

비자의 항균 및 알레르기성 접촉 피부염 개선 작용 연구

최찬현 · 이승인 · 임순호¹ · 정현우*

동신대학교 한의과대학, 1: 동신대학교 제약공학과

Study on the Improvement Effect of Antibacterial and Allergic Contact Dermatitis on Torreyae Semen Extracts

Chan Hun Choi, Soong In Lee, Soon Ho Yim¹, Hyun Woo Jung*Department of Korean Medicine Pathology, College of Korean Medicine,
1: Department of Pharmaceutical Engineering, Dongeui University

The purpose of this study was to investigate the efficacy of Torreyae semen extract against antimicrobial and allergic contact dermatitis to explore its utility as a herbal resource. To this end, the antibacterial effects of Torreyae Semend extracted with hot water and ethanol (30%, 60%, 90%) were investigated using *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *pseudomonas aeruginosa*, and *Propionibacterium acnes*. And observed the anti-atopic dermatitis efficacy with a mouse model that allergic contact dermatitis induced by DNCB. Experimental results showed that the antibacterial activity against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* was significantly higher in the hot water extract of Torreyae Semen. We observed that the extracts of 30% ethanol and hot water of Torreyae Semen inhibited growth in a concentration-dependent manner in *P. acnes* & *S. epidermidis*. We observed that the administration of hot water extracts and 30% ethanol extract of Torreyae Semen significantly reduce the thickness of ear & back and gross skin condition compared to the control group in the mice with allergic contact dermatitis. As a result of H & E histological staining, it was observed that the Torreyae Semen extraction group had markedly reduced epidermis and skin thickness, granules, and keratinization compared to the control group. The groups administrated with Torreyae Semen hot water extracts had decreased TNF- α and IL-10 contents compared with the control group. As a result, Torreyae Semen may be used as a useful herbal resource because it has a certain level of antibacterial and anti-atopic effects.

keywords : Torreyae Semen, antibacterial, allergic contact dermatitis, Hot water extraction, and Ethanol extraction

서론

비자(榧子)는 우리나라 제주도 및 남부지방에 주로 분포하는 주목과(朱木科 : Taxaceae)에 속한 상록교목인 비자나무(榧) *Torreya nucifera* (L.) Siebold & Zucc.의 열매로, 가을에 열매가 익었을 때 따서 육질의 가종피(假種皮)를 제거하고 씻어 말린 약재이다¹⁾. 한의학적으로 비자는性は平하고,味는甘하며,肺·胃·大腸으로歸經하고殺蟲,消積,潤燥通便,潤肺하는효능을지니고있으며,주로회충,구충,조충,蟲積腹痛,疳積,肺燥咳嗽,腸燥便秘,痔瘡를치료한다¹⁻³⁾.

비자에 대한 연구는 한의서에 기재된 효능에 근거하여 구충 및 살충 효과에 중점을 둔 연구^{4,5)}와 비자의 생리활성 물질을 분석하고 다양한 플라보노이드와 폴리페놀 성분을 중심으로 항산화 효과를 규명하는 연구들이 진행되었고⁶⁻⁸⁾, 이러한 비자의 항산화 효능을 응용하여 화장품 원료 등의 기능성 소재로서 산업화되기도 하였

다^{9,10)}.

알레르기성 질환은 산업의 발달과 환경오염으로 인해 선진국을 중심으로 급격히 증가하는 추세로¹¹⁾, 사회적 문제로 크게 부각되고 있으나 서양의학의 대표적 치료제인 스테로이드제, 항히스타민제의 도포나 복용이 부작용으로 인해 지속적 사용이 제한되어 부작용이 적은 천연 소재 발굴 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 단일 한약 재료써는 상엽(桑葉), 자초(紫草), 단삼(丹蔘), 소엽맥문동(小葉麥門冬), 백굴채(白屈菜), 감송향(甘松香), 화피(樺皮), 백선피(白鮮皮), 현삼(玄蔘), 우방자(牛蒡子) 등이 항아토피 소재로서의 효능이 연구되었다¹²⁻¹⁶⁾.

저자들은 기능성 생물 소재로서의 비자의 활용성을 높이기 위해서 기존의 항균 및 항산화 기능에 대한 효능성 뿐 아니라 알레르기성 접촉 피부염에 대한 효능 검증이 필요하다고 판단하였고, 이에 비자의 추출법에 따른 항균 및 알레르기성 접촉 피부염에 대한 효능을 확인하여 항균 및 항아토피 효과를 지닌 기능성 생물소재로

Hyun-Woo Jeong, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam

E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr · Tel : +82-61-330-3524

Received : 2019/07/16 · Revised : 2019/09/11 · Accepted : 2019/11/15

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.12.33.6.341

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

서의 개발 가능성을 타진해 보고자 하였다.

이를 위해 비자나무 열매인 비자를 열수 추출 및 에탄올 농도 변화(30%, 60%, 90%)에 따라 추출한 후 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* 균주를 이용하여 항균효과를 관찰하였으며, DNCB로 알레르기성 접촉 피부염을 유발시킨 생쥐 모델을 이용하여 항아토피 피부염 효능을 관찰한 바 소기의 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 비자

실험에 사용된 시료는 비자 추출물이며, 비자(*Torreya Semen*)는 전남 나주시 다도면 불회사¹⁷⁾ 인근에서 자생하고 있는 朱木科에 속한 상록교목인 비자나무 *Torreya nucifera* (L.) Siebold & Zucc.에서 자연낙과한 성숙한 열매만을 채취한 후 음건하여 사용하였다.

2) 균주

실험에 사용된 균주인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*는 한국생명공학연구원 생물자원센터(BRC)에서 분양받아 사용하였다.

3) 동물

기관내 실험동물윤리위원회(승인번호: 2015-09-03-02)의 승인 후 동물실험 전문업체인 (주)샘타코에서 7주령의 수컷 Balb/c 계통의 생쥐 (23±2 g)를 구매하였고 사육장 반입 후 식품의약품안전처에서 고시한 동물실험시설 규정에 적합한 시설에서 1주일 간 적응시켰다. 적응기간 중에는 고형사료와 물을 충분히 공급하였고, 12시간 명암주기 및 실내온도 (24±2°C)와 습도 (55±5%)를 일정하게 유지하였다.

