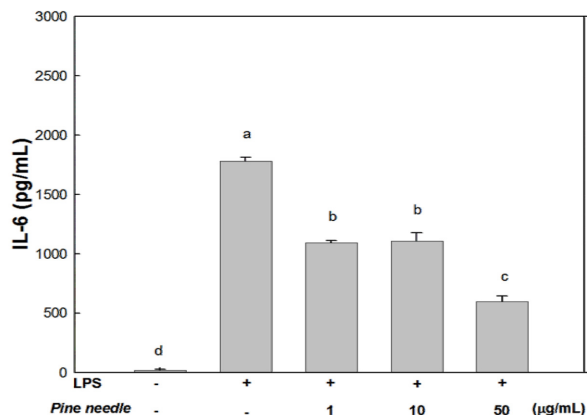


Fig. 3. Inhibitory effects of *pine needle* ethanol extracts on the secretion of IL-6 in peritoneal macrophages. ^{a-d}means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

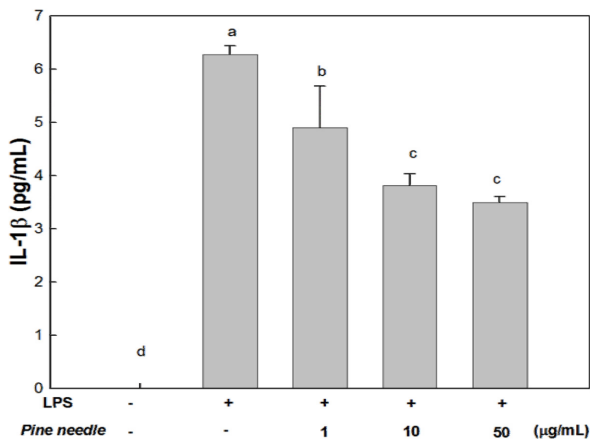


Fig. 4. Inhibitory effects of *pine needle* ethanol extracts on the secretion of IL-1β in peritoneal macrophages. ^{a-d}means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

정한 결과와 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 송엽 에탄올 추출물이 효과적으로 염증성 cytokine의 생성을 억제시켜, 항아토피 기능 물질로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

3.4. 비장 세포 배양액의 cytokine 분비량

아토피 피부염은 알레르기 증상의 하나로, 면역학적으로 T 세포, 호산구, 비만세포 등 다양한 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있다. 최근 아토피 피부염의 면역학적 요인에 관한 연구가 활발히 진행되면서 급성 및 만성에 관여하는 면역 기전에 차이가 있음이 밝혀지고 있다 [4,5]. 이에 본 연구에서는 송엽 에탄올 추출물이 어떤 면역학적 요인에 의해 아토피 피부염을 억제하는지 알아보기 위해 마우스에 아토피 피부염을 유발하고 비장을 분리·배양하여 Th 1 cytokine인

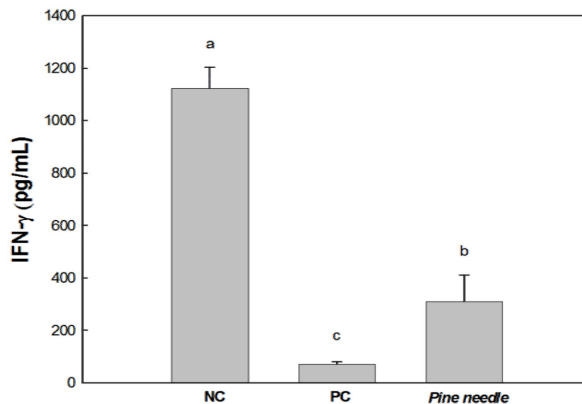


Fig. 5. Effects of *pine needle* ethanol extracts on IFN-γ secretion in splenocyte from atopic dermatitis-like skin lesions mice. Negative control (NC): untreated, Positive control (PC): DNCB and vehicle, *Pine needle*: DNCB and *pine needle* ethanol extracts. ^{a-c} means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

