

Original Article / 원저

## 편백유(*Chamaecyparis Obtusa* Oil)가 DNCB로 유도된 NC/Nga생쥐의 아토피에 미치는 효과 연구

손기정<sup>1</sup> · 박정환<sup>2</sup> · 김윤희<sup>2</sup> · 고가연<sup>2</sup> · 김윤주<sup>4</sup> · 한지연<sup>3</sup> · 고기태<sup>5</sup> · 안택원<sup>2</sup>

<sup>1</sup>서울 일중한의원 <sup>2</sup>대전대학교 한의과대학 사상체질외학과

<sup>3</sup>대전대학교부속 온궁한의원 <sup>4</sup>대전대학교 한의과대학 침구과교실

<sup>5</sup>영동편백치유숲 영농조합

### Anti-atopic Effect of *Chamaecyparis Obtusa* oil (CHO\_O) in DNCB-induced atopic dermatitis-like skin lesions NC/Nga mice

Ki-Jeong Son<sup>1</sup> · Jung-Hwan Park<sup>2</sup> · Youn-Ha Kim<sup>2</sup> · Ga-Yeon Go<sup>2</sup> · Yun-Joo Kim<sup>4</sup> ·  
Ji-Yeon Han<sup>3</sup> · Ki-Tae Ko<sup>5</sup> · Taek-Won Ahn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Il-joong Clinic of Korean Medicine, Seoul.

<sup>2</sup>Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon Univ.

<sup>3</sup>On-goong Clinic of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon Univ.

<sup>4</sup>Dept. of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon Univ.

<sup>5</sup>Young-dong Cypress pine Healing Woodland Agricultural Association.

### Abstract

**Objective** : The aim of this study is to investigate the effect of *Chamaecyparis Obtusa* Oil to NC/Nga mice induced in Atopic dermatitis-like skin lesions by DNCB Methods.

**Methods** : NC/Nga mice which have been induced to Atopic dermatitis-like skin lesions by DNCB are divided into 3 groups, the one is the mice which have been spread with *Chamaecyparis Obtusa* Oil 2% cream, the other is which have been spread with dexamethasone (Dexa.) 0.5% on their Atopic lesion, another is the control group, then we take the blood sample of each group to measure state of the dorsal skin, the number of immunocytes, and resect the skin lesion to analyze the state of cells.

**Result & Conclusion** : There are meaningful results of measuring the number of IgE, IL-4, IFN- $\gamma$  and the state of the skin lesion and cells in the group with *hamaecyparis Obtusa* Oil 2% cream in comparison with the other groups.

**Key words** : Anti-atopic; *Chamaecyparis Obtusa*; atopic dermatitis

© 2016 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

## I. 서 론

아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 습진성 피부병변과 극심한 가려움증을 특징으로 하는 만성 염증성 피부 질환이다<sup>1)</sup>. 아토피 피부염은 산업화된 국가에서 꾸준히 유병률이 증가하는 추세를 보이고 있으며 가장 빈번한 염증성 피부병변 중의 하나로, 우리나라 또한 소아의 경우 1995년부터 2010년까지 계속해서 유병률이 증가하고 있는 추세다<sup>2-4)</sup>. 이 질병은 환자의 피부보호기능과 면역반응이 환경에 반응 하는 유전적인 요소 및 알러지, 환경적 · 사회적 인자 및 심인성 요인 등이 복합적으로 작용하여 나타나는 질환으로서, 임상 양상은 나이에 따라 다르게 나타나며 알러지 항원 등의 자극요소가 침입하여 발생하는 피부의 강렬한 소양증과 염증반응이 대표적이다. 유아에서는 뺨, 이마, 두피에서 전형적인 홍반성 구진과 수포가 발생하며, 2세부터 사춘기까지는 심출성 병변이 줄고 만성 병변이 늘어 성인기로 들어서면 태선화되는 양상을 보인다<sup>3,5)</sup>.

아토피 피부염의 치료방법은 스테로이드제와 항히스타민제가 있는데 이는 장기간 복용시 부작용을 일으킴에 따라 그 대체요법들에 대한 연구가 활발히 진행중이며 임상에도 다용되고 있다<sup>7,8)</sup>. 아토피 피부염에서 이용되는 대체의학은 온천 및 목욕요법, 식이요법, 한약, 건강보조식품 등이 있으며, 보고자마다 각각 다르나 연구에 따르면 국내의 경우 70~80%정도로 파악된다<sup>9,10)</sup>.

편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)는 일본과 대만 등에서 자생하는 구과목 측백나무과(*Cupressaceae*) 편백속(*Chamaecyparis*)에 속하는 상록 침엽 교목으로 타 침엽수보다 더 많은 피톤치드를 생산한다. 편백유

(*Chamaecyparis Obtusa Oil*)는 편백(*Hinoki cypress*)의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 수지로부터 얻어지는 휘발성 오일로 sabinene, limonene, bornly acetate, borneol, a-terpineol, elemol 등이 포함되어 살충작용과 박테리아와 진균에 대한 항균작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 항산화 · 항암 효과 등이 보고되고 있다<sup>11,13,14)</sup>.

이에 본 연구에서는 편백유(*Chamaecyparis Obtusa Oil*)의 아토피 피부염에 대한 치료 효과를 확인하기 위하여, 아토피양 집촉피부염 유발 NC/Nga mouse에 편백유 2% 크림형을 도포한 후 혈중 백혈구와 호중구, 호산구의 세포수, 면역글로블린-E, 사이토카인, 조직분석 등을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시약 및 기기

##### (1) 실험시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 적혈구 용혈액(ACK lysis solution), DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), 2-isopropanol을 사용하였다. 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, anti-CD4-PE (phycoerythrin), anti-CD8-FITC (fluorescein isothiocyanate), T-stim은 BD Bioscience (USA)사 제품을, anti-CD11b-FITC, anti-CD23-FITC, anti-Gr-1-PE, 그리고 anti-B220-PE, anti-CD3 mAb 등은 Pharmingen사

Corresponding author : Taek-won Ahn, Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon Univ, Notasan-ro 4, Seobul-gu, Cheon-an, Choongchung-namdo, South Korea,  
Tel : +82-41-521-7535, Fax : +82-41-521-7007, E-mail : twahn@dju.kr  
• Recieved 2016/1/4 • Revised 2016/2/10 • Accepted 2016/2/15

(USA) 제품을, IL-4, IL-5, 그리고 IFN- $\gamma$  ELISA kit는 eBioscience사(USA) 제품을, IgE ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit는 Shibayagi사 (Shibukawa, Japan) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 실험기기

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기 (DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치 (rotary vaccum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> 배양기(Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Molecular Devices, USA), HPLC (High performance liquid chromatography ; Waters Co. USA) 등을 사용하였다.