2. 방법

1) 시료추출

비자를 각각 열수(DW), 에탄올(EtOH) 30%, 60%, 90%로 추출한 시료를 사용하였다. 비자 50 g을 각각 플라스크에 넣고 1,000 mL의 추출 용매에 충분히 비자를 침전시킨 후 Heating mantle를 이용하여 환류 열수 추출 및 에탄올 농도 변화(30%, 60%, 90%)에 따른 추출 등, 추출방법에서 조건을 달리하여 추출하였다. 환류추출의 온도는 105°C, 에탄올 추출은 80°C로 설정하여 4시간 동안 추출하였다. 이 후 여과한 추출물을 동결 건조하여 사용하였으며 비자 50 g을 열수 추출과 에탄올로 추출하였을 때 동결건조 양은 열수로 추출한 경우 1.322 g 이었고 EtOH 30%로 추출한 경우 0.534 g, EtOH 60%는 0.638g, EtOH 90%는 1.084g 이었다.

2) Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

항균활성 평가를 위해 계대 배양된 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 배양액을 100 µl씩 분주한 후 멸균 면봉을 이용하여 도말하여 준비하였고, 비자 추출물 시료를 직경 8 mm의 paper

disc에 각각 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml 농도로 천천히 흡수시킨 뒤 건조조정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 그 후 각각의 균들을 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 37°C에서 24시간 배양한 후 paper disc 주위의 저해환 (clear zone, mm)의 크기로 항균활성을 비교하였다.

3) Growth inhibitory activity 측정

시료에 따른 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*에 미치는 항균력에 대한 최소생장농도를 결정하기 위하여 MIC(Minimal Inhibitory concentration) 시험법으로 확인하였다. 균주 배양은 각각의 균주를 활성탄소 가스팩을 넣어 혐기성 상태를 유지시켜 배양하였고 시험은 duplicate로 하였으며, 시료의 항균활성의 정도는 18시간 후의 O.D값을 측정함으로써 최소 저해 농도를 확인하였다.

4) 비자 추출물의 알레르기성 접촉 피부염 효능 평가

(1) 알레르기성 접촉 피부염 병태모델 유발

4-dinitrochlorobenzene (DNCB, Sigma, USA)를 이용하여 알레르기성 접촉 피부염(Atopic dermatitis, AD) 병태모델¹⁴⁾을 만들었다. acetone과 olive oil을 4대 1로 섞은 혼합액 (Acetone Olive Oil, AOO)에 DNCB를 1% 비율로 희석한 혼합용액을 제모한 생쥐의 피부에 도포하여 AD를 유발하였다. 등 부위와 귀 부위에 AOO액과 DNCB가 혼합된 용액을 10일간 1회/2일씩 총 5회에 걸쳐 각각 30 µl와 50 µl씩 도포하여 최종적으로 알레르기성 접촉 피부염을 유발하였다.

(2) 실험군 분류

정상군 (Normal group)은 제모 후 AD를 유발시키지 않고, AOO만을 도포한 군으로, 대조군 (Control group)은 DNCB로 AD를 유발하고, AOO를 도포한 군으로 1 DW(1 mg DW group)는 DNCB로 AD를 유발하고, 열수 추출물 1 mg를 1일 1회 투여한 군으로, 3 DW(3 mg DW group)는 DNCB로 AD를 유발하고, 열수 추출물 3 mg를 1일 1회 투여한 군으로, 1 EtOH(1 mg EtOH group)은 DNCB로 AD를 유발하고 30% EtOH 추출물 1 mg를 1일 1회 투여한 군으로, 3 EtOH(3 mg EtOH group)는 DNCB로 AD를 유발하고, 30% EtOH 추출물 3 mg를 1일 1회 투여한 군으로 설정하였다. 실험군은 총 5군으로 다음과 같이 분류하였다.

(3) 귀 및 등 피부 두께 측정

AD로 유발된 생쥐에서 시료 투여로 변화된 귀 두께와 등 피부 두께를 측정하기 위하여 실험 마지막 날 생쥐를 희생시킨 후, 등과 귀의 피부를 절제한 후 디지털 캘리퍼 (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 각각의 두께를 측정하였다.

(4) 피부 표면의 육안적 관찰 및 Symptom score 판정

실험기간 동안의 시료 투여에 따른 AD의 변화 정도를 관찰하기 위하여 각 군별 생쥐의 등 부위를 Digital camera (Samsung, Korea)로 촬영하였고, 이를 기초로 생쥐의 등에 발생한 피부질환의 병변 정도를 관찰하여 수치화하였으며 피부 부종과 종창의 정도를 다음의 기준에 따라 판정하였다.

(5) 피부의 조직학적 관찰

실험이 끝난 후 등 피부의 조직학적 관찰을 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E)염색을 실시하였다. 희생된 생쥐로부

터 AD가 유발된 부위의 피부 조직을 절취해 10% 포르말린에 고정 한 후, 파라핀에 포매한 후 미세절단기 (Leica, Germany)를 이용하여 4mm 두께로 잘라 슬라이드 글라스위에 부착하였다. 부착된 조직으로부터 파라핀을 제거하고 hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색한 후 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다(x 100).

(6) L-10 및 TNF- α 측정

혈청 내 IL-10와 TNF- α 양을 측정하기 위해서 최종적으로 실험을 마친 생쥐에게서 채혈한 후 혈청을 분리하여 Biotin conjugate 50 μ l를 첨가해 incubation한 후 washing buffer로 세척한 후 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 다시 실온에서 30분 동안 incubation한 후 washing buffer로 4회 세척하고, stabilized chromogen을 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차폐된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 stop solution을 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 Microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

5) 통계방법

수집된 데이터 중 통계적 유의성을 검증하는 것이 필요한 것은 통계프로그램인 IBM SPSS Statistics 25을 사용하여 유의성을 검증하였다. 각 실험군 간의 데이터 비교는 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 사용하였고 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법을 활용하였으며 p-value가 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 인정하였다.

