



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

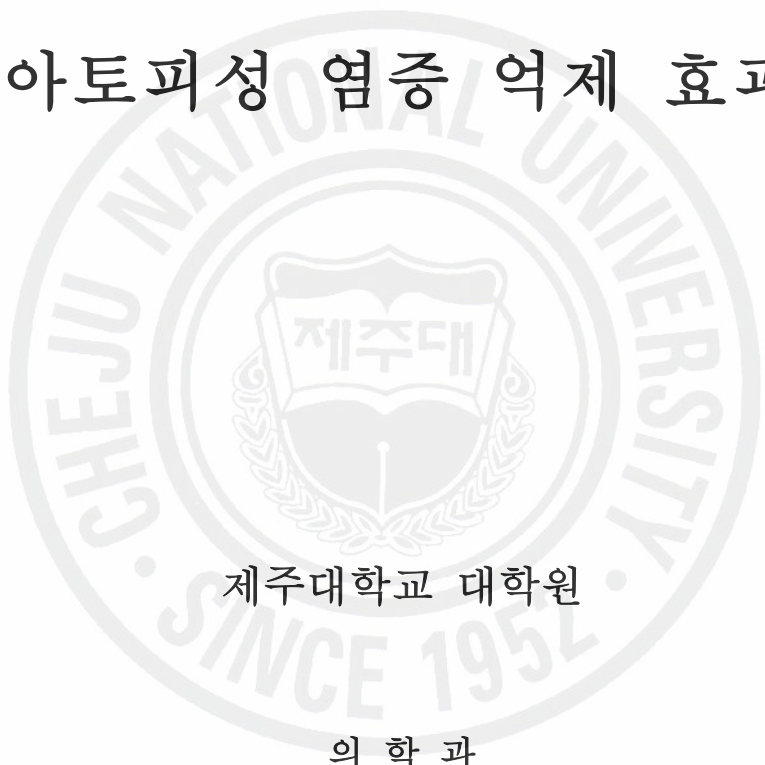
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

왕벚나무 (*Prunus yedoensis*
Matsum) 수피 추출물의
아토피성 염증 억제 효과

The seal of Cheju National University is a large, faint watermark in the background. It features a central shield with the Korean characters '제주대' (Jeju University) and an open book below it. The shield is surrounded by a laurel wreath. The outer ring of the seal contains the text 'CHEJU NATIONAL UNIVERSITY' at the top and 'SINCE 1952' at the bottom.

제주대학교 대학원

의 학 과

강 경 진

2006년 12월

왕벚나무 (*Prunus yedoensis*
Matsum) 수피 추출물의
아토피성 염증 억제 효과




지도교수 : 유 은 숙

강 경 진

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2006년 12월

강경진의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	강 희 경	
위 원	박 덕 배	
위 원	유 은 숙	

제주대학교 대학원

2006년 12월

Inhibitory effect of organic extracts
from *Prunus yedoensis* Matsum barks
on the atopic dermatitis-like
inflammation

Gyeong-Jin Kang

(Supervised by Professor Eun-Sook Yoo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science in
Medicine

2006. 12

This thesis has been examined and approved.

Deokyoung Kang

Deokbae Park

Eunsook Yoo

Dec. 15. 2006

DEPARTMENT OF MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic, relapsing inflammatory skin disease associated with allergy and it is commonly characterized with dry skin, severe pruritus, high serum IgE levels and eosinophilia. Keratinocytes produce many cytochemokines which are involved in the pathogenesis of skin disorders. In particular, macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) & thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) are Th2-type cytokines, and it has been reported that serum MDC and TARC levels are associated with AD disease activity. In present study, we investigated the anti-inflammatory activities of *Prunus yedoensis* Matsum barks *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, we evaluated of their inhibitory effect on the atopic dermatitis (AD)-like inflammatory markers (MDC and TARC) and Jak-STAT pathway (Jak1 and STAT1) in HaCaT human keratinocytes. *In vivo*, we evaluated the inhibitory effect of EtOAc fraction on the skin symptoms in AD-like murine model induced by DNCB or special diets. Among different fractions obtained from crude extract (80% EtOH), EtOAc fraction and E5 sub-fraction showed potent inhibitory activity on the mRNA and protein levels of MDC and TARC at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in HaCaT cells. In addition, E5, EtOAc sub-fraction, inhibited the activity of the STAT1 proteins associated with MDC and TARC in a dose-dependent manner. Also, the EtOAc fraction alleviated AD-like skin symptoms (skin surface hydration, epidermis thickness) in AD-like murine model induced by DNCB or special diets. These results suggest that *P. yedoensis* may have an anti-atopic activity by suppressing the inflammatory chemokines (MDC and TARC) and skin barrier dysfunction *in vitro* and *in vivo*.

Key word : *Prunus yedoensis* Matsum, Atopic dermatitis, MDC/CCL22, TARC/CCL17, Jak-STAT, HaCaT keratinocytes, AD-like murine model

목 차

A B S T R A C T	i
목 차	ii
LIST OF SCHEME	iv
LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vi

I. 서 론	1
--------------	---

II. 재료 및 방법	5
-------------------	---

1. 왕벚나무 시료 제조
2. 세포 배양 및 시약
3. 세포독성평가 ; LDH assay
4. RNA 분리
5. RT-PCR
6. Chemokine 생성 및 정량
7. Western blot analysis
8. 실험동물
9. 왕벚나무 수피 추출물 도포제 제조
10. 아토피 피부염의 유발과 추출물의 도포
11. 피부 조직 표본 제작
12. 피부표면 수분 및 표피 두께 측정
13. 혈청 IgE 생성 및 정량
14. 특수염색
15. 영상분석 및 통계처리

III. 결 과	17
----------------	----

1. 세포독성 (LDH 유리에 미치는 영향)
2. MDC 와 TARC mRNA 발현에 미치는 영향
 - 2-1) 용매 분획이 MDC 와 TARC mRNA 발현에 미치는 영향

- 2-2) EtOAc 분획 및 소분획이 MDC 와 TARC mRNA 발현에 미치는 영향
- 3. EtOAc 분획 및 소분획이 chemokine 양에 미치는 영향
- 4. Jak-STAT 신호전달에 미치는 영향
- 5. 아토피 유발 동물모델에서의 육안적 · 조직학적 결과
 - 5-1) DNCB 도포 모델
 - 5-2) Special diets 섭취 모델
- 6. 피부표면 수분 및 표피 두께 변화에 미치는 영향
 - 6-1) 피부표면 수분 변화에 미치는 영향
 - 6-2) 표피 두께 변화에 미치는 영향
- 7. 혈청 IgE 생성에 미치는 영향
- 8. 피부조직 내 mast cell의 침윤에 미치는 영향

IV. 고	찰	56
V. 참	고 문 헌	61
VI. 적	요	67

LIST OF SCHEME

Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from <i>Prunus yedoensis</i> Matsum	7
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---



LIST OF TABLES

Table 1. Primer sequences and the expected product sizes in RT-PCR analysis	10
Table 2. Composition of normal and special diets for HR-1 hairless mice	13



LIST OF FIGURES

Figure 1. Cytotoxicity of solvent fractions of <i>P. yedoensis</i> on the culture medium of HaCaT human keratinocytes	18
Figure 2. Cytotoxicity of EtOAc fraction of <i>P. yedoensis</i> on the culture medium of HaCaT human keratinocytes	19
Figure 3. Cytotoxicity of EtOAc sub-fractions of <i>P. yedoensis</i> on the culture medium of HaCaT human keratinocytes	20
Figure 4. Inhibition of MDC mRNA expression by solvent fractions of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	22
Figure 5. Inhibition of TARC mRNA expression by solvent fractions of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	23
Figure 6. Inhibition of MDC mRNA expression by EtOAc fraction of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	25
Figure 7. Inhibition of TARC mRNA expression by EtOAc fraction of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	26
Figure 8. Inhibition of MDC mRNA expression by EtOAc sub-fractions of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	27
Figure 9. Inhibition of TARC mRNA expression by EtOAc sub-fractions of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	28

Figure 10. Inhibition of MDC mRNA expression by EtOAc sub-fraction (E5) of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	29
Figure 11. Inhibition of TARC mRNA expression by EtOAc sub-fraction (E5) of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	30
Figure 12. Inhibition of MDC production by EtOAc fraction of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	32
Figure 13. Inhibition of TARC production by EtOAc fraction of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	33
Figure 14. Inhibition of MDC production by EtOAc sub-fractions of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	34
Figure 15. Inhibition of TARC production by EtOAc sub-fractions of <i>P. yedoensis</i> in HaCaT human keratinocytes	35
Figure 16. Effect of EtOAc fraction of <i>P. yedoensis</i> on the levels of Jak1 & STAT1 in HaCaT human keratinocytes	37
Figure 17. Effect of EtOAc sub-fractions of <i>P. yedoensis</i> on the levels of Jak1 & STAT1 in HaCaT human keratinocytes	38
Figure 18. Effect of EtOAc sub-fraction (E5) of <i>P. yedoensis</i> on the levels of Jak1 & STAT1 in HaCaT human keratinocytes	39
Figure 19. Naked eye- and microscopic observation of skin tissue treated with DNCB	41

Figure 20. Naked eye- and microscopic observation of skin tissue in normal and special diet-fed hairless mice	43
Figure 21. Changes in the degree of skin surface hydration by DNCB treatment	45
Figure 22. Changes in the degree of skin surface hydration in normal and special diet-fed hairless mice	46
Figure 23. Changes in epidermis thickness by DNCB treatment	48
Figure 24. Changes in epidermis thickness in normal and special diet-fed mice	49
Figure 25. Changes in serum IgE levels by DNCB treatment	51
Figure 26. Changes in serum IgE levels in normal or special diet-fed hairless mice	52
Figure 27. Changes in the infiltration of mast cells in skin tissue in DNCB and PRE-treated hairless mice	54
Figure 28. Changes in the infiltration of mast cells in skin tissue in normal and special diet-fed hairless mice	55

I. 서 론

아토피(atopy)는 음식물과 흡입성 물질에 대한 알레르기 반응의 결과로 피부염이나 천식, 고초열이 나타나는 것을 Coca AF와 Coke RA에 의해 “아토피”라고 정의된 바 있는데, 이러한 알레르기 질환에는 아토피 피부염, 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염 등이 있다 (Min, 2004). 특히 아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 알레르기성 비염이나 천식을 동반하는 경우가 많은 만성 재발성 피부질환으로, 한 해 태어나는 신생아 중 20%가 앓는다는 보고가 나올 정도로 매우 흔한 피부병이다. 이 질환은 소양감, 피부건조증, 모낭 주위 항진, 구순염, 태선화, 습진양병변 등이 특징적으로 나타난다 (Kim, 1983; Chang, 1998).

아토피 피부염의 원인에 대해서는 여러 가설이 제시되어 있으나 확실한 원인은 밝혀지지 않고 있으며 유전학적·면역학적 요인, 이상 약물반응, 환경요인, 미생물 등이 관여할 것이라고 보고 있다. 최근에는 아토피 피부염 환자에서의 혈청 IgE치의 비정상적인 증가, 세포면역의 중추적 역할을 담당하는 T 림프구의 수적, 기능적 장애 등이 보고된 바 있다 (Baik, 2005).

아토피 피부염의 면역학적인 요인으로는 T 세포 성숙 결핍설, CD8+ 억제 T 세포의 수적 감소 등이 제안된 바 있었으나, 최근엔 CD4+ T 세포의 역할이 더욱 중요한 것으로 알려지고 있다 (Min, 2004). 즉, B 세포로부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4, B 세포로부터 IgE 생성을 촉진하는 IL-5, IgE 생성을 증폭시키는 IL-6 등을 분비하는 T 세포는 CD4+ T 세포 중 Th2 세포인데, AD환자의 말초 혈액 및 피부 병변으로부터 분리한 항원 특이 T 세포 클론이 Th2로 밝혀졌고, 이 세포들에서 IL-4 등의 Th2 cytokine 프로파일 분비된다는 사실이 입증되었다 (Min, 2004).

인체의 외부 침입에 대한 방어 기작인 면역 체계는 T 세포의 활성화를 중심으로 이루어진다고 알려져 있다. Th1 세포가 생산하는 Th type 1 cytokine은 Th1 세포의 분화를 유도하는 반면 Th2 세포의 증식과 분화를 억제하며, 반대로 Th2 세포가 생산하는 Th type2 cytokine은 Th2 세포의 증식과 분화를 유도하는 반

면 Th1 세포의 분화를 억제한다고 알려져 있다. 이와 같은 상호 견제를 통해 균형을 이루며 Th1과 Th2 면역반응을 조절하므로, 이 균형이 깨어지게 되면 Th1/Th2 불균형으로 인한 여러 가지 면역 질환을 겪게 되는 것으로 이해될 수 있다 (Chen, 2004; Ngoc *et al*, 2005). 아토피 피부염과 같은 알레르기 질환도 그 균형이 Th2 쪽으로 치우친 결과로 유발된 면역 질환 중의 하나이다. 즉, Th2 세포와 알레르기 질환의 관계는 Th2 세포 기능의 증가와 Th1 세포 기능의 감소라는 Th2 가설을 통해 이해할 수 있다 (Min, 2004).

아토피 피부염 환자의 피부에서 T 세포의 이동은 특히 chemokine과 그에 대한 수용체에 의해서 매개된다는 보고가 있다. Chemokine (chemoattractant cytokine)은 염증부위에 백혈구의 이동, 면역세포의 분화, HIV감염의 억제와 면역 조절 기능 등 여러 가지 활성을 가지는 분자량이 작은 cytokine의 한 부류이다. 현재 약 50 여종이 알려져 있으며 chemokine은 구조적으로 처음 위치하는 두 개의 시스테인 잔여기의 상대적 위치에 따라 CXC, CC 및 CX3C 그리고 C의 네 종류의 아집단으로 나누어진다. chemokine은 염증질환, 감염질환, 알레르기질환, 혈관성질환, 암질환, 자가면역질환 등의 여러 가지 병리학적 증상에 밀접하게 관련되어 있으며, 최근 새로운 chemokine과 그 수용체들이 발견되면서 면역세포의 발생과 성숙, 근간세포(stem cell)보호, T 세포의 분화와 이주, HIV의 억제 및 Th1/Th2 cytokine balance의 조절 작용 등 새로운 기능들이 많이 알려지고 있다. 그중에서 CC chemokine은 특히 알레르기성 염증반응에서 호산구, 호염구, 림프구를 끌어들이는 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Lee, 2002; Baumer *et al*, 2004). 또한, chemokine 수용체로는 CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4와 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8과 CX3CR1 등이 있는데, Th1(CXCR3, CCR5) 세포와 Th2(CCR3, CCR4, CCR8) 세포가 각각 다른 chemokine 수용체를 발현한다. 특히, CXCR3와 CCR4 chemokine 수용체는 각각 Th1과 Th2 세포에서 특이적으로 발현된다고 보고되었다 (Belperio, 2004; Esche, 2004).

다양한 chemokine 수용체들 중 CCR4는 Th2 세포에 많이 발현된다고 알려져 있고, AD-like murine model과 AD 환자의 병변 모두에서 과발현된다는 보고가 있다. 또한, 모든 CLA(+) 피부귀소 기억/작동 T 세포는 필수적으로 CCR4를 표

현하는 것으로 밝혀졌고, 이러한 CCR4는 Th2 세포와 호산구의 선택적인 염증피부로의 동원을 통해 아토피 피부염의 병리기전에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다 (Na, 2005). 이러한 CCR4에 특이적으로 결합하는 chemokine으로는 macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)와 thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17)로 알려져 있다. MDC는 단핵구, 단핵구 유래 수지상 세포와 자연 살해 세포 등에 대한 이주를 강하게 조절하는 chemokine으로 알려져 있고, TARC는 염증병변으로 Th2 세포의 이주를 선택적으로 조절하는 chemokine으로 보고되었으며, 흉선에서 기본적으로 발현되고 단핵구 유래 수지상 세포, 내피 세포와 각질 세포 등에서 생성되며, 특히 T 세포의 피부귀소에 중요한 chemokine으로 알려져 있다. 최근 MDC와 TARC의 아토피 피부염과 관련된 연구에서는 아토피 피부염 환자에서 혈청농도의 증가가 보고되고, 아토피 피부염 동물모형에서 MDC와 TARC의 피부발현이 증가됨이 보고되었다 (Kakinuma *et al*, 2002; Maeda *et al*, 2002; Shinada *et al*, 2004; Jakubzick, 2004; Rozyk *et al*, 2005).

