



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](#)

2019년 2월
박사학위 논문

햄프씨드 오일과 햄프씨드-
헬리크리섬 혼합오일이 mice의
유발된 아토피 피부염에
미치는 영향

조선대학교 대학원

보완대체외학과

박 신 희

헴프씨드 오일과 헴프씨드-
헬리크리섬 혼합오일이 mice의
유발된 아토피 피부염에
미치는 영향

Influence of Hempseed and Hempseed-
Helichrysum Oil Blend on Mice with
Induced Atopic Dermatitis

2019년 2월 25일

조선대학교 대학원

보완대체의학과

박 신 희

햄프씨드 오일과 햄프씨드-
헬리크리섬 혼합오일이 mice의
유발된 아토피 피부염에
미치는 영향

지도교수 이 미 자

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2018년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

박 신 희

박신희의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 문 경 래 印

위 원 원광대학교 교수 박 승 택 印

위 원 조선대학교 교수 소 금 영 印

위 원 조선대학교 교수 홍 란 印

위 원 조선대학교 교수 이 미 자 印

2018년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	iii
도목차	iv
ABSTRACT	vi
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법	5
A. 실험동물	5
B. 세포주	5
C. 세포배양	5
D. 실험재료	6
1. 시료	6
2. 시약	6
3. DNCB 제조	6
4. 시료 오일 성분	6
E. 실험방법	9
1. 블랜딩 오일 제조	9
2. 피부염 유발 및 오일 도포	9
3. 피부등급 평가	9
4. 긁기에 대한 행동학적 관찰	10

5. 햄프씨드 오일과 헬리크리섬 오일 및 햄프씨드-헬리크리섬 혼합오일 세포독성과 세포생존률 측정	10
6. 오일의 항산화 측정	10
7. NO 생성 억제능 측정	11
8. 혈청 내 IgE 측정	11
9. 총 콜라겐 밀도 측정	12
10. TNF- α 밀도 측정	12
11. 통계처리	13
III. 결과	14
A. 피부등급 평가	14
B. 행동학적 관찰 평가	16
C. 오일의 세포독성 측정	17
D. 오일의 항산화 측정	22
E. NO생성을 통한 항염 측정	27
F. 혈청 내 IgE 변화	32
G. 총 콜라겐 밀도 변화	34
H. TNF- α 밀도 변화	37
IV. 고찰	40
V. 결론	45
참고문헌	47

표 목 차

Table 1.	The component of Hempseed (<i>Cannabis sativa</i>) oil
Table 2.	The component of Helichrysum (<i>Helichrysum italicum</i>) oil
Table 3.	Effect of HS and HH oil on skin lesions in NC/Nga mice
Table 4.	Effect of HS and HH oil on scratching behavior in NC/Nga mice
Table 5.	The cytotoxicity of 2% HC, 2% HS, 2% HH by XTT assay
Table 6.	The cytotoxicity of 3% HC, 3% HS, 3% HH by XTT assay
Table 7.	Effect of several oils (HC, HS, HH) on superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity
Table 8.	Effect of several oils (HC, HS, HH) on nitric oxide (NO) production
Table 9.	The level of IgE of oils (HS, HH) in serum of NC/Nga mice
Table 10.	Total density of collagen of oils (HS, HH) in serum of NC/Nga mice
Table 11.	The change of TNF- α on oils (HS, HH) in NC/Nga mice

도 목 차

- Fig. 1. Skin lesions.
- Fig. 2. The cytotoxicity of 2% oils [Helichrysum oil (HC), Hempseed oil (HS), blending oil (HC+HS, HH)].
- Fig. 3. The cytotoxicity of 3% oils [Helichrysum oil (HC), Hempseed oil (HS), blending oil (HC+HS, HH)].
- Fig. 4. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of HC oil. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$
- Fig. 5. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of HS oil. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$
- Fig. 6. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of HH oil. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$
- Fig. 7. NO inhibitory activity of 2% HC oil at the concentrations of 30, 70 and 110 μ l. Asterisks denote results significantly different from the control (0+LPS). * $p<0.05$, *** $p<0.001$
- Fig. 8. NO inhibitory activity of 2% HS oil at the concentrations of 30, 70 and 110 μ l. Asterisks denote results significantly different from the control (0+LPS). * $p<0.05$, *** $p<0.001$
- Fig. 9. NO inhibitory activity of 2% HH oil at the concentrations of 30, 70 and 110 μ l. Asterisks denote results significantly different from the control (0+LPS). * $p<0.05$, *** $p<0.001$
- Fig. 10. The level of IgE in serum. AD mice were treated with Hempseed oil (HS) and 2% blending oil (HH). * $p<0.05$
- Fig. 11. Effect of Hempseed (HS) and 2% blending oil (HH) on total density of collagen. *** $p<0.001$
- Fig. 12. The histological observation of collagen density in NC/Nga mice. x 200