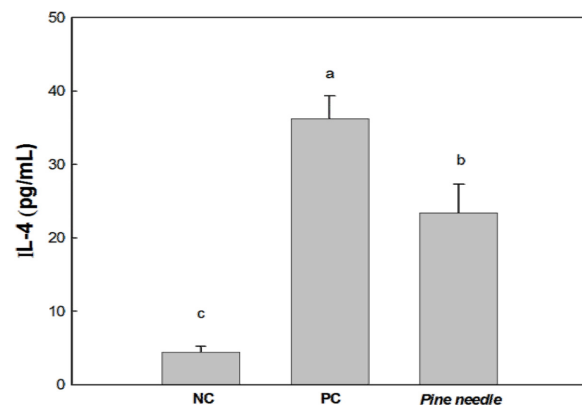


Fig. 6. Effects of *pine needle* ethanol extracts on IL-4 secretion in splenocytes from atopic dermatitis-like skin lesions mice. Negative control (NC): untreated, Positive control (PC): DNCB and vehicle, *Pine needle*: DNCB and *pine needle* ethanol extracts. ^{a-c} means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

IFN-γ와 Th 2 cytokine인 IL-4의 분비량을 측정하였다. 그 결과, IFN-γ의 분비량이 유의적으로 증가하였으나 negative control에 비해 현저히 낮은 값을 보였다 (Fig. 5). IL-4의 분비량의 경우 (Fig. 6), positive control에 비해 낮은 값을 보였다. 이는 땅콩 껍질 추출물 [43] 및 *Quillaja saponin* [44]을 비장 세포에 처리한 경우 IFN-γ의 분비량 증가와 더불어 IL-4의 분비량이 감소하였다는 연구결과와 일치하였다. 따라서 송엽 에탄올 추출물이 Th 1 세포와 Th 2 세포의 조절을 통한 아토피 피부염 억제에 효과적일 것으로 사료된다.

3.5. 혈청의 total IgE 함량

아토피 피부염을 가진 환자의 80~85%가 혈청 중 총 IgE의

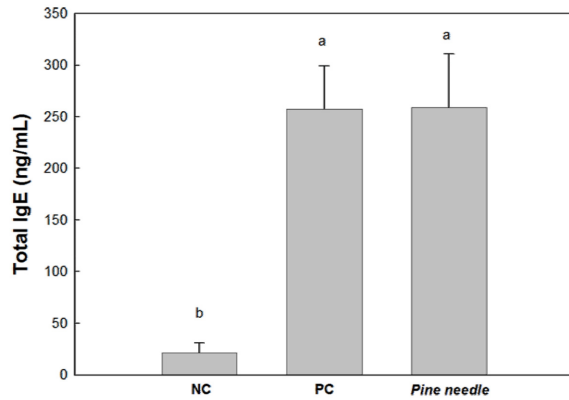


Fig. 7. Effects of *pine needle* ethanol extracts on total IgE secretion in sera from atopic dermatitis-like skin lesions mice. Negative control (NC): untreated, Positive control (PC): DNCB and vehicle, *Pine needle*: DNCB and *pine needle* ethanol extracts. ^{a,b} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

함량이 상승되어 있으며 아토피 피부염뿐만 아니라 천식, 비염 등의 알레르기성 질환의 발현에 IgE가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그러므로 알레르기성 질환에 있어 IgE의 생산 조절기전을 알아내려는 연구가 많이 보고되어 왔다 [45]. 이에 본 실험에서는 송엽 에탄올 추출물의 처리가 IgE의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청의 total IgE 함량을 측정하였다. 그 결과 (Fig. 7), 송엽 에탄올 추출물 처리구의 경우 positive control과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

