

# 비만세포에서 은행잎 플라보놀이 의한 Th2 Cytokine 발현 및 신호전달 억제 기전 효과

권혜영\*, 정규진\*\*, 정광조\*\*\*

국제대학교 뷰티디자인계열, 충남대학교 약학과\*\*, 대전대학교 뷰티건강관리학과\*\*\*

## Suppressive effects of Th2 cytokines expression and the signal transduction mechanism in MC/9 mast cells by flavonol derived from *Ginkgo biloba* leaves

Hae-Young Kwon\*, Kyu-Jin Chung\*\*, Kwang-Jo Cheong\*\*\*

Dept. of Cosmetology, Kookje College\*

College of Pharmacy, Chungnam National University\*\*

Dept. of Beauty Health Care, Daejon University\*\*\*

**요약** 은행잎 유래 플라보놀 성분이 갖는 항아토피 활성화에 대해 입증된 바는 드물다. 이 논문에서는 MC/9 비만세포에서의 은행잎 플라보놀의 항아토피 효과를 조사하기 위하여 ELISA와 Real-time PCR, western blot으로 은행잎 플라보놀을 분석하였다. 분석 결과 IL-13, MIP-1a의 생성량은 농도 의존적으로 현저하게 감소되었으며 IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$  유전자 발현량은 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 효과적으로 억제되었다. western blot 분석 결과 c-jun과 NFAT-1 단백질 발현이 감소되었음을 확인하였다. 이러한 결과들은 은행잎 유래 플라보놀 성분이 NFAT-1, c-jun 전사 인자의 전사를 억제함으로써 MC/9 비만세포에서의 Th2 사이토카인의 생성을 감소시키는 효과를 갖는 것을 나타낸다. 따라서 은행잎 유래 플라보놀 성분이 아토피 피부염 치료제로서 활용가능성이 있음을 보고하고자 한다.

**주제어** : 플라보놀, 은행잎, MC/9 비만세포, Th2 사이토카인, 아토피 피부염

**Abstract** The effects of Flavonol contents from *Ginkgo biloba* leaf on anti-atopy activity have not rarely been verified. This study is to investigate the effects of flavonol on Th2 cytokine production in MC/9 mast cells. For this, flavonol was analyzed by ELISA and Real-time PCR. Analysis results showed that flavonol significantly suppressed production of Th2 cytokines(IL-13, MIP-1a) in a dose dependent manner. The mRNA expression of IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$  were effectively restrained by Flavonol at the concentration 25,50,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . And decrease of expression of NFAT-1, c-jun protein was confirmed by western blot analysis. These results indicate that flavonol has effects of decreasing the Th2 cytokine production in the MC/9 mast cell causing inhibition of transcription factors such as NFAT-1, c-jun. Thus, we would like to brief that flavonol may have the applicability as therapeutic agent for atopic dermatitis.

**Key Words** : Flavonol, *Ginkgo biloba* leaves, MC/9 mast cell, Th2 cytokine, atopic dermatitis

Received 12 June 2015, Revised 26 July 2015

Accepted 20 August 2015

Corresponding Author: Kwang-Jo Cheong  
(Dept. of Beauty Care, Daejon University)

Email: Cheong@dju.ac.kr

ISSN: 1738-1916

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서론

아토피 피부염은 만성적, 재발성의 염증성 피부질환으로 도시화가 진행됨에 따라 유병률이 증가하고 있으며 [1], 장기간의 치료에도 불구하고 완치가 어려운 난치성 질환으로 환자의 삶에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[2].

아토피의 치료제로 현재 사용되고 있는 약물은 스테로이드제나 항히스타민제, 면역억제제 등이 사용되고 있는데 [3] 이들은 일시적인 증상치료에 그치고 있으며, 특히 재발이 쉽고, 만성적인 질환에 장기적으로 사용될 경우 피부 위축과 같은 피부부작용 뿐만 아니라 소화기계, 혈관계, 신경계에 이르는 다양한 부작용 사례가 나타난다. 따라서 인체 내 부작용이 적은 천연식물성 소재로부터 항아토피 활성을 찾는 연구[4,5]가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에 사용된 은행잎의 주성분은 flavonoid계 화합물과 terpene계 화합물들이 밝혀졌으며, 이들 성분의 다양한 항균 작용, 항진균 작용, 항암작용, 혈관계 조절작용 등 약리학적인 작용이 속속 밝혀지고 있다[6].

은행잎에 관한 기존 연구로는 은행잎의 flavonoid 성분에 대한 확인 및 정량에 관한 연구[7,8] 및 노란은행잎 성분에 대한 연구 및 항균활성에 대한 연구[9,10,11] 등, 성분학적 연구와 은행잎 추출물의 항균효과에 관한 연구가 주로 보고되고 있다.

그러나 알려진 피부질환에 있어서 혈관 확장, 가려움 동반, 혈관 투과성 증가 등의 증상을 유발시키는 히스타민을 분비시켜 아토피 피부염의 유지와 진행에 주요하게 작용하는 비만세포를 이용한 은행잎 플라보놀 성분에 관한 연구는 현재 미비한 상황이다. 이에 본 논문은 아토피 피부염에 대한 은행잎 플라보놀 성분의 효과를 실험적으로 확인하기 위하여 MC/9 비만세포를 이용하여 세포 독성 및 IL-13, MIP-1a cytokine 생성 및 IL-4, IL-5, IL-13, 그리고 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현을 조절할 수 있는지를 real-time PCR과 ELISA로 측정하였다. 이 연구는 in vitro 상에서 상기의 방법을 통해 은행잎 플라보놀 성분의 활성과 기전을 조사하여 현실적이고 융복합적 연구결과를 도출하기 위한 기초자료를 제공하는 것에 의의가 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