Fig. 13. Effect of Hempseed (HS) and 2% blending oil (HH) on TNF- α . *** $p < 0.001$

Fig. 14. The histological observation of TNF- α in NC/Nga mice.
x 200

ABSTRACT

Influence of Hempseed and Hempseed- Helichrysum Oil Blend on Mice with Induced Atopic Dermatitis

Park, Shin Hee

Advisor : Prof. Lee, Mi Ja

Dept. of Complementary and Alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

This study was performed to evaluate the therapeutic effect of an oil blend (HC-HS & HS) containing a mixture of Helichrysum (HC) and Hempseed (HS) oil on atopic dermatitis (AD)-induced NC/Nga mice. For this purpose, the skin score, scratching behavior, oil cytotoxicity, superoxide anion-radical (SAR) scavenging ability-dependent anti-oxidant effect, nitric oxide inhibitory ability-dependent anti-inflammatory effect, changes in serum IgE levels, and density of collagen and tumor necrosis factor [(TNF)- α] were assessed in NC/Nga (AD)-induced mice. Additionally, AD-induced mouse tissue was morphologically observed using a light microscope. The skin scores and scratching behavioral indices of the HS, HC, or HH (HC+HS) oil-treated groups, and especially of the HH oil-treated group were more significantly reduced than those of the AD-induced group. There were no significant differences in the cell viability observed between the control and 2% or 3% oil (HC, HS, HH)-treated groups; therefore, none of the oils showed any statistically significant cytotoxic effect. The anti-oxidant and anti-inflammatory abilities of the oil-treated group (HC, HS, HH), and especially the HH oil-treated group were more significantly increased than those in the AD-induced group. During the quantitative measurement of IgE levels, the densities of collagen and TNF- α in the oil (HC, HS, HH)-treated group,

and especially in HH oil-treated group were significantly decreased, as compared to those in the AD-induced group. During the light microscopic observation of tissues from AD-induced mice, the oil-treated group (HS, HC, HH) showed a significant decrease in the total levels of collagen and expression of TNF- α , as compared with those in the AD-induced group. Hence, the blended oil-treated group (HH) showed more useful therapeutic effects than the oil (HC, HS)-treated group with regard to the anti-oxidant effect, anti-inflammatory effect, IgE level, total densities of collagen and TNF- α , skin score, and scratching behavior in AD-induced mice. Therefore, it is suggested that essential oils such as HS or HC might be useful for the prevention or treatment of AD. Furthermore, blended oil (HH) is more effective than the each of the oils (HC, HS), because of the synergic effects in AD treatment. Conclusively, oil blends such as HH oil might play an important role in the improvement of AD via aromatherapy.

Key Words: Blend of Helichrysum and Hempseed oils, Atopic dermatitis, Therapeutic effect, Anti-oxidant effect, Anti-inflammatory effect