3.6. 비장 세포의 증식능 측정

MTT assay는 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethyl-

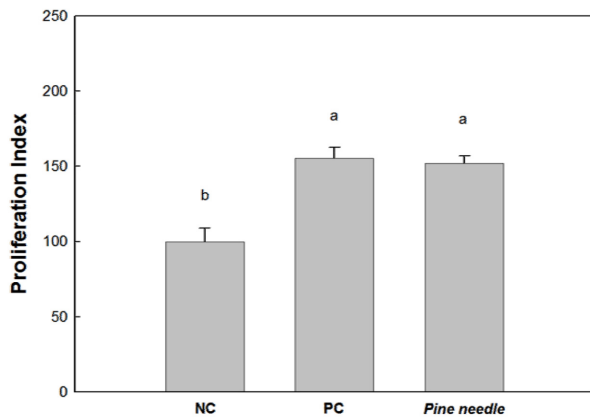


Fig. 8. Effects of *pine needle* ethanol extracts on the proliferation splenocytes from atopic dermatitis-like skin lesions mice. Negative control (NC): untreated, Positive control (PC): DNCB and vehicle, *Pine needle*: DNCB and *pine needle* ethanol extracts. ^{a,b} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) as determined by duncan's multiple range test.

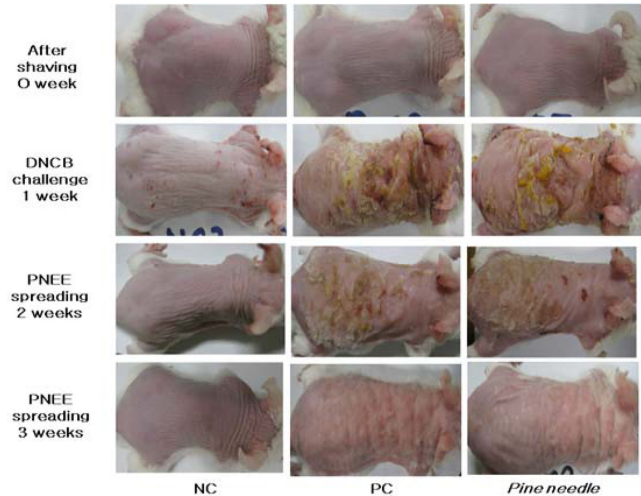


Fig. 9. Effects of *pine needle* ethanol extracts in atopic dermatitis-like skin lesions mice. Negative control (NC): untreated, Positive control (PC): DNCB and vehicle, *Pine needle*: DNCB and *pine needle* ethanol extracts.

thiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 원리를 이용하는 검사법이다 [46]. 이에 송엽 에탄올 추출물의 도포가 비장세포의 증식에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 DNCB로 아토피 피부염을 유발한 마우스에 2주간 송엽 에탄올 추출물을 처리한 후, 비장세포를 분리·배양하고 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 송엽 에탄올 추출물 처리구의 비장세포 증식능이 약 50% 증가하였다 (Fig. 8). 따라서 송엽 에탄올 추출물의 도포는 비장세포 증식능을 증가시켜 면역세포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

3.7. 아토피 피부염 증상

아토피 피부염은 태선화, 인설 및 건조와 같은 증상을 유발한다. 또한 급·만성기 전반에 걸쳐 소양감이 발생하게 되는데, 이는 긁는 행위로 인해 창상, 2차 감염 등 2차적인 피부증상 악화를 초래하기 때문에 아토피 피부염 치료에 있어서 중요시되고 있다. 이에 본 연구에서는 피부염을 인위적으로 일으키는 hapten 형성 물질인 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)를 BALB/c 마우스의 등 부위에 도포하여 아토피 피부염 유사 마우스 모델을 만든 후, 송엽 에탄올 추출물을 도포하여 아토피 피부염 증상에 미치는 영향을 알아보았다 (Fig. 9). 아토피 피부염 증상은 제모 직후, DNCB로 아토피 피부염 유발, 시료 도포 1주일과 2주일에 마우스 등 피부조직의 외형적 변화 (홍반, 가려움과 건조피부, 부종, 짓무름 및 태선화)를 관찰하였다. 제모 직후에는 모든 처리구에서 큰 차이를 보이지 않았으며, DNCB를 이용한 아토피 피부염 유발 기간 동안 negative control에 비해 DNCB 처리구에서 짓무름, 홍반 및 부종을 관찰할 수 있었다. 송엽 에탄올 추출물을 1주일 도포하였을 때, positive control에 비해 홍반, 가피, 짓무름 및 건조함의 증상이 감소한 것을 확인할 수 있었고 2주일 도포 시, 홍반 및 부종 증상이 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 황