#### 2.1.1 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, dubecco's modified Eagle's medium 배양액(DMEM), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol-1, sodium dodecyl sulfate(SDS)는 Sigma사(USA) 제품을, streptomycin은 Gibco사(USA) 제품을 사용하였다. HPLC(high performance liquid chromatography) 표준시료로 사용한 rutin과 quercetin은 Sigma사(US-A) 제품을 사용하였다. T-stim은 BD Bioscience사(US-A) 제품을, IL-5, IL-13는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit는 BioSource사(USA) 제품을, I-gE ELISA kit는 Shibayagi사(Japan) 제품을, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

#### 2.1.2 기기

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기(DWT-1800T, 대응, Korea), 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> 배양기(STERI-cycle 370, Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, USA), spectrophotometer(Shimadzu, UV-1800, Japan), Bio-freezer(Sanyo, MDF-137, Japan), Quantitative Real-Time PCR(Applied Biosystems, 7500 Fast, USA), ELISA reader(Molecular Devices, spectramax 340 PC, USA), HPLC(Waters Co. 2695 system, USA) 등을 사용하였다.

#### 2.1.3 세포 배양

본 실험에 사용된 MC/9 murine mast cell line(ATCC CRL 8306)을 10% FBS, 10% T-stim(USA), 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 2 mM L-glutamine(Sigma, USA) 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기에서 배양하였다. 세포는 주 2~3회씩 계대 배양하였다.

### 2.1.4 은행잎 추출물 분리

본 실험에 사용한 은행잎은 2011년 9월에 대전광역시 유성구 신성동 대덕연구단지에서 채집하여, 음지에서 자연 건조시킨 후 분말형태로 마쇄하여 분획물 분리에 사용하였다. 은행잎(200g)을 70% ethanol(2L)에 3일간 침지한 후 60°C에서 5시간 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압건조하여 얻어진 추출물(18g)을 물 200 ml에 분산한 후 chloroform 200 ml로 2회 용매분획 하였다. 수상층을 D101 resin(200g)으로 컬럼크로마토그래피를 실시하였고, 10% ethanol 1L, 20% ethanol 1L, 그리고 70% ethanol 2L로 용출하였으며, 70% ethanol 용출액을 감압 건조하여 플라보놀(1g)을 얻었다.

### 2.1.5 HPLC 분리 및 지표성분 연구

은행잎 플라보놀 분석을 위한 HPLC(Waters 2695 system, Waters Co. USA)는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector (Agilent Technologies, Germany), degasser(Agilent Technologies, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다.

HPLC 조건으로 컬럼 오픈의 온도는 25°C, 분석과장은 250nm, 유속은 0.3 ml/min을 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column(250mm × 4.6mm; particle size 5 μm, Phenomenex, USA)를 사용하였다. A용매로 100% 3차 증류수 및 B용매로 100% acetonitrile에 각각 0.1% formic acid를 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 다음과 같다<Table 1>. 지표성분으로 rutin과 quercetin을 표준시료와 은행잎 플라보놀에서의 성분분석을 하였다.

<Table 1> Solvent gradient condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

## 2.2 실험방법

### 2.2.1 세포 독성 측정

나. 세포 독성(cytotoxicity) 측정

세포 독성은 EZ-Cytox assay법[12]을 약간 변형하여 실험에 사용하였으며 MC/9비만세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 배양한 후 플라보놀(최종 농도 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μl씩 각 well에 가하고 실험 종료시까지 배양하였으며 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 450 nm에서 흡광도를 ELISA reader로 측정하였다.

### 2.2.2 Real-Time PCR

(polymerase chain reaction)

가. RNA 추출

MC/9 세포를 48-well plate에 5×10<sup>5</sup>/ml로 1 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE(1 μg/ml)로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 3시간 후 플라보놀(100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml)을 처리하고 1 시간 후에 DNP-BSA(0.5 μg/ml, 항원)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻었다. 그 세포에 trizol(Ambion, USA) 시약을 1 ml넣고 eppendorf tube에 넣은 후 chloroform(Sigma Co.)을 100 μl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 층이 분리되면 eppendorf tube에 상청액을 옮겨 담고, 동량으로 isopropanol(Sigma, USA)을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 이때 상청액은 버리고 80% ethanol(Sigma, USA)로 세척한 후, 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상청액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water(Invitrogen, USA)로 cell의 양에 따라 20~30 μl 넣어 녹였다.

나. 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix와 1 μl random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 μl) 및 RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor(20 U/μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH

8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 μl의 M-MLV RT(200 U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

#### 다. cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 Probe와 Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 <Table 2>. Mouse GAPDH probe set; Endogenous Control(VIC®/MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems(4352339E) 유전자 발현은 Taqman PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard를 GAPDH를 사용하였으며, primer의

최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation을 50°C에서 2 분, 94°C에서 10분, 그리고 40 cycle을 95 °C에서 0.15분, 60°C에서 1분간 수행하였으며 Target group의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR로 다음과 같이 측정하였다.

$$y = x(1+e)^n$$

x : starting quantity  
y : yield  
n : number of cycles  
e : efficiency

#### 2.2.3 ELISA 측정

MC/9 세포를 48-well plate에 5×10<sup>5</sup>/ml로 1 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE(1 μg/ml)로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였으며, 3시간 후 플라보놀(100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA(0.5 μg/ml)으로 자극한 뒤 16시간 후에 세포를 얻었다. Mouse IL-13(BD bioscience), MIP-1a(Biosource) ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 μl씩 분주하

고 4°C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μl씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100μl 씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μl씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μl씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μl씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