2) 실험동물

아토피 피부염 병변을 관찰하기 위하여 수컷이며 7주령의 20 ~ 22 g NC/Nga생쥐(SLC, Inc, Japan)를 중앙실험동물에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (승인번호:DJUAR2013-005)을 받았다.

3) 편백유의 크림제형 제조

편백유의 크림제형은 수상, 유상, 안정제에 2% 편

백유와 양성대조군 0.5% dexamethasone의 제형을 성분이 같도록 혼합하여 직접 제조하였으며 구성성분은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. *Chamaecyparis Obtusa* Oil Cream Formulation

Ingredient	2% <i>Chamaecyparis Obtusa</i> Oil (content)	dexamethasone (control) (content)	
Glycerine	10.00	10.00	
Silicon derivative	0.20	0.20	
Water-based	Microcide-C	0.20	
	EDTA-2Na	0.01	
	Keltrol F(1%)	5.00	
	Sepiplus 400	0.30	
	Lanette O	2.00	
Oil-based	Olive M 1000	1.00	
	Tego care 450	2.00	
	Puresyn 4	2.00	
	TCG-M	3.00	
	DC 200/6cs	2.50	
	Lipex Shea	1.00	
	Vitamin E	0.50	
	D-P	0.10	
	BHT	0.02	
	Stabilizer	TEA	0.10
		Di water	2.00
	A	B	
Additive	2% <i>Chamaecyparis Obtusa</i> Oil	2.00	
	dexamethasone (control)		0.5

2. 실험방법

1) Atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by DNCB : 피부염 유도 및 시료처리

7주령의 NC/Nga 생쥐를 1주일 동안 적응시킨 후 NC/Nga 생쥐의 등에 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치 후 1%의 DNCB (dinitrochlorobenzene)가 들어 있는 아세톤 : 올리브오일(3 : 1) 200  $\mu$ l를 제모 부위에 도포하고, 3일

후 2차 도포하였다. 1차 도포 후 7일째부터는, 1주일  
에 3회씩 3주간 0.4% DNCB 용액 150  $\mu$ 를 재차 도  
포 (10주령 ~13주령)하여 아토피 피부염을 유발시켰  
으며, 피부발진 육안 평가는 Yamamoto의 평가항목<sup>2)</sup>  
을 참고하여 erythema / hemorrhage, dryness /  
scarring, edema, excoriation / erosion,  
lichenification 5가지 항목으로 하고 육안 평가하여  
아토피 피부발진을 판단하였다. 실험 참여군은 각각  
0.4% DNCB를 도포하지 않은 Normal group, 0.4%  
DNCB 도포 후 별다른 처치를 하지 않은  
DNCB-control group, 0.4% DNCB 도포 후 편백유  
처치를 한 실험군, 0.4% DNCB 도포 후  
dexamethasone (Dexa.) 0.5%를 처치한 양성대조군  
으로 설정하였다. 시료 도포 방법은, 0.4% DNCB를  
2주간 도포한 후 편백유를 2% 크림형으로 제조하여  
각각 3 주간(12주령 ~15주령) 오전 11시에 1회씩 등  
부분에 곁고루 도포하여 실험군으로 설정하였고, 양  
성 대조군의 경우 양성 대조 약물로 dexamethasone  
(Dexa.) 0.5%를 주 5회 발진된 등 부위에 도포하였다.  
도포 종료한 다음 혈액을 채혈하고 등 부위의 피부를  
절제하여 10% 포르말린 용액에 담아 보관하였다.

(1) 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구 세포수의 측정  
최종 실험종료 후 heparin (20 IU) 30  $\mu$  처리  
된 3 ml syringe 주사기로 심장 혈액 0.8 ml를  
채취하였다. 전혈을 서울의과학연구소(서울시  
용산구)에 의뢰하여 혈액 중 백혈구와 호중구,  
호산구의 총 세포수를 자동 혈액 분석기로 측  
정하였다.

(2) 채혈 및 IgE 수준 측정  
NC/Nga 생쥐의 후안와 정맥총 (retro-orbital  
venus plexus)에서 10주, 12주, 14주에  
capillary tube를 이용하여 약 100  $\mu$ 의 혈액을  
채혈한 후 원심분리기 6,500 rpm에서 20분간  
원심분리한 후 30  $\mu$ 의 혈청을 분리하였다. 혈  
청은 취하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였고 NC/Nga  
생쥐의 혈청 내 IgE 농도 측정은 ELISA로 IgE

수준을 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐에  
서 10주, 12주, 그리고 14주에 채혈한 혈청 5  
 $\mu$  (1/10 dilution)와 dilution buffer 45  $\mu$ 를  
혼합하여 각 well에 분주하고, 2시간 동안 25 $^{\circ}$ C  
실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으  
로 세척한 다음, biotin-conjugated anti IgE  
를 넣고 2시간 방치하였다. 그리고 다시 2회 수  
세 후 완충용액으로 세척한 다음 Avidin-HRP  
conjugated antibody 100  $\mu$ 를 처리하고 1시간  
실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 또한  
TMB 기질을 100  $\mu$ 씩 분주하고 암소에서 30  
분간 방치한 후 100  $\mu$ 의 stop 용액을 처리한  
후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하  
였다.