Signal transducer and activator of transcription (STAT)1은 IFN- γ 에 반응하는 Janus kinases (Jak) 에 의해 발현하는 세포질 내 전사인자이다 (Han, 2002). Jaks는 cytokine이나 IFNs 수용체의 membrane-proximal 영역에 존재하면서 cytokine이나 IFNs의 신호전달에 관계하는 protein tyrosine kinases이다. Jaks는 Jak1, Jak2, Jak3와 Tyk2의 4가지 형태로 존재하는데, 각각의 catalytically active kinase 영역과 regulatory pseudo kinase 영역은 protein의 carboxy terminus에 포함되어 있다. IFNs가 세포막에 있는 IFNs 수용체에 결합을 하면, 수용체의 세포질 영역의 tyrosine motifs와 그와 관련된 proteins가 인산화되면서 순차적인 신호전달이 시작된다. 세포질 내 영역에서 인산화된 Jak에 STAT이 결합을 하게 되고, STAT이 Jak에 의해서 다시 인산화 된다. 인산화된 STAT은 homodimers나 heterodimers를 형성한 후 핵 내로 이동하고, specific DNA sequences에 결합하여 cytokine, chemokine과 같은 염증인자의 발현을 조절하게 된다고 알려져 있다 (Ivashkiv, 2004; Best *et al*, 2005). 이전의 연구에서 IFN- γ 는 다양한 세포 종류에서 STAT, ERK와 p38 MAP kinases를 활성화시킨다는 보고가 있었다 (Komine *et al*, 2005). 또한, IFN- γ 와 IFN- α 가 각각

Jak1/Jak2와 Jak1/Tyk2를 활성화시키고, STAT protein은 다양한 리간드들, 특히 IFN- γ 에 의해서는 STAT1, interleukin (IL)-6에 의해서는 STAT3, IL-4에 의해서는 STAT6가 각각 활성화된다고 보고되었다 (Strobl *et al*, 2001).

왕벚나무 (*Prunus yedoensis* Matsum)는 장미과 (Rosaceae) 벚나무속 (Prunus L.)에 속하는 식물로 높이가 15m에 달하는 낙엽교목으로서 수피가 평활하며 어린가지에 잔털이 약간 있다. 잎은 호생하며 길이 6 - 12 cm로서 표면에 털이 없고 뒷면에 털이 있으며, 가장자리에 예리한 겹으로 된 톱니모양이 있다. 꽃은 4월에 잎 보다 먼저 피고 백색 또는 연한홍색이며, 산방화서에 3 - 6 개의 꽃이 달리고 소화경에 털이 있다. 화축에 포가 있고 꽃받침통은 털이 없으며 열편은 난형 예두이고 암술대에 털이 없으며 열매는 둥글고 6 -7 월에 적색에서 흑색으로 익는다 (Lee, 1999). 대부분이 북반구 온대 지역에서 자라며, 우리나라에도 전국 산지에 20여종이 있으며, 그 열매는 식용을 하기도 하고, 민간 의학에서는 각기병, 수종, 유선염, 치통과 통경제 등으로 사용하였다 (Jung *et al*, 2004). 줄기 및 껍질은 기침, 담마진, 우육체 등의 민간약으로 이용되어 왔으며, 줄기의 껍질에는 면역력 증가물질이 포함되어 있다는 보고와 항알레르기 효과가 있다는 보고가 있다 (Kim *et al*, 2004).

이에 본 연구에서는, 왕벚나무 수피 추출물이 아토피 피부염에 대한 치료 효과를 갖고 있을 것으로 기대되었고, 이를 규명하기 위하여 HaCaT 세포에 hIFN- γ (10 ng/ml)로 자극하였을 때 유도되는 chemokine인 MDC와 TARC에 대해 왕벚나무 수피 용매 분획 및 소분획이 억제 효과를 나타내는지 조사하였다. 또한, HaCaT 세포에서 IFN- γ 에 의한 MDC와 TARC의 생성에 관여한다고 생각되는 신호전달 protein인 Jak1과 STAT1에 대한 왕벚나무 수피 용매 분획 및 소분획의 영향을 조사하였다. 또한, DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) 처리와 special diets 방법으로 아토피 피부염을 유발한 동물모델에서 왕벚나무 수피 추출물의 처리에 의한 육안적, 조직학적 변화를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 왕벚나무 시료 제조

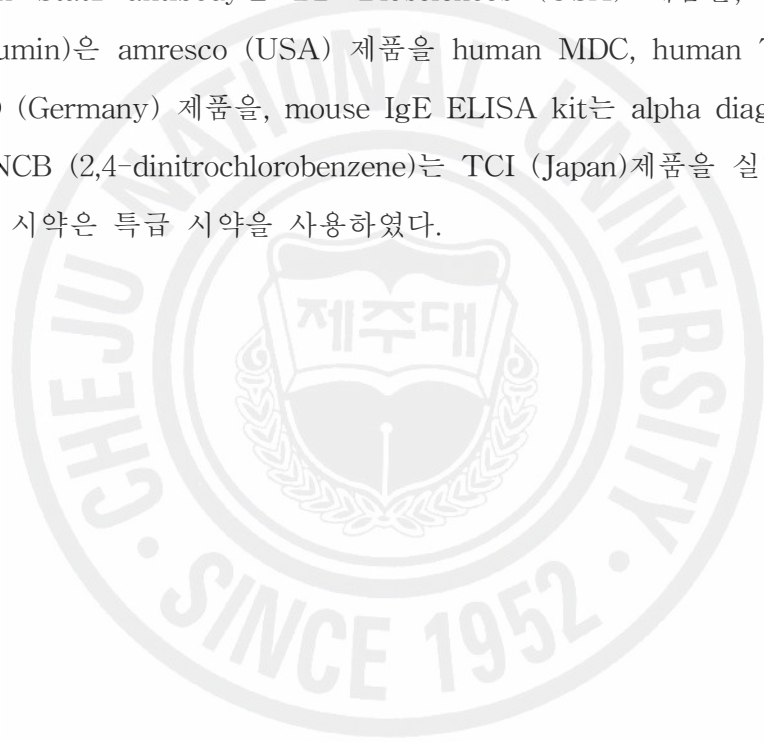
건조 왕벚나무 수피 60 g에 80% 에탄올 60 l를 2회 가하여, 3시간 가열 환류하고 실온으로 냉각하여 여과하였다. 여액을 합하고 농축하여 8.6 g의 왕벚나무 수피 추출물 (PR-T)을 제조하였다. 왕벚나무 추출물 3 g을 물 1.5 l에 현탁시키고 에틸아세테이트 2 l로 3회 추출하였다. 에틸아세테이트 층을 합하여 농축하여 왕벚나무 에틸아세테이트 추출물분획 (PR-E) 0.92 g을 제조하였다. 물 층을 수포화부탄올 2 l로 3회 추출하여 합하고 감압 하에서 농축하여 왕벚나무 부탄올 추출물분획 (PR-B) 1.18 g을 제조하였다. 물 층을 감압 하에서 농축하여 왕벚나무 물 추출물분획 (PR-W) 0.9 g을 제조하였다. 또한, 에틸아세테이트 추출물분획 5 g을 실리카겔 칼럼 내경 4.5 cm, 길이 25 cm에서 크로마토그래피 하였다. 용매는 디클로로메탄 : 메탄올 (50 : 1, 850 ml ; 30 : 1, 820 ml ; 10 : 1, 880 ml ; 8 : 1, 720 ml ; 7 : 1, 560 ml ; 6 : 1, 660 ml ; 5 : 1, 600 ml ; 4 : 1, 500 ml ; 메탄올, 500 ml)로 용출하고 UV, 2% FeCl₃용액으로 발색하여 소분획 PR-E1; 1.2 g, PR-E2; 0.28 g, PR-E3; 1.56 g, PR-E4; 1.35 g, PR-E5; 0.7 g (메탄올 용출분획)을 얻었다 (Scheme 1).

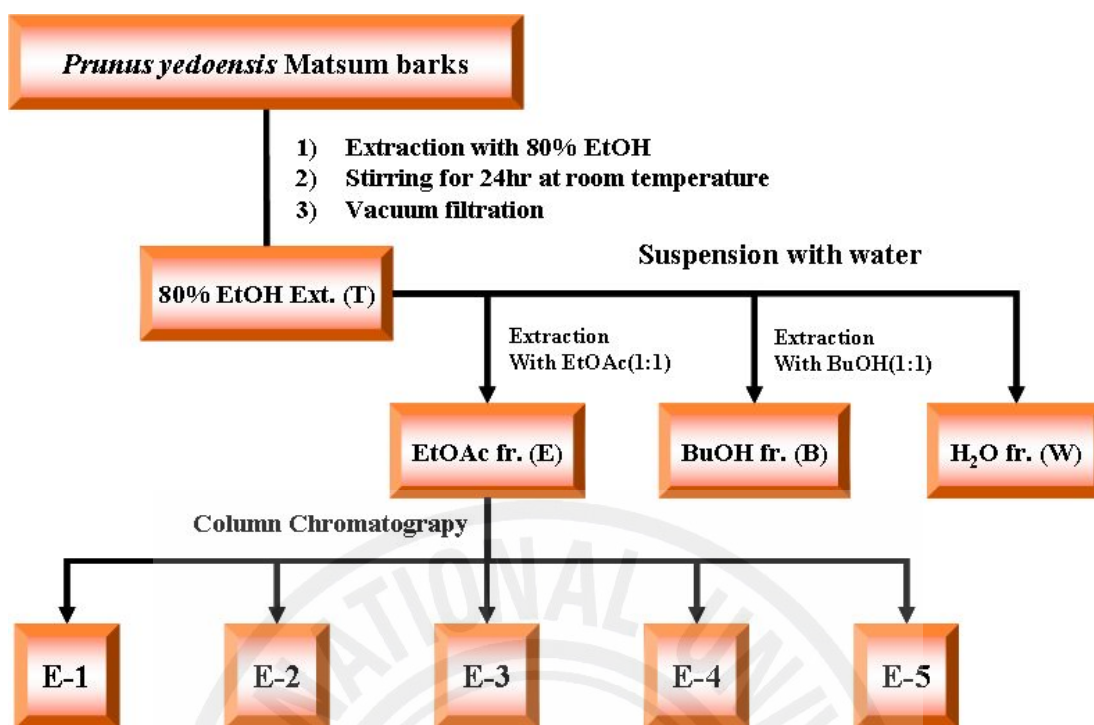
2. 세포 배양 및 시약

형질 전환된 인간각질형성세포주인 HaCaT 세포는 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS ; Gibco BRL, USA)과 100 unit/ml penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium,

Gibco BRL, USA)을 세포배양액으로 이용하여, 37°C, 5% CO₂로 유지되는 항온기 (incubator)에서 배양하였다. 계대배양은 배양 플라스크 (culture flask) 면적의 80% 정도를 차지할 때까지 배양한 다음, 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 배양 플라스크로부터 분리한 후, 10% FBS가 포함된 배양액으로 trypsin을 중화하고 원심 분리하여 여러 차례 계대배양 하였다.

Human interferon- γ (hIFN- γ , recombinant E. coli)는 Roche (Korea) 제품을, MDC/CCL22 primer와 TARC/CCL17 primer는 Bioneer (Korea) 제품을, β -actin primer는 Bionex 제품을, mouse anti-human Jak1 antibody와 mouse anti-human Stat1 antibody는 BD Biosciences (USA) 제품을, BSA (Bovine serum albumin)은 amresco (USA) 제품을 human MDC, human TARC ELISA kit는 R&D (Germany) 제품을, mouse IgE ELISA kit는 alpha diagnostic (USA) 제품을, DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)는 TCI (Japan) 제품을 실험에 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.





Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Prunus yedoensis* Matsum

3. 세포독성평가 ; LDH assay

Lactate dehydrogenase (LDH)는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로 원형질막의 손상이 있으면 세포 밖의 배양액으로 급격하게 분비된다. 따라서 LDH 유리의 증가는 원형질막이 손상된, 즉 죽은 세포가 증가함을 이야기한다. 여러 농도의 왕벚나무 추출물로 처리한 배양 세포에 일정 시간 후에 substrate mix를 추가하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 50 μ l의 반응중지 용액을 넣고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용해용액을 넣어 모든 세포를 용해시킨 상태에서 흡광도를 측정하였고, 이를 100%로 했을 때 LDH가 유리된 처리 세포의 흡광도의 백분율을 계산하였다. 모든 실험은 동일한 조건에서 실시하였고, Cytotox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, USA)를 사용하였다.

4. RNA 분리

HaCaT 세포 (1×10^6 cells/ml)를 60 ϕ dish에 분주하고 18 시간 배양한 후, 10배 농도로 조제된 시험 약물과 hIFN- γ (최종농도 10 ng/ml)를 동시 처리하여 배양한 후 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심 분리시켜 RNA를 침전시키고 75%의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

5. RT-PCR

1 μg 의 total RNA를 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70°C 5 min, 25°C 5 min, 37°C 60 min, 그리고 70°C에서 15 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 MDC, TARC, β -Actin을 증폭시키기 위하여 1 μl cDNA, 4 μM 의 5' 과 3' primer, 10x buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μl 로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C/45초, 55~60°C/45초, 72°C/60초, 35회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다 (Table 1).

Table 1. Primer sequences and the expected product sizes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size(bp)
MDC	F	5'-GCATGGCTCGCCTACAGACT-3'	497
	R	5'-GCAGGGAGGGAGGCAGAGGA-3'	
TARC	F	5'-ATGGCCCCACTGAAGATGCT-3'	351
	R	5'-TGAACACCAACGGTGGAGGT-3'	
β -Actin	F	5'-ATGGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'	588
	R	5'-CAGCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'	



6. Chemokine 생성 및 정량

Human keratinocyte cell line 인 HaCaT 세포를 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cells/ml로 조절한 후 12 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50 μ l를 hIFN- γ (최종농도 10 ng/ml)를 포함하는 새로운 배지 (FBS(-)) 450 μ l에 가하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 얻어진 상층액의 MDC 및 TARC 함량을 각각 human MDC immunoassay, human TARC immunoassay kit (R&D, Germany)를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

7. Western blot analysis

HaCaT 세포 (1×10^6 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질과 hIFN- γ (10 ng/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 1 ml의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Protein Assay Kit (Bio-rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 20~30 μ g의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 1% BSA (Amresco, USA)가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 overnight 실시하였다. Jak1의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-human Jak1 (1 : 250) (BD, USA)을, STAT1의 발현 양을 확인하기 위한 항체로는 anti-human

STAT1 (1 : 250) (BD, USA)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Co., U.K.)를 1 : 2500으로 희석하여 상온에서 40분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Intron, Korea)과 1분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

8. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 7주된 암컷 hairless mice (HOS:HR-1)로, 중앙실험동물(주)에서 구입하여 사용하였다. DNCB (2,4-Dinitrochlorobenzene) 도포 실험에서는 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다. Special diets를 사용한 실험에서는 normal diets와 HR-1을 위한 special diets (HR-AD manufactured diet, Nosan Corp, Japan)를 동량으로 섭취시키고, 음용수는 충분히 공급하였다 (Table 2).

9. 왕벚나무 수피 추출물 도포제 제조

실험에 사용한 도포제는 PBS와 에탄올, 글리세롤을 적정 비율 (10:5:1)로 혼합한 것을 기제로 하고 (carrier), 여기에 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 농도가 1% (W/V)가 되도록 희석하였다.

Table 2. Composition of normal and special diets for HR-1 hairless mice

<% or per kg>

	Normal diets	Special diets (HR-AD)		Normal diets	Special diets (HR-AD)		Normal diets	Special diets (HR-AD)
<i>General ingredients</i>			<i>Minerals</i>			<i>Vitamins</i>		
Moisture	8.00%	2.10%	Ca	0.85%	89%	A	10000 IU	32157 IU
Crude protein	18.00%	20.70%	P	0.62%	0.62%	D ₃	2000 IU	4799 IU
Crude fat	5.00%	0.40%	Mg	0.25%	0.02%	E	50 IU	160 mg
Crude fiber	3.20%	6.00%	K	0.25%	0.43%	K	10 mg	4.1 mg
Crude ash	5.00%	5.40%	Na	0.28%	0.20%	B ₁	15 mg	12.8 mg
NEF*	58.20%	65.40%	Fe	200 mg	277 mg	B ₂	10 mg	15.4 mg
			Mn	100 mg	79 mg	B ₆	10 mg	52.1 mg
			Zn	44 mg	114 mg	B ₁₂	0.01 mg	0.08 mg
			I	4 mg	1.3 mg	Biotin	0.5 mg	0.8 mg
			Co	2 mg	.002 mg	Pantothenic acid	30 mg	28.6 mg
			Cu	unknown	21 mg	Choline	2300 mg	434 mg
						Folic acid	1 mg	0 mg
						Inositol	100 mg	unknown
						Niacin	100 mg	unknown

* NEF, nitrogen free extract

10. 아토피 피부염의 유발과 추출물의 도포

생후 7주된 암컷 hairless mice를 일주일간 순화 시킨 후, DNCB 무처리군 (DNCB (-)), DNCB 처리군 (DNCB (+)), DNCB 처리 후 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획 처리군 (DNCB-PRE)으로 각각 7마리씩 나누었다. 1% DNCB (TCI, Japan) 용액 (acetone) 100 μ l를 등 부위에 도포하여 감각시키고, 일주일 후 0.5% DNCB용액 50 μ l를 도포하였다 (day 0). 이후 2일 간격으로 0.5% DNCB용액 100 μ l를 36일간 도포하여 피부염을 유발하였다.