Table 1. Scoring criteria for the mice skin condition

Score	Skin condition
0	Conditions without skin lesions
1	Conditions with a slight coloring
2	Conditions with severe coloring and erythema
3	Conditions with erythema and snowfall
4	Conditions with erythema, bloodstain, and snowfall
5	Conditions with severe erythema, bloodstain, and snowfall

결 과

1. 항균효능 평가

1) Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

S. aureus, *S. epidemidis*, *P. aeruginosa*균주에 대해 비자를 열수 추출, 30% 에탄올, 60% 에탄올, 90% 에탄올로 추출하여 각각의 항균활성을 확인하였다(Table 2, Fig. 1). 시료를 disc당 0.5, 1.0, 2.0 mg이 되도록 paper disc에 흡수시킨 뒤 disc를 중심 으로 생성된 저해환 (clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교 하였고 그 결과 비자 열수 추출물 시료가 *S. aureus*, *S. epidemidis*, *P. acnes* 모든 균주에서 2.0 mg/disc, 1.0 mg/disc 농도에서 항균 활성이 관찰되었다.

2) Growth inhibitory activity 측정

(1) *Propionibacterium acnes*

비자 열수 추출, 30% 에탄올, 60% 에탄올, 90% 에탄올, 4가지 시료에 대한 생육저지농도를 결정하기 위하여 각 시료를 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml로 serial dilution하여 시험하였고 그 결과 *P. acnes* 균에서의 MIC는 DW, 30% EtOH, 60%

EtOH, 90% EtOH 추출물의 2 mg/ml 농도에서 약 32~39% 정도 고르게 생육 저지를 하였으며, 농도 의존적인 항균 효과를 나타냈다(Table 3, Fig. 2).

(2) *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis*에서의 4가지 시료에 대한 생육 저지농도를 결정하기 위하여 각 시료를 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml로 serial dilution하여 시험한 결과 열수 추출물, 30% EtOH 추출물에서만 2 mg/ml은 약 47%, 1 mg/ml은 약 40% 정도 생육 저지를 하여 농도 의존적인 항균 효과가 관찰되었다 (Table 4, Fig. 3).

Table 2. Antimicrobial effects of Torreyae Semen extracted by various condition

Sample	Concentration	Diameter of inhibition zone against bacterial strains (mm)		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidemidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
DW	2.0mg/disc	9.35 \pm 0.21	10.30 \pm 0.57	10.20 \pm 0.28
	1.0mg/disc	7.40 \pm 0.14	8.80 \pm 0.28	7.70 \pm 0.28
	0.5mg/disc	-	-	-
30% Ethanol	2.0mg/disc	8.65 \pm 0.07	9.95 \pm 0.35	8.55 \pm 0.21
	1.0mg/disc	-	8.70 \pm 0.00	-
	0.5mg/disc	-	-	-
60% Ethanol	2.0mg/disc	8.15 \pm 0.21	9.15 \pm 0.07	8.20 \pm 0.28
	1.0mg/disc	-	7.90 \pm 0.42	-
	2.0mg/disc	8.15 \pm 0.21	8.35 \pm 0.00	7.70 \pm 0.00
90% Ethanol	1.0mg/disc	-	7.75 \pm 0.00	-
	0.5mg/disc	-	-	-

- : No effect

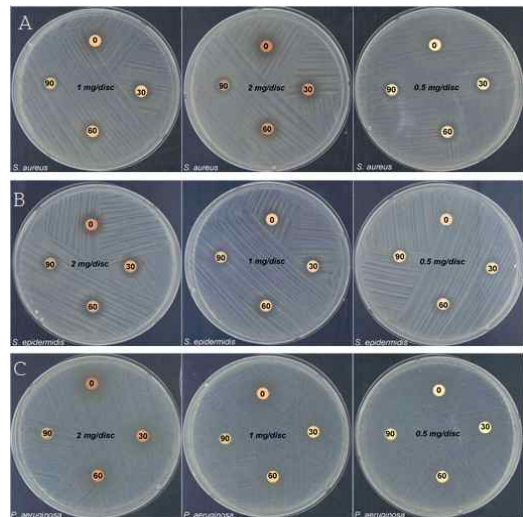


Fig. 1. Antimicrobial effects of Torreyae Semen extracted by various condition. A(top): *Staphylococcus aureus*, B(middle): *Staphylococcus epidermidis*, C(bottom) : *Pseudomonas aeruginosa*, 0: DW, 30: 30% Ethanol, 60: 60% Ethanol, 90: 90% Ethanol Extract.

Table 3. Growth inhibitory activity on *Propionibacterium acnes*

	Concentration (mg/ml)	Concentration (mg/ml)			
		2	1	0.5	0.25
DW		31.95	39.75	37.97	336.97
Inhibition rate(%)	30 EtOH	47.93	50.35	45.3	43.97
	60 EtOH	85.74	74.16	73.88	61.33
	90 EtOH	90.14	99.72	93.62	77.65

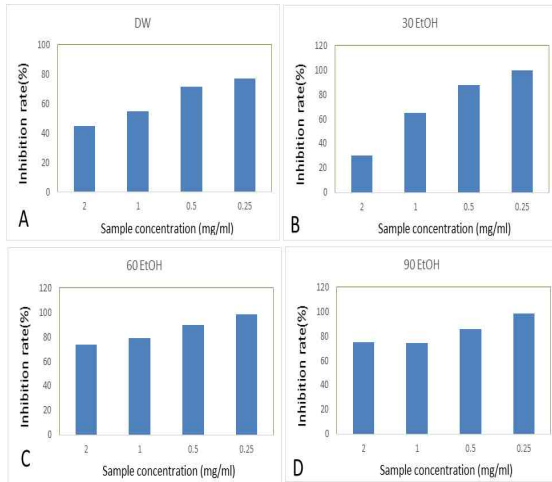


Fig. 2. Growth inhibitory activity of Torreyae Semen extracted by various condition on *Propionibacterium acnes*. A (top left): distilled water extract (DW), B (top right): 30% Ethanol (30 EtOH). C (bottom left): 60% Ethanol (60 EtOH), D (bottom right): 90% Ethanol (90 EtOH). Values are represented as mean.