런해독탕 [47] 및 자초 추출물 [48] 도포에 의해 홍반 및 소양감 증상이 감소하였다는 연구결과와 일치하였다. 이상의 결과를 통해 송엽 에탄올 추출물은 아토피 피부염 증상을 감소시켜 아토피 피부염 치료 외용제로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결론

아토피 피부염 마우스 모델을 이용하여 송엽 에탄올 추출물의 아토피 피부염 억제 효과를 확인하기 위해 대식세포 배양 상층액의 NO와 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine 분비량을 측정하였다. 그 결과, 50 μ g/mL 농도에서 현저히 낮은 NO 분비량을 보였으며, 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하여 약 50% 이상의 높은 NO 분비 저해능을 보임을 확인하였다. TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 경우, 송엽 에탄올 추출물 첨가에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 비장세포 배양 상층액의 IFN- γ 와 IL-4 cytokine 분비량을 측정한 결과, IFN- γ 의 분비량이 negative control에 비해 현저히 낮은 값을 보였으며, IL-4의 분비량의 경우, positive control에 비해 낮은 값을 보였다. 따라서 송엽 에탄올 추출물이 Th 1 세포와 Th 2 세포의 조절을 통한 아토피 피부염 억제에 효과적인 것으로 사료된다. 또한 아토피 피부염 증상을 관찰한 결과, 송엽 에탄올 추출물을 1주일 및 2주일 도포하였을 때, positive control에 비해 홍반, 가피, 짓무름, 부종 및 건조함의 증상이 현저히 감소함을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 송엽 에탄올 추출물은 아토피 피부염 치료 외용제로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사

본 연구는 2011년도 지식경제부 지역산업기술개발사업의 지원을 받아 이루어진 것으로 이에 감사드립니다. (NO.70006183)