또한 생후 4주된 암컷 hairless mice를 일주일간 안정화시킨 후, normal diets 섭취군 (ND), special diets 섭취군 (AD-cont.), special diets 섭취 후 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획 처리군 (AD-PRE)으로 각각 7마리씩 나누어 13주간 섭취 시켜 피부염을 유발하였다.

각각의 실험군에 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 100 μ l씩 2일 간격으로 도포하고, 대조군에는 기제를 동량 도포하여 육안적인 변화를 관찰하였다.

11. 피부 조직표본 제작

각각의 실험 종료 후 경추탈골 시키고, 등 쪽의 피부를 절제한 후 10% 중성 포르말린 용액에 넣어 고정시켰다. 10% 중성 포르말린 용액에 담긴 피부조직을 24시간 동안 고정한 후, 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하고 3 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 H&E (Haematoxylin & eosin)를 이용하여 염색하여 피부 조직표본을 제작하였다.

12. 피부표면 수분 및 표피 두께 측정

DNCB 도포와 special diets 섭취를 통한 아토피 피부염 동물 모델에서 피부 표면 수분 측정을 2일 간격으로 실시하였으며, 수분 측정은 수분측정기 (scalar, Japan)를 사용하여 측정하였다.

표피 두께 변화는 H&E 염색한 조직 표본을 이미지화한 후, Image-Pro plus ver. 4.5를 이용하여 측정하였다.

13. 혈청 IgE 생성 및 정량

DNCB 도포실험에서는 5주째, 그리고 special diets 실험에서는 13주째 실험동물을 ethyl ether로 마취한 후 심장 천자법으로 채혈하여 혈청을 분리하고, 혈청 내 IgE를 측정하기 위하여 mouse serum IgE ELISA kit (alpha diagnostic, USA)를 이용하여 측정하였다.

14. 특수 염색

염증부위 내 세포 이주에 영향을 미치는 비만세포의 분포와 형태변화를 조사하기 위하여 toluidine blue method를 실시하였다. 우선 파라핀에 포매하여 3 μm 두께로 절편을 제작하였고, 절편을 toluidine blue (sigma, USA)에 3분간 염색하고 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

15. 영상분석 및 통계처리

전기영동 및 슬라이드 염색과 같은 이미지화된 결과를 수치화하기 위하여, Quantity One Ver. 4.2.1과 Image-Pro plus ver. 4.5를 이용하여 분석하였으며, 결과는 $\text{mean} \pm \text{standard error}$ 로 기록하였고, 유의성 검정은 Student's T-test 분석방법을 이용하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 세포독성 (LDH 유리에 미치는 영향)

왕벚나무 수피 추출물 용매 분획의 HaCaT 세포에 대한 독성은 LDH assay를 통해 조사하였다. 그 결과 대조군 11.9%에 비하여 80% EtOH (PR-T), EtOAc (PR-E), H₂O (PR-W) 용매 분획에서 각각 28.5, 17.1, 14.8%로 큰 독성을 나타내지 않았지만, BuOH (PR-B) 용매 분획에서는 39.8%로 비교적 높은 독성을 나타내었다 (Figure 1).

또한, EtOAc 분획 (PR-E)을 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리했을 때, 대조군 10.3%에 비하여 각각 71.5, 9.6, 6.1, 6.6, 8.0%로 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 높은 독성을 나타냈으나, 처리 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 세포독성을 나타내지 않았다 (Figure 2).

EtOAc 분획의 소분획을 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리했을 때, 대조군 8.9%에 비하여 E1, E2, E3, E4, E5 분획에서 각각 17.3, 7.3, 10.7, 8.8, 11.0%로 독성을 나타내지 않았다 (Figure 3).

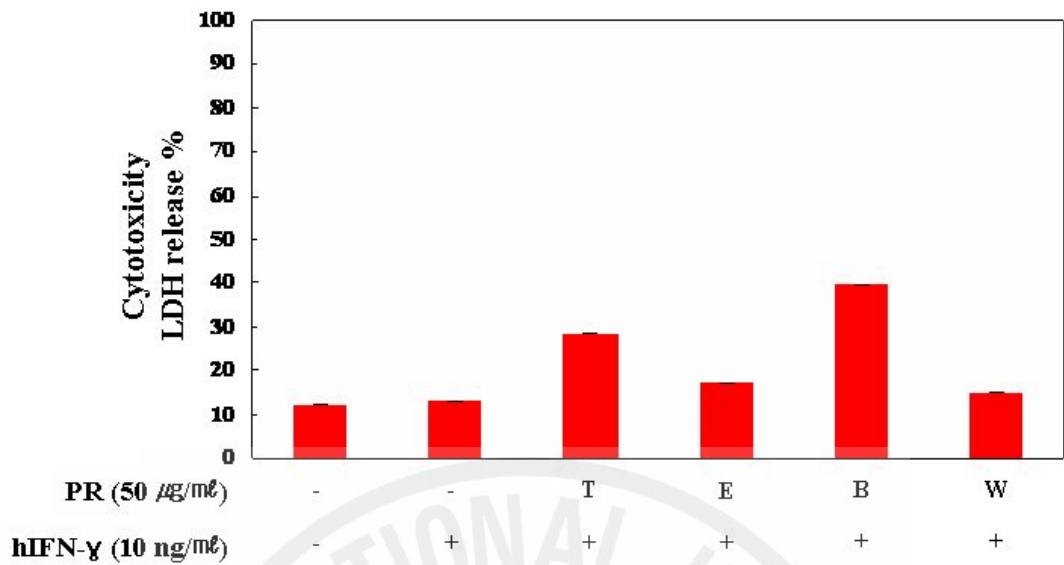


Fig. 1. Cytotoxicity of solvent fractions of *P. yedoensis* on the culture medium of HaCaT human keratinocytes. Cells (2.0×10^5 cells/well) were pre-incubated for 18 hr, and LDH release was measured after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 µg/ml).

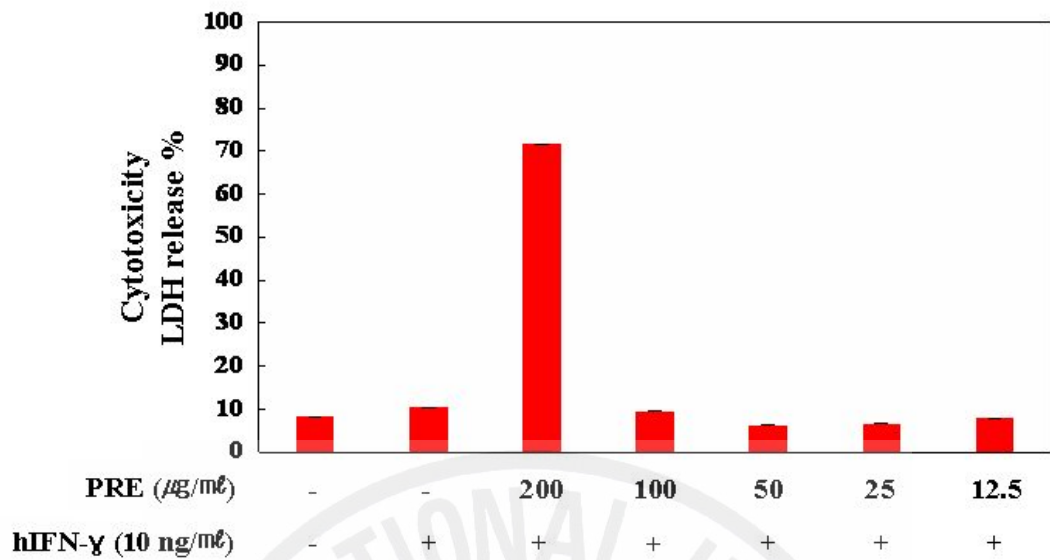


Fig. 2. Cytotoxicity of EtOAc fraction of *P. yedoensis* on the culture medium of HaCaT human keratinocytes. Cells (2.0×10^5 cells/well) were pre-incubated for 18 hr, and LDH release was measured after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis*.

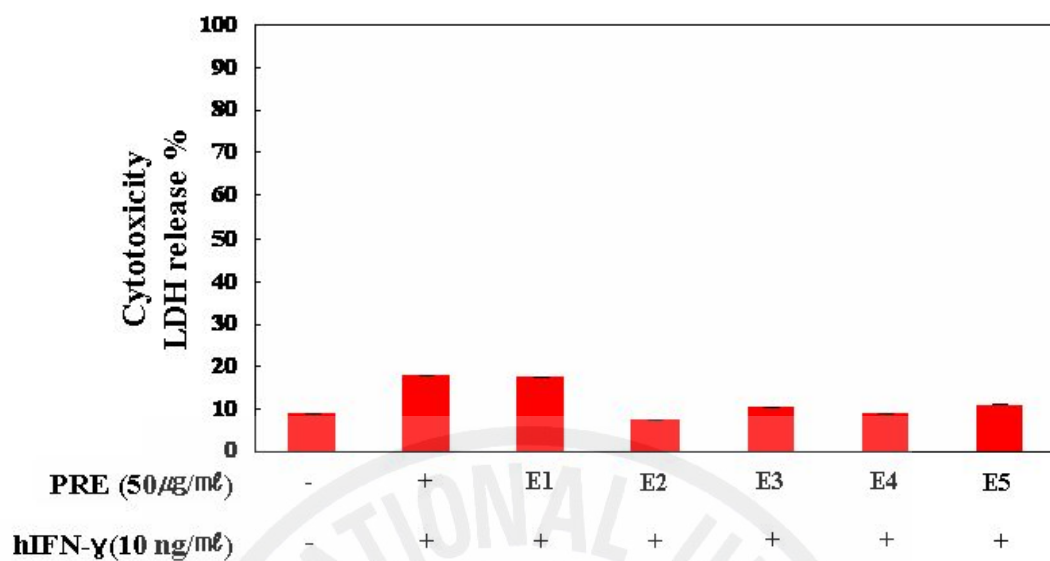


Fig. 3. Cytotoxicity of EtOAc sub-fractions of *P. yedoensis* on the culture medium of HaCaT human keratinocytes. Cells (2.0×10^5 cells/well) were pre-incubated for 18 hr, and LDH release was measured after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 μ g/ml).

2. MDC 와 TARC mRNA 발현에 미치는 영향

hIFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 왕벚나무 수피 용매 분획과 EtOAc 분획의 소분획에 의한 chemokine mRNA 발현 억제정도를 조사하였다.

1) 용매 분획이 MDC 와 TARC mRNA 발현에 미치는 영향

HaCaT 세포에 hIFN- γ (10 ng/ml)를 사용하여 chemokine의 생성을 유도한 후 왕벚나무 수피 추출물 용매분획에 의한 mRNA 발현의 변화정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다. hIFN- γ 에 의해 MDC와 TARC의 mRNA 발현은 대조군에 비하여 증가하였으며, 용매 분획을 50 μ g/ml로 처리한 결과 EtOAc 분획 (PR-E) 처리에 의해서 MDC와 TARC의 mRNA 발현이 현저히 감소하였다 (Figure 4 and 5).

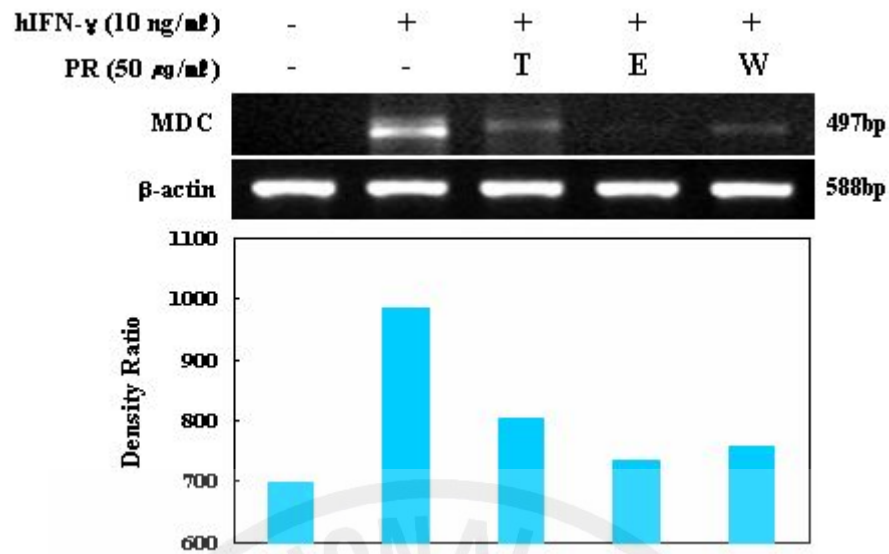


Fig. 4. Inhibition of MDC mRNA expression by solvent fractions of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of MDC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 μ g/ml).

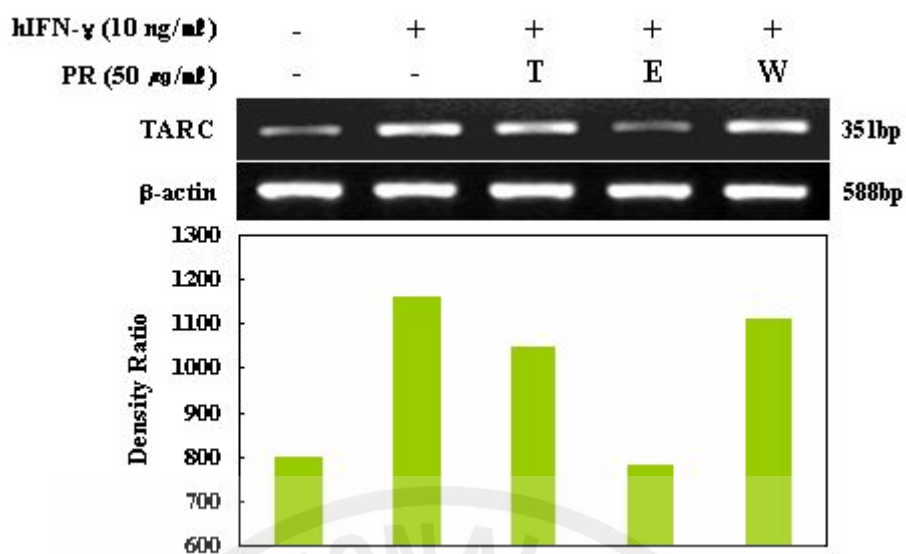


Fig. 5. Inhibition of TARC mRNA expression by solvent fractions of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of TARC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 μ g/ml).

2) EtOAc 분획 및 소분획이 MDC 와 TARC mRNA 발현에 미치는 영향

왕벚나무 수피 추출물 용매분획 중 MDC와 TARC mRNA 발현에 대해 높은 억제효과를 나타낸 EtOAc 분획의 농도별 억제 효과와 EtOAc 분획의 소분획에 의한 억제 효과를 확인하였다. HaCaT 세포에 hIFN- γ (10 ng/ml)를 사용하여 chemokine의 생성을 유도한 후 EtOAc 분획을 HaCaT 세포에 대해 높은 독성을 나타낸 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 제외한, 농도별 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 각각 처리 하여 mRNA 발현 변화정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다. hIFN- γ 에 의해 MDC와 TARC의 mRNA 발현은 대조군에 비하여 증가하였으며, EtOAc 분획은 농도 의존적으로 MDC 발현을 억제하였고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 강한 억제효과를 나타냈다. 또한, TARC의 발현에 대한 억제효과도 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 강하게 나타났으며, 농도 의존적인 TARC 생성 억제효과를 나타내었다 (Figure 6 and 7).

EtOAc 분획의 소분획 (E1, E2, E3, E4 and E5)에 의한 억제효과는, HaCaT 세포에 hIFN- γ (10 ng/ml)를 사용하여 chemokine의 생성을 유도한 후 소분획을 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 mRNA 발현의 변화정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다. hIFN- γ 에 의해 MDC와 TARC mRNA 발현은 대조군에 비하여 증가하였으며, 소분획 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 결과 E5 소분획 (PR-E5)에서 MDC와 TARC mRNA 발현이 현저히 감소하였다 (Figure 8 and 9).

EtOAc 분획의 소분획들 중에서 MDC와 TARC에 대한 높은 억제효과를 나타낸 E5 소분획의 농도별 억제효과를 확인하였다. HaCaT 세포에 hIFN- γ (10 ng/ml)를 사용하여 chemokine의 생성을 유도한 후 E5 소분획을 농도별 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 각각 처리하여 mRNA 발현의 변화정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다. hIFN- γ 에 의한 MDC와 TARC의 발현은 대조군에 비하여 증가하였으며, E5 소분획을 농도별로 처리한 결과 MDC와 TARC mRNA 발현에 대해 농도 의존적으로 억제효과를 보였다 (Figure 10 and 11).