Table 4. Growth inhibitory activity on *Staphylococcus epidermidis*

		Concentration (mg/mL)			
		2	1	0.5	0.25
Inhibition rate(%)	DW	45.12	30.42	73.38	74.74
	30 EtOH	54.75	64.96	78.97	74.48
	60 EtOH	71.33	87.82	89.32	85.35
	90 EtOH	77.24	99.35	98.48	98.12

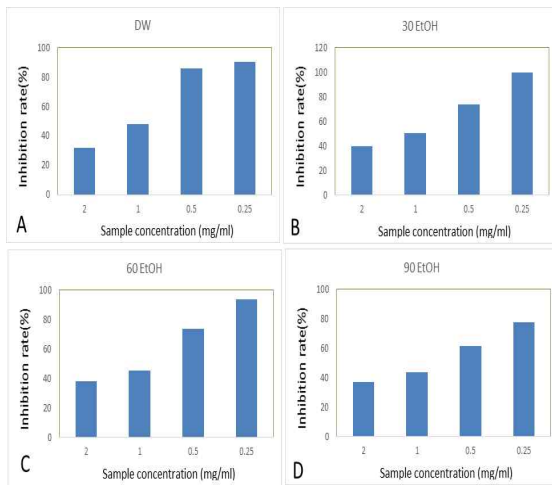


Fig. 3. Growth inhibitory activity of Torreyae Semen extracted by various condition on *Staphylococcus epidermidis*. A (top left): distilled water extract (DW), B (top right): 30% Ethanol (30 EtOH). C (bottom left): 60% Ethanol (60 EtOH), D (bottom right): 90% Ethanol (90 EtOH). Values are represented as mean.

2. 알레르기성 접촉 피부염 효능 평가

1) 등과 귀 두께 측정

항균실험 결과 최적의 시료농도가 30% EtOH로 확인되었기에 이 시료로 알레르기성 접촉 피부염 효능 평가를 in vivo 로 진행하였다. 이를 위해 알레르기성 접촉 피부염을 유발시킨 생쥐에서 시료 투여로 변화된 귀 두께와 등 피부 두께를 측정하였고, 그 결과

비자를 열수 추출하고 3 mg/mL을 처리한 실험군(3DW)이 대조군보다 2가지 항목 모두에서 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였다(Fig. 4).

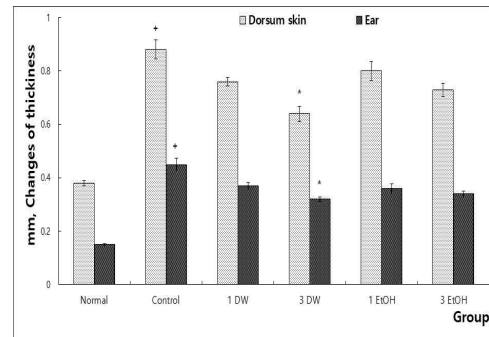


Fig. 4. The changes of thickness of dorsum & ear skin on AD mice. Normal : naive group, Control : AOO treated group, 1DW: group administered that distilled water extract 1mg/mL, 3DW: group administered that distilled water extract 3mg/mL, 1EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 1mg/mL, 3EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 3mg/mL. Values are represented as mean±SD. + : Statistically significance compared with Normal group(* ; P<0.05). * : Statistically significance compared with Control group(* ; P<0.05).

2) 피부 표면의 육안적 관찰

시료 투여에 따른 알레르기성 접촉 피부염의 변화 정도를 관찰하기 위하여 각 군별 생쥐의 등에 발생한 피부질환의 병변 정도를 관찰하여 수치화하여 비교한 결과 각각의 실험군은 대조군보다 유의성 (p<0.05) 있게 등 피부의 염증 반응이 3 DW, 3 EtOH, 1 DW군 순으로 감소하는 것을 확인하였다(Table 5 & Fig. 5-6).

Table 5. The changes of symptom score on AD mice

	Symptom score	
	Mean	SD
Normal	0	0
Control	4.50	0.53
1 DW	3.40	0.70
3 DW	3.00	0.82
1 EtOH	3.7	0.48
3 EtOH	3.40	0.52

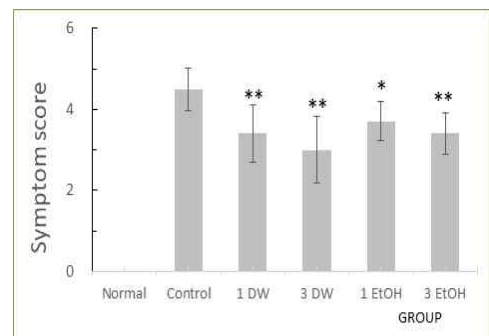


Fig. 5. The changes of symptom score on AD mice. Normal : naive group, Control : AOO treated group, 1DW: group administered that distilled water extract 1mg/mL, 3DW: group administered that distilled water extract 3mg/mL, 1EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 1mg/mL, 3EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 3mg/mL. Values are represented as mean±SD. * : Statistically significance compared with Control group(* ; P<0.05). ** : Statistically significance compared with Control group(** ; P<0.01).

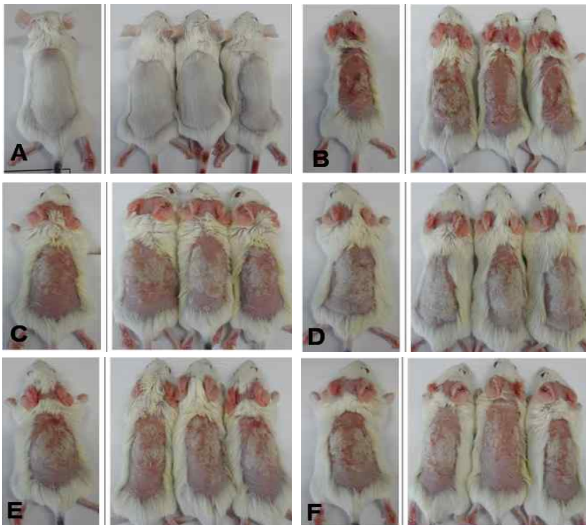


Fig. 6. The changes of clinical aspects of skin condition on AD mice. Clinical aspect of dorsum skin on AD mice were observed using digital camera at the end of the day. A (top left): Normal, B (top right): Control, C (middle left): 1DW(DW 1 mL/time/day), D (middle right): 3DW(DW 3 mL/time/day), E (bottom left): 1EtOH(30% EtOH 1 mL/time/day), F (bottom right) : 3EtOH(30% EtOH 3 mL/time/day).