(3) 비장세포 분리 및 사이토카인 측정

NC/Nga 생쥐 실험 14주 후에 실험을 종료하고  
비장을 적출하여 100 mesh로 비장세포를 분리  
하였으며, 전날 CD3 mAb 0.5  $\mu$ g/ml을 96well  
plate에 coating하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight  
한 다음 D-PBS로 2회 수세하였다. 분리한 비  
장세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후  
CD3 mAb가 coating된 각각의 well에 5x10<sup>5</sup>  
세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48시간 동  
안 배양한 후, 원심분리기 2,000 rpm에서 3분  
간 원심분리한 후 200  $\mu$ 의 배양상청액을 얻었  
으며 배양상청액내의 IL-4 (R&D system,  
USA)와 IFN- $\gamma$  (R&D system, USA), 그리고  
IL-5 (R&D system, USA)의 수준 측정은  
ELISA로 측정하였다. 각 well에 배양상청액  
50  $\mu$ 를 분주하고, 2시간 동안 25 $^{\circ}$ C 실온에서  
방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한  
다음 biotin conjugated anti-IgE를 넣고 2시간  
방치하였으며, 다시 2회 수세 후 완충용액으로  
세척한 다음 Avidin-HRP conjugated  
antibody 100  $\mu$ 를 처리하고 1시간 실온에서  
방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100

μ씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Axillary lymph node(ALN), 그리고 등피부조직에서 형광 유세포 분석

실험을 종료한 후 NC/Nga 생쥐에서 ALN를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1700 rpm)하고 2회 세척한 후 cell strainer (FALCON, USA)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 등 피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)를 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상청액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 분리한 ALN과 피부조직 침윤세포의 총 세포수를 측정 한 다음 모든 조직의 세포 등을  $5 \times 10^5$  Cells/ml 세포로 조정 한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였으며, 각각에 anti-CD11b-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-Gr-1-PE, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, 그리고 B220<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

(5) 조직 분석

등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10% paraform-aldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였으며 그 조직을 파라핀으로 포맷하였고, 5 μm 두께로 block을 만들었다. 그 조직 부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline

/eosin (H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 (x200, Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

(6) 통계 분석

각 실험군 결과값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p(0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

(\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01, \*\*\* : p < 0.001)

### III. 실험 결과

#### 1. 피부손상에 대한 약물의 효과

1) DNCB로 유도하여 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 동물모델에서 등피부의 조직학적 특징

DNCB를 등 피부에 도포하여 NC/Nga 쥐의 아토피 피부염을 유발했다. NC/Nga 피부 생검에서 hematoxylin과 eosin(H&E)로 염색했고, 광학현미경 (×100)에서 표피가 두껍게 보인다(Fig. 1). DNCB-Dexa group<sup>‡</sup> 및 DNCB-CHO\_O 2% group에서 표피의 비후 현상이 유의성 있게 감소하였다.

2) DNCB로 유도하여 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 동물모델의 toluidine blue 염색한 등피부조직에서의 조직학적 상태

DNCB 도포하여 NC/Nga 쥐의 아토피 피부염을 유발 후, NC/Nga 피부 생검에서 toluidine blue staining로 염색했고, 광학현미경에서 피부에 탈과립된 비만세포가 보인다(Fig. 2).

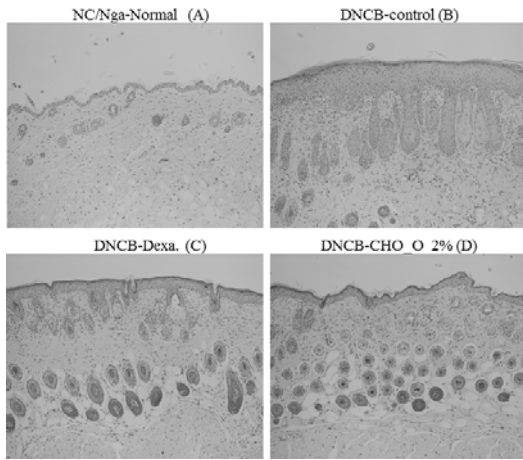


Fig. 1. H&E Staining on Histological features of dorsal skin.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 + DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 † DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

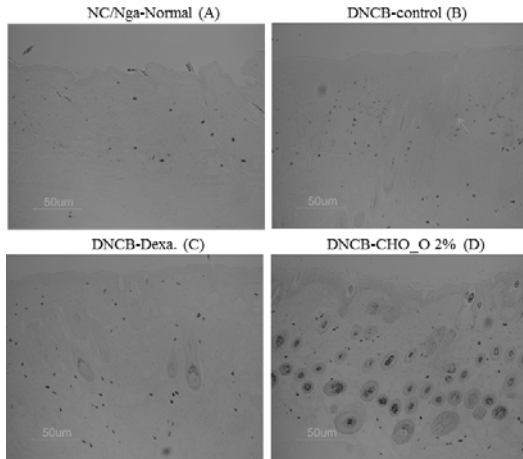


Fig. 2. Toluidin Staining on Histological features of dorsal skin.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 + DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 † DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

## 2. ALN과 피부조직의 총 세포수

T test에서 DNCB-CT group의 자료와 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 값을 나타낸다(Fig. 3) (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001). 총 ALN 세포수의 경우 DNCB-CT group의 경우 약  $10 \times 10^6$ , DNCB-CHO\_O 2% group의 경우 약  $8 \times 10^6$  으로 감소하였다.

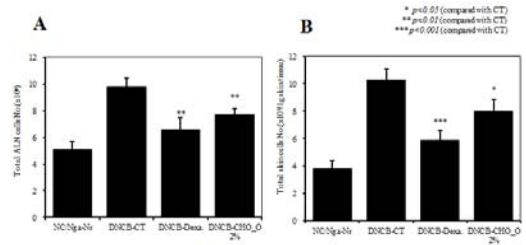


Fig. 3. Effects of Dexa. and CHO\_O on total cell number of ALN and dorsal skin in NC/Nga mouse by DNCB.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 + DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 † DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

## 3. 유세포분석기를 통하여 등피부표면의 세포구성 탐색

1) DNCB로 유도하여 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 동물모델에서 dexamethasone과 편백유를 처리 후 등피부표면세포의 CD4+ 와 CD8+ 통과비율과 그 변화

NC/Nga 쥐의 등 피부세포 ( $2 \times 10^5$  cells/ml) 를 등 피부로부터 분리한 후 2회 세척했고, 유세포분석기로 분석했다. T test에서 DNCB-CT group의 자료와 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 값을 나타낸다 (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001).

