

ATO-ALL이 인간유래 피부 각질형성세포인 HaCaT 세포에서 피부재생에 미치는 효과

신윤민¹, 이원길¹, 김승형², 최정준¹

¹대전대학교 한의과대학 분자의학실험실, ²대전대학교 동서생명과학연구원

The effects of ATO-ALL on skin regeneration in human epidermal keratinocytes, HaCaT cells

Younmin Shin¹, Won-Kil Lee¹, Seung Hyung Kim², Jeong June Choi¹

¹Laboratory of Molecular Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

²Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

Objectives : Atopic dermatitis is an irritable skin disease accompanying rash and itching leading to impaired skin barrier. ATO-ALL is an ethanol extract of natural products comprising 12 herbs and effective on atopic dermatitis. In this study, we aimed to propose that the effect of ATO-ALL on skin regeneration in human keratinocyte cell line, HaCaT cells. **Methods** : To evaluate the skin regenerating effects of ATO-ALL, scratch wound healing assay, bromodeoxyuridine (BrdU) assay, and propidium iodide (PI) assay were performed using cultured HaCaT cell line. **Result** : Scratch wound healing assay showed that ATO-ALL was able to enhance the gap filling activity more than 2-fold at 7 ppm concentration compared with control group. BrdU assay demonstrated that ATO-ALL treatment increased the de novo cell proliferation in a dose-dependent manner. Finally, PI assay indicated that the cell cycle of HaCaT cells was modulated by ATO-ALL treatment. **Conclusions** : These results suggested that ATO-ALL may have skin regenerating effects by increasing cell proliferation via cell cycle regulation. Taken together, ATO-ALL is supposed to have a potential on regeneration of damaged skin or functional disease including atopic dermatitis.

Key words : ATO-ALL, Skin, keratinocyte, wound healing, atopic dermatitis

서론

인간의 피부는 표피, 진피, 피하지방으로 구성되어 있으며, 가장 바깥층인 표피는 가장 아래쪽의 기저세포층이 계속해서 분열하여 세포가 바깥쪽으로 이동함으로써 항상성이 유지된다¹⁾. 표피의 주요 구성 세포인 각질형성세포 (keratinocytes)는 피부의 면역 반응에 중요한 역할을 수행하며²⁾, 외부의 자극으로부터 체내를 보호하는 필수적인 장벽 기능을 한다³⁾. 각질형성세포의 분열성장으로 인해 피부장벽이 형성되는데, 피부장벽 기능의 이상은 피부건조를 유발시켜 아토피 피부염과 같은 피부질환으로 이어질 수 있다.

아토피 피부염은 주로 영유아기에 발생하는 매우 흔한 염증성 질환이며, 알레르기 항원, 장벽 기능 장애 및 유전자에 대한 과도한 면역 반응에 관여한다^{4,5)}. 이 질환을 갖는 사람들의 피부 각질층은 장벽 기능 및 수분 유지 기능이 감소되며 심한 가려움을 느끼게 된다. 가려움으로 인해 긁는 과정은 피부장벽을 무너뜨리고 면역체계의 이상반응은 피부의 기능을 저해함으로써 아토피 피부염의 증상을 악화시킨다. 외부의 병원균 및 미생물로부터의 감염을 방지하고, 각질형성세포의 증식을 활성화하여 아토피 피부염을 치료하기 위한 전략이 최근 대두되고 있어 피부재생 및 상처 치유를 유도하는 효능을 통해 아토피 피부염을 치료하고자 하는 시도들이 제시되고 있다⁶⁾.