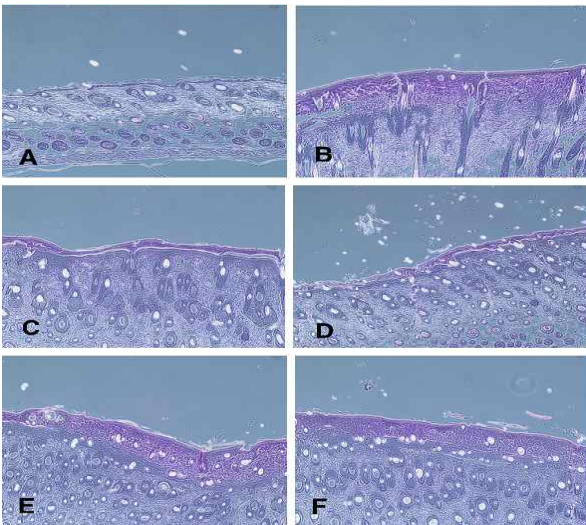


Fig. 7. The histopathological observation of dorsum skin in AD mice. A (top left): Normal, B (top right): Control, C (middle left): 1DW, D (middle right): 3DW, E (bottom left): 1EtOH, F (bottom right) : 3EtOH, ×100. Normal : naive group, Control : AOO treated group, 1DW: group administered that distilled water extract 1mg/mL, 3DW: group administered that distilled water extract 3mg/mL, 1EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 1mg/mL, 3EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 3mg/mL.

3) 피부의 조직학적 관찰

Normal 군의 등 피부는 epidermis가 얇게 분포하였고, 다른 특이소견이 거의 관찰되지 않았으며(Fig. 7A), Control 군의 등 피부에서는 정상군에 비해 표피의 과각화증(epidermal hyperplasia), 표피 및 진피의 세포질 증가(thickening of epidermis and dermis) 등 조직병리학적 소견이 관찰되었다(Fig. 7B). 1DW군은 Control군에 비해 표피 및 진피의 두께가 다소 줄

어들었고, 과각화, 과립증가, 부전각화증 등이 다소 감소하였다 (Fig. 7C). 3DW군은 Control군에 비해 정상군에 가깝게 표피 및 진피의 두께가 현저히 줄어들었고, 과각화, 과립증가, 부전각화증 등이 현저히 감소하였다(Fig. 7D). 1EtOH 군은 Control군에 비해 표피 및 진피의 두께가 다소 줄어들었고, 그 주변에 세포변형과 각화증상 등이 다소 감소하였고(Fig. 7E), 3EtOH군은 Control군에 비해 표피 및 진피의 두께가 줄어들었고, 그 주변에 과각화, 과립증가, 부전각화증 등이 다소 감소하였다(Fig. 7).

4) IL-10 측정

시료의 투여가 IL-10 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과 실험 군들의 IL-10 함량은 대조군보다 증가하였으나 이 중 1DW, 3DW, 1EtOH 군에서 통계적 유의성이 관찰되었다(Table 6 & Fig. 8).

Table 6. The changes of IL-10 level on AD mice.

	IL-10 (pg/mL)	
	Mean	SD
Normal	45.60	7.83
Control	36.79	1.89
1 DW	44.48	5.93
3 DW	45.00	2.71
1 EtOH	44.40	4.35
3 EtOH	42.92	2.71

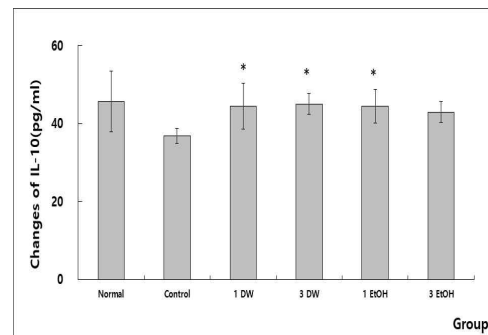


Fig. 8. The changes of IL-10 level on AD mice. Normal : naive group, Control : AOO treated group, 1DW: group administered that distilled water extract 1mg/mL, 3DW: group administered that distilled water extract 3mg/mL, 1EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 1mg/mL, 3EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 3mg/mL. Values are represented as mean±SD. * : Statistically significance compared with Control group(* ; P<0.05).

5) TNF-α 측정

비자 열수 추출물과 30% EtOH로 추출한 추출물을 투여한 결과 실험군들의 TNF-α 함량은 대조군보다 감소하였으며 모든 실험군에서 통계적으로 유의성이 관찰되었다(Table 7 & Fig. 9).

Table 7. The changes of TNF-α level on AD mice.

	TNF-α (pg/mL)	
	Mean	SD
Normal	32.23	2.88
Control	43.44	4.70
1 DW	38.20	2.41
3 DW	37.52	2.87
1 EtOH	37.95	3.26
3 EtOH	37.62	2.92

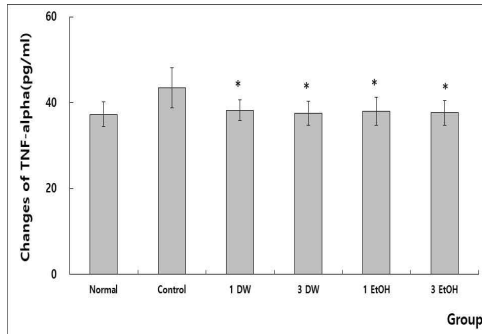


Fig. 9. The changes of TNF- α level on AD mice. Normal : naive group, Control : AOO treated group, 1DW: group administered that distilled water extract 1mg/ml, 3DW: group administered that distilled water extract 3mg/ml, 1EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 1mg/ml, 3EtOH: group administered that 30% Ethanol extract 3mg/ml. Values are represented as mean \pm SD. * : Statistically significance compared with Control group(*; $P < 0.05$).