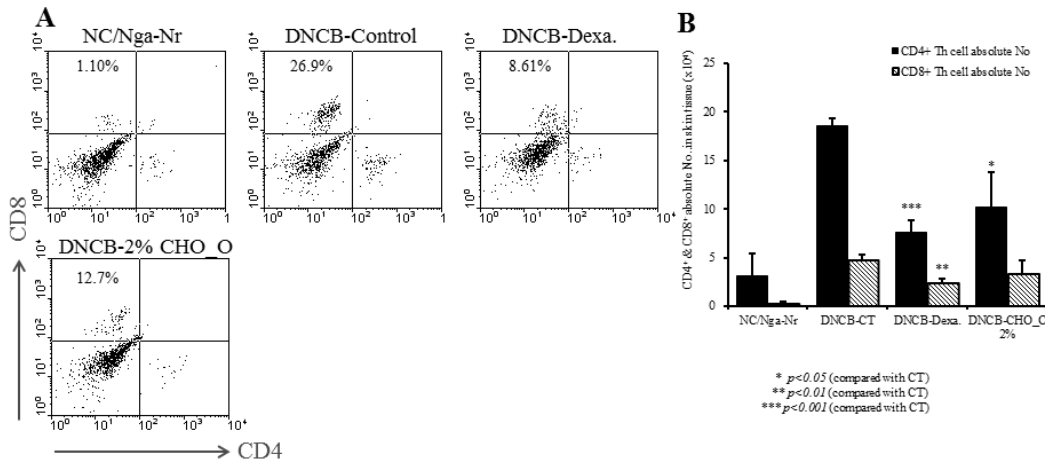


Fig. 4. Effects of Dexa. and CHO\_O on the percentage of CD4+ & CD8+ gated cells and changes of total absolute numbers in dorsal skin cells in NC/Nga mouse by DNCB. Total cell content (%) of CD4+ & CD8+ (A), total absolute number of CD4+ & CD8+ (B) in NC/Nga mouse.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)

+ DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)

‡ DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)

§ DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

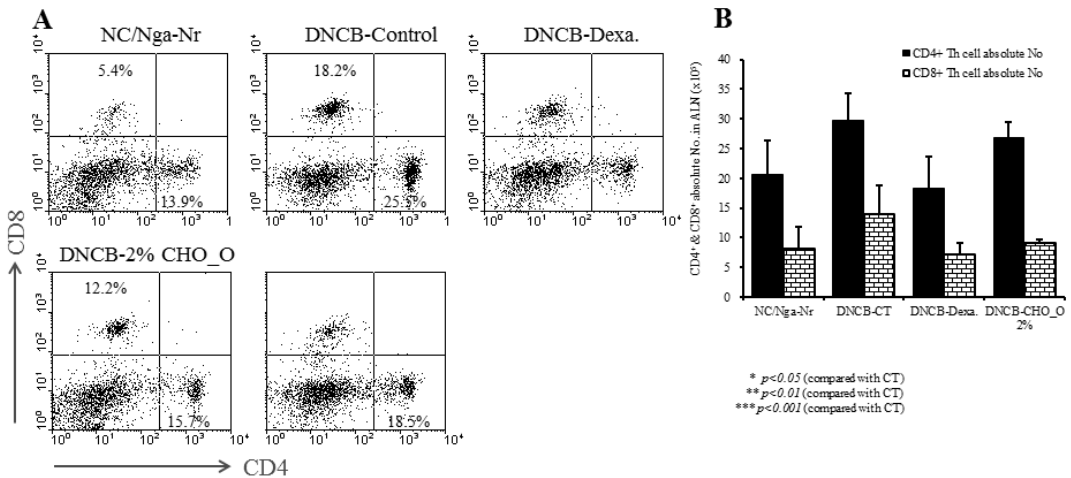


Fig. 5. Effects of Dexa. and CHO\_O on the percentage of CD4+ & CD8+ gated cells and changes of total absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse by DNCB.

Total cell content (%) of CD4+ & CD8+ (A), total absolute number of CD4+ & CD8+ (B) in NC/Nga mouse.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)

+ DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)

‡ DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)

§ DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

4. 세포분석기를 통하여 ALN 세포의 구성 탐색

1) DNCB로 유도하여 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 동물모델에서 dexamethasone과 편백유를 처리 후 ALN세포의 CD4+ 와 CD8+ 통과비율과 그 변화

NC/Nga 쥐의 ALN 세포( $2 \times 10^5$  cells/ml) 를 ALN 으로부터 분리한 후 2회 세척했고, 유세포분석기로 분석했다. T test에서 DNCB-CT group의 자료와 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 값을 나타낸다 (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). DNCB-CHO\_O 2% group 이 DNCB-CT group과 비교하여 CD4+, CD8+ 의 절대세포수가 유의하게 감소하였다.

2) DNCB로 유도하여 아토피피부염이 유발된 NC/Nga 동물모델에서 dexamethasone과 편백유를 처리 후 ALN세포의 B220+CD23+ 통과비율과 그 변화.

NC/Nga 쥐의 ALN 세포( $2 \times 10^5$  cells/ml)를 ALN 으로부터 분리한 후 2회 세척했고, 유세포분석기로 분석했다. T test에서 DNCB-CT group의 자료와 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 값을 나타낸다 (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). DNCB-CHO\_O 2% group 이 DNCB-CT group과 비교하여 B220+CD23+의 절대세포수가 유의하게 감소하였다.