Received Aug 26, 2019, Revised Sep 02, 2019, Accepted Sep 23, 2019 Published online Sep 23, 2019

Corresponding Author: Jeong June Choi

62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, Laboratory of Molecular Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

Tel : 042-480-2648, E-mail : c27022@dju.ac.kr

ATO-ALL은 멜론 (*Cucumis melo*), 옻나무 (*Rhus verniciflua* Stokes), 목련 (*Magnolia denudata*), 연꽃 (*Nelumbo nucifera*), 금은화 (*Lonicera japonica*), 감국 (*Chrysanthemum indicum* L.), 관동화 (*Farfarae Flos*), 홍화 (*Carthamus tinctorius* L.), 석류 (*Punica granatum* L.), 매실 (*Prunus mume*), 마치현 (*Portulaca oleracea*), 인삼 (*Panax ginseng*)으로 구성된 천연추출물 소재다. 본 연구에서는 ATO-ALL이 나타내는 피부재생 효능을 검증하고자 하였다. 이에, 사람의 각질형성세포인 HaCaT 세포를 활용하여 scratch wound healing assay를 실시하고 각질형성세포의 증식능을 BrdU assay로 평가하였다. 또한 각질형성세포의 세포주기의 변화에 주는 영향을 평가하여 유의적인 결과를 얻었기에 논문으로 발표하는 바이다.

재료 및 방법

1) ATO-ALL의 제조

ATO-ALL은 GL biotech (Daejeon, Korea) 에서 공급받아 사용하였다. 에탄올 추출액 형태로 제공받은 ATO-ALL을 rotary evaporator (Buchi, Switzerland)로 50℃에서 감압 농축하였다. 농축된 ATO-ALL을 액체 질소에 담가 완전히 얼린 뒤 동결 건조 (Hanil science medical, Daejeon, Korea)를 7일간 수행하여 액상상태의 시료를 확보하였다. 시료는 -80℃에 보관하였고 필요 시 phosphate buffered saline (PBS)에 희석하여 사용하였다.

2) 세포배양

본 실험에 사용된 인간유래 피부 각질형성세포 (keratinocyte)인 HaCaT 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 U/ml penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WELGENE Inc, Korea) 배지를 사용하여 37℃로 유지되는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

3) 세포독성평가

HaCaT 세포를 2x10⁵cell/ml로 96-well에 100 µl 씩 분주하고 24시간 안정화시킨 후, ATO-ALL을 농도별로 가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시

간 배양하였다. 24시간 후 세포 배양액을 버리고, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, 0.5 mg/ml, Sigma Aldrich, St. Louise, MO, USA) 용액을 각 well에 100 µl 씩 처리하였다. 이후 4시간 동안 배양한 후 MTT 용액을 제거해주고, dimethyl sulfoxide (DMSO)를 각 well에 100 µl를 넣어주어 MTT formazan을 용해시켰다. 30분간 37℃에서 MTT formazan을 완전히 용해한 후 570 nm 파장에서 micro spectrophotometer (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 상대적 세포생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 설정하고 흡광도의 상대적인 값을 비교하여 구하였다.

4) Scratch wound healing assay

HaCaT 세포를 5x10⁵cell/ml로 24-well에 500 µl 씩 분주하고 24시간 동안 안정화하였다. FBS를 포함하지 않는 DMEM 배지로 교체한 후 각 well에 200 µl tip을 이용하여 스크래치를 내고 0.7, 7, 70 ppm 농도의 ATO-ALL과 양성 대조군인 ascorbic acid (Sigma Aldrich, USA)를 처리한 후 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 시료 처리 후 0시간, 48시간대에 현미경을 이용하여 각 well의 중앙 부위에 위치하는 세포를 찍었으며, Image J 프로그램(ver1.46, NIH, USA)을 이용하여 0시간 대비 48시간에 세포가 증식된 면적을 계산하여 closure rate (%)를 구하였다.

Closure rate (%)= (A-B)/A*100 (A : 0시간 wound area, B : 48시간 wound area)

5) Bromodeoxyuridine (BrdU) assay

HaCaT 세포를 5x10⁴cell/ml로 96-well에 100 µl 씩 분주하고 24시간 동안 안정화 한 뒤 FBS를 포함하지 않는 DMEM 배지로 교체하여 18시간 동안 배양하였다. 0.7, 7, 70 ppm 농도의 ATO-ALL과 양성 대조군인 epidermal growth factor (EGF, Sigma Aldrich, USA)를 세포에 처리하고 각 well에 10X BrdU solution을 10 µl 씩 넣어준 후, 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포의 증식능은 BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell Signaling Technology, USA) 를 이용하여 제품 제조사의 메뉴얼에 따라 수행하였다. 세포 배양액을 제거한 후, Fixing/Denaturing Solution을 100 µl 씩