고찰

비자(Torreyae Semen)는 비자나무의 果實로 한의학에서는 驅蟲消積, 潤腸通便하는 효능이 있어 가을에 채취해 육질의 假種皮를 제거한 후 말려 깨뜨리거나 살짝 볶은 후 蟲로 인한 복통이나 변비 등에 사용하여 왔으나 다량 복용은 금하고 있다¹⁾.

비자에 관련된 연구가 현재까지 다양하게 진행되고 있는데, 전 등⁶⁾은 비자를 항산화 소재로 활용하기 위해 여러 가지 형태(열수 추출물, 에탄올 추출물)로 추출한 후 항산화적 생리활성을 관찰한 결과, 물 추출물이 플라보노이드와 폴리페놀 화합물 추출에 효과적 이었고, 더불어 우수한 생리활성 효과를 보여 이를 활용한 기능성 식품이나 의약품 재료로의 개발 가능성 있는 생약자원이라 하였고, 노 등¹⁸⁾은 비자의 독성, 중독증상, 中毒劑量 등에 관해 문헌적으로 관찰한 결과 비자는 신경계, 소화계, 신경계통에 중독증상이 있어 구토나 설사 등의 형태로 중독증상을 치료하고, 비자의 중독을 예방하기 위해서는 복용량의 범위(6-30g/1일, 15g/1회)를 지켜야 한다고 주장하였으며, 손 등⁹⁾은 비자의 유박을 이용해 항노화에 미치는 효과를 관찰한 결과 피부 노화과정에 밀접한 관련이 있는 최종 당화산물 생성과 엘라스타제 활성 및 콜라겐과 최종당화산물의 교차결합 등에 유의한 반응을 나타내 화장품 소재로서의 활용 가치가 있다 보고하였다.

또한, 비자의 자생지역에 따른 효능연구를 진행한 연구들도 있는데, 김⁷⁾은 우리나라 남부지역의 비자와 중국산 비자의 유효성분을 비교 평가하기 위하여 물과, 에탄올, 메탄올로 추출한 후 각각 폴리페놀, 플라보노이드 화합물의 함량, DPPH 라디칼 소거 활성 등의 항산화 활성 효과를 측정하여 항산화제로서의 개발과 기능성 식품소재로서의 활용가치를 보고하였고, 박¹⁹⁾은 우리나라 남부지역과 제주도에서 자생하고 있는 비자를 식용으로 사용하여 그 외피를 이용해 기능성 소재로서의 활용가치를 확인하기 위하여 생리활성을 측정하여 그 유효성을 보고하였다. 이와 같이 최근의 연구 방향이 한약재를 비롯한 많은 생물자원을 이용해 기능성 생물소재를 개발하기 위한 연구들이 다양하게 이루어지면서 개비자나무²⁰⁾, 산딸기²¹⁾, 여뀌²²⁾, 애기똥풀²³⁾, 딸기 잎²⁴⁾, 먼나무²⁵⁾, 편백나무 정유²⁶⁾ 등

을 기능성 화장품이나 의약품 재료로 사용될 수 있을 것으로 보고 하는 등 기능성 생물소재로서의 활용 가능성을 모색하는 연구가 진행되고 있다.

이렇듯 기능성 생물소재를 찾기 위한 다양한 연구가 활발하게 진행되고 있고, 특히 우리나라에 자생하고 있는 비자에 대한 관심⁷⁾이 고조되고 있는 추세에서 본 저자들은 우리나라 남부 지역에서 자생하고 있는 비자림에서 채취한 비자를 이용하여 일차적으로 비자 열수 추출물이 미치는 항산화 활성 및 뇌신경 세포의 보호효과에 대한 유의성을 보고²⁷⁾하였고, 이차적으로 기능성 생물소재로서의 개발가능성을 제시하고자 항균 및 알레르기성 접촉 피부염에 대한 효능을 확인하였다.

이번 실험에서는 비자 추출물의 항균 활성을 비교 관찰하기 위하여 열매를 각각 열수(DW), 에탄올(EtOH) 30%, 60%, 90%로 추출한 시료를 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정된 결과 열수 추출물 2.0 mg/disc 시료가 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* 모든 균주에서 항균 활성을 나타내었고, 30% 에탄올 추출물 2.0 mg/disc 시료가 *S. epidermidis*에 대해서 항균활성을 보였다. 또한 4가지 시료에 대한 최소생육저지농도를 결정하기 위하여 각 시료를 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml 농도로 serial dilution하여 시험을 진행한 결과 *P. aeruginosa* 균에서의 MIC는 2 mg/ml 농도의 열수, 30% EtOH, 60% EtOH, 90% EtOH 추출물에서 약 32~39% 정도 고르게 생육 저지를 하였고, 농도 의존적인 항균 효과를 나타냈으며, *S. epidermidis* 균에서의 MIC는 열수, 30% 에탄올 추출물에서만 2mg/ml 농도처리시 약 47%, 1 mg/ml 농도 처리시 약 40% 정도 생육 저지를 하였으며, 농도 의존적인 항균 효과가 관찰되었다.

이와 같은 결과는 여드름의 주요 원인균으로 알려진 *P. acnes* 균주에 대한 MIC test에서는 다른 피부질환 원인균과 다르게 모든 추출물에서 상대적으로 강하고 농도 의존적인 항균력을 나타냈으며, 특히 열수 추출물 시료에서 비교적 높은 수준의 항균 활성을 나타내었다. 이는 열수와 30% 에탄올 추출 시료가 모든 종류의 피부질환 원인균에 대해 일정 수준 이상의 항균력을 가지는 것으로 판단할 수 있으며, 특히 비자를 열수 추출할 때 유효한 활성을 가질 것으로 생각할 수 있었다. 이런 연구 결과는 고 등²⁸⁾이 발표한 비자의 항균 작용 연구와 같이 Paper Disc법으로 *Staphylococcus aureus*(12214), *Staphylococcus epidermidis*(40411), *Streptococcus mutans*(40105), *Escherichia coli*(41300) 및 *Penicillium citrinum*(11663), *Aspergillus niger*(32318)을 사용한 항균 실험에서 항균 활성을 확인할 수 있었다는 보고와 일치하는 결과이지만 비자의 부위별 항균작용에서는 종자보다는 잎에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*의 활성 효과를 얻었다고 보고해 비자나무의 부위별 항균 작용은 더욱 진행해야 할 것으로 보인다.