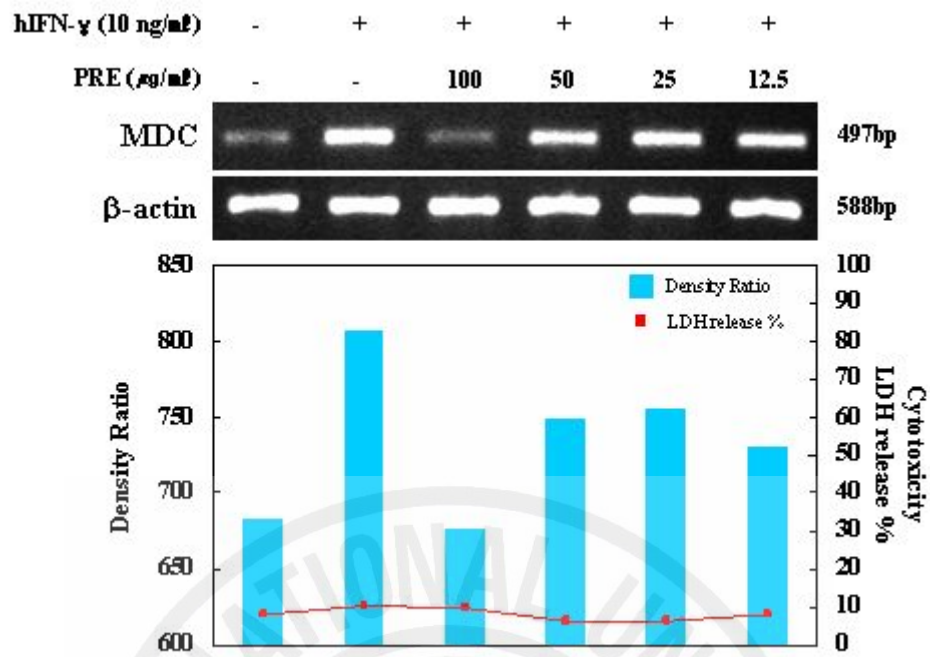


Fig. 6. Inhibition of MDC mRNA expression by EtOAc fraction of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of MDC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (100, 50, 25, 12.5 μ g/ml).

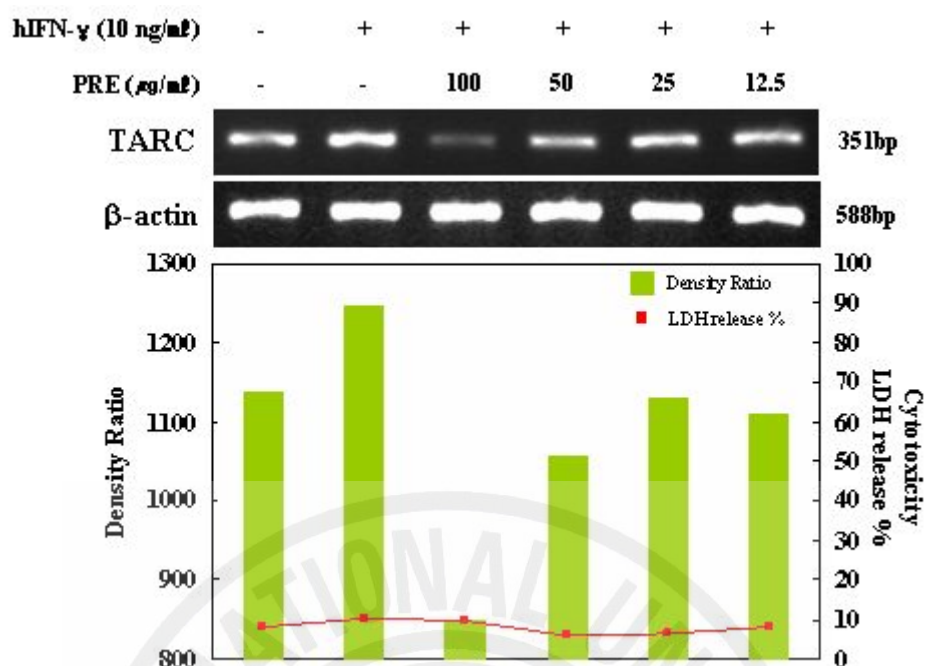


Fig. 7. Inhibition of TARC mRNA expression by EtOAc fraction of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of TARC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (100, 50, 25, 12.5 μ g/ml).

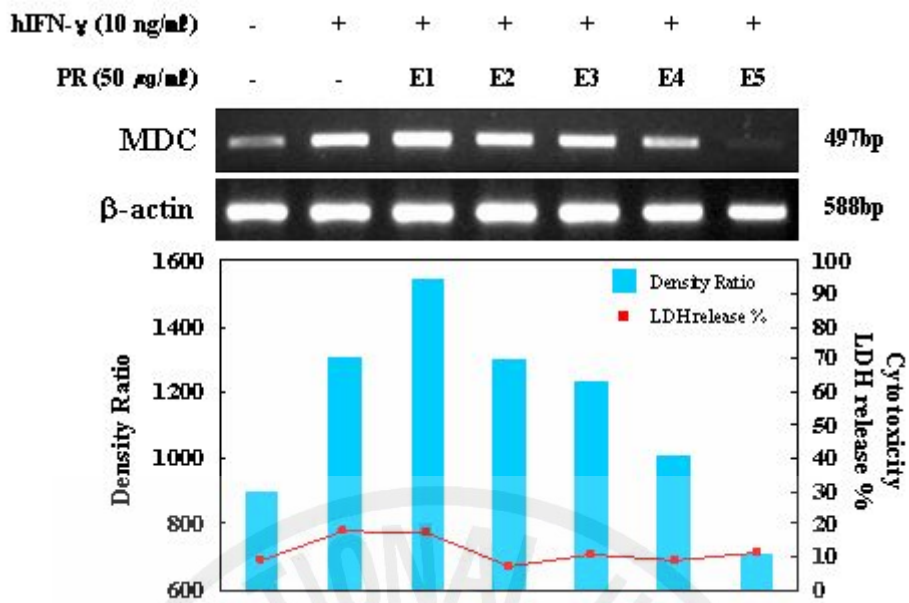


Fig. 8. Inhibition of MDC mRNA expression by EtOAc sub-fractions of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of MDC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 μ g/ml).

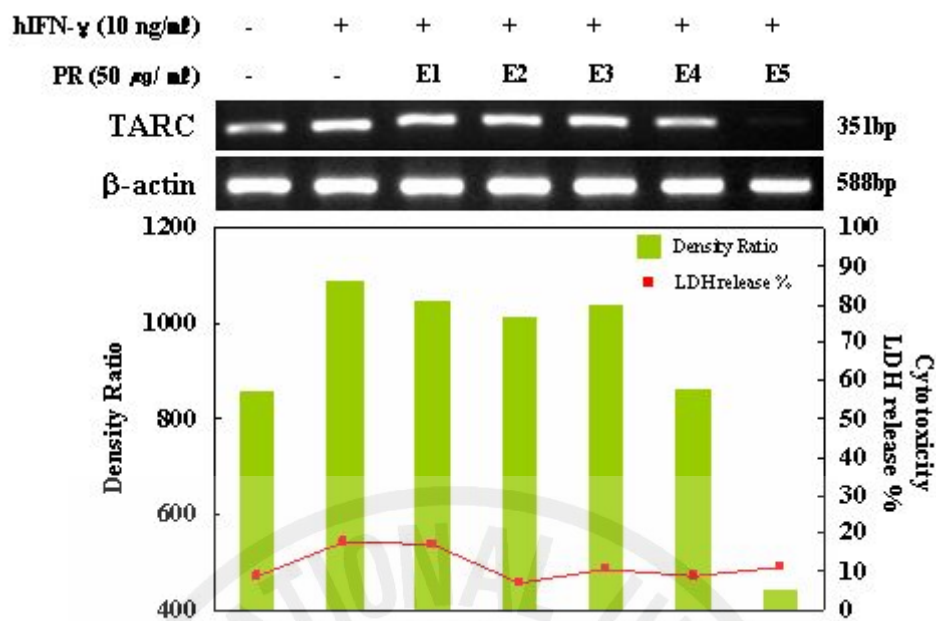


Fig. 9. Inhibition of TARC mRNA expression by EtOAc sub-fractions of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of TARC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 μ g/ml).

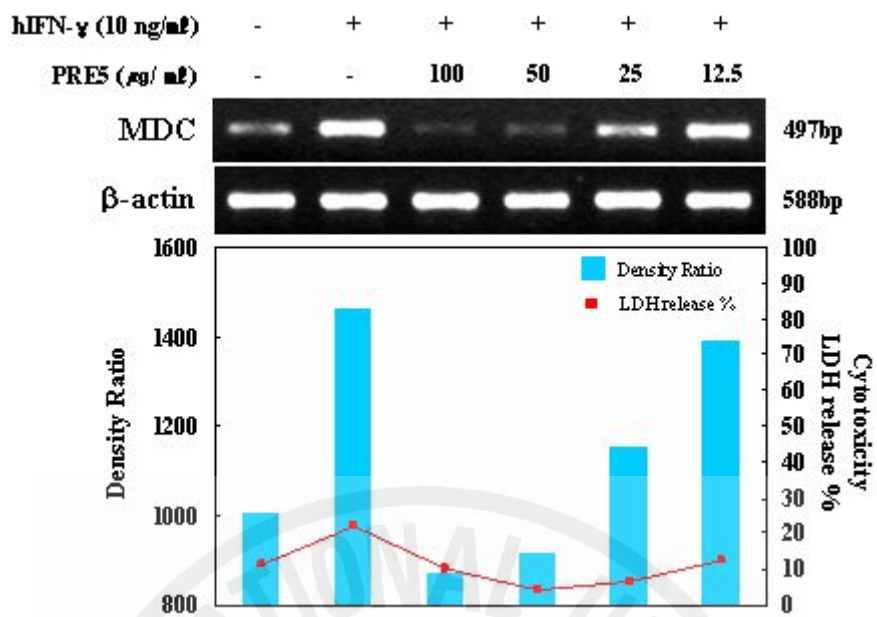


Fig. 10. Inhibition of MDC mRNA expression by EtOAc sub-fraction (E5) of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of MDC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (100, 50, 25, 12.5 μ g/ml).

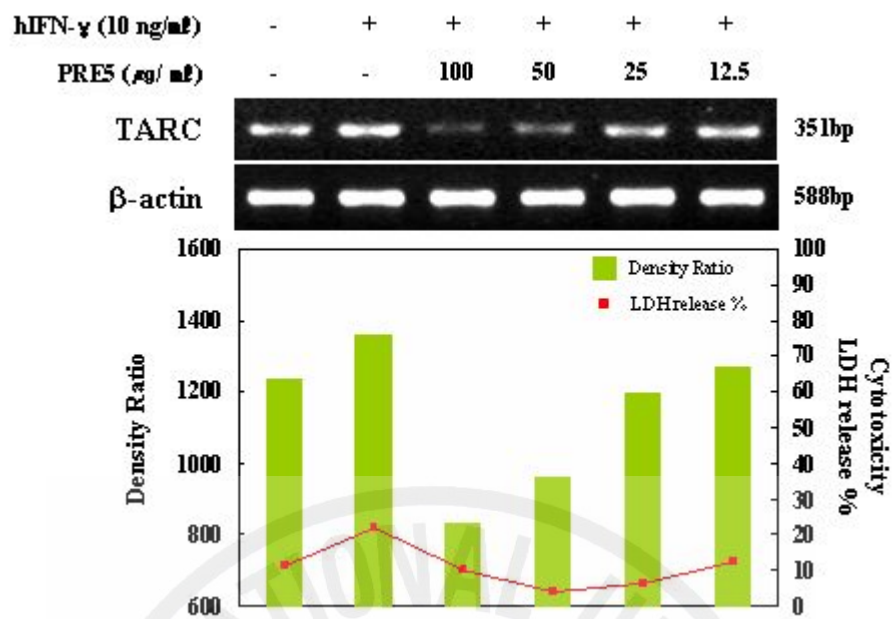


Fig. 11. Inhibition of TARC mRNA expression by EtOAc sub-fraction (E5) of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. Cells (5.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the level of TARC mRNA was determined after 24 hr stimulation with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (100, 50, 25, 12.5 μ g/ml).

3. EtOAc 분획 및 소분획이 Chemokine 양에 미치는 영향

hIFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 생성되는 MDC와 TARC에 대한 왕벚나무 수피 EtOAc 분획의 억제활성을 ELISA 방법으로 조사하였다. hIFN- γ 의 자극에 의해 HaCaT 세포에서 chemokine이 생성되는 것으로 알려져 있고, 이에 따라 hIFN- γ 10 ng/ml을 처리하여 HaCaT 세포에서 MDC와 TARC의 생성을 유도하였다. 여기에 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 농도별 (50, 25, 12.5 μ g/ml)로 처리하여 MDC와 TARC의 생성을 확인하여 본 결과, 50 μ g/ml에서 MDC와 TARC 생성 억제효과를 나타내었고, 농도의존적인 생성 억제효과를 나타내었다 (Figure 12 and 13).

또한, 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 소분획을 50 μ g/ml로 처리하여 MDC와 TARC 생성에 대한 억제효과를 확인하였다. 그 결과 E5 소분획 (PR-E5)에서 MDC와 TARC의 생성을 현저히 억제하였다 (Figure 14 and 15).

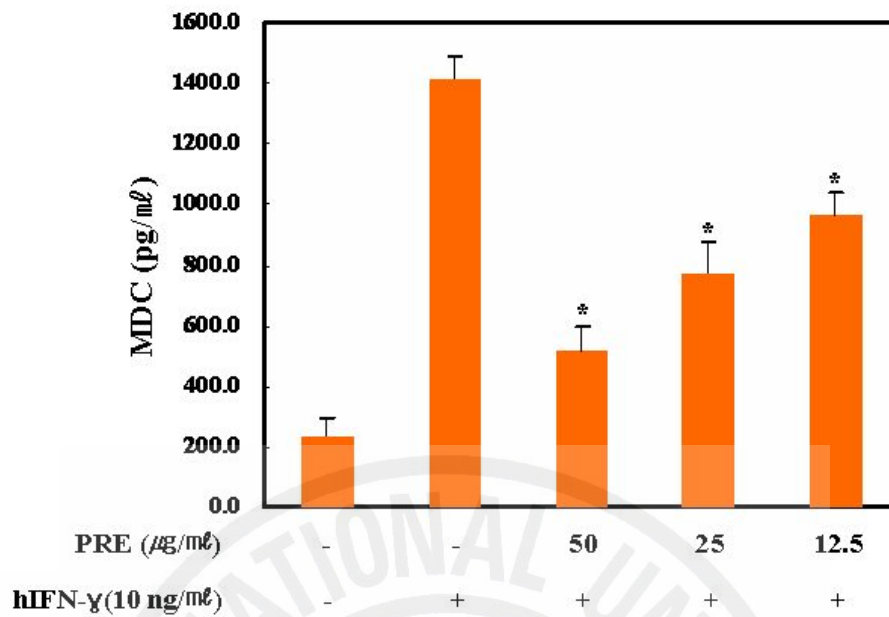


Fig. 12. Inhibition of MDC production by EtOAc fraction of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. MDC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^5 cells/well) stimulated with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* $P < 0.05$: *

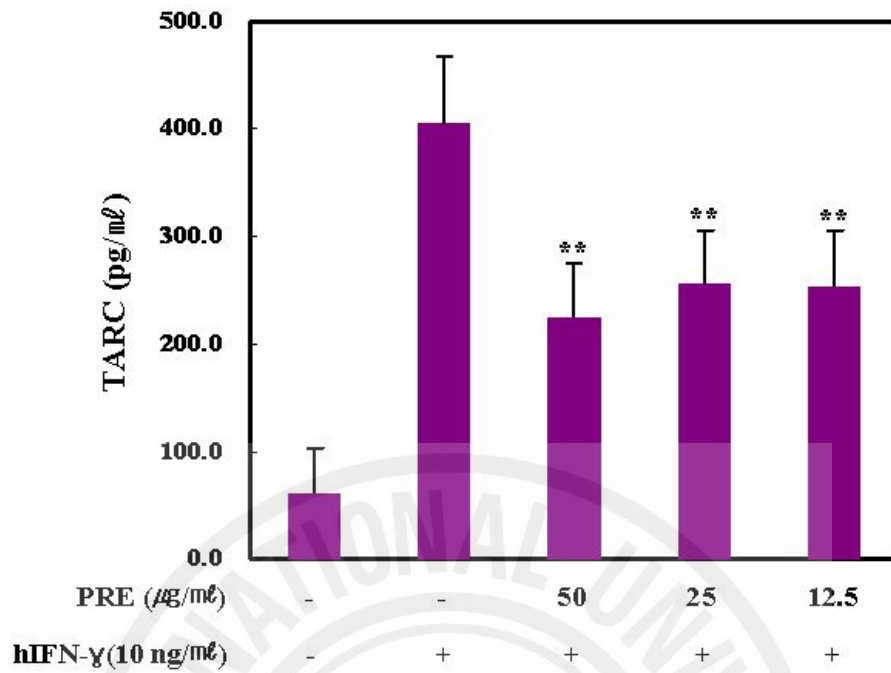


Fig. 13. Inhibition of TARC production by EtOAc fraction of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. TARC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^5 cells/well) stimulated with hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of *P. yedoensis* $P < 0.01$: **