넣어주고 30분 동안 상온에서 방치하였다. Fixing/Denaturing Solution을 제거한 후, detection antibody solution을 well 당 100 µl 씩 넣어주고 1 시간 동안 상온에서 방치하였다. 그 후, Washing Buffer로 3번 세척하고 HRP-conjugated secondary antibody solution을 각 well 당 100 µl 씩 넣고 상온에서 30분 동안 방치하였다. 상등액을 제거한 뒤, 3번 세척을 하고 TMB substrate를 100 µl 씩 넣어주었다. 상온에서 30분 방치한 후 stop solution을 100 µl 씩 넣고 450 nm의 파장에서 micro spectrophotometer (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하여 세포의 증식능을 평가하였다.

6) Propidium iodide (PI) staining assay

HaCaT 세포를 1×10⁵cells/ml로 60 mm에 3 ml 씩 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. ATO-ALL을 0.7, 7, 70 ppm의 농도로 처리하고 24시간 동안 CO₂incubator에서 배양한 후, cell scraper를 이용하여 세포를 수거하였다. PBS로 세포를 수세한 뒤 차가운 75% 에탄올로 세포를 풀어주고 -20℃ 냉동실에 24시간 동안 넣어두어 세포를 고정하였다. 에탄올을 제거한 후 PBS로 세포를 2회 수세하여 ethanol을 완전히 제거한 뒤 PI (20 µg/ml)/RNase (100 µg/ml) 1 ml을 30분 동안 처리하였다. 이후 flow cytometry (Becton Dickinson, USA)로 분석하였다.

7) 통계분석

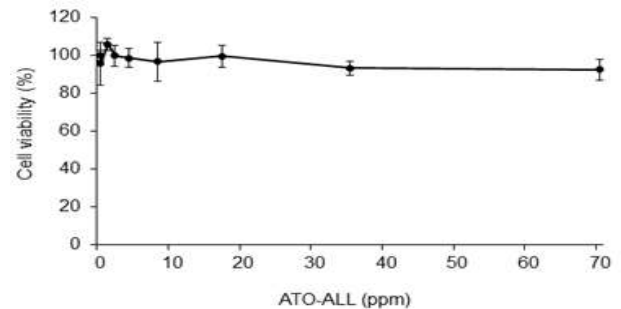
실험 결과는 mean±SD (standard deviation)으로 표기하였다. 통계처리는 IBM SPSS Statistics 25 프로그램을 사용하였고, 일원배치 분산분석 (one way ANOVA) 시스템을 사용하여 Tukey's HSD test로 유의성을 검정하였다. p<0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과

1) ATO-ALL의 세포독성 평가

ATO-ALL이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 통해 세포독성을 관찰하였다. ATO-ALL을 HaCaT 세포에 0.5~70 ppm 처리하여 관찰한 결과 세포독성은 거의 나타나지 않았다(Fig.

1). 낮은 농도의 ATO-ALL은 통계적인 유의성을 나타내지는 않았으나 세포의 성장을 촉진하는 것으로 나타났다. 따라서 ATO-ALL은 70 ppm 이내의 농도에서는 각질형성세포에 대한 세포독성이 없음을 확인하였으며, 이후 실험에서는 70 ppm 이내의 농도에서 실험을 실시하였다.