5. WBC counting

에테르마취 후 눈 뒤 충에서 혈액을 채취했고 직후 헤파린 처리했다. hematology (BD, U.S.A.)로 세포 내용물이 측정되었다(Fig. 7). WBC counting(%)을 측정한 결과 DNCB-CHO\_O 2% group에서 DNCB-CT group의 WBC counting(%)에 비하여 유의성 있게 감소하였다(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

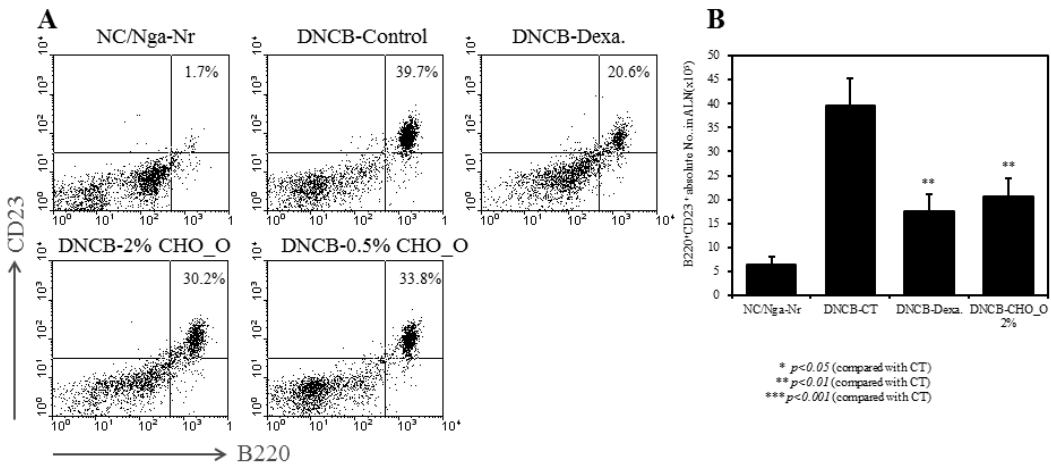


Fig. 6. Effects of Dexa. and CHO\_O on the percentage of B220+CD23+ gated cells and changes of total absolute numbers in ALN cells in NC/Nga mouse by DNCB.

Total cell content (%) of B220+CD23+ (A), total absolute number of B220+CD23+ (B) in NC/Nga mouse.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)

+ DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)

‡ DNCB-Dexa. : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)

§ DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).



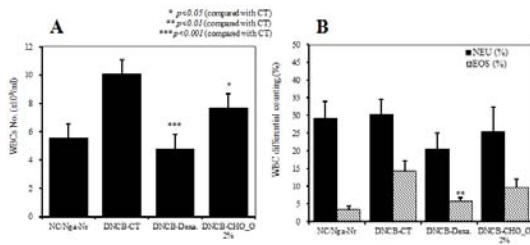


Fig. 7. WBC differential counting in atopy dermatitis skin lesions— induced in NC/Nga mouse by DNCB.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 † DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 ‡ DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

## 6. 혈청에서의 IgE의 수준

에테르마취 후 눈 뒤 종에서 혈액을 채취했고 직후 해파린 처리했다. 원심분리로 혈장 샘플을 얻은 뒤 사용 전까지 -20°C 에서 보관했다. ELISA kit (Shibayagi, Japan)을 이용해서 sandwich ELISA로 총 IgE level을 측정했다. 각각의 포인트는 6마리 쥐의 SE의 평균을 의미한다. DNCB-CHO\_O 2% group이 DNCB-CT group에 비하여 통계학적으로 유의성있게 감소한 값을 나타내었다(Fig. 8)(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 7. IL-4와 IFN- $\gamma$ level

15주 된 쥐의 지라세포를 48시간 동안 anti-CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 로 재자극했다. ELISA kit I (Biosource, USA)을 이용해서 sandwich ELISA로 IL-4와 IFN- $\gamma$  level 을 측정했다. T test에서 DNCB-CT group의 자료와 비교하여 DNCB-CHO\_O 2% group이IL-4값이 유의하게 감소하였다. 그러나 IFN- $\gamma$  level의 경우, DNCB-Dexa group, DNCB-CT group과는 달리 DNCB-CHO\_O 2% group에서만 유의하게 Level이 증가하였다(Fig. 9)(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

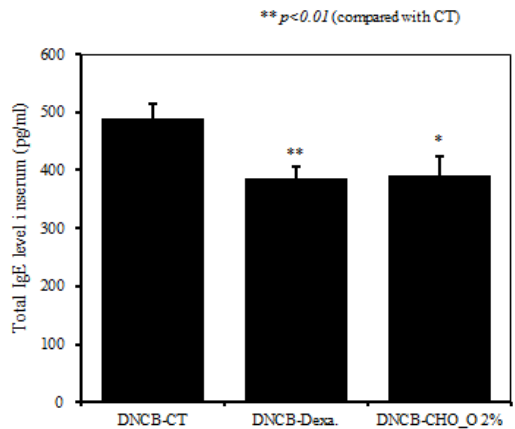


Fig. 8. Serum IgE elevation and development of atopic dermatitis skin lesions—induced in NC/Nga mouse by DNCB.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 † DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 ‡ DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

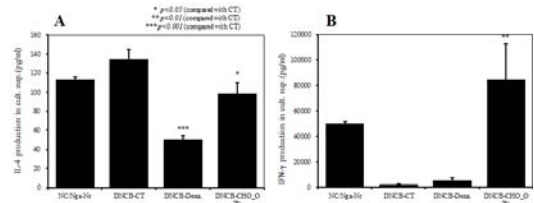


Fig. 9. Serum and culture supernatant on IL-4, and IFN- $\gamma$  level in splenocytes in atopy dermatitis skin lesions—induced in NC/Nga mouse by DNCB.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 † DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 ‡ DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

## 8. IL-5 level

15주 된 쥐의 지라세포를 48시간 동안 anti-CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 로 재자극했다. ELISA kit I (Biosource, USA)을 이용해서 sandwich ELISA로 IL-5 level 을

측정했다. T test에서 DNCB-CT group의 자료와 비교하여 DNCB-CHO\_O 2% group이 IL-5값이 유의하게 감소하였다(Fig. 10)(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

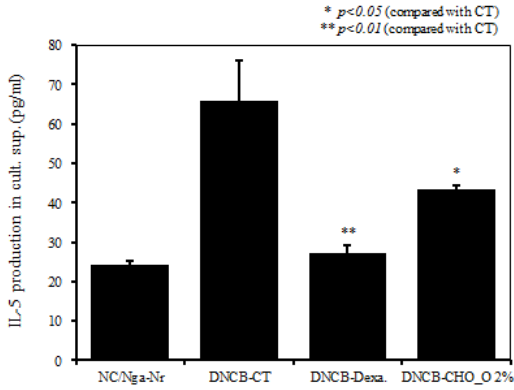


Fig. 10. Serum and culture supernatant on IL-5 level in splenocytes in atopy dermatitis skin lesions-induced in NC/Nga mouse by DNCB.