#### 2.2.4 Western blotting

MC/9 세포를 100×20 mm plate에 4×10<sup>5</sup>/ml로 10ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE(1 μg/ml)로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 그리고 3시간 후 플라보놀(100, 200, 400 μg/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA(0.5 μg/ml, 항원)으로 자극한 뒤 1시간 후에 차가운 PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리하여 상청액을 버렸다. Lysis buffer(RIPA buffer 980 μl + protease inhibitor cocktail 100 × 10 μl + PMSF 100 mM 10μl) 100 μl로 얼음에서 15~20분간 배양한 후 상청액을 얻었다. 또한 nuclear extract kit(Active motif, USA)를 사용하여 hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15분간 배양한 후 원심분리 하여 상청액(cytoplasmic fraction)을 모았으며, tube에 남아 있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리하여 상청액(nuclear fraction)을 얻었다. 그렇게 얻은 단백질은 BCA단백질 정량법으로 정량하였으며, 10% SDS PAGE gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20분 동안 pre-running시키고, 그 사이에 단백질을 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. gel의 첫 번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120 V로 내렸다. 그렇게 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20분 동안 transfer buffer에 담가 놓고, 그 사이에 membrane을 gel의 크기에 맞게 자르고 transfer buffer에 미리 담가 두었다. 그리고

[Table 2] Primer sequence for real-time PCR analysis

Target gene	Primer	Sequences
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCCTTGTTCGCGTAAG-3'
IL-5	Forward	5'-AGCACAGTGGTAAAAGAGACCTT-3'
	Reverse	5'-TCCAATGCATAGCTGGTGATTT-3'
IL-10	Forward	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'
	Reverse	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
TNF-a	Forward	5'-GGCTTTCCGAATTCACTGGAGCCT-3
	Reverse	5'-CCCCGGCCTTCAAATAAATACATTCATA-3'
GAPDH	Probe	5'-CATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3

Transfer buffer로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1시간 30분 동안 membrane으로 이동시켰다. 또한 Membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skin milk(TBS/T buffer)로 1시간 동안 blocking 해주었으며, primary antibody(NF-AT1, NF-AT2, c-Jun, p-c-Jun, c-Fos, GATA 1, GATA 2, NF-kB p65, YY-1)로 4°C에서 하루를 반응시킨 후, 다음날 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담가 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰으며 결과에 대한 밴드밀도(band densities)는 YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer(Bio-Rad, USA)를 사용하여 최종 측정 분석하였다.

### 2.3 통계

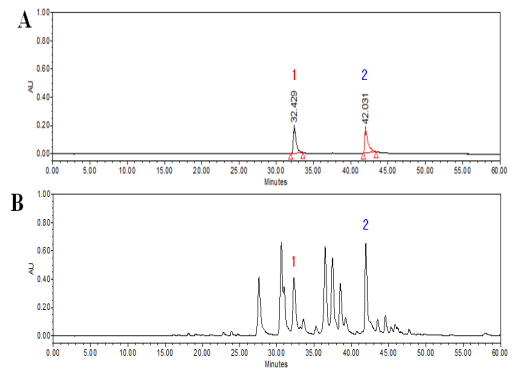
각 실험군 결과값은 unpaired student's T-test 통계 프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

## 3. 결과

### 3.1 지표 성분 분석

대전광역시 유성구 신성동 대덕연구단지에서 2011년 9월에 은행잎을 채집하여 D101 resin(200g)을 사용하여 컬럼크로마토그래피로 플라보놀 성분을 분리하였다. 은

행잎 플라보놀 성분에 함유된 표준물질의 동정에 있어 HPLC- DAD를 통해서 머무름 시간의 일치를 통하여 rutin(1)과 quercetin(2)의 패턴을 확인하여 표준물질을 동정하였다[Fig. 1].

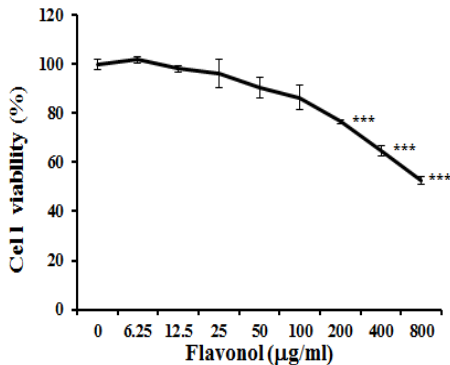


[Fig. 1] HPLC chromatograms of standard mixture and extract of the leaf of *Ginkgo biloba*. Chromatograms of standard mixture(A) and *Ginkgo biloba* leaf extract(B) are recorded at 350 nm.

Peaks of rutin(1) and quercetin(2) are shown. The results are expressed the mean± SE(N=6). Statistically significant value was shown compared with control group by T test(\*\*\*p<0.001).

### 3.2 세포독성

플라보놀의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 200 µg/ml(p<0.001)과 800 µg/ml(p<0.001)에서 세포독성이 나타났고, 플라보놀 200 µg/ml 이상의 모든 농도에서 세포독성이 나타났[Fig. 2].



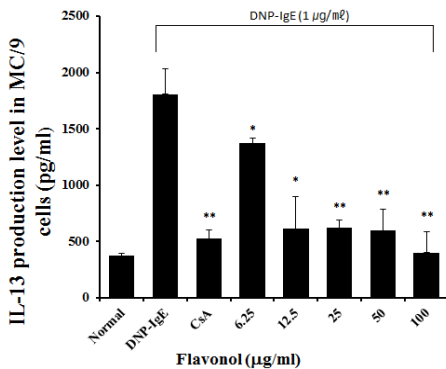
[Fig. 2] Cytotoxic effects of Flavonol on murine MC/9 mast cell line.

Statistically significant value was shown compared with control group by T test(\*\*\*p<0.001).