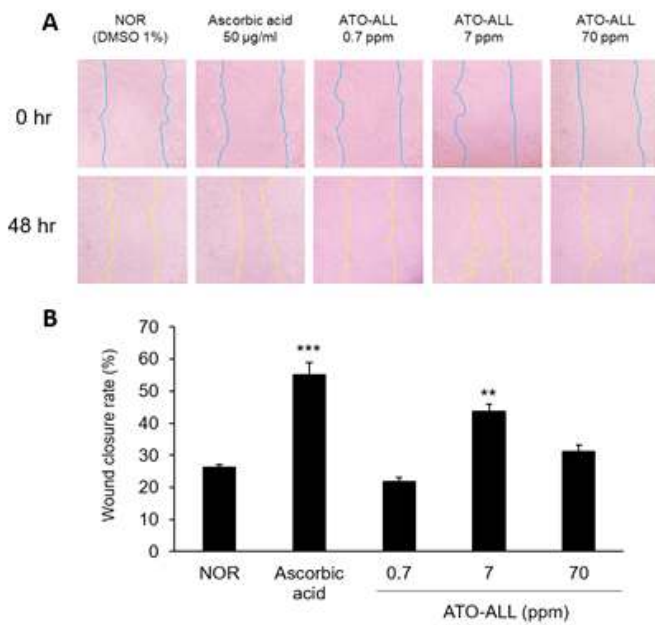
[Figure. 1.] Effect of ATO-ALL on the cell viability in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. The cells were treated with various ATO-ALL concentrations ranged from 0.5-70 ppm for 24 hr. The cell viability was measured by MTT assay. Data are presented as mean±SD from three independent experiments.

2) ATO-ALL이 세포재생에 미치는 효과

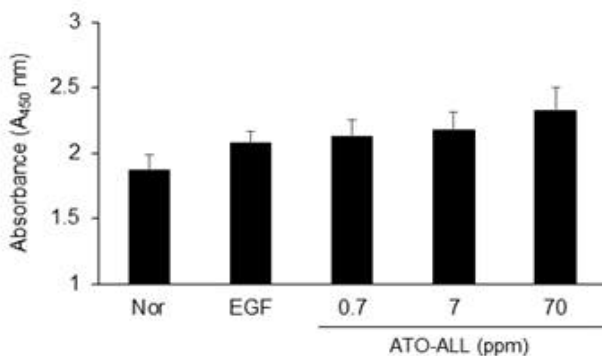
ATO-ALL의 세포재생에 대한 효과를 알아보기 위하여 HaCaT 세포를 사용하여 scratch wound healing assay를 통해 그 효능을 관찰하였다. 대조군 (DMSO 1%)의 경우 48시간에는 26.3±0.9%의 closure rate를 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid는 55.1±3.7%의 closure rate를 나타내어 대조군에 비해 피부재생 효능이 있음을 확인하였다. ATO-ALL을 HaCaT 세포에 48시간 처리한 결과 0.7 ppm에서는 closure rate이 21.8±1.4%로 나타나 저농도에서는 피부재생 효능이 거의 나타나지 않았다. 반면 70 ppm에서는 31.1±2.0%, 7 ppm에서는 43.7±2.4%의 closure rate를 나타내어 피부재생 효능이 있음을 알 수 있었다. 특히 7 ppm에서 가장 강한 피부재생 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

3) ATO-ALL이 세포증식에 미치는 효과

ATO-ALL의 HaCaT 세포 증식에 미치는 효과를 보기 위해 BrdU assay를 실시한 결과, 대조군의 흡광도 값이 1.87±0.12였으나 ATO-ALL을 처리한 세포에서는 흡광도 값이 각각 0.7 ppm에서 2.13±0.13,



[Figure. 2.] Effect of ATO-ALL on scratched wound healing in HaCaT cells. The cells (5×10^5 cell/ml) were cultured for 24 hr to reach 100% cell confluency and a scratch was made in each cell culture well. The cells were incubated to ATO-ALL with indicated concentrations or ascorbic acid (50 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hr. (A) The scratched area locating in the center of each well were observed under the bright field microscope ($\times 200$ magnification). (B) Wound closure rate was calculated by comparing the area size covered by newly grown cells. Data are presented as mean \pm SD from three independent experiments. (Nor; normal)



[Figure. 3.] Effect of ATO-ALL on cell proliferation in HaCaT cells. The cells (5×10^4 cell/ml) were incubated with ATO-ALL for 24 hr. After the cell culture medium was exchanged to serum free, cell incubation was further performed for 18 hr. The cells were treated with ATO-ALL as indicated concentrations or EGF (10 ng/ml) for 24 hr. The cell proliferation was measured by BrdU assay. (Nor; normal)

7 ppm에서 2.18 ± 0.14 , 70 ppm에서 2.32 ± 0.18 을 나타내어 ATO-ALL에 의하여 세포의 증식이 농도의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 EGF 처리군 (10 ng/ml)은 2.07 ± 0.09 의 흡광도 값을 나타내었다. 따라서, ATO-ALL이 피부세포의 증식을 촉진하여 피부재생 효능을 나타내는 것으로 사료되며, 그 효과는 EGF보다 뛰어났다 (Fig. 3).