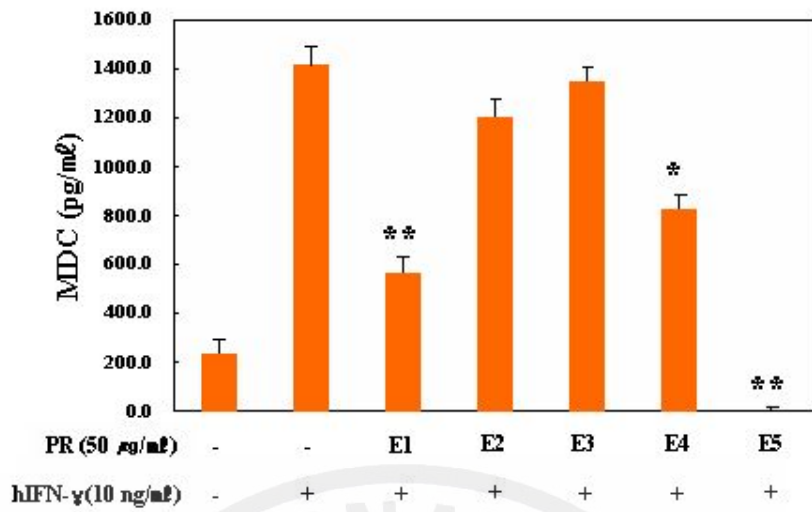


Fig. 14. Inhibition of MDC production by EtOAc sub-fractions of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. MDC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^5 cells/well) stimulated with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 µg/ml). $P < 0.05$: *, $P < 0.01$: **

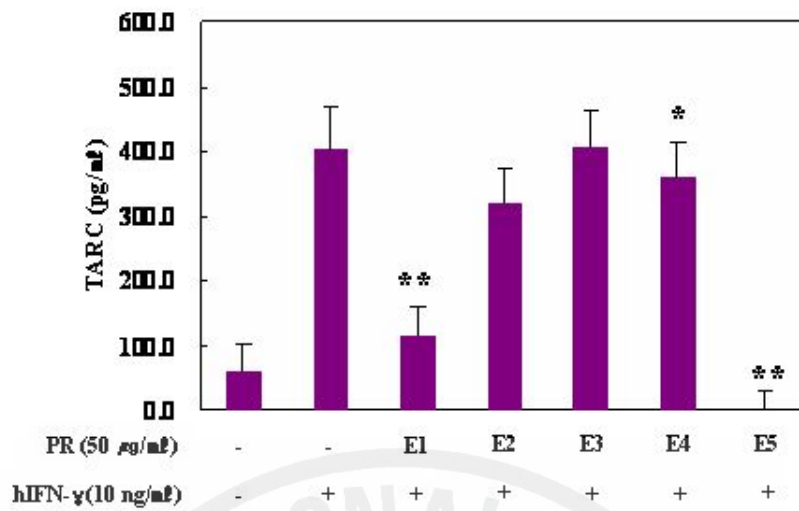


Fig. 15. Inhibition of TARC production by EtOAc sub-fractions of *P. yedoensis* in HaCaT human keratinocytes. TARC concentration in culture medium was measured with ELISA method in HaCaT cells (3.0×10^5 cells/well) stimulated with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 µg/ml). $P < 0.05$: *, $P < 0.01$: **

4. Jak-STAT 신호전달에 미치는 영향

MDC와 TARC 생성에 관련 있다고 알려진 Jak-STAT 신호전달 경로에 대한 왕벚나무 수피 추출물의 영향을 조사하였다. HaCaT 세포를 IFN- γ (10 ng/ml)로 자극하고, EtOAc 분획 (50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$)과 EtOAc 분획의 소분획 (50 $\mu\text{g/ml}$)을 처리 하여 Jak1과 STAT1 발현에 미치는 영향을 western blotting을 통하여 확인하였다. EtOAc 분획을 농도별로 처리한 결과 STAT1 발현에 대한 억제효과를 확인 하지 못하였다 (Figure 16). 반면, EtOAc 분획의 소분획을 처리한 결과 E5 소분획 (PR-E5) 처리에 의해서 STAT1 발현이 현저하게 감소하였다 (Figure 17).

STAT1 발현에 대한 억제효과를 나타낸 E5 소분획의 농도 의존적인 억제효과를 확인하기 위하여, IFN- γ (10 ng/ml)로 자극한 HaCaT 세포에 E5 소분획을 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 Jak1과 STAT1 발현에 미치는 영향을 western blotting을 통하여 확인하였다. 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 소분획 E5를 농도별로 처리한 결과 STAT1 발현을 농도 의존적으로 억제 하였다 (Figure 18).

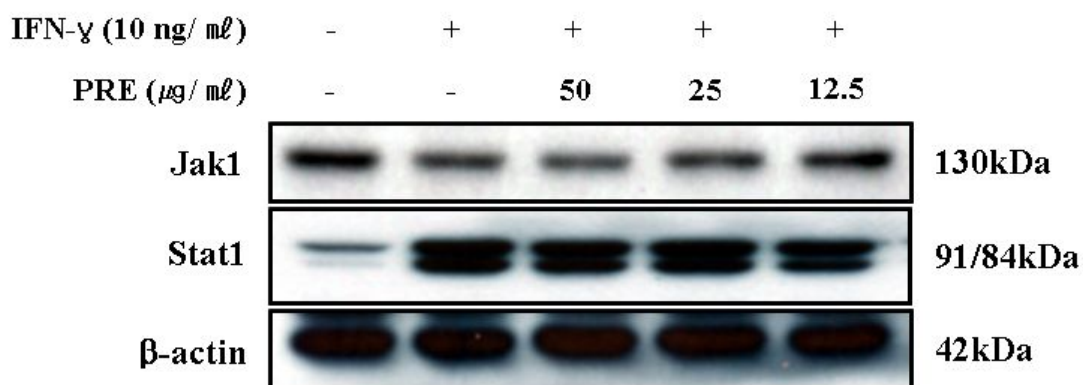


Fig. 16. Effect of EtOAc fraction of *P. yedoensis* on the levels of Jak1 & STAT1 in HaCaT human keratinocytes. HaCaT cells (5×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and further incubated with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50, 25, 12.5 μ g/ml) for 24 hr. Protein levels of Jak1 & STAT1 were determined using Westernblotting method.

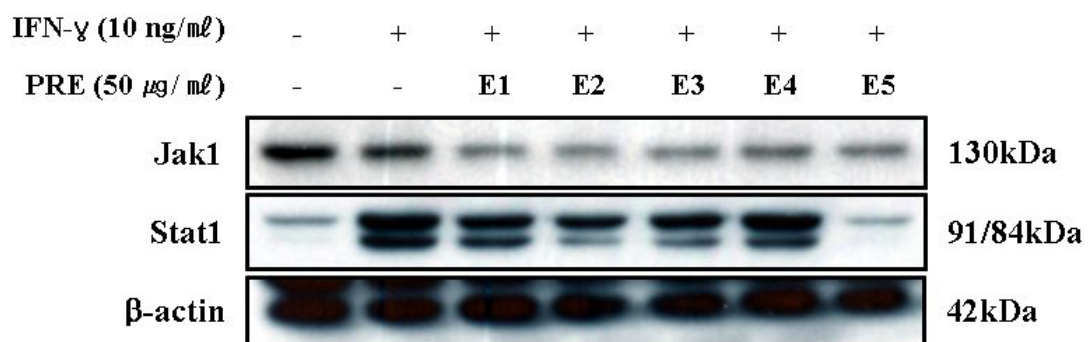


Fig. 17. Effect of EtOAc sub-fractions of *P. yedoensis* on the levels of Jak1 & STAT1 in HaCaT human keratinocytes. HaCaT cells (5×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and further incubated with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (50 μ g/ml) for 24 hr. Protein levels of Jak1 & STAT1 were determined using Westernblotting method.

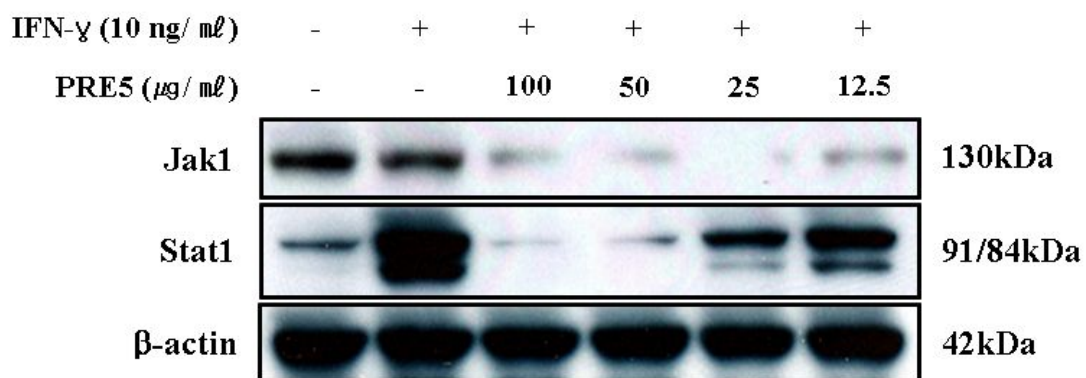


Fig. 18. Effect of EtOAc sub-fraction (E5) of *P. yedoensis* on the levels of Jak1 & STAT1 in HaCaT human keratinocytes. HaCaT cells (5×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and further incubated with hIFN- γ (10 ng/ml) in the presence of *P. yedoensis* (100, 50, 25, 12.5 μ g/ml) for 24 hr. Protein levels of Jak1 & STAT1 were determined using Westernblotting method.

5. 아토피 유발 동물모델에서의 육안적 · 조직학적 결과

1) DNCB 도포 모델

반복적인 DNCB 도포에 의해 아토피 피부염이 유발된 실험동물에서 정상군 (DNCB (-)), 기제만 처리한 군 (DNCB (+))과 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 처리한 군 (DNCB-PRE)을 비교하였다. 육안적 관찰의 결과, DNCB를 반복적으로 도포하고 기제만을 처리한 군에서는 정상군 (Figure 19A)에 비하여 각질층의 손상과 DNCB를 도포한 부분에서 홍반을 관찰할 수 있었다 (Figure 19B). 반면, 왕벚나무 수피 추출물을 처리한 군에서는 각질의 형성, 홍반 등과 같은 증상이 대조군에 비해 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 19C).

조직학적인 관찰을 통해 DNCB와 기제만을 처리한 군에서는 정상군 (Figure 19D)에 비하여 상피 각질층의 탈락, 세포 과형성과 진피의 염증세포 침윤 등이 관찰되었으나 (Figure 19E), DNCB와 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 각질층의 탈락과 상피 내 세포과형성이 대조군에 비해 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 진피에 침윤된 염증세포들이 감소하거나 전체적으로 퍼져있는 양상을 관찰할 수 있었다 (Figure 19F).

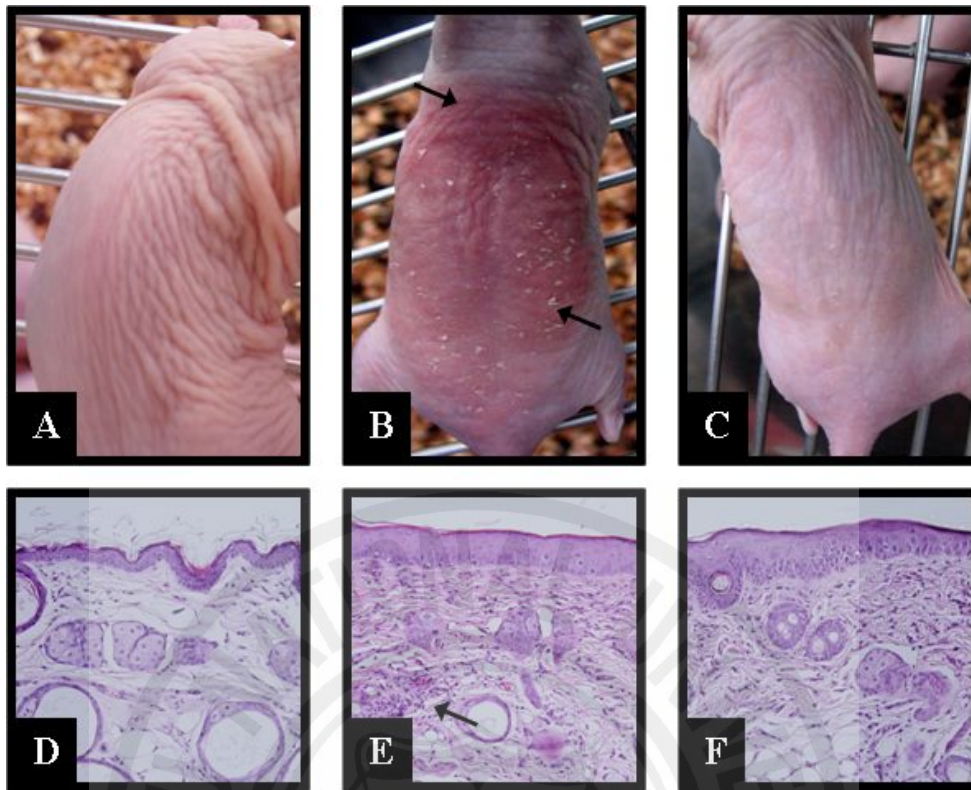


Fig. 19. Naked eye- and microscopic observation of skin tissue treated with DNCB (A, D : DNCB (-) group, B, E : DNCB (+) group, C, F : DNCB-PRE group).

2) Special diets 섭취 모델

Normal diets를 섭취한 군(ND)과 special diets 섭취에 의해 아토피 피부염이 유발된 군(AD)에 대한 왕벚나무 수피 추출물의 효능을 육안, 조직학적인 관찰을 통하여 확인하였다. Special diets를 섭취하여 아토피 피부염이 유발된 군은 normal diets를 섭취한 군 (Figure 20A)에 비하여 각질의 형성정도가 심했고, 피부 표면에 전체적으로 굵은 주름이 나타났다 (Figure 20B). 반면에 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 기제만을 도포한 군에 비하여 각질의 형성정도가 감소하였으나, 피부 표면의 굵은 주름에서는 확연한 차이를 나타내지 않았다 (Figure 20C).

조직학적인 관찰에서 special diets 섭취 후 기제를 처리한 군은 normal diets를 섭취한 군 (Figure 20D)에 비하여 표피의 두께가 증가하고, 각질의 과형성도 확인할 수 있었으며, 진피에 침윤된 염증세포가 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 20E). 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 처리한 군에서는 기제만을 처리한 대조군에 비하여 염증세포의 침윤이 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 육안적인 관찰에서 각질의 형성이 감소함을 확인할 수 있었으나, 조직학적인 관찰을 통해서서는 각질층의 감소나 확연한 표피 두께의 변화를 확인하지 못하였다 (Figure 20F).

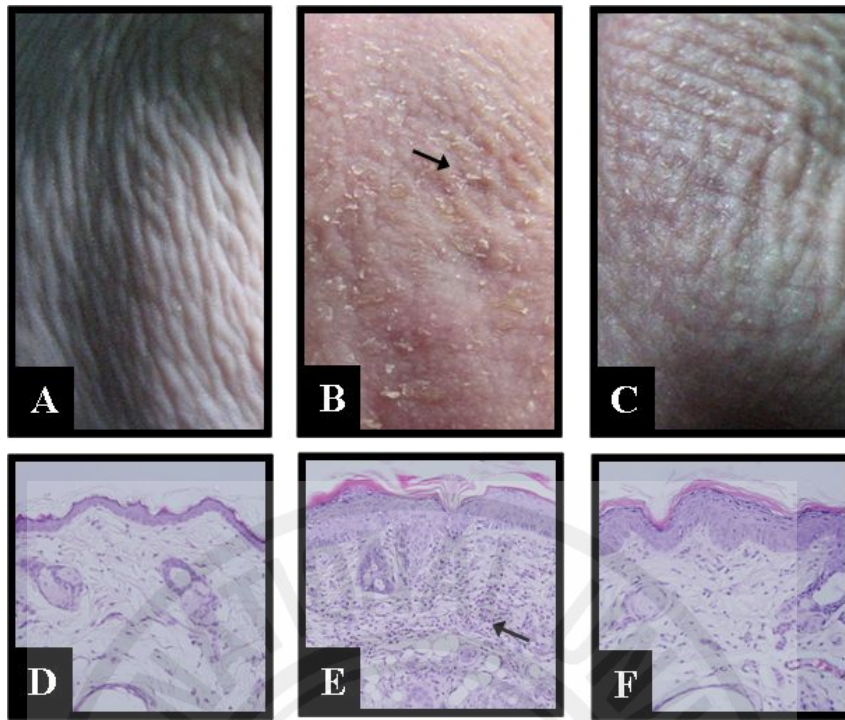


Fig. 20. Naked eye- and microscopic observation of skin tissue in normal and special diet-fed hairless mice (A, D : ND group, B, E : AD-cont. group, C, F : AD-PRE group).