### 3.3 ELISA 분석

#### 3.3.1 IL-13 단백질 생성

MC/9 비만세포에서 IL-13 생산량은 정상군은 370.2±22.5 (pg/ml)이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 1807.5±227.9 (pg/ml)로 정상군에 비해 약 4.8배 이상 증가되었다. 양성대조군인 Cyclosporin A(CsA)는 IL-13 생산량이 521.2±78.3 (pg/ml)으로 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 감소되었다. 플라보놀 처리한 실험군의 IL-13 생산량은 6.25 µg/ml에서는 1368.8±48.9 (pg/ml)로 대조군에 비하여 약 24.3% 이상 유의성 있게(p<0.05) 감소되었고, 12.5 µg/ml에서 100 µg/ml까지 대조군에 비하여 약 65.8%~77.8%의 유의성 있게 감소되었다(p<0.05, p<0.01)[Fig. 3].

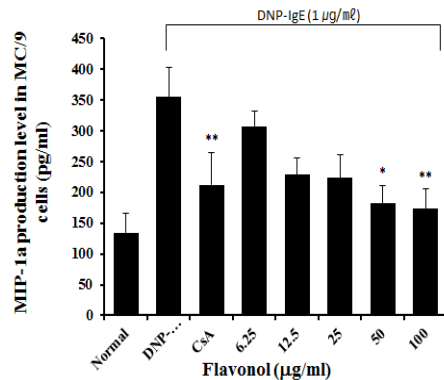


[Fig. 3] Suppressive effects of Flavonol on IL-13 production.

5×10<sup>5</sup> MC/9 cells were primed with 1 µg/ml anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of 0.5 µg/ml DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA(10 µg/ml) or Flavonol(6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml) for 16 hours. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values are expressed as means±S.E. from two-independent experiments(\*\*\* p<0.001).

#### 3.3.2 MIP-1α 단백질 생성

MC/9 비만세포에서 MIP-1α 생산량은 정상군은 134.6±31.8 (pg/ml)이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 355.5±47.2 (pg/ml)로 정상군에 비해 약 2.6배 이상 증가되었다. 양성대조군인 Cyclosporin A(CsA)는 MIP-1α 생산량이 212.4±53.1 (pg/ml)로 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 감소되었다. 플라보놀 처리한 실험군의 MIP-1α 생산량은 6.25µg/ml에서 25 µg/ml에서까지 대조군에 비하여 13.5%~37%까지 감소되었으나 통계학적 유의성은 보이지 않았다. 그리고 50 µg/ml에서는 181.8±28.7 (pg/ml), 또한 100µg/ml에서는 173.9±31.9 (pg/ml)로 대조군에 비하여 각각 약 48.8%(p<0.05)와 51.0%(p<0.01)로 유의성 있게 감소되었다[Fig. 4].



[Fig. 4] Suppressive effects of Flavonol on MIP-1α production.

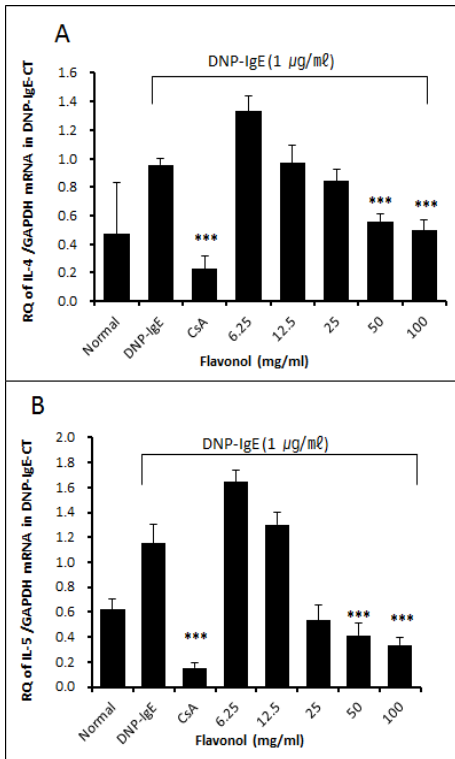
5×10<sup>5</sup> MC/9 cells were primed with 1 µg/ml anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of 0.5 µg/ml DNP-BSA.

### 3.4 Real-time PCR 분석

#### 3.4.1 IL-4와 IL-5 mRNA 유전자 발현

IL-4와 IL-5 mRNA 유전자 발현은 정상군은 각각 0.472± 0.358과 0.621±0.088이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은 각각 0.957±0.043과 1.153±0.153으로 정상군에 비하여 각각 약 2.0배와 1.8배 이상 유전자 발현 증가되었다. 양성대조군인 CsA처리군은 각각 0.229±0.087(p<

0.001)과  $0.154 \pm 0.041$  ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 약 76% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다. 플라보놀 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-4와 IL-5 mRNA 유전자 발현은 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군에 비하여 차이가 없었고, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군에 비하여 IL-4와 IL-5 mRNA 모두 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 대조군에 비하여 약 41.3%~70.5% 이상의 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다( $p < 0.001$ )[Fig. 5].



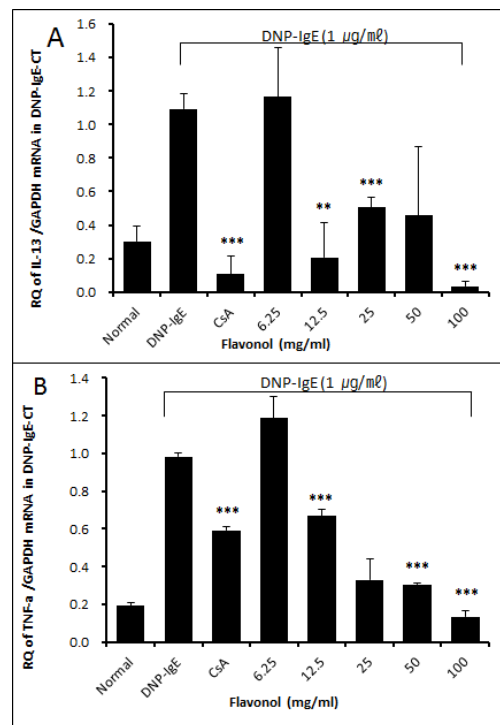
[Fig. 5] Suppressive effects of Flavonol on IL-4 and IL-5 mRNA expression.