본 연구의 병태모델의 유발에 사용한 DNCB는 알레르기성 접촉 피부염을 유발시키는 대표적 유발 물질로 최근 단일한약재 혹은 복합처방의 구강투여 연구 및 직접 도포용 외용제 개발 연구에 관련한 한의약학 병태모델의 유발물질로 활용되고 있어^{29,30)}, 본 연구자들도 DNCB를 이용해 알레르기성 접촉 피부염 병태모델을 유발한 후 비자의 다양한 추출물 중 항균효과를 나타낸 열수 추출물 시

료와 30% 에탄올(30E) 추출 시료를 병태모델의 피부에 도포하였다. 그 결과 연구종료시, 대조군의 등과 귀의 두께는 정상군보다 비후되었지만 열수 추출물을 처리한 실험군의 두께는 대조군보다 얇아지는 것을 확인할 수 있었고, 피부의 염증 역시 대조군의 피부 염증반응은 정상군에 비해 확연하게 나타났으나 3 mg/mL의 열수 추출 시료와 3 mg/mL 30% 에탄올 추출 시료, 1 mg/mL 열수 추출 시료를 처리하였을 때 모두 대조군보다 유의성 있게 등 피부의 염증 반응이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 병태모델의 염증 피부를 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 통해 조직학적으로 관찰한 결과, 3 mg/mL 열수 추출 시료를 처리한 실험군에서 대조군보다 정상군에 가깝게 표피 및 진피의 두께가 현저히 줄어들었고, 과각화, 과립증가, 부전각화증 등이 현저히 감소하였다. 이는 목향 추출물을 이용하여 알레르기성 접촉 피부염에 대한 억제 효과를 관찰한 결과 TNF- α 등을 억제해 귀와 등쪽의 피부미란, 표피 및 진피조직의 과형성 및 염증세포의 침윤 등의 조직병리적인 조건에서 유의한 반응을 보였다는 임의 보고³¹⁾와 상통하는 결과로 생각되었다.

알레르기성 접촉 피부염과 사이토카인의 관련성에 있어 김 등³²⁾은 IL-10의 결핍으로 알레르기성 접촉 피부염이 유발되고, 치료에 IL-10의 조절물질을 사용하면 알레르기성 접촉 피부염의 기작 연구에 중요한 지표 라고 하였기에 본 실험에서도 혈청 내 사이토카인인 염증매개(TNF- α) 및 항염증(IL-10) 사이토카인 함량을 관찰하였다. 그 결과 대조군의 IL-10 함량은 정상군보다 감소하였지만 열수 추출 시료를 투여한 실험군의 IL-10 함량이 대조군보다 유의하게 증가하였고, 대조군의 TNF- α 의 함량의 경우는 대조군의 TNF- α 함량이 정상군보다 증가하였지만 비자 추출물을 처리한 모든 실험군들의 TNF- α 함량이 대조군보다 유의하게 감소하였다. 이는 김 등의 보고³²⁾와 같이 비자가 알레르기성 접촉 피부염 치료 기전으로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과 알레르기성 접촉 피부염을 유발시킨 병태모델에 비자를 열수 추출한 후 고농도로 투여하였을 때 알레르기성 접촉 피부염 개선 효과를 나타내어 향후 비자를 활용할 때 추출방법으로는 전 등⁶⁾의 보고와 같이 열수 추출이 유의할 것으로 보이며, 열수 추출한 비자가 항균작용과 함께 알레르기성 접촉 피부염에 유효할 것으로 판단되는 바 향후 이와 관련된 연구를 지속적으로 진행한다면 피부의 염증과 관련된 각종 질환 치료약물의 소재로 활용될 가능성이 충분하리라 사료된다.

결 론

비자를 이용해 열수와 농도별(30%, 60%, 90%) 에탄올로 추출한 시료에 대한 항균효과와 알레르기성 접촉 피부염 개선 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Disc diffusion assay에 의한 항균활성 평가에서는 비자 열수 추출물이 *S. peidermidis*와 *P. aeruginosa*에 대해 항균활성이 높은 것으로 나타났고, *Propionibacterium acnes* MIC와 *Staphylococcus epidermidis* MIC에서는 비자 열수 추출물과 30% 에탄올 추출물은 농도의존적으로 생육을 저지해 항균 효과가 있었다.

이 두 가지 시료를 알레르기성 접촉 피부염을 유발시킨 병태모델에 처리한 결과, 귀 및 등 두께 그리고 등 피부의 육안적 관찰에서 대조군에 비해 접촉성 피부염에 대한 유의성 있는 효과를 나타내었고, 특히 비자 열수 추출물은 등피부의 표피 및 진피의 두께가 현저히 줄어들었고, 과각화, 과립증가, 부전각화증 등도 현저히 감소하였다. 또한 비자 열수 추출물은 대조군에 비해 TNF- α 함량을 감소시키고 IL-10 함량을 증가시켰다.

이상의 결과 비자는 열수 추출하였을 때와 30% 에탄올로 추출하였을 때 항균작용이 있는 것으로 관찰되었고, 알레르기성 접촉 피부염을 유발시킨 병태모델에서도 유의한 효과를 나타내었다. 또한 추출방법에 있어서는 에탄올추출법도 유의하지만 항균 및 접촉성 피부염의 효과적인 측면에서는 볼 때 열수 추출법이 더욱 유의한 것으로 나타났다. 이에 저자는 향후 이러한 연구결과가 비자를 다양하게 사용하거나 치료약물(보조제)로 개발하는데 있어서 유용하게 활용될 수 있을 것이라 생각되어진다.