6. 피부표면 수분 및 표피 두께 변화에 미치는 영향

왕벚나무 수피 추출물의 도포가 실험동물의 등 부위 피부표면의 수분과 표피 두께의 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 피부표면 수분 변화에 미치는 영향

DNCB 도포에 의한 아토피 피부염 유발 동물 모델에서 등 피부표면의 수분 변화량을 측정하였다. 0.5% DNCB를 반복적으로 도포하였을 때, 정상군 36.18 ± 1.29 (day 6), 35.36 ± 1.33 (day 16), $35.79 \pm 0.87\%$ (day 26)에 비해 피부표면의 수분이 각각 감소하였다. 0.5% DNCB와 기제를 도포한 군에서는 각각 32.39 ± 1.67 (day 6), 32.24 ± 1.51 (day 16), $32.31 \pm 1.82\%$ (day 26)로 수분의 변화에 큰 차이를 나타내지 않은 반면, 0.5% DNCB와 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 각각 30.81 ± 1.77 (day 6), 32.72 ± 1.36 (day 16), $33.55 \pm 1.87\%$ (day 26)로 피부표면 수분이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다 (Figure 21.)

또한, special diets 섭취 동물모델에서 피부표면 수분을 측정했을 때, normal diets를 섭취한 정상군에서는 각각 36.06 ± 0.88 (10 week), 35.36 ± 1.33 (11 week), $35.68 \pm 0.95\%$ (12 week)인 것에 비하여 special diets를 섭취한 대조군에서 각각 29.49 ± 2.03 (10 week), 29.03 ± 2.13 (11 week), $30.29 \pm 2.08\%$ (12 week)로 피부표면의 수분이 감소하였다. 기제만을 도포한 대조군에서는 수분의 변화가 크지 않은 반면, 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 각각 30.82 ± 1.16 (10 week), 31.76 ± 1.35 (11 week), $31.14 \pm 2.29\%$ (12 week)로 피부표면 수분이 유의적으로 증가하였다 (Figure 22).

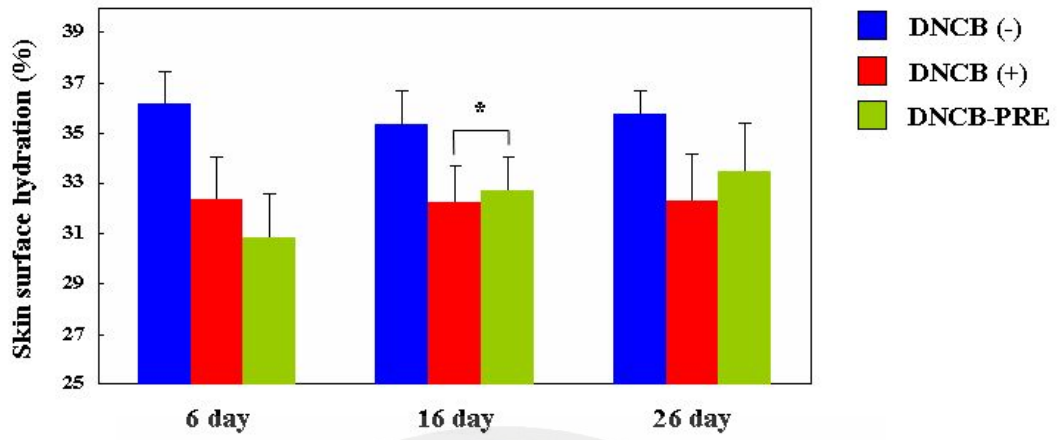


Fig. 21. Changes in the degree of skin surface hydration by DNCB treatment (DNCB (-) : PBS + carrier, DNCB (+) : 0.5% DNCB + carrier, DNCB-PRE group : 0.5% DNCB + 1% PRE). $P < 0.05$: *

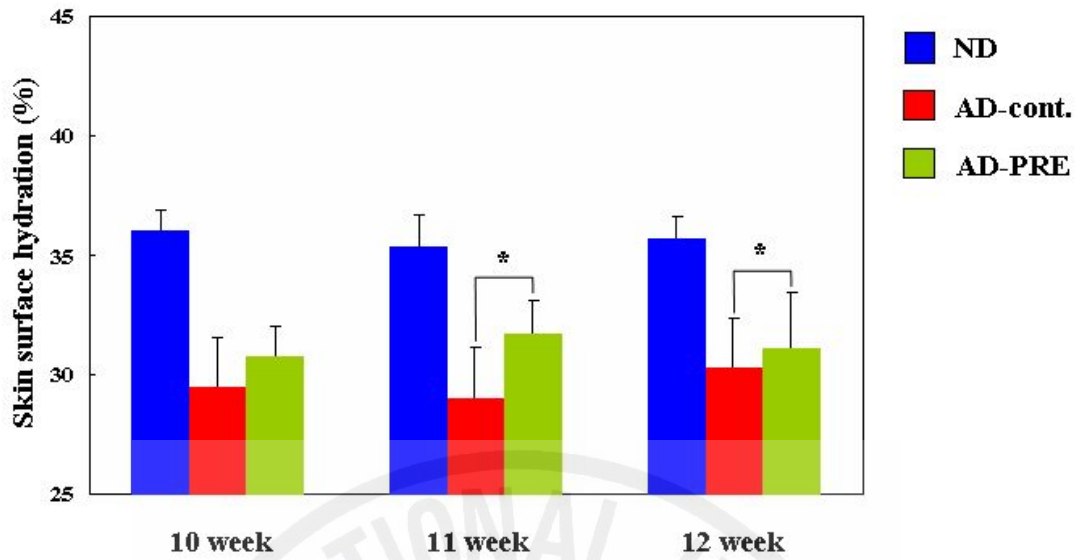


Fig. 22. Changes in the degree of skin surface hydration in normal and special diet-fed hairless mice (ND group : normal diets, AD-cont. group : AD-diets + carrier, AD-PRE group : AD-diets + 1% PRE). $P < 0.05$: *

2) 표피 두께 변화에 미치는 영향

DNCB 도포와 special diets 섭취에 의해 유도된 아토피 피부염 동물 모델에서 왕벗나무 추출물 EtOAc 분획의 도포가 표피 두께 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 0.5% DNCB와 기제를 도포한 군의 표피 두께는 $31.98 \pm 1.49 \mu\text{m}$ 로 정상군 $12.63 \pm 0.81 \mu\text{m}$ 에 비해 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이에 반해 0.5% DNCB와 1% 왕벗나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군은 $26.62 \pm 4.26 \mu\text{m}$ 로 대조군에 비해 표피 두께가 유의적으로 감소되었다 (Figure 23).

또한, special diets를 섭취한 아토피 피부염 동물모델에서도 normal diets를 섭취한 정상군이 $12.63 \pm 0.80 \mu\text{m}$ 인 것에 비해 special diets를 섭취한 군에서 표피 두께가 $35.22 \pm 5.03 \mu\text{m}$ 로 증가한 것을 관찰할 수 있었고, 1% 왕벗나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 $31.32 \pm 2.70 \mu\text{m}$ 로 대조군에 비해 표피 두께가 유의적으로 감소되었다 (Figure 24).

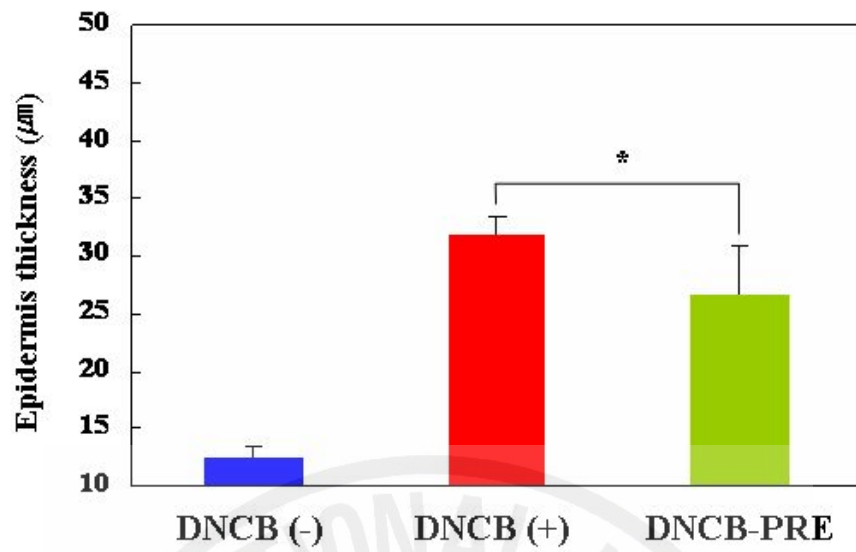


Fig. 23. Changes in epidermis thickness by DNCB treatment (DNCB (-) : PBS + carrier, DNCB (+) : 0.5% DNCB + carrier, DNCB-PRE group : 0.5% DNCB + 1% PRE). $P < 0.05$: *

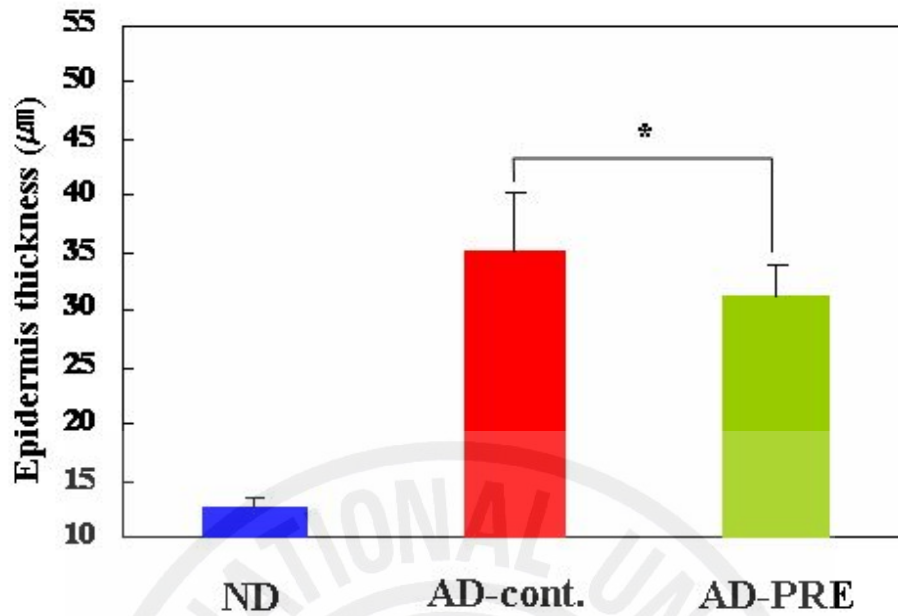


Fig. 24. Changes in epidermis thickness in normal and special diet-fed mice (ND group : normal diets, AD-cont. group : AD-diets + carrier, AD-PRE group : AD-diets + 1% PRE). $P < 0.05$: *

7. 혈청 IgE 생성에 미치는 영향

DNCB 도포와 special diets 섭취에 의해 아토피 피부염이 유발된 군에 대한 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 도포가 실험동물의 혈청 IgE 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 혈청 내 IgE량은 실험 종료 후 ether를 이용하여 실험동물을 마취 시키고 심장 천자 법을 이용하여 채혈한 후 원심분리기로 혈청을 분리하여 IgE량을 mouse serum IgE ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

DNCB 도포에 의해 아토피 피부염이 유발된 실험군에서 기체만을 도포한 군(DNCB (+))과 왕벚나무 수피 추출물을 도포한 군(DNCB-PRE)의 혈청 내 IgE량은 각각 27.79 ± 3.65 와 $25.01 \pm 2.58 \mu\text{g/ml}$ 로 DNCB (+)군에 비해 DNCB-PRE군이 감소하였다 (Figure 25). 또한, normal diets를 섭취한 군(ND)과 special diets의 섭취에 의해 아토피 피부염이 유발된 실험군에서 기체만을 도포한 군(AD-cont.), 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군(AD-PRE)의 혈청 내 IgE량은 각각 0.26 ± 0.03 , 11.12 ± 3.53 , $9.66 \pm 4.97 \mu\text{g/ml}$ 로 ND군에 비해 special diets를 섭취한 실험군에서 혈청 내 IgE량이 증가하였고, AD-PRE군이 AD-cont.군에 비해 혈청 IgE량이 감소하였다 (Figure 26).

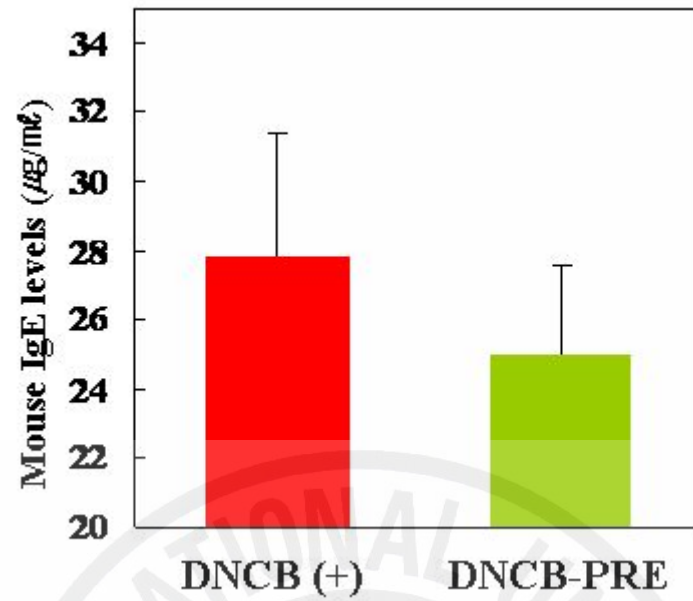


Fig. 25. Changes in serum IgE levels by DNCB treatment (DNCB (+) group : 0.5% DNCB + carrier (PBS + EtOH + Glycerol), DNCB-PRE group : 0.5% DNCB + 1% PRE).

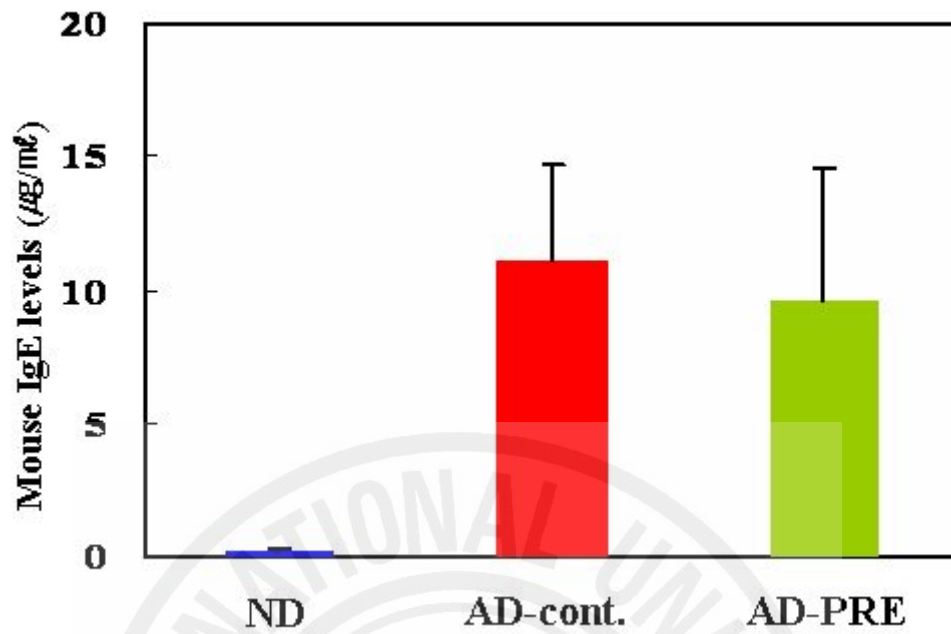


Fig. 26. Changes in serum IgE levels in normal or special diet-fed hairless mice (ND group : normal diets, AD-cont. group : AD-diets + carrier, AD-PR group : AD-diets + 1% PRE).

8. 피부조직 내 mast cell의 침윤에 미치는 영향

DNCB 도포와 special diets 섭취에 의해 아토피 피부염이 유발된 동물 모델에서 왕벚나무 수피 추출물이 mast cell의 진피 내로의 침윤에 미치는 영향을 toluidine blue 염색을 통하여 관찰하였다. 0.5% DNCB와 기제를 도포한 군에서는 DNCB를 처리하지 않은 군에 비하여 mast cell의 진피 내로의 침윤이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었고, 이 때 0.5% DNCB와 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포하여도 mast cell의 진피 내 침윤에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 27).

Special diets에 의한 동물 모델에서는 normal diets를 섭취한 정상군에 비해 special diets를 섭취하고 기제만을 처리한 대조군에서 진피 내로 침윤한 mast cell의 수가 증가한 양상을 나타내었다. 이에 반해 special diets를 섭취한 후 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 대조군에 비해 mast cell의 진피 내 침윤이 감소하는 것으로 관찰되었다 (Figure 28).