$5 \times 10^5$  MC/9 cells were primed with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Flavonol (6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hours. The expression of IL-4(A) and IL-5(B) mRNA was analyzed by real-time PCR.

### 3.4.2 IL-13과 TNF- $\alpha$ mRNA 유전자 발현

IL-13과 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현은 정상군은 각각  $0.302 \pm 0.090$ 과  $0.191 \pm 0.017$ 이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 각각  $1.093 \pm 0.093$ 과  $0.983 \pm 0.018$ 로 정상군 (NC/Nga-Nr)에 비하여 각각 약 3.6배와 5.1배 이상 유전

자 발현이 증가되었다. 양성대조군인 CsA 처리군은 각각  $0.108 \pm 0.107$  ( $p < 0.001$ )와  $0.592 \pm 0.021$  ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 각각 90.1%과 39.7% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었다. 플라보놀 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-13과 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현은 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군에 비하여 차이가 없었고, 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상에서는 대조군에 비하여 IL-13과 TNF- $\alpha$  mRNA 모두 감소되었다. 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 대조군에 비하여 현저한 감소로 통계학적으로 유의성 있는 결과를 얻었다( $p < 0.001$ )[Fig. 6].



[Fig. 6] Suppressive effects of Flavonol on IL-13 and TNF- $\alpha$  mRNA expression.

$5 \times 10^5$  MC/9 cells were primed with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Flavonol (6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hours. The expression of IL-13(A) and TNF- $\alpha$ (B) mRNA was analyzed by real-time PCR. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. from two-independent experiments (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3.5 western blotting 분석

#### 3.5.1 GATA-1, GATA-2 신호전달 기전

GATA-1 단백질 발현은 정상군(NC/Nga-Nr)(GATA-1 band lane 1)에 비하여 대조군(GATA-1 band lane 2)이

증가되었고, 양성대조군(GATA-1 band 3)은 대조군에 비하여 감소되었다[Fig. 7]. 실험군의 GATA-1의 단백질 발현은 대조군에 비하여 큰 차이가 나지 않았으며, GATA-2의 단백질 발현은 모든 실험군에서 차이가 나지 않았다[Fig. 7].

### 3.5.2 AP-1 신호전달 기전

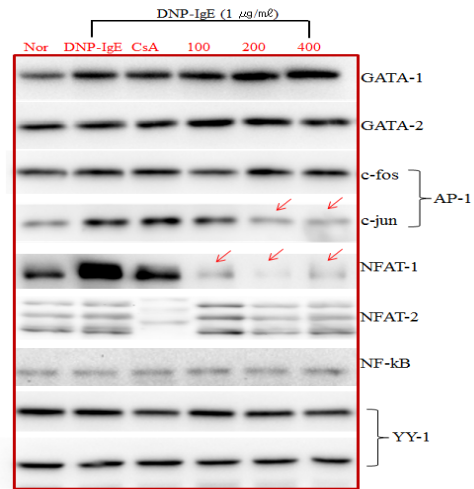
c-jun의 단백질 발현은 정상군(NC/Nga-Nr)(c-Jun band lane 1)에 비하여 대조군(c-Jun band lane 2)이 현저하게 증가되었고, 플라보놀 처리군의 c-Jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c-Jun band lane 4), 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c-Jun band lane 5), 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c-Jun band lane 6) 농도에서 현저하게 감소되었다. c-Fos의 단백질 발현은 정상군(NC/Nga-Nr)(c-fos band lane 1)에 비하여 대조군(c-fos band lane 2)에서 증가되었으나, 양성대조군 및 플라보놀 처리 실험군의 c-Fos 단백질 발현은 대조군에 비하여 차이를 보이지 않았다(c-Fos band lane 3-6)[Fig. 7].

### 3.5.3 NFAT 신호전달 기전

NFAT-1의 단백질 발현은 정상군(NC/Nga-Nr)(NFAT-1 band lane 1)에 비하여 대조군(NFAT-1 band lane 2)이 크게 증가되었고, 양성대조군의 CsA 처리군(NFAT-1 band lane 3)에서는 대조군에 비하여 현저하게 감소되었다. 그리고 플라보놀 처리군의 NFAT-1 단백질 발현은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c-Jun band lane 4), 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c-Jun band lane 5), 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c-Jun band lane 6) 농도에서 대조군에 비하여 현저하게 신호단백질이 감소되었다. NFAT-2의 단백질 발현은 정상군(NC/Nga-Nr)(NF-AT2 band lane 1), 대조군(NFAT-2 band lane 2), 양성대조군(NFAT-2 band lane 3) 및 플라보놀 처리 실험군(NFAT-2 band lane 4-6)에서 대조군에 비하여 차이가 나지 않았다[Fig. 7].

### 3.5.4 NF- $\kappa$ B p65 신호전달 기전

NF- $\kappa$ B p65의 단백질 발현은 정상군(NC/Nga-Nr)(NF- $\kappa$ B p65 band lane 1), 대조군(NF- $\kappa$ B p65 band lane 2), 양성대조군(NF- $\kappa$ B p65 band lane 3) 및 플라보놀 처리 실험군(NF- $\kappa$ B p65 band lane 4-6)에서 대조군에 비하여 차이가 나지 않았다[Fig. 7].



[Fig. 7] Effect of Flavonol on protein expression of signal events in MC/9 cells induced with DNP-IgE.

$2 \times 10^6$  MC/9 cells were primed with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Flavonol(100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 hours.