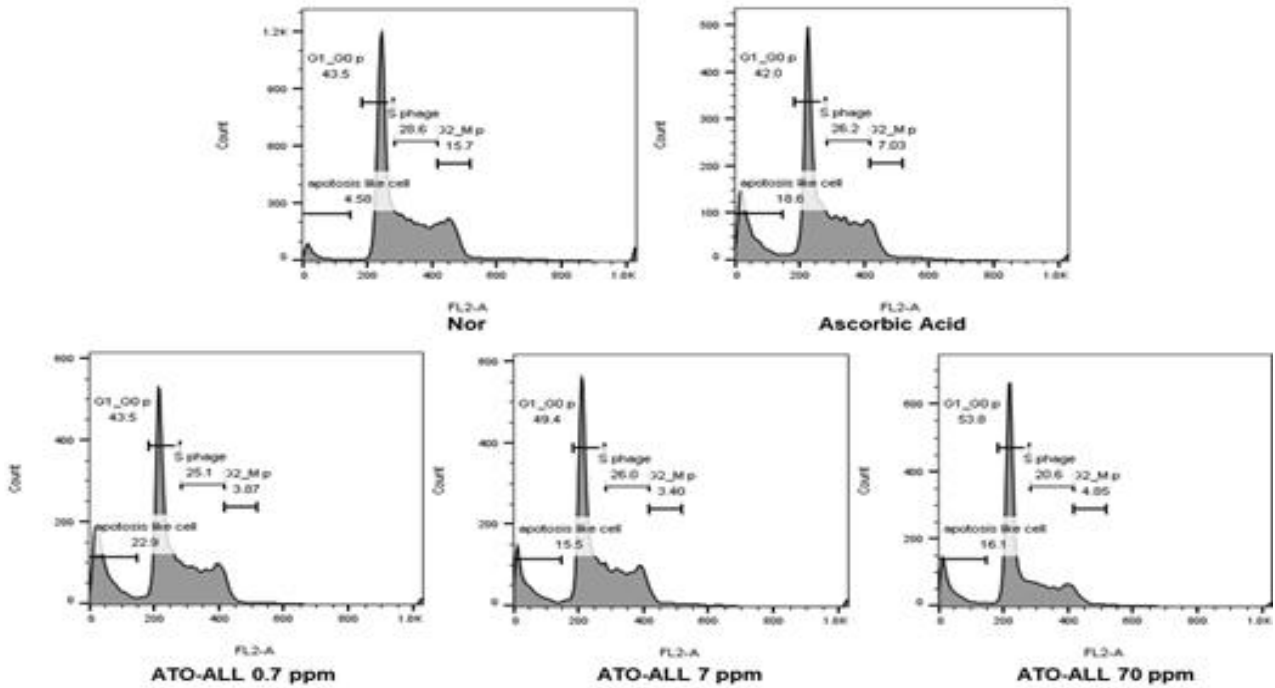
4) ATO-ALL이 세포주기에 미치는 효과

ATO-ALL이 각질형성세포의 세포주기의 변화를 유도하여 세포재생 효능을 나타내는지 확인하고자 PI staining assay를 실시하고 flow cytometry로 측정하였다. 그 결과, 대조군의 G1/G0, S, G2/M phase에서 각각 43.5%, 28.6%, 15.7%의 분포를 나타내었을 때, ATO-ALL을 0.7 ppm을 처리한 세포는 G1/G0, S, G2/M phase의 비율이 43.5%, 25.1%, 3.87%로 나타났으며, 7 ppm은 각각 49.4%, 26.0%, 3.40%이었고 70 ppm의 ATO-ALL을 처리한 세포들은 53.8%, 20.6%, 4.85%로 나타났다 (Fig. 4). 따라서 ATO-ALL은 농도의존적으로 G1/G0 phase의 비율이 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하고 있는 반면, S phase의 비율과 G2/M의 비율은 대조군에 비해 감소하는 것으로 보아 ATO-ALL은 피부세포의 세포주기의 변화에 영향을 주는 것으로 여겨진다.