\* NC/Nga-Nr : Before DNCB Treatment(Normal, A)  
 † DNCB-CT : NCB treatment for 5 weeks(DNCB-Control, B)  
 ‡ DNCB-Dexa : DNCB with Dexamethason ointment(5%) for 3 weeks(C)  
 § DNCB-CHO\_O 2% : DNCB with skin apply of 2% CHO\_O-cream ointment for 3 weeks(D).

#### IV. 고 찰

아토피 피부염은 주위에서 흔히 볼 수 있는 만성 염증성 피부질환으로, 소아 및 성인에게 광범위하게 발병하는 알러지 질환 중 하나이다. 산업화 국가에서 크게 증가하여 전세계적으로 10~20%의 유병률을 보이며, 우리나라 유병률도 점차 증가하고 있는 실정이다<sup>2-4,15</sup>. 아토피 피부염은 알러지, 환경적·사회적 인자 및 심인성 요인 뿐만 아니라 복잡한 유전학적인 기전에 의해서 발생된다. 그 중에서도 외인성 아토피는 IgE 항체와 T cell, 사이토카인 등과 연관이 있고, 특히 외인성·내인성 아토피 피부염 모두 호산구 증가증과 관련이 있다<sup>15</sup>. 항원의 자극으로 인해 항체 IgE가 생산되고, 비만세포의 고친화성 수용체와 IgE 항체가 결합한 상태에서 다시 항원의 자극을 받을 경

우 알러지 유발물질인 Cytokine, Histamine, Leukotrienes를 분비한다. 또한 아토피 피부염에서의 면역 체계는 helper T cell(Th) 세포의 활성화를 중심으로 이루어지며, 활성화된 Th 세포는 그들이 분비하는 사이토카인의 종류에 따라 제1형과 2형으로 나누어진다. 그중 아토피성 피부염은 제2형 T 세포(Th2)가 활성화되어 나타난 면역 질환으로 급성적으로 발생하여 Th2가 활성화되면, IL-4, IL-5등을 분비하여 IgE와 호산구 등의 생산과 면역반응을 촉진하고 Th1을 억제하여 탐식작용을 촉진하는 IFN-r 등의 사이토카인의 분비를 저하시키게 된다<sup>16,17</sup>. 이 기전으로 말미암아 아토피의 대표적인 임상증상인 피부의 염증과 가려움증이 나타나게 된다.

현재 사용되는 아토피 피부염 치료제로는 부신피질 호르몬제 등의 스테로이드 제제, 항히스타민제, 인터페론-r등의 면역제제 등이 사용되어 유의성 있는 치료 효과를 보이나, 일부 환자들에게는 치료 반응이 적거나 과민 반응 및 간신독성 등으로 인한 부작용이 문제시 되고 있다<sup>18</sup>. 이에 따라 양방적 치료와 함께 한방적 치료 및 대체 요법을 사용하는 환자들이 늘고 있으며, 그에 따른 연구도 크게 늘어나고 있다.

구과목 측백나무과(Cupressaceae) 편백속(Chamaecyparis)에 속하는 편백(Hinoki cypress)은 노송나무라고도 불리우며, 예부터 한국, 일본 등 동아시아에서 실생활에 널리 응용되던 나무이다. 편백나무 특유의 향은 살균, 살충, 감모, 피부미용, 혈액순환 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있고, 실험실적으로도 MRSA를 포함한 병원성 세균 및 진균에 대한 항균 작용<sup>13,14,19</sup>이 뛰어나고, 세포단위에서 우수한 항염 및 항산화작용을 보이며<sup>20</sup>, 정유성분에 대한 미백 효과<sup>21</sup> 등 여러 분야에서 뛰어난 효과가 있다는 것이 입증되고 있다. 또한 아토피 치료에 대해서도 효과가 뛰어나 아토피가 있는 유아의 피부상태 및 면역력을 호전시키고<sup>22</sup>, in-vivo 실험 상 잎 추출물이 아토피군에서의 염증성 사이토카인 농도의 감소를 보이는 등<sup>11</sup> 지속적으로 연구가 이루어지고 있다. 본 논문에서는

편백 추출 oil의 외용적 사용에 대한 아토피 동물모델에서 호전도 여부 파악 및 면역기능 변화에 대해 실험적으로 증명해 보고자 하였다.

상기 실험에 사용된 NC/Nga mouse는 사람의 아토피 피부염과 면역학적 변화가 유사하여 아토피 피부염 실험에 가장 일반적으로 이용되는 모델이다<sup>23)</sup>. NC/Nga mouse를 이용하여 아무처리 하지 않은 정상군(A), 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포한 음성 대조군(B), 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포하고 양성 대조 약물로 dexamethasone (Dexa.) 0.5%를 주 5회 발진된 등부위에 도포한 양성 대조군(C), 등을 제모한 후 1%의 DNCB를 2주간 도포하고 편백유를 2% 크림형으로 제조하여 각각 3주간 등부분에 도포한 실험군(D)으로 나누어 본 실험을 진행하였다(Fig. 1). DNCB 유도로 인해 등 피부의 표피가 정상 세포와 비교하여 두꺼워진 상태와 비교하여, dexamethasone 0.5% 도포한 대조군 및 편백유 2% 도포군에서 표피의 비후 현상이 유의성 있게 감소하였다.

ALN과 피부조직의 총 세포수를 살펴보면 DNCB만을 처치한 음성대조군(DNCB-CT)보다 DNCB 처리와 편백유 2% 도포 군이 유의성(p<0.01)있게 감소하였다. 총 ALN 세포수의 경우 DNCB 처치군의 경우 약  $10 \times 10^6$ , 편백유 처치군의 경우 약  $8 \times 10^6$  으로 감소하였으며, Dexamethasone 처치군과 비슷한 감소를 보였다(Fig. 3).