## 4. 고찰

아토피 피부염의 발병 기전은 면역학적 측면에서 비만세포, T세포 등과 같은 세포들과 cytokine, immuno-globulin 등과 같은 인자들이 관련되어 있으며 Th2 매개 cytokine 간의 불균형, IgE 증가, 비만세포의 증가나 활성화 등이 기전으로 보고되었다[13].

이 중 비만세포에서 분비하는 Th2 사이토카인은 계속해서 Th2 면역반응을 확장하고 IgE의 생산을 증가시킴으로서 만성 알러지 반응에 기여를 한다[14]. 따라서 비만세포에서의 사이토카인 발현량을 감소시킬 수 있다면 알러지 반응의 경감 혹은 만성으로의 확장 억제를 기대할 수 있다[15].

본 연구에 사용된 은행잎 추출물은 동양의학에서 수천 년간 심혈관 질환, 천식 질환의 증상 완화를 위한 약제로 사용되어 왔으며 현재도 은행잎 추출물의 약리작용을 밝히려는 연구가 여러 분야에서 진행되고 있으나 현재까지 은행잎 플라보놀 성분을 소재로 한 아토피 피부염의 효과에 대한 연구결과는 전무한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 은행잎 추출물에서 분리한 플



라보놀 성분의 항아토피 효과를 조사하였다.

실험 결과를 살펴보면, 플라보놀의 MC/9 비만세포에서 세포독성을 측정된 결과, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이상에서 세포독성이 나타났다[Fig. 2].

비만세포에서 분비되는 IL-4, IL-13는 Th2 세포의 반응을 증가시킬 뿐만 아니라, 점액분비와 점액세포의 변질에 관여하며, 섬유모세포의 성장과 세포외 기질단백의 합성에 관여함이 보고[16,17]된 바 있으며 이는 IL-4와 IL-13이 만성 알레르기 반응과 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

한편, MIP-1a는 IgE에 의해 매개되는 여러 가지 알러지성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 호산구를 직접적으로 유인하거나 유인을 도와주는 역할을 하여, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여한다고 보고[18]되어 이들의 생성량을 줄일 수 있다면 염증세포들의 모집 억제를 통해 아토피 피부염에서의 과잉 염증반응이 완화될 것이라고 생각하였다.

이에 플라보놀이 비만세포에서 IL-13과 MIP-1a 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 플라보놀을 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 뒤 24시간 후 ELISA로 IL-13과 MIP-1a 생산량을 측정된 결과 이들 단백질 생산이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다[Fig. 3-4].

일반적으로 아토피 피부염 환자의 특징으로 말초 혈액의 Th2 표현 세포가 증가되어 있고, Th1 표현 세포는 감소되어 전신적으로 Th2 세포반응을 우세하게 만든다[19]. 비만세포는 IgE-Fc $\epsilon$ ERI 반응에 의해 활성화 되는 데 활성화된 비만세포는 히스타민, 류코트리엔 등의 화학전달물질과 Th2 사이토카인 (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , MIP-1a)등을 분비하여 과민반응을 유발하게 된다.

이에 플라보놀이 비만세포에서 IL-4, IL-5, IL-13, 그리고 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 세포에 CsA와 다양한 농도의 플라보놀을 처리한 후 DNP-IgE(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 자극한 뒤 6시간 후 real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다. 그 결과 IL-4, IL-5, IL-13, 그리고 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다[Fig. 5-6]. 이는 알레르기 반응에 있어서 플라보놀이 IL-4, IL-5, IL-13, MIP-1a mRNA 유전자 발현을 효과적으로

억제함으로써 Th2 세포반응을 효과적으로 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

비만세포에서 IL-13의 발현 기전이 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만 다수의 전사인자가 IL-13의 프로모터에 작용하여 조절되는 것으로 확인되고 있다.

IL-13의 생산은 NFAT, GATA, AP-1을 포함하는 여러 전사인자와의 협동에 의해 조절되며[20] 특히 NFAT-2는 GATA와 협력하여 IL-13 전사 조절에 수반되는 가장 중요한 전사인자라고[21] 알려져 있다. GATA-2는 IL-13에 결합하는 AP-1 결합을 유도할 뿐만 아니라 비만세포에서 IL-13 생성을 증가시킨다[22].

CsA는 칼슘 의존성 T세포의 신호전달 과정을 차단하는 면역 억제제로서[23] NFAT 신호전달 기전을 차단한다고 보고된 바[24] 있으며 본 실험에서는 양성대조군에 처리하였다.

본 연구의 MC/9세포에서 신호전달 기전 실험으로 플라보놀이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현을 측정된 결과, 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과와 [Fig. 3], [Fig. 4]에서 보듯 실험군이 대조군에 비하여 IL-13, MIP-1a의 생성량이 현저하게 감소된 결과를 관련지어 볼 때 AP-1과 NFAT 신호전달 기전이 IL-5, IL-13, MIP-1a의 생산에 주요한 영향을 미칠 수 있다고 판단된다. AP-1은 Jun과 Fos로 이루어진 이형이합체로 NFAT와 협력하여 IL-4 활성을 촉진시키고 GATA-2에 의해 유도되어 IL-13의 발현을 증가시키는 전사인자이다[25,26].

플라보놀이 비만세포에서 c-jun과 c-fos의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, western blot으로 c-jun과 c-fos의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 플라보놀의 실험군의 c-jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 현저하게 감소되었으나[Fig. 7, c-jun, lane 5-6] c-Fos 단백질 발현은 대조군에 비하여 차이를 보이지 않았다[Fig. 7]. 이 결과는 플라보놀이 c-jun의 단백질 발현을 효과적으로 감소시켜 AP-1 신호전달 기전을 억제함으로써 알러지 염증 반응을 억제한다고 판단할 수 있다.