고찰

본 연구에서는 ATO-ALL의 피부재생 효과를 확인하기 위해 인간유래 피부 각질형성세포인 HaCaT 세포에 대한 세포의 증식능을 측정하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 세포 독성이 없는 것을 확인하였으며, 농도의존적으로 세포 증식을 촉진하여 피부재생 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

아토피 피부염은 인체의 면역 체계의 변화에 의해 Th2 면역반응이 Th1 면역반응에 비해 우세해지면서 나타나는 피부질환이다⁷⁾. 이러한 면역적 변화는 Th2 cell, 비만세포, 호산구와 같은 면역세포들의 피부침윤을 유발하며 각각의 면역세포들은 다양한 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인과 히스타민, 프로스타글란딘 E2와 같은 면역물질을 분비하는 과정을 거쳐 나타난다^{8,9)}. 이러한 국소적인 피부의 환경의 변화는 피부에 존재하는 TSLP 수용체를 활성화하여 가려움증을 유발하고 피부의 수분을 제거하여 건조



[Figure. 4.] Effect of ATO-ALL on cell cycle in HaCaT cells. The cells were cultured for 24 hr and incubated with ATO-ALL or ascorbic acid (50 μ g/ml) for another 24 hr. The cells were harvested and stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry.

한 피부가 되도록 한다¹⁰⁾. 건조한 피부는 가려움증의 증상을 더욱 잘 느낄 수 있도록 하는데 가려움에 의해 피부를 긁는 과정이 반복되면 피부의 손상을 유발하게 된다. 피부의 epidermis는 장벽기능을 가지고 있는데 긁는 과정은 이러한 피부장벽의 기능을 파괴한다. 피부장벽의 손상은 피부가 가려움에 더욱 민감하도록 만들고 외부 병원체의 침입에 더욱 취약해지며 수분의 손실이 증가하게 되는 결과를 불러온다. 이렇게 손상된 피부는 아토피 피부염의 증상을 더욱 악화시키는 작용을 하게 된다. 따라서 아토피 피부염을 치료하기 위한 전략으로 손상된 피부장벽을 빨리 회복시키는 전략이 최근 대두되고 있다. 피부의 재생은 각질형성세포들의 증식과 분화에 의해 나타나게 된다. 특히 상처가 발생하거나 손상된 피부에서는 epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF)와 같은 성장인자 및 각종 사이토카인에 의해 각질형성세포의 증식과 이주가 조절되는 것으로 알려져 있으며¹¹⁾, 이는 손상된 조직 복원에 중요한 역할을 한다.

본 연구에서는 ATO-ALL이 각질형성세포의 손상에 긍정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. Scratch wound healing assay는 본 시료가 각질형성세포의 상처 치유에 효과적인 것을 보여주었다. 본 연구에서는 유의적인 변화를 나타낸 농도가 7 ppm으로 나타났다. 가장 높은 농도인 70 ppm에서는 오히려 7