인체내에서 CD4+ T세포는 특정한 B 림프구에 작용하여 B 림프구가 항원과 반응하도록 함으로써 항체 형성을 촉진시키며, 세포성 면역반응 자체도 증강시킨다. 또한 CD8+ T 세포는 직접적으로 항원을 죽일 수 있는 독성물질을 방출하여 항원을 죽이며, 세포성 면역반응을 이끌어낸다<sup>24)</sup>. CD23+는 비만세포, 호중구, 호산구 등의 표면 분자이며, 알레르기 질환에서 IgE 생성 및 염증반응에 연관된다<sup>25)</sup>. B220+는 사람에게 없으며, 생쥐 B 세포 표면에 있는 표식자이다<sup>26)</sup>. NC/Nga 생쥐에서 ALN를 각각 적출하여 유세포 분

석을 통하여 CD4+, CD8+, 그리고 B220+CD23+의 절대세포수를 산출한 결과, 편백유 2% 도포군이 음성대조군과 비교하여 세포수가 감소하였다(Fig. 4-6).

WBC는 말초혈액에서 외부항원에 대한 면역기능을 가지며, 아토피 환자 말초혈액에서 WBC 수는 과립구 세포수가 증가하면서 함께 증가한다. Neutrophil과 Eosinophil은 백혈구의 일종으로 Neutrophil의 경우 정상 백혈구의 40~75%이며, 생체 방어의 침범으로 외부물질에 대한 탐식, 살균 작용 등을 하며, Eosinophil은 정상 백혈구의 2~5%로 알레르기 및 국소 염증에서 세포반응을 나타낸다<sup>27)</sup>. 혈액 내 WBC 수(%)를 측정된 결과 편백유 도포군에서 음성대조군의 WBC 수(%)에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 감소하였다(Fig. 7). Neutrophil과 Eosinophil의 경우 편백유 2% 도포군에서 음성대조군에 비해 정도 감소하였으나, 유의성은 없었다.

아토피 피부염의 면역학적 기전을 보면, 급성 반응이 일어나 Th2세포가 편향적으로 활성화되어 면역글로블린-E(Ig-E)를 증가시키며, IL-4, IL-5의 분비가 증가하면서 Th1세포를 억제하게 되는데, 급성에서 만성으로 증가하게 되면 Th1의 사이토카인도 동시에 증가하여 염증반응을 더 악화시킨다<sup>16,17,28)</sup>. 최종 실험 종료 후 10주령, 12주령, 14주령에서 채혈하여 혈청 내 Ig-E 수준을 측정된 결과, 2% 편백유 크림도포군이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성(p<0.05)있게 감소한 값을 나타내었다(Fig. 8). 또한 IL-4 Level을 측정된 결과 2% 편백유 도포군이 음성대조군과 비교하여 IL-4값이 유의하게 감소하였다(Fig. 9). IL-5 level의 경우에도 2% 편백유 도포군이 음성대조군의 자료와 비교하여 유의하게 감소하였다(Fig. 10.). Th2가 활성화되어 나타나는 IL-4, IL-5의 경우 호산구 및 IgE 등의 면역반응을 촉진시키며 아토피 환자에게서 혈중 농도가 올라가는 경향이 있는데<sup>29,30)</sup>, 음성대조군과 비교하여 유의성 있게 낮은 수치를 보여주었다.

IFN- $\gamma$ 의 경우 Th1에서 분비되며, 알레르기 반응

을 일으키는 Th2세포를 억제하고, B세포 분화를 억제하여 Ig-E 생산 증가를 낮추는 역할을 하는데<sup>27)</sup>, 아토피 환자들에서는 Th2의 과활성화로 인해 낮은 혈중 농도를 보인다<sup>30)</sup>. 그러나 IFN- $\gamma$  level의 경우 2% 편백유 도포군에서 음성대조군 및 치료제 대조군인 Dexamethasone 처치군과 비교하여 유의하게 생성능이 증가된 수치를 보여주었다(Fig. 9).

이 실험 결과를 통해 편백유는 아토피양 접촉 피부염 유발 NC/Nga mouse에서의 면역학적 염증 반응의 조절에 유의미한 결과를 도출한다고 볼 수 있다. IgE 수치 및 IL-4,5수치 등에서는 유의성은 있으나 Dexamethasone 처치군보다는 면역학적 변화가 약간 적게 나타나는 반면에, IFN- $\gamma$  level의 생성능 변화에서는 오히려 Dexamethasone 처치군보다 뛰어난 생성능의 증가를 보였다. 이는 아토피로 인한 전반적인 인체 면역능 저하의 회복에 편백유가 Dexamethasone보다 더 우수할 수 있음을 보여주는 결과로, 이로써 아토피로 인한 소양증이나 피부손상, 면역력 저하에 대해 대체의학요법의 한 치료법으로 응용할 수 있는 외용제로써의 가능성을 보여주었다고 생각해 볼 수 있다. 그러나 아토피양 접촉 피부염 동물 모델을 이용하여 사람의 아토피 피부염 유발 시 발생하는 다른 유전적인 요인을 고려하지 못했다는 측면에서 사람의 아토피 피부염에 직접 반영하기에는 어려움이 있다. 따라서 대체의학 치료의 한 용법으로 사용되기 전에 아토피 피부염 환자들을 대상으로 한 추가적인 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

아토피양 접촉 피부염 유발 NC/Nga mouse에 2% CHO\_O-cream ointment를 피부를 도포하여 아토피 피부염 치료에 미치는 영향을 살펴본 결과 편백유가 포함된 cream에서 대조군과 비교하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었다.