한편 전사인자 NFAT는 비활성화 상태에서 인산화된 형태로 세포질에 존재하며 항원 수용체의 자극에 의해서 유도된 세포내 Ca $^{2+}$  농도의 증가로 calcineurin이 활성화되어 NFAT의 탈인산화를 일으킨다. 탈인산화된 NFAT

는 핵 내로 이동하여 활성화된 T세포에서 IL-2 promoter에 존재하는 antigen receptor response element에 결합함으로써 면역세포들에서 면역반응의 유도과 조절에 필수적인 여러 사이토카인유전자(IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )와 세포표면인자(CD40L, FasL, IL-2Ra) 등의 발현에 중요한 역할을 한다[27]. 본 연구결과에서는 플라보놀이 MC/9 비만세포에서 NFAT-1과 NFAT-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NFAT-1 NFAT-2 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군의 NFAT-1의 단백질 발현은 감소되었으나[Fig. 7, NFAT-1, lane 4-6] NFAT-2의 단백질 발현은 대조군에 비하여 차이를 보이지 않았다. 이는 플라보놀이 NFAT-1 신호전달 기전을 차단하여 IL-5, IL-13, 그리고 MIP-1a의 생성이 감소됨으로써 알레르기 염증 반응을 조절하는 것으로 사료된다.

NF- $\kappa$ B는 면역기능, 염증반응, 혈관 내피세포의 활성화, 세포성장 등에 관여하는 전사인자로서 거의 모든 세포에 존재한다. 기저상태에서 I $\kappa$ B와 결합하여 세포질 내에 비활성화 상태로 존재하는 NF- $\kappa$ B는 바이러스 감염, 내독소, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 염증매개 사이토카인에 의해 활성화된다. 즉, 외부 자극에 의해 I $\kappa$ B가 분해되면 세포질에 존재하던 NF- $\kappa$ B가 핵 속으로 이동되어 여러 유전자의  $\kappa$ B element에 결합하여 그 유전자의 전사를 가져온다. 이런 경로를 통해 전사가 활성화되는 대표적인 염증매개 물질로는 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF, adhesion molecule 등을 들 수 있다[28]. 플라보놀이 비만세포에서 NF- $\kappa$ B p65의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군의 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현이 대조군과 차이를 보이지 않았다.

이러한 결과를 종합해 보면 플라보놀이 활성화된 비만세포와 Th2세포에서 발현하는 IL-5, IL-13, 그리고 MIP-1a의 생성을 감소시킴으로써 알레르기 염증 반응을 제어하는 것으로 판단되며, 그 중 c-jun과 NFAT-1 전사인자의 발현을 감소시켜 NFAT, AP-1 신호전달 기전을 효과적으로 차단함으로써 항아토피 효능을 나타내는 것으로 생각된다.

## 5. 결론

은행잎에서 분리한 플라보놀이 MC/9 비만세포에서의 Th2 사이토카인 발현에 미치는 영향을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) IL-13 단백질 생성은 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 억제되었다.
- 2) MIP-1a 단백질 생성은 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 억제되었다.
- 3) IL-4와 IL-5 mRNA 유전자 발현은 모두 50, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 억제되었다.
- 4) IL-13 mRNA의 유전자 발현은 12.5, 25, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 억제되었다.
- 5) TNF- $\alpha$  mRNA의 유전자 발현은 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 억제되었다.
- 6) 플라보놀 처리 결과 MC/9 비만세포에서 신호전달 인자인 NFAT-1 단백질 발현이 대조군에 비하여 감소되었다.

## REFERENCES

- [1] Daniels J and Harper J, The epidemiology of atopic dermatitis. *Hosp Med*, Vol. 63, No. 11, pp. 649-652, 2002.
- [2] Finlay AY, Quality of life in atopic dermatitis, *J Am Acad Dermatol.*, Vol. 45, pp.64-66, 2001.
- [3] Lim KK, Su WP, Schroeter AL, Sabers CJ, Abraham RT, Pittelkow MR : Cyclosporine in the treatment of dermatologic disease: an update, *Mayo Clin Proc*, 71(12):1182-1191, 1996.
- [4] Jeong, Seung-Il Choi, Byung-Min Yun, Young-Gab Lee, Jang-Won Jang, Seon-Il, A Noble Therapeutic Approach of Atopic dermatitis by Development of Th2 Chemokine Inhibitors from Natural Products : Inhibitory Effect of Sophora flavescens Extract in Atopic Dermatitis Model mice, NC/Nga, Herbal formula science, Vol.17 no.1, pp.141-151, 2009.
- [5] Sung Ha Yun , Sang Sun Lee, Jung Eun Jang, Geon Woong Noh. Sensory Evaluation of Chungkukjangs