ppm 보다 낮은 wound healing의 결과를 나타내었는데 이는 ATO-ALL에 포함된 기타 성분들 때문으로 여겨진다. ATO-ALL 시료에는 에탄올을 비롯하여 글리세린 성분이 다량 함유되어 있다. 농축과정에서 이 성분이 농축될 가능성이 있으며 70 ppm의 고농도에서는 세포의 증식에 영향을 줄 수 있을 것으로 여겨진다. BrdU assay는 ATO-ALL이 세포증식에 영향을 주는 것을 뒷받침 한다. 그러나 ATO-ALL의 세포증식에 대한 효과는 제한적인 것으로 보인다. 비록 BrdU assay를 통해서 ATO-ALL이 세포의 증식을 유도한 것으로 나타났으나 통계적으로 유의적이지 않았다. 또한 세포주기를 관찰한 결과에서도 세포의 증식과 관련된 G2/S Phase의 세포수가 ATO-ALL에 의해 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 이는 ATO-ALL이 피부재생 과정에서 세포의 증식을 일정 수준까지 유도한 뒤 세포의 분화를 촉진하기 때문으로 여겨진다. 이러한 가설은 본 연구에서 ATO-ALL이 G0/G1 주기에 있는 세포의 수를 증가시킨 결과로 뒷받침 된다. 각질형성세포는 G1 phase에 들어가게 되면 증식을 멈추고 분화를 하게 되고 최종 분화 과정을 통해 피부의 epidermis를 형성하게 된다¹²⁾. 따라서 ATO-ALL은 세포의 증식을 일정 수준까지만 유도한 뒤 각질형성세포의 분화를 이끄는 것으로 보인다. 향후 ATO-ALL이 각질형성세포의 분화에 나타내는 효능에 대한 연구는 향후

진행해야 할 것으로 보인다.

ATO-ALL은 12가지 천연소재의 에탄올 추출물이다. ATO-ALL의 성분인 옷나무에는 여러 페놀¹⁹⁾ 화합물이 포함되어 있으며, 그 중 fisetin은 비만세포에서 히스타민 방출과 IL-6, IL-8과 같은 초기 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 또한, 금은화에는 luteolin, quercetin, astragaloside 등과 같은 성분이 포함되어 있는데, 이들은 LPS로 패혈증이 유발된 랫드의 간에서 TNF- α 와 iNOS의 발현을 억제하는 항염증의 효과^{14,15)}와 함께 그람 양성 균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*의 세균들에 대한 항균작용¹⁶⁾을 나타내는 것을 보고되어 있다. 감국은 국화과에 속하는 다년생 초본으로, 최근 여러 연구를 통해 감국의 항균, 항암, 항산화, 항염증 활성 등이 보고되고 있으며^{17, 18)}, 주요 성분으로는 flavonoid 화합물인 apigenin, luteolin 등이 알려져 있다¹⁹⁾. 홍화는 국화과에 속하는 여러해살이풀로, 여러 가지 지방산의 glyceride가 주성분이다. 홍화씨에는 linoleic acid가 다량 함유되어 있으며, 고혈압, 골다공증, 관절염 등의 치료에 효능이 있는 것으로 보고되었다²⁰⁾. 관동화는 국화과에 속하는 식물로, 항산화²¹⁾, 혈소판 응집억제²²⁾ 등의 효능이 보고되었다. 목련은 목련과에 속하는 낙엽관목으로서 항염증 작용, 피부진균과 포도상구균 억제 작용이 보고되었다²³⁾. 마치현은 쇠바름과에 속한 초본으로서 장내 세균 억제²⁴⁾, 항산화²⁵⁾, 신경세포 보호 효과²⁶⁾ 등 최근 다양한 연구들을 통해 그 효과가 입증되었다. 또한, 인삼의 주요 성분인 ginsenoside 등은 항염증^{27,28)}, 항알러지^{29,30)} 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.

결론

본 연구 결과 ATO-ALL은 각질형성세포의 피부재생 능력을 증진시키는 것을 보여준다. 이러한 과정은 세포의 증식을 유도하여 나타나는 것으로 보이나 세포 증식에 대한 효능은 제한적으로 보여지는 것으로 여겨진다. 이렇게 ATO-ALL이 각질형성세포의 피부재생에 나타내는 효능은 피부장벽이 손상된 아토피 피부염과 같은 피부질환에 본 추출물이 유효할 수 있음을 제시한다. 그러나 피부질환의 개선에 대한 ATO-ALL의 정확한 생리학적 기작과 함께 유효한 성분에 대한 연구는 향후 밝혀야 할 부분으로 남아 있다.