References

1. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology. Seoul: Younglimsa; 2012. p. 423-4.
2. Gao Xuemin. Traditional Chinese Medicine (Volume 1). Beijing: People's Health Publishing House; 2008. p. 956-8.
3. Seo BI, Jeong KY. Easy-to-understand herbal medicine Revised edition, Daegu: Daegu Haany Univ. Publishing department; 2012. p. 257.
4. Kim ND. Study on the Anthelmintic Principle of *Torreya nucifera*, Journal of the Pharmaceutical Society of Korea. 1966;10:30-2.
5. Jang, SR, Kim DC. In Vitro Anti-bacterial and Anti-inflammatory Effects of Six Types of Herb Aqueous Extracts, J Korean Obstet Gynecol. 2014;27(1):81-100.
6. Jeon HS, Lee YS, Kim NW. The Antioxidative Activities of *Torreya nucifera* Seed Extracts, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2009;38(1):1-8.
7. Kim SB, Kim BW, Hyun SK. Comparison of antioxidant activities and effective compounds in Korean and Chinese *Torreya* seeds. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 2018;50(3):274-9.
8. Lee YS, Jeon HS, Joo EY, Kim NW. Development of Cosmetic Materials Using *Torreya nucifera* Needles. Journal of Investigative Cosmetology. 2012;8(3):157-63.
9. Son DH, Kim MK, Park DH, Jung ES. Effect of Defatted *Torreya nucifera* Seed Extract on the Cross-linking of Advanced Glycation End Products to Collagen, J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 2019;45(1):19-25.
10. <http://m.innisfree.com/kr/ko/mProductView.do?prdSeq=>

- 13842&cmpid =innisfree-kr-m_mobile:other_kakao:00_fiv e:20170317
11. Lee JH. Effect of Germinated Brown Rice Enzyme Bread on the Anti-Allergy and Immune, Activity, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 2010.
 12. Kang SY. Diagnosis and treatment of allergic diseases. Seoul:Ilchhak; 1995. p. 241-52.
 13. Kim SH. A review study concerning treatment of atopic dermatitis in Korean Medicine. Department of PhysiologyGraduate School Daegu Haany University, 2018.
 14. Kim MS, Hwang HI, Lee YR, Kim HW, Park JK. The Effects of Lentinula edodes and Aquilariae agallocha Extracts Combination on the Repair of UVA-Damaged DNA and DNCB-Induced Allergic Dermatitis. The Korean Journal of Food And Nutrition. 2015;28(5):759-65.
 15. Sim TK, Ko DK, Kim HC, Baek YJ, Lee JS, Yoo HS. Effects of Amyda sinensis on Allergic Inflammation Mechanism related Atopy Dermatitis, Research Institute of Korean Medicine, Taejon University. 2011;20(1):69-83.
 16. Lee JH. Effect of Germinated Brown Rice Enzyme Bread on the Anti-Allergy and Immune, Activity, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 2010.
 17. Kwang IT. Torreya nucifera Forest on Boolhei Temple in Na-ju, Forest and Culture. 2013;22(4):6-10.
 18. Roh SS, Seo BI, Kim JJ, Park JH. A philological study on poisoning of Torreyae Semen(榧子), The Journal of Applied Oriental Medicine. 2013;13(1):21-4.
 19. Park JE. Screening of physiologically active compounds in extract from Torreya nucifera seed's shellusing LC-MS/MS, The Graduate School Chung-Ang University, 2015.
 20. Cho CH, Yoo GJ, Kim SY, Lee GS, Kim JH, Hyun JO, et al. Antimicrobial Activity and Cell Cytotoxicity of Korean Plum-yem Extract, Journal of Applied Biological Chemistry, 2009;52(2):45-50.
 21. Kim DY, Cho SC. Studies on Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract from Rubus crataegifolius Leaf, Food Eng. Prog. 2016;20(1):21-7.
 22. Kim JE, Kim EH, Park SN. Antibacterial Activity of Persicaria hydropiper Extracts and Its Application for Cosmetic Material. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010;38(1):112-5.
 23. Choun YM, Jung JY, Ko KS. A Study on the Possibility of Functional Cosmetic Material by Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chelidonium majus Extract. Journal of the Korean Society of Cosmetology. 2017;23(5):921-9.
 24. Lee DS, Kim KH, Yook HS. Cosmetic Effects of the Fractional Extracts from Strawberry (Fragaria ananassa var. 'Seolhyang') Leaf, J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2018;47(3):271-8.
 25. Kim MH. Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities and Contact Dermatitis Treatment Effect of Caffeoyl Quinic Acid Derivatives Isolated from Ilex rotunda, The Graduate School Chung-Ang University, 2013.
 26. Yoo KH. The effects of essential oil of Chamaecyparis Obtuse impregnant fabric for atopic dermatitis, The Graduate School Chung-Ang University, 2015.
 27. Lee SI, Choi CH, Kim JS, Lim SS, Jung HW. The Antioxidant Activities and Neuroprotective Effects of Hot Water Extractsfrom from Torreyae Semen. Kor. J. Herbol. 2017;32(6):41-8.
 28. Ko HJ, Sohn SM, Kim WS, Lee NH, Suh IS. Antimicrobial Activity of Torreya nucifera Extract, International Symposium of the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. 2008:267.
 29. Byun SH, Lee BW, Kim SC. Effect of Samyoyongantang on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB, Kor. J. Oriental Medic Prescrip. 2005;13:59-69.
 30. Kim CH, Kim KJ. The effects of Yanghyulsamultanggamibang to allergic contact dermatitis, J. Ko.r Oriental Medic Ophthal & Otolaryngol & Dermatol. 2005;18:13-26.
 31. Lim HS. Anti-atopic dermatitis action of Saussurea lappa extract in experimental model, Graduate School Chungnam National University, 2014.
 32. Kim YK, Choi OH, Song CH. Role of IL-10 in the Trimellitic Anhydride-induced Contact Dermatitis, Anatomy & Biological Anthropology. 2013;26(2):71-9.