- with Herbal Extracts and Clinical Evaluation in Atopy Dermatitis Patients, The Korean journal of nutrition, Vol. 37 no.8, pp.669-674, 2004.
- [6] R.Rouseff, Citrus Nutrition and Quality, American chemical society New York, pp.83-107, 1980.
- [7] Sam Sik Kang, Ju Sun Kim, Wie-jong Kwak and Ki-hyup Kim, Flavonoids from the Leaves of *Gin-kgo biloba*, Kor. J. Pharmacogn. Vol. 21, No. 2, pp.111-120, 1990.
- [8] Sam Sik Kang, Ju Sun Kim, Wie-jong Kwak and Ki-hyup Kim. Identification and Quantitative An-alysis of Flavonol Glycosides from *Ginkgo bilob-a* Leaves by High Performance Liquid Chromato-graphy, Kor. J. Pharmacogn., Vol. 21, No. 2, pp. 148-152,1990.
- [9] Young-Suk Kwon, Hyun-Hok Cho, Seong-Yun Jeong, Sang-Youb Lee, Min-ju Kim, Sun-Ja Cho and Sang-Joon Lee, Antibacterial Activities of *Gink-go Biloba* Leaves Extracts Against Isolated Bact-eria from Museums ,Journal of the Environmental Scie-nces, Vol. 15, No. 10, pp.983-388, 2006.
- [10] Jung Im Kim, Young Hee Choi, and Oh Kyung Kwon. Dyeability and Antibacterial Activity of *Gin-kgo Biloba* Leaf Extract Using Three Kinds of Aqueous Extraction Solvents. Journal of the Korean Society of Dyers and Finishers, Vol. 16, No. 2, pp. 8-14, 2004.
- [11] In-Hwa Lee, Youn Shim, Seung-Hyun Choi, Ju-Young Park, Sung-Woo Han, Jn-Young Song, Suk-Jin Yoon. A Study on the Antimicrobial Effect of *Ginkgo biloba* Leaves Extracts according to Con-centrations of Ethanol for *staphylococcus aureus*, KSBB Journal , Vol. 21 No. 4, pp. 312-316, 2006.
- [12] Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated te-trazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, *Talanta*, Vol. 44, No. 7, pp. 1299-1305, 1997.
- [13] Sandstrom MH, Faergemann J. Prognosis and pr-ognostic factors in adult patient with atopic derm-atitis : a long-term follow-up qeuestionnaire study. *Br J Dermatol*. Vol. 150, pp. 103-110, 2004.
- [14] Ahn KM. Role of mast cells in allergic inflammat-ion and innate immunity. *Korean J Pediatr*. Vol. 47, pp. 1137-1141, 2004.
- [15] Taketomi Y, Murakami M. Lipid networks in m-ast cell biology. *Yakugaku Zasshi*, Vol. 131, No. 1, pp.73-84, 2001.
- [16] An HS. Textbook of pediatrics. 9th ed. Seoul: Ko-rea Textbook Publishing Co. pp. 1104-1121, 2010.
- [17] The Korean Academy of Asthma, Allergy and Cl-inical Immunology. Asthma and allergic disease. Seoul: Koonja Pub. pp.13-116, 2002.
- [18] Shin HW. The experimental study on the asthma suppressive & immune response of armeniacae am-arum semen herbal-acupuncture at ST36 in OVA-induced asthma mouse. Grad School Daejeon Univ. 2006
- [19] Jung-Hee Kim, Current Understanding of Atopic Dermatitis, *Pediatric allergy and respiratory diseas-e*, Vol. 14, No. 1, pp. 12-23, 2004.
- [20] Masuda A, Yoshikai Y, Kume H, Matsuguchi T. The Interaction between GATA Proteins and Acti-vator Protein-1 Promotes the Transcription of IL-13 in Mast Cells, *J Immunol*, Vol. 173, No. 9, pp. 5564-5573, 2004.
- [21] Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Tertilt C, Bopp T, Heib V, Becker M, Taub-e C, Schild H, Schmitt E, Stassen M. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokin-es, *J I-mmunol*, Vol. 177, No. 10, pp. 6667-6674, 2006.
- [22] Lewin I, Nechushtan H, Ke Q, Razin E : Regulati-on of AP-1 expression and activity in antigen sti-mulated mast cells: the role played by protein kin-ase C and the possible involvement of Fos inter-acting protein, *Blood*, Vol. 82, No. 12, pp. 3745-3751, 1993.
- [23] Lee JS, Yun SJ, Lee JB, Kim SJ, Won YH, Lee SC.

The Efficacy of Cyclosporin in Patients with Atopic Dermatitis, Korean journal of dermatology, Vol. 46, No. 2, pp. 224-230, 2008.

- [24] Lee M, Park J. Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression, Mol Cells, Vol. 22, No. 1, pp. 1-7, 2006.
- [25] Park JC. Transcription Factor NFAT: The Regulation in Immune Response. KSBMB News. Vol. 20, No. 2, pp. 1-7, 2000.
- [26] Rooney JW, Hoey T, Glimcher LH. Coordinate and Cooperative Roles for NFAT and AP-1 in the Regulation of the Murine IL-4 Gene. Immun. Vol. 2, pp. 473-83, 1995.
- [27] Im Seon Lee, Nguyen Tien Dat, Xing Fu Cai, Guanghai Shen, and Young ho Kim. Inhibitory Effects of Natural Products against NFAT(nuclear factor of activated T cells) Transcription Factor, Kor. J. Pharmacogn. Vol. 34, No. 2, pp. 150-155, 2003.
- [28] Park, Gye YoungLee, Seung HeeHwangbo, BinYim, Jae-JoonLee, Choon-TaekKim, Young WhanHan, Sung KooShim, Young-SooYoo, Chul-Gyu. Pro-inflammatory Cytokine Expression Through NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B Pathway in Lung Epithelial Cells. Tuberculosis and Respiratory Diseases. Vol. 49, No. 3, pp. 332-342, 2000.

**권혜영(Kwon, Hae Young)**



- 2008년 8월 : 숙명여자대학교 향장학과 (향장학 석사)
- 2013년 2월 : 대전대학교 뷰티건강관리학과 (미용의학 박사)
- 2009년 9월 ~ 현재 : 국제대학교 뷰티디자인계열 교수
- 관심분야 : 대체의학, 미용
- E-Mail : khyohui@hanmail.net

**정규진(Chung, Kyu Jin)**



- 2010년 2월 : 숙명여자대학교 향장학과 (향장학 석사)
- 2012년 8월 : 충남대학교 약학과 박사수료
- 2011년 3월 ~ 2014년 3월 : 벽성대학 건강재활복지과 교수
- 관심분야 : 대체의학, 미용
- E-Mail : doccap@naver.com

**정광조(Cheong, Kwang Jo)**



- 1985년 2월 : 서울대학교 행정대학원 (행정학석사)
- 2009년 2월 : 중국허룽강성 중의약대학(의학박사)
- 1989년 9월 ~ 현재 : 대전대학교 뷰티 건강관리학과 교수
- 관심분야 : 대체의학
- E-Mail : Cheong@dju.ac.kr