Reference

1. Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*. 2007 ; 4(14) : 413-37.
2. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002 ; 88(1-2) : 1-12.
3. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 2012 ; 132(3) : 949-63.
4. Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 ; 125(1) : 16,29. e11.
5. De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol*. 2009 ; 129(1) : 14-30.
6. Prasad V, Dorle AK. Evaluation of ghee based formulation for wound healing activity. *J Ethnopharmacol*. 2006 ; 107(1) : 38-47.
7. Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992 ; 90(3) : 323-31.
8. Ahn K. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. *Korean Journal of Pediatrics*. 2004 ; 47(11) : 1137-41.
9. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008 ; 454(7203) : 445.
10. Schäfer L, Kragballe K. Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 1991 ; 96(1) : 10-5.
11. Hatamochi A, Mori K, Ueki H. Role of cytokines in controlling connective tissue gene expression. *Arch Dermatol Res*. 1994 ; 287(1) : 115-21.
12. Gandarillas A. The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint. *Cell Cycle*. 2012 ;

- 11(24) : 4507-16.
13. Park H, Lee S, Son H, Park S, Kim M, Choi E, Singh TS, Ha J, Lee M, Kim J. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res.* 2008 ; 31(10) : 1303.
14. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF- κ B activation through reducing I- κ B degradation in rat liver. *Int J Mol Med.* 2001 ; 7(1) : 79-83.
15. Kwak WJ, Han CK, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Son KH. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2003 ; 51(3) : 333-5.
16. Ji Hyun Bae, Mi Soon Kim, Eun Hae Kang. Antimicrobial Effect of *Lonicerae* Flos Extracts on Food-borne Pathogens. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 2005 ; 37(4) : 642-7.
17. Cheng W, Li J, You T, Hu C. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linne. *J Ethnopharmacol.* 2005 ; 101(1-3) : 334-7.
18. Cheon MS, Yoon T, Choi G, Moon BC, Lee A, Choo BK, Kim HK. *Chrysanthemum indicum* Linné extract inhibits the inflammatory response by suppressing NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 122(3) : 473-7.
19. Ryu SY, Choi SU, Lee CO, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch Pharm Res.* 1994 ; 17(1) : 42-4.
20. Kennedy WK, Unrau J. A rapid method for determining the oil content of safflower and sunflower seeds. *Agron J.* 1949 ; 41 : 93-5.
21. Hwangbo C, Lee HS, Park J, Choe J, Lee J. The anti-inflammatory effect of tussilagone, from *Tussilago farfara*, is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2009 ; 9(13-14) : 1578-84.
22. Lee JS, Min BS, Lee SM, Na MK, Kwon BM, Lee CO, Kim YH, Bae KH. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Carpesium abrotanoides*. *Planta Med.* 2002 ; 68(08) : 745-7.
23. Kim Y, Ko Y, Kim Y, Yang H. Evaluation of cell cytotoxicity on the extractives of magnoliaceae. 2001 ; 20 : 1-8.
24. Bae J. The effect of *Portulaca oleracea* on the pathogens of gastroenteritis in infants. *The Korean Journal of Food And Nutrition.* 2012 ; 25(2) : 233-8.
25. Lee H, Seo Y, Lee B, Lee D. DPPH radical scavenging effect and in vitro lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering.* 2003 ; 51(3) : 333-5
26. E Abdel Moneim A. The neuroprotective effects of purslane (*Portulaca oleracea*) on rotenone-induced biochemical changes and apoptosis in brain of rat. *CNS&Neurological Disorders-Drug Targets.* 2013 ; 12(6) : 830-41.
27. Kim A, Kang S, Lee K, Lee M, Ha S, Cha Y, Kim SY. The chemopreventive potential and anti-inflammatory activities of Korean black ginseng in colon26-M3. 1 carcinoma cells and macrophages. 2010 ; 53(1) : 101-5.
28. Ro J, Ahn Y, Kim K. Inhibitory effect of ginsenoside on the mediator release in the guinea pig lung mast cells activated by specific antigen-antibody reactions. *Int J Immunopharmacol.* 1998 ; 20(11) : 625-41.
29. Bae E, Trinh HT, Yoon H, Kim D. Compound K, a metabolite of ginsenoside Rb1, inhibits passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *J Ginseng Res.* 2009 ; 33(2) : 93-8.
30. Lee JH, Cho SH. Korean red ginseng extract ameliorates skin lesions in NC/Nga mice: an atopic dermatitis model. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 133(2) : 810-7.