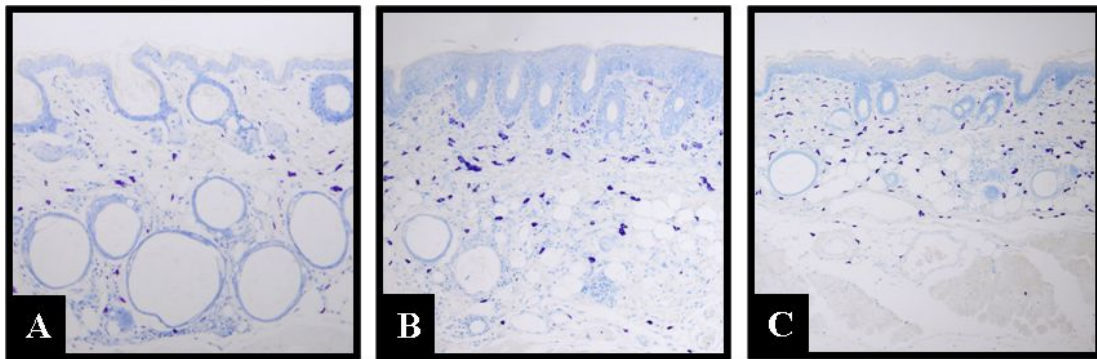
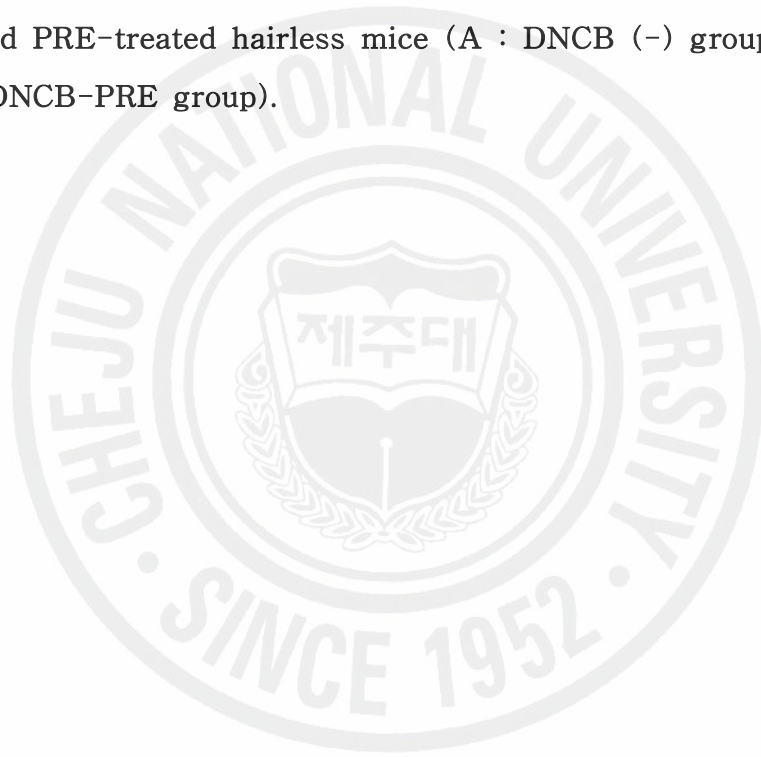


Fig. 27. Changes in the infiltration of mast cells in skin tissue in DNCB and PRE-treated hairless mice (A : DNCB (-) group, B : DNCB (+), C : DNCB-PRE group).



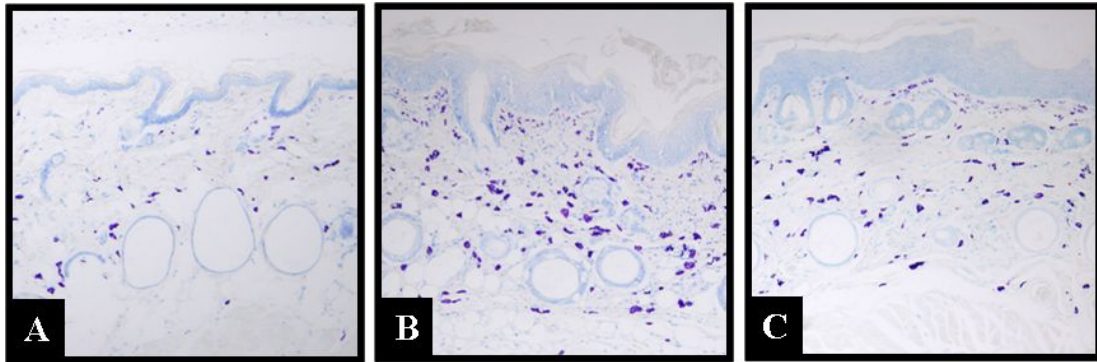
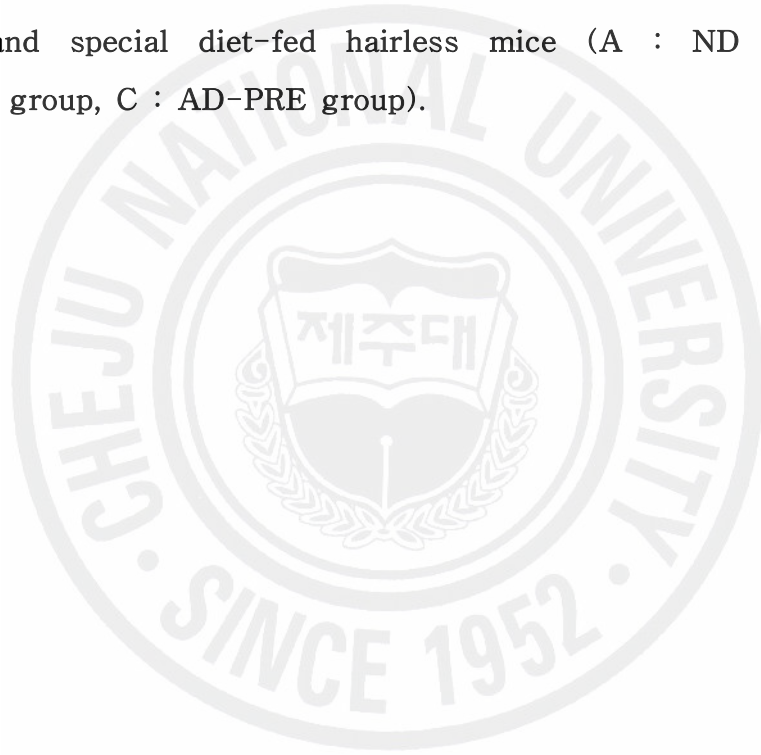


Fig. 28. Changes in the infiltration of mast cells in skin tissue in normal and special diet-fed hairless mice (A : ND group, B : AD-cont. group, C : AD-PRE group).



IV. 고 찰

아토피 피부염은 전 인구의 0.5% ~ 20%에서 발생하는 대단히 흔한 피부질환으로 소아기에 흔히 보이며 소양감, 구질, 태선화, 습진양병변 등의 임상적 소견을 보인다. 원인이나 발병기전은 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않으나 유전적 요인, 환경적 요인, 여러 가지 면역학적 이상 등이 복잡하게 연관되어 작용한다고 알려져 있고, 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염 등의 아토피성 질환의 과거력이나 가족력이 있는 환자에서 흔히 발생하며 임상적 경과가 만성적이며 자주 재발한다고 알려있다 (Kim, 1983; Chang *et al*, 1998; Na, 2005).

아토피 피부염에서 MDC와 TARC의 관련성을 연구한 보고에 따르면 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga 마우스의 피부 병변에서 MDC와 TARC의 발현이 증가하였고 (Vestergaard *et al*, 1999), 아토피 피부염 환자에서 혈청 농도가 증가하였으며, 또한 human keratinocytes 인 HaCaT 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 로 자극 했을 때, MDC와 TARC의 발현이 증가한다는 보고가 있다 (Vestergaard, 2001; Yu, 2002; Xiao, 2003). 따라서 이러한 연구 결과들은 MDC와 TARC가 아토피 피부염 국소 피부병변에서 다량 생산되며 그 결과 CCR4 발현 T 세포의 피부 침윤과 순환 혈액 내 농도가 증가되는 것을 시사 한다고 할 수 있다 (Na, 2005). 이에 본 연구에서는 HaCaT human keratinocytes를 이용하여 MDC와 TARC의 생성을 유도하고, 왕벚나무 수피 추출물이 MDC와 TARC 생성에 대한 억제효과를 갖는지를 조사하였다.

우선 HaCaT 세포에 hIFN- γ (10 ng/ml)를 이용하여 자극하고, 왕벚나무 수피 추출물에 의한 세포독성을 LDH assay를 이용하여 평가하였다. 왕벚나무 수피 추출물의 80% EtOH, EtOAc, BuOH, H₂O 용매 분획에 대한 독성 평가에서는 BuOH 용매 분획이 대조군에 비해 39.8%로 비교적 높은 독성을 나타냈을 뿐, 다른 분획에서는 독성을 나타내지 않았다. EtOAc 분획의 농도별 200, 100, 50, 25, 12.5 μ g/ml에서의 세포에 대한 독성 평가에서는 200 μ g/ml에서 세포 독성을 나타냈지만, 나머지 농도에서는 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다. 또한, EtOAc

분획의 소분획인 E1, E2, E3, E4, E5를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리 했을 때 세포에 대한 독성을 평가한 결과 독성을 나타내지 않았다.

왕벚나무 수피 추출물의 세포독성을 확인 한 후 독성이 없는 농도 범위에서 hIFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 발현되는 MDC와 TARC mRNA에 대한 억제 효과를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 용매 분획 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대한 mRNA 발현 억제효과를 확인한 결과, 80% EtOH 분획과 EtOAc 분획에서 MDC와 TARC mRNA 발현에 대한 억제효과를 확인할 수 있었으며, BuOH 분획을 처리한 실험군에서는 강한 세포독성을 나타내어 제외시켰다.

왕벚나무 수피 추출물의 용매 분획의 MDC와 TARC mRNA 발현에 대한 강한 억제효과를 나타낸 EtOAc 분획의 농도별 억제효과를 확인해 본 결과, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 세포독성을 나타내었지만, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서는 농도의존적인 억제효과를 나타내었다. EtOAc 분획의 소분획인 E1, E2, E3, E4, E5 을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 MDC와 TARC mRNA 발현에 대한 억제효과를 확인하여 본 결과, E5 소분획에서 강한 억제효과를 나타내었다. 또한, E5 소분획을 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리 하였을 때, MDC와 TARC mRNA 발현에 대한 농도 의존적인 억제효과를 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과를 바탕으로 HaCaT 세포에 hIFN- γ 로 자극하여 생성되는 MDC와 TARC에 대한 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 억제 정도를 ELISA assay를 통해 정량분석 하였다. EtOAc 분획을 농도별로 처리했을 때, MDC와 TARC mRNA 발현 억제 양상과 비슷한 양상으로 MDC와 TARC의 생성을 억제했다. 이는 MDC와 TARC의 생성이 왕벚나무 수피 추출물을 처리에 의한 mRNA 발현 억제를 통해 조절되어 나타난 결과로 보여진다. 또한, EtOAc 분획의 소분획들에 대한 MDC와 TARC 생성 억제 효과를 확인하여 본 결과, E3, E4와 E5 소분획에서 mRNA 발현 억제효과와 유사한 양상을 보였으며, E5 소분획의 강한 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다. 하지만, E1 소분획의 경우에는 RT-PCR을 통한 mRNA 발현 억제효과가 나타나지 않았지만, ELISA assay를 통한 protein 생성 억제효과 평가에서는 MDC와 TARC의 생성을 억제한 것으로 나타났다.

IFN- γ 는 다양한 세포 종류에서 STAT, ERK, p38 MAP kinase 등을 활성화시

킨다고 알려져 있고, HaCaT 세포에 TNF- α 와 IFN- γ 를 함께 처리를 했을 때 TARC의 생성을 증가시키고, IFN- γ 를 단독으로 처리하였을 때에는 STAT1의 인산화와 처리 후 약 1시간 내의 약한 p38의 인산화가 나타난다는 보고가 있다 (Komine, 2005). 또한, HaCaT 세포에서 IL-4와 IFN- γ 의 자극에 의해서 MDC의 생성이 증가한다는 보고가 있으며 (Bonecchi, 1998), MDC와 TARC의 생성에는 STAT, NF- κ B and AP-1 sites가 관여한다는 보고가 있다 (Nakayama, 2004). 이와 관련해서, IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 생성되는 MDC와 TARC에 대한 왕벚나무 수피 추출물의 억제효과가 MDC와 TARC 생성에 관여한다고 생각되는 Jak-STAT pathway의 Jak1과 STAT1에 미치는 영향을 Western blotting을 통하여 확인하여 보았다.

먼저, HaCaT 세포에 hIFN- γ 을 10 ng/ml로 처리하고 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 농도별로 처리하여 Jak1 (130 kDa)과 STAT1 (91/84 kDa)에 대한 억제효과를 확인해 보았다. 그 결과 EtOAc 분획의 농도 의존적인 억제효과를 확인하지 못했다. 하지만, EtOAc 분획의 소분획인 E1, E2, E3, E4 와 E5를 처리했을 때는 mRNA 발현 억제 양상이나 단백질 정량을 통한 결과와 비슷한 양상을 보였고, E5 소분획에서 STAT1에 대한 강한 억제 양상을 나타냈다. 또한, E5 소분획의 STAT1에 대한 농도 의존적인 억제 효과도 확인할 수 있었다. E5 소분획이 Jak-STAT pathway의 신호전달에 관여하는지를 확인하기 위하여 시료 처리 후 1시간 동안 시간에 따른 Jak1과 STAT1 단백질의 인산화에 대한 영향을 연구 중에 있다.

아토피 피부염의 면역학적 이상소견의 하나로 아토피 피부염 환자에서 혈청 IgE 가 정상인에 비해 증가되어 있으며, 일반적으로 증가의 정도는 피부염의 증상이 심할수록 더 큰 것으로 알려져 있다 (Chang, 1998). 항원에 의해 감작된 IgE 항체는 주로 호염기구 또는 비만 세포와 결합하여 항원 항체 반응을 일으키는데 이때 세포질 내에서 과립이 방출되어 반응을 일으키면서 유리된 히스타민, 각종 염증이나 조직을 파괴시키는 화학전달 물질 등에 의해 온몸으로 전달되며 각종 알레르기 반응 즉, 피부발진, 두드러기, 천식, 아토피 피부염, 비염 등을 일으키며 여러 가지 문제를 야기 시킨다는 보고가 있다 (Cho, 2001). 또한, 알레르기 증상의 대부분은 비만세포나 호산구가 분비하는 히스타민 등의 염증반응 때

개물질에 의해서 기도, 피부 등의 상피세포 주변의 모세혈관의 확장, 면역 세포의 유입, 근육의 수축과 점액 분비물의 증가에 따른 소양, 부종, 충혈, 기침, 가래 등의 임상적 증상으로 나타난다는 보고가 있다 (White, 1990; Min, 2004).

다양한 아토피 피부염 동물 모델 중, 피부염을 인위적으로 일으키는 hapten 형성물질인 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)나 TNCB (2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene)를 도포하거나, special diets 섭취를 통한 아토피 피부염 동물 모델은 피부 표면 수분과 두께의 변화, 조직학적인 관찰을 통한 다양한 염증세포의 침윤, 혈청 IgE 수준의 변화 등과 같은 지표를 통해 아토피 피부염 동물 모델에 적합하다는 연구 결과가 있다 (Matsumoto, 2004; Fujii, 2005; Baik, 2005; Fujii, 2006).

이에 human keratinocytes인 HaCaT 세포 실험에서 활성이 확인된 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 아토피 피부염 인자 억제 활성을 *in vivo*에 적용시키고자, DNCB 도포와 special diets 섭취로 유도된 아토피 피부염 동물 모델을 통해 그 효과를 알아보았다. 먼저, DNCB 도포에 의해 아토피 피부염이 유발된 실험 동물 모델에서 0.5% DNCB와 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획의 도포에 의한 육안적인 변화, 조직학적인 변화, 등 피부 표면의 수분 변화, 표피 두께의 변화와 혈청 IgE 수준의 변화를 살펴보았다. 0.5% DNCB와 기제만을 도포한 대조군에서 정상군에 비해 등 부위에서 붉은 주름, 홍반과 함께 심한 각질이 일어나 있는 것을 관찰할 수 있었고, H&E 염색을 통해서 진피에 침윤된 많은 염증세포와 표피 두께의 증가를 확인할 수 있었다. 또한, 정상군에 비해 등 피부 표면의 수분이 감소하고, 혈청 IgE 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 0.5% DNCB와 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 함께 도포한 실험군에서는 대조군에 비해 등 부위의 주름, 홍반, 각질 등이 감소함을 관찰할 수 있었고, 진피 내 염증세포의 수와 표피 두께가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 대조군에 비해 등 피부 표면의 수분이 증가하고, 혈청 IgE 수준이 감소한 양상을 보였다. 하지만, toluidine blue를 이용한 mast cell 관찰에서는 대조군과 실험군에서 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획과 DNCB를 함께 도포함으로써 인한 계속된 알러젠의 유입으로 mast cell의 침윤이 감소하지 않은 것으로 생각된다.