REFERENCES

1. Tanabe, W., T. Kobayachi, T. Takahata, F. Morimatsu, R. Shibata, and T. Nichimura (2002) Some human B cell and T cell epitopes bovine serum albumin, the major beef allergen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 1348-1353.
2. Jiang, J., T. Yamaguchi, N. Funakushi, T. Kuhara, P. S. Fan, R. Ueki, H. Suto, Y. Kase, S. Ikeda, and H. Ogawa (2009) Oral administration of yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. *J. Dermatol. Sci.* 56: 37-42.
3. Leung, D. and Y., M. (2000) Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 860-876.
4. Leung, D., Y. M. M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura, and Q. A. Harmid (2004) New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 113: 651-657.
5. Sehra, S., M. Holbreich, M. H. Kaplan, F. M. B. Tuana, N. Mousdicas, and J. B. Travers (2008) Clinical correlations of recent developments in the pathogenesis of atopic dermatitis. *An. Bras. Dermatol.* 83: 57-73.
6. Akdis, M., C. Akdis, L. Weigl, R. Disch, and K. Skin-homing. Blaser (1997) CLA⁺ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: IgG4 counter-regulation by CLA-memory T cells. *J. Immunol.* 159: 4611-4619.
7. Van Reijssen, F. C., C. A. F. M. Brukjinzeel-Koomen, F. S. Kalthoff, E. Maggi, S. Romagnani, and J. K. T. Westland (1992) Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 184-193.
8. Del Prete, G., E. Maggi, P. Parronchi, I. Chretien, A. Tiri, and D. Macchia (1988) IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* 140: 4193-4198.
9. Punnonen, J., G. Aversa, B. G. Cocks, A. N. Mckenzie, S. Menon, and G. Zurawski (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3730-3734.
10. Back, O., A. Scheynius, and S. G. O. Johansson (1995) Ketoconazole in atopic dermatitis: Therapeutic response in correlated with decrease in serum IgE. *Arch. Dermatol. Res.* 287: 448-451.
11. Homey, B., M. Steinhoff, T. Ruzicka, and D. Y. Leung (2006) Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 178-189.
12. Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2003) *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. pp. 31-31, 247-269, 285-288, 303-308, 432. WB Saunders Company, Philadelphia, USA.
13. Fry, L. (2007) *An atlas of atopic eczema*. Gunja Press. Seoul, Korea. 121-129.
14. Yoon, M. Y. (2008) Therapeutic effects of hydrolyzed preparation of *Scutellariae radix* extracts on atopic dermatitis of NC/Nga mice induced by D. pteronyssinus. DS Ph. D. thesis, Woosuk university, 23-24.
15. Arellano, F. M., C. E. Wentworth, and A. Arana (2007) Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 127: 808-816.
16. Furue, M., H. Terao, Y. Moroi, T. Koga, Y. Kubota, J. Nakayama, F. Furusawa, Y. Tanaka, I. Katayama, N. Kinukawa, T. Nose, and K. Urabe (2004) Dosage and adverse effects of topical tacrolimus and steroid in daily management of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 31: 277-283.
17. Kim, Y. H. and Y. S. Park (2006) Effect of *Scutellaria baicalensis* water extract on antioxidative activity and epidermal thickness in DNCB-induced allergic contact dermatitis animal model. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 543-548.
18. Shon, M. Y. and S. H. Nam (2007) Effect of *Eucommia ulmoides* extracts on allergic contact dermatitis and oxidative damage induced by repeat elicitation of DNCB. *J. Korean Soc. Food Sci.*