1. ALN과 등표면피부조직의 총세포수가 유의성 있게 감소하였다.
2. 등피부표면세포의 CD4+ 와 CD8+이 각각 유의성 있게 감소하였다.
3. ALN세포의 CD4+ 와 CD8+이 각각 유의성 있게 감소하였다.
4. ALN세포의 B220+CD23+이 유의성 있게 감소하였다.
5. 혈액 내 백혈구 수가 유의성 있게 감소하였다.
6. 혈액 내 IgE 수준이 유의성 있게 감소하였다.
7. 비장세포 배양 상층액에서 IL-4와 IL-5 생성량이 각각 유의성 있게 감소하였다.
8. 비장세포 배양 상층액에서 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과를 통해 편백유는 아토피양 접촉 피부염 유발 NC/Nga mouse에서 면역학적 염증 반응을 조절하는 데에 유의적인 효과가 있다고 볼 수 있으며 이러한 기전을 바탕으로 아토피 피부염에 대체 치료법으로 이용 가능할 것으로 판단된다.

## VI. 감사의 글

대전대학교 웰에이징소재개발구축사업(과제번호 : R0004851)의 지원을 받아 수행되었음.

## References

1. T Bieber, Atopic dermatitis, N Engl J Med, 2008;1483-94.
2. Kenji K, New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: Interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. J of Dermatological science, 2013;70(1):3-11.
3. CA Akdis, M Akdis, T Bieber, C

- Bindslev-Jensen, M Boguniewicz, P Eigenmann, et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;61(8):969-87.
4. Ahn KM, Kim JH, Kwon HJ, Chae YN, Hahm MI, Lee KJ, et al. The prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in Korean children: Nationwide cross-sectional survey using complex sampling design. *J Korean Med Assoc* 2011;54(7):769-78.
  5. Raquel LO, Marta MS, Roberto T, Mariana CZ, Aline SI, Anderson AC, et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *REV ASSOC MED BRAS*. 2013;59(3):270-5.
  6. Mark B, Donald YM. Atopic Dermatitis: A Disease of Altered Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Immunol Rev*. 2011;242(1):233-46.
  7. R Sidbury, Hanifin JM. Old, New, And Emerging Therapies for Atopic Dermatitis. *Dermatologic Clinics*. 2000;18(1):1-11.
  8. Kim WK. Complementary Alternative Medicine in Atopic Dermatitis. *J of Pediatric allergy and respiratory disease*. The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease. 2008;18(4):273-5.
  9. Jin HW. Use of Alternative Medicine for Atopic Dermatitis. Pusan univ. Master`s Thesis of Department of medicine. 2005:1-33.
  10. Park SE. Cognition of Atopic Dermatitis and Real Condition of Alternative Medicine-Use, Gwangju Women univ. Master`s Thesis of Department of Beauty Education. 2011:1-84.
  11. Cho SE. Anti-oxidative, Anti-inflammatory And Immunomodulatory Effects of Chamaecyparis obtusa Leaves Extracts for Atopic Dermatitis. Konkuk univ. Doctorate Thesis of Department of Bioengineering. 2012:1-84.
  12. Jung JY. Antibacterial Effect with Essential Oil from Hinoki cypress on skin Microbiota. Gwangju Women univ. Master`s Thesis of Department of Beauty Science. 2011:1-38.
  13. Lee HO, Baek SH, Han DM. Antimicrobial Effects of Chamaecyparis obtusa Essential Oil. *Korean J of Microbiology and Biotechnology*. 2001;29(4):253-7.
  14. S Koyama, Y Yamaguchi, S tanaka, J Motoyoshiya. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (Kiso-Hinoki), Chamaecyparis obtusa. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1997;28(5):797-804.
  15. Park YM. Advances In the Pathophysiology of Atopic Dermatitis Allergy Asthma. *J of Pediatric allergy and respiratory disease*. 2006;16(3):189-96.
  16. Lionel F. Atlas of Atopic eczema. 1st ed. USA:Taylor & Francis Group. 2003:33-58.
  17. Inagaki N, Nagai H. Drugs for the treatment of allergic disease. *Jpn J of Pharmacol*. 2001;86(3):275-80.
  18. Hong JH. A research Western medical science, The Korean traditional medicine, Local clinic and Naturopathy about Atopy. *Korean J of Eco Early childhood Education*.

- 2008;7(1):65-85.
19. Seok TS. Antibacterial Activities of Phytoncide Hinoki Cypress Oil upon Contaminants of the Multiple-use Facilities, Daeguhanny univ. Doctorate Thesis of Department of Public Health, 2012:1-48.
  20. Cho SE, Lee DH. Antioxidant And Anti-inflammatory Activity of Leaves Extracts of Chamaecyparis Obtusa, J of The Korean Society of cosmetology, 2011;17(5):970-5.
  21. Kim SH, Lee SY, Hong CY, Kwak KS, Yeo HM, Lee JJ, et al. Whitening and Antioxidant Activities of Essential Oils from Cryptomeria japonica and Chamaecyparis obtusa, MOKCHAE KONGHAK, 2011;39(4):291-302.
  22. Cha YR. The Effects of Chamaecyparis obtusa extracts on the skin change in a child's atopy. Seokyung univ. Master`s Thesis of Department of Beauty Arts, 2012:1-107.
  23. Vestergard C, H Yoneyama, K Matsushima. The Nc/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. Trends in Molecular Medicine, 2000;6(5):209-19.
  24. Ryouji Y, Haruko N, Yutaka I, Toshihiro A, Takao A, Masato K. Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in STAT6-Deficient NC/Nga mouse. The Journal of immunology, 2002; 168(4):2020-7.
  25. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocytemacrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitricoxide, JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1996; 156(5):1916-22.
  26. Kim SJ, IMMUNOLOGY, Seoul, Korea Medical Book, 1994;206.
  27. Kim HM. Immunity and Allergy. Shin-il Books, 2008 ;168,171,222.
  28. Beltrani VS. The Clinical Spectrum of Atopic dermatitis, J of Allergy and Clinical Immunology, 2013;21(1):80-90.
  29. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets:Th1,Th2 and more. Immunology Today, 1996;17(3):138-46.
  30. Lee KY, Roh KW. Plasma Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-4, IL-5 and IL-10 Concentrations in Atopic Dermatitis, J of Pediatric allergy and respiratory disease, 1998;8(1):72-8.