Special diets 섭취에 의한 아토피 피부염 동물 모델에서는 special diets를 섭취하고 기제만을 도포한 군이 normal diets를 섭취한 군에 비해서, 심한 각질의 형성, 표피 두께의 증가, 등 피부 표면의 수분 감소, 혈청 IgE 수준의 증가를 확인할 수 있었다. 이에 반해 special diets를 섭취하고 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포한 군에서는 기제만을 도포한 군에 비해 등 피부에 일어난 각질의 형성이 줄어들고, 표피 두께의 감소, 피부 표면의 수분의 증가, 혈청 IgE 수준의 감소를 확인할 수 있었다. Toluidine blue의 염색을 통한 mast cell의 관찰에서도 normal diets를 섭취한 군에 비해 special diets를 섭취한 군에서 mast cell의 진피 내로의 침윤이 현저하게 증가한 것을 관찰할 수 있었고, 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 처리한 군에서는 기제만을 처리한 군에 비해 mast cell의 침윤이 감소한 양상을 확인할 수 있었다.

본 실험 결과를 요약하면, 왕벚나무 수피 추출물의 EtOAc 분획과 E5 소분획이 *in vitro* 에서 아토피 피부염 인자인 MDC와 TARC의 발현과 생성 억제 효과를 나타냈으며, Jak-STAT pathway 신호전달과 관련된 STAT1에 대한 억제효과를 나타냈다. 또한 DNCB 도포와 special diets 섭취에 의해 아토피 피부염이 유도된 동물 모델에 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 처리 했을 때, 피부표면 수분의 증가, 표피 두께의 감소, 혈청 IgE 수준의 감소와 같은 증상 완화 효과를 나타냈다. 이러한 결과들은 천연식물로부터 아토피 피부염의 예방 및 치료를 위한 활성 성분의 분리와 작용기전 연구에 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

V . 참 고 문 헌

- 이창복. 1999. 대한식물도감. *향문사*. 454
- B. Strobl, V. Arulampalam, H. Is'harc, S. J. Newman, J. F. Schlaak, D. Watling, A. P. Costa-Pereira, F. Schaper, I. Behrman, K. C.F. Sheehan, R. D. Schreiber, F. Horn, P .C. Heinrich and I. M. Kerr. 2001. A completely foreign receptor can mediate an interferon- γ -like response. *The EMBO journal*. Vol. 20 No. 19. 5431-5442.
- B. Yu, T. Koga, K. Urabe, Y. Moroi, S. Maeda, Y. Yanagihara and M. Furue. 2002. Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast. *Journal of dermatological science*. 30:29-36.
- C. Esche, A. de Benedetto and L. A. Beck. 2004. Keratinocytes in atopic dermatitis: Inflammatory signals. *Current allergy and asthma reports*. 4:276-284.
- C. Jakubzick, H. Wen, A. Matsukawa, M. Keller, S. L. Kunkel and C. M. Hogaboam. 2004. Role of CCL4 ligands, CCL17 and CCL22, during schistosoma mansoni egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. *American journal of pathology*. Vol. 165, No. 4. 165:1211-1221.
- C. Vestergaard, H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani and K. Matsushima. 1999. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *The journal of clinical investigation*. 104:1097-1105.
- C. Vestergaard, N. Kirstejn, B. Gesser, J. T. Mortensen, K. Matsushima and C. G. Larsen. 2001. IL-10 augments the IFN- γ and TNF- α induced TARC production in HaCaT cells: a possible mechanism in the

- inflammatory reaction of atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*. 26:46-54.
- H. A. Jung, H. Y. Chung, J. H. Jung and J. S. Choi. 2004. A new pentacyclic triterpenoid glucoside from *Prunus serrulata* var. *spontanea*. *Chem. Pharm. Bull.* 52(1):157-159.
- I. J. Lee. 2002. Epidermal cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis. *Yonsei Univ.*
- J. A. Belperio, M. Dy, L. Murray, M. D. Burdick, Y. Y. Xue, R. M. Strieter and M. P. Keane. 2004. The role of the Th2 CC Chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *The journal of immunology*. 173:4692-4698.
- J. K. Han. 2005. Effect of kami-dangkueejja(KDKEJ) in atopic dermatitis animal model. *Daejeon Univ.*
- J. H. Choi. 2000. Skin barrier function strangeness in atopic dermatitis. *Asthma and allergy*. Vol. 20. 5:693-694.
- K. J. Rozyk, T. Targowski, E. Paluchowska, W. Owczarek and A. Kucharczyk. 2005. Serum thymus and activation-regulated chemokine, Macrophage-derived chemokine and eotaxin as marker of severity of atopic dermatitis. *Allergy*. 60:685-688.
- K. Matsumoto, K. Mizukoshi, M. Oyobikawa, H. Ohshima and H. Tagami. 2004. Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Research and Technology*. 10:122-129.
- K. Matsumoto, K. Mizukoshi, M. Oyobikawa, H. Ohshima, Y. Sakai and H. Tagami. 2005. Objective evaluation of the efficacy of daily topical applications of cosmetics bases using the hairless mouse model of atopic dermatitis. *Skin Research and Technology*. 11:209-217.
- K. Y. Chang, S. Y. Cho, H. J. Kang and J. H. Hahm. 1998. Clinical and

- laboratory relevance of atopic dermatitis to its degree of severity. *Ewha Med J.* Vol. 21, No. 3. 181–187.
- L. B. Ivashkiv and X. Hu. 2004. Signaling by STATs. *Arthritis research* 6:159–168.
- L. Chen, O. Martinez, L. Overbergh, C. Mathieu, B. S. Prabhakar and L. S. Chan. 2004. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin exp immunol.* 138:375–387.
- L. P. Ngoc, D. R. Gold, A. O. Tzianabos, S. T. Weiss and C. Celedon. 2005. Cytokines, allergy, and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology.* 5:161–166.
- M. C. Park. 2003. The efficacy of Sihocheonggan-san extract to improve the function of stratum corneum on mice model after atopic dermatitis elicitation. *Dongguk Univ.*
- M. Fujii, J. Tomozawa, N. Mizutani, T. Nabe, K. Danno and S. Kohno. 2005. Atopic dermatitis-like pruritic skin inflammation caused by feeding a special diet to HR-1 hairless mice. *Experimental Dermatology.* 14:460–468.
- M. Fujii, T. Nabe, J. Tomozawa and S. Kohno. 2006. Involvement of skin barrier dysfunction in itch-related scratching in special diet-fed hairless mice. *European Journal of Pharmacology.* 530:152–156.
- M. Komine, T. Kakinuma, S. Kagami, Y. Hanakawa, K. Hashimoto and K. Tamaki. 2005. Mechanism of thymus- and activation-regulated chemokine(TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. *J invest dermatol.* 125:491–498.
- M. Matsumoto, C. Ra, K. Kawamoto, H. Sato, A. Itakura, J. Sawada, H. Shio, H. Suto, K. Mitsuishi, Y. Hikasa and H. Matsuda. 1999. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *The Journal of Immunology.* 162:1056–1063.

- M. V. White. 1990. The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy clin immunol.* 86:599-605.
- M. Y. Kim. 1983. A clinical observation of patients with atopic dermatitis in childhood. *Chungnam medical journal.* Vol. 10, No. 2. 361-365.
- R. Bonncchi, S. Sozzani, J. T. Stine, W. Luini, G. D'Amico, P. Allavena, D. Chantry and A. Mautovani. 1998. Divergent effects of Interleukin-4 and Interferon- γ on Macrophage-Derived Chemokine production : An amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood.* Vol. 92, No. 8. 2668-2671.
- S. E. Cho. 2001. A study on skin care & medical treatment of atopic dermatitis as pathologic point of view. *Kongju communication arts college a collection of learned papers.* Vol. 8. 637-651.
- S. K. Han, J. Y. Song, Y. S. Yun, S. Y. Yi. 2002. Gamma irradiation-reduced IFN- γ expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 35, No. 6. 583-589.
- S. Maeda, S. Fujiwara, K. Omori, K. Kawano, K. Kurata, K. Masuda, K. Ohno and H. Tsujimoto. 2002. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 88:79-87.
- S. M. Best, K. L. Morris, J. G. Shannon, S. J. Robertson, D. N. Mitzel, G. S. Park, E. Boer, J. B. Wolfenbarger and M. E. Bloom. 2005. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of virology.* 12828-12839.
- S. Till, R. Dickason, D. Huston, M. Humbert, D. Robinson, M. Larche, S. Durham, A.B. Kay and C. Corrigan. 1997. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4⁺ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J allergy Clin Immunol.* 99:563-9.
- T. Horikawa, T. Nakayama, I. Hikita, H. Yamada, R. Fujisawa, T. Bito, S.

- Harada, A. Fukunaga, D. Chantry, P. W. Gray, A. Morita, R. Suzuki, T. Tezuka, M. Ichihashi and O. Yoshie. 2002. IFN- γ -inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *International immunology*. 7:767-773.
- T. Kakinuma, K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, M. Komine, A. Asahina and K. Tamaki. *Clin exp immunol*. 127:270-273.
- T. Nakayama, K. Hieshima, D. Nagakubo, E. Sato, M. Nakayama, K. kawa and O. Yoshie. 2004. Selective induction of Th2-attracting chemokine CCL17 and CCL22 in Human B cells by Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr virus. *Journal of virology*. Vol. 78, No. 4. 1665-1674
- T. Xiao, S. Kagami, H. Saeki, M. Sugaya, T. Kakinuma, H. Fujita, S. Yano, H. Mitsui, H. Torii, M. Komine, A. Asahina, K. Nakamura and K. Tamaki. 2003. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF- α and IFN- γ enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *Journal of dermatological science*. 31:111-117.
- W. Baumer, U. Seegers, M. Braun, T. Tschernig and M. Kietzmann. 2004. TARC and RANTES, but not CTACK, are induced in two models of allergic contact dermatitis. Effects of cilomilast and diflorasone diacetate on T-cell-attracting chemokines. *British Journal of Dermatology*. 151:823-830.
- Y. G. Min. 2004. Effects of Sopoongsangagambang administration along with external spray treatment on atopic dermatitis development in NC/Nga mice. *Dongshin Univ*.
- Y. H. Baik. 2005. Salviae miltiorrhizae root inhibits atopic dermatitis in the DNCB-induced atopic dermatitis NC/Nga mice. *Kyung Won Univ*.
- Y. H. Na. 2005. Role of chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Pediatric allergy and respiratory disease*. Vol 15, No. 3. 238-241.

Y. Shinada, K. Takehara and S. Sato. 2004. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological science*. 24:201-208.



VI . 적 요

본 연구에서는 천연물로부터 효능이 뛰어난 아토피 피부염 관련 염증 인자 억제 활성물질을 찾기 위하여 왕벚나무 수피를 채집하여 계통적인 방법에 의하여 추출하고, 그 추출물에 의한 아토피 피부염 관련 염증 인자에 대한 억제효과를 조사하였다.

벚나무의 열매 및 줄기는 수종, 유선염, 통경제, 기침, 담마진, 우육제 등의 민간약으로 이용되어 왔다. 하지만, 그와 관련된 성분의 생리 활성에 대한 보고는 벚나무 잎의 항산화 활성과 줄기 껍질에서 항알레르기 효능이 있다는 보고만 있을 뿐, 아토피 피부염 관련 인자에 대한 생리 활성과 관련된 보고는 거의 없는 실정이다. 이에 HaCaT human keratinocytes에 interferon γ (IFN- γ)로 자극을 주어 유도되는 chemokines (MDC와 TARC)와 이와 관련된 Jak-STAT pathway의 Jak1과 STAT1에 대한 왕벚나무 수피 추출물의 억제 활성을 조사하였다. 또한, DNCB 도포와 special diets 섭취로 유도된 아토피 피부염 동물 모델에 대한 왕벚나무 수피 추출물의 효과를 확인하였다.

결과, 왕벚나무 수피 추출물을 용매 분획별로 처리하였을 때 IFN- γ (10 ng/ml)로 자극한 HaCaT 세포에서 EtOAc 분획이 MDC와 TARC mRNA 발현에 대한 현저한 억제 효과를 보였으며, EtOAc 분획의 E5 소분획에서 MDC와 TARC의 mRNA와 protein level에 대한 강한 억제 효과를 나타내었다. Jak-STAT pathway의 Jak1과 STAT1에 대한 억제 정도를 확인하기 위해 IFN- γ (10 ng/ml)로 자극을 주고 EtOAc 분획의 E5 소분획을 처리 하였을 때, STAT1에 대한 농도의존적인 억제 효과를 확인할 수 있었다. 또한, DNCB 도포와 special diets 섭취에 의해 유도된 아토피 피부염 동물 모델에서 1% 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획을 도포하였을 때, 육안적·조직학적 피부 상태 변화, 피부표면 수분, 표피 두께, 혈청 IgE 수준과 같은 아토피 피부염 관련 인자에 대한 효과를 확인할 수 있었다.

결과적으로, *in vitro*와 *in vivo* 에서 왕벚나무 수피 추출물 EtOAc 분획 및 소분획의 아토피 피부염 관련 염증 인자에 대한 억제 활성을 확인할 수 있었으며,

이러한 결과들은 천연식물로부터 아토피 피부염의 예방 및 치료를 위한 활성 성분의 분리와 작용기전 연구에 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

Key word : 왕벚나무, 아토피 피부염, MDC/CCL22, TARC/CCL17, Jak-STAT pathway, HaCaT keratinocyte, 아토피 피부염 동물 모델



감사의 글

넘어야 할 한계가 없다면 도착한 후의 기쁨은 반으로 줄어든다.

건너야 할 어두운 계곡이 없다면 정상에서의 경이로움은 반으로 줄어든다.

- 헬렌 켈러 (Helen Keller)

유은숙 교수님께서 졸업선물로 주신 책에서 “달콤한 도전”의 한 구절입니다. “도전”은 제가 좋아하는 단어입니다. 새로운 도전으로 생각했던 석사 과정을 마무리하는 이 시점에서 지난 대학원 생활을 돌아보면 웃음과 안도의 한숨이 납니다. 저의 새로운 도전에 도움과 격려를 주신 여러분들에게 이 지면을 빌어 감사의 말씀을 전하고자 합니다. 먼저, 부족한 저에게 관심과 조언을 아끼지 않으시며, 믿고 이끌어 주신 유은숙 교수님께 정말 감사드립니다. 또한, 논문의 부족한 부분을 세심하게 지적해 주신 강희경 교수님과 박덕배 교수님께도 감사하다는 말씀을 전하고 싶습니다. 그리고 대학원 과정동안 늘 관심과 조언으로 학문의 길로 이끌어 주신 이영기 교수님, 이봉희 교수님, 강현욱 교수님, 정영배 교수님, 맹영희 교수님, 조문제 교수님, 고영상 교수님, 현진원 교수님, 이근화 교수님, 김수영 교수님, 조수현 교수님, 은수용 교수님께도 감사드립니다.

그리고, 많은 조언을 해주신 남권호 선생님과 생화학 교실의 영미 누나, 희경이 누나, 지은 누나, 경아, 미생물학 교실의 지현 누나, 정은이와 약리학 교실의 상철이형, 재희, 엘비라 선생님, 과사에서 많이 도와준 명선이에게 고마움을 전합니다. 모든 면에서 큰 힘이 되어 준 혜자 누나, 새로운 도전으로 이끌어준 원종이형, ‘동기사랑 나라사랑’을 외치며 함께 고생했던 정일이와 진영이, 매일 티격태격 고생하면서 많은 도움을 준 은진이, 시기를 잘못 맞춰 열떨결에 고생한 선순이와 동물실험에 많은 도움을 주신 병리학 교실 이정희 선생님께 감사의 마음을 전합니다.

힘들었던 시간 함께 하며 잠시나마 내게 웃음을 주던 인라인 동호회 INNO 여러분들께도 감사의 마음을 전합니다. 오랜 시간 끈끈한 우정을 나누며 서로에게 힘이 되어준 태일이, 철수, 민호, 영민이와 사촌동생 챙겨준다고 신경써준 정윤이형, 옆에서 힘내라며 많이 챙겨준 미정이에게 감사하단 말을 전합니다.

많은 격려해 주신 큰 어머니, 작은 아버지, 작은 어머니와 외할아버지, 외할머니와 영화, 영이, 영욱, 영우, 영숙 이모와 이모부, 윤호, 철호 삼촌과 부족한 아들을 믿고 응원해 주시는 아버지와 어머니, 멀리서 많은 응원을 보내주는 누나와 매형에게 감사하다는 말씀을 전합니다.

앞으로 더 열심히 하는 모습 보이는 경진이가 되겠습니다. 감사합니다.