- Nutr*: 36: 1517-1522.
19. Kim, K. S., M. J. Ahn, G. S. Kim, S. C. Park, M. H. Rhee, J. G. In, B. H. Kim, Y. L. Nah, H. H. Kim, and S. H. Han (2007) Effects of *Opuntia humifusa* extract on DNCB-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice. *Lab. Anim. Res.* 23: 169-173.
 20. Lee, I. H., S. H. Lee, I. S. Lee, Y. K. Park, D. K. Chung, and R. W. Choue (2008) Effects of prociotic extracts of kimchi on immune function in NC/Nga mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 82-87.
 21. Park, S. O., B. S. Park, C. M. Ryu, and Y. S. Ahn (2012) Effect of herb extracts mixed with *Houttuynia Cordata* on antiatopic dermatitis in DNCB-induced BALB/c mouse. *J. Korean Oil Chemists' Soc.* 29: 175-183.
 22. Choi, M. J., H. K. Jung, Y. S. Jeong, S. C. Park, and J. H. Hong (2010) Anti-allergic activities of fermented *Eriobotrya japonica* and *Saurus chinensis* extracts in 2,4-Dinitrochlorobenzene-induced BALB/c mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1611-1618.
 23. Moon, K. S. (2001) *Chemical composition and utilization of medicinal herbs*. Ilwol Co. Ltd., Seoul, Korea. p 115.
 24. Wei, F. X., M. Y. Li, Y. H. Song, and H. Z. Li (2008) Apoptosis and activity changes of telomerase induced by essential oil from pine needles in HepG2 cell line. *Zhong Yao Cai* 31:1197-1200.
 25. Yoon, J. A., K. W. Yu, S. H. Shin, and H. Y. Cho (2010) Activation of intestinal immun system by an orally administered methanol extract from pine needles. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 356-362.
 26. Kim, Y. M, Y. K. Jeong, M. H. Wang, W. Y. Lee, and H. I. Rhee (2005) Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21: 756-761.
 27. Chung, Y. J., M. W. Bae, M. I. Chung, J. S. Lee, and K. S. Chung (2002) Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 691-695.
 28. Park, K. N. and S. H. Lee (2003) Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of *vibrio*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 185-190.
 29. Mishell, B. B. and S. M. Shiigi (1980) *Selected methods in cellular immunology*. 1th ed. pp. 4-27. W.H. Freeman, Sanfrancisco, USA.
 30. Ahn, J. Y., L. R. Im, J. H. Park, D. K. Kim, and M. Y. Lee (2009) Effects of *Rdaix* water extract on development of atopic dermatitis in BALB/c mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 40: 218-223.
 31. Lim, S. I. (2000) Purification and characterization of protease produces by *Aspergillus wentii* isolated from korean traditional meju. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 161-167.
 32. Bae, S. H. and C. Rhee (1998) Influences of extraction pH on the functionality of soybean protein isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 557-561.
 33. Lim, E. J., Y. H. Lee, C. O. Huh, S. H. Kwon, J. Y. Kim, and Y. B. Han (2007) Rheological properties of bread dough added with *Enteromorpha intestinalis*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 652-657.
 34. Moncada, S., R. M. J. Palmer, and E. A. Higgs (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
 35. Mori, M. (2007) Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 137: 1616-1620.
 36. Yen, G. C., P. D. Duh, D. W. Huang, C. L. Hsu, and T. Y. C. Fu (2008) Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemical. Toxicol.* 46: 175-185.
 37. Tsuru, S. and K. Nomoto (1983) Effect of PSK on specific tumor immunity to syngeneic tumor cells. *J. Clin. Lab. Immunol.* 10: 215-219.
 38. Chae, W. Y., M. J. Kim, D. S. Kim, J. E. Park, S. K. Jo, and S. T. Yee (2007) Effect of *Asterina pectinifera* extracts on the activation of immune cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 269-375.
 39. Delgado, A. V., A. T. McManus, and J. P. Chambers (2003) Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuro.* 37: 355-361.
 40. Kim, Y. B., I. W. Lee, J. H. Kang, and M. P. Yang (2011) *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid modulates nuclear factor- κ B p65 activity on the production of tumor necrosis factor- α in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J. Vet. Clin.* 28: 190-195.
 41. Lee, K. H., A. J. Kim, and E. M. Choi (2009) Antioxidant and anti-inflammatory activity of pine pollen extract *in Vitro*. *Phytother. Res.* 23: 41-48.
 42. Lee, H. A. and J. S. Han (2012) Anti-inflammatory effect of *Perilla frutescens* (L.) britton var. *frutescens* extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Prev. Nutr. Food Sci.* 17: 109-115.
 43. Takano, F., T. Takata, A. Yoshihara, Y. Nakamura, Y. Arima, and T. Ohta (2007) Aqueous extract peanut skin and its main constituent procyanidin A1 suppress serum IgE and IgG1 levels in mice-immunized with ovalbumin. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 922-927.
 44. Katayama, S. and Y. Mine (2006) *Quillaja* saponin can modulate ovalbumin-induced IgE allergic responses through regulation of Th1/Th2 balance in a murine model. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3271-3276.
 45. Ishizaka, K. (1984) Regulation of IgE synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 159-182.
 46. Twentyman, P. R. and M. Luscombe (1987) A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* 56: 279-285.
 47. Kim, B. A., M. S. Kim, B. M. Kang, S. H. Byeon, I. H. Park, J. H. Park, J. W. Jung, E. M. Ahn, H. A. Jung, H. J. Jang, W. Bae, H. Y. Lee., P. N. Choi, and C. I. Park (2008) Inhibitory studies of hwangtyunhaedok-tang on development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Kor. J. Herbology* 23: 59-65.
 48. Kim, Y. R., S. Y. Cho, D. B. Seo, S. H. Kim, S. J. Lee, and Y. H. Cho (2009) Effects of oral intake of gromwell water fraction on ceramides content and the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 547-551.