I. 서 론

피부는 신체와 환경 사이에 주요 장벽 기능을 하며 이러한 기능 중 중요한 것은 피부 가장 바깥쪽의 지질 매트릭스로 과도한 수분 손실을 방지하며 외부적 침입으로 인한 면역 반응을 일으키지 않도록 방어한다(1). 아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 이러한 피부장벽기능에 영향을 주는 재발을 높은 만성적 피부염으로 우리나라를 비롯하여 많은 선진국에서 매년 증가추세에 있으며 소아나 유아뿐만 아니라(2), 최근에는 성인에 있어서도 그 이환율이 높게 나타나고 있다(3). 아토피 피부염이라는 용어는 1933년 Hill과 Sulzberger가 호흡기 알레르기와 재발성 피부염이 동반되어 나타난다는 사실을 밝혀내고 처음 명명한 것으로(4), 현재의 치료는 스테로이드 계통의 연고나 외용제 또는 보습제나 면역 억제제들이 사용되고 있는데 부작용이 있거나 장기적으로 예후가 좋지 않아서 치료기간이 길어지더라도 부작용을 나타내지 않으면서 효과적인 치료약제의 개발이 필요하다(5). 아토피 피부염의 병태 생리는 피부 장벽기능 장애, 세포매개 면역반응의 변화, IgE가 매개된 과민증 및 환경 요인과 같은 다양한 요인을 가지며(6), 만성 염증과 간헐적인 기도폐쇄를 동반하는 기관지 천식이나 알레르기성 비염 등의 발생 빈도가 높아짐으로서 호흡기계 질환과도 깊은 관련성이 있다고 제시되었다(7). 이 같은 이유의 하나로, 두 질환 발생 요인의 하나인 도움 T 세포(Helper T-cell, Th)의 균형 파괴를 비롯하여 염증매개 세포인 호산구나 대식세포, 비만세포의 활성화, Interleukin (IL)-1, IL-4, Interferon (IFN)- γ , Tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 사이토카인 및 IgE와 같은 면역 매개물질 분비 등 여러 병인들의 복합적인 작용에서 기인한 것으로 알려져 있으며(8, 9), 자유 라디칼(free radicals) 또한 병인의 한 요인으로 제시된 바 있다(10).

자유라디칼로 인해 과량 생성된 ROS는 bid나 caspase -3 같은 apoptosis인자를 활성화시켜 계획된 세포 자멸사를 유발시킴으로서 세포를 퇴화 내지는 사멸시킨다고 알려져 있으며(11), 아토피 피부염에 의해 항원 자극된 CD4+ Th 세포는 Th1과 Th2 세포로 분화되고 Th2 세포에서 분비된 interleukin-4 (IL-4)는 B세포를 형질세포로 전환시킨 후 IgE 생성을 유도하여 혈청 내

IgE 수준을 급격히 높이는 동시에, 생성된 IgE는 조직 내 Fc-εR1 수용체를 매개로 하여 비만세포와 결합한 다음 소양감을 유발시키는 요인으로 작용한다(3).

비만세포가 아토피 피부염에 이완될 경우 IgE 수용체가 갑자기 증가하여 수많은 IgE-비만세포 결합체가 형성되고, 그 결과 비만세포에서는 탈과립 과정이 이루어짐에 따라 심한 소양감 증가현상을 초래하게 된다(12).

한편, Th1 세포에서 분비된 TNF-α는 염증세포의 침윤과 호산구의 생존율을 감소시켜 세포 자멸사를 유발하는 동시에(13), 호산구나 대식세포와 같은 염증매개세포에 의하여 만들어진 ROS와 함께 NF-κB의 활성화증가는 물론, 이들 세포로 하여금 호흡분출에 의한 과량의 ROS 생성을 촉진시켜 병변을 더욱 악화시킨다(14).

콜라겐은 Transforming growth factor-β (TGF-β)를 비롯한 palate-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGFs), cellular macrophage - colony stimulating factor (CM-CSF)와 같은 다양한 인자들이 관여함으로서 피부장벽의 회복과(15) 재생에 중요한 역할을 수행하고 있다(16). 따라서 본 연구는 혈청 내 IgE의 분석과 콜라겐, TNF-α의 밀도 관찰을 통해 각 오일이 손상된 피부장벽 개선에 미치는 영향을 측정하였다.

최근 식물의 화학성분인 페놀 화합물을 비롯한 이소프레노이드, 당배당체(glycoside)와 같은 물질에는 생리활성에 유효한 천연 성분들이 함유되어 있어서 산화적 손상을 비롯한 암이나 염증성 병변 치료에 매우 효과적으로 작용한다고 제시되었다(17, 18). 특히, 허브는 정유(essential oil)를 생성하여서 수정을 위해 곤충을 끌어들이거나 또는 독성을 분비하여 수정이나 열매결실의 방해로 막는 수단으로 사용하고 있다(19). 정유는 향기가 나면서 휘발성이 강한 물질로 지방유와는 다르고 기름보다는 물과 같은 농도를 지녔으며(20) 항산화뿐만 아니라 항염, 항독, 항균과 같은 다양한 효능을 나타내는 활성성분이 함유되어 있어 서양에서는 오래전부터 각종 질병의 치료를 위한 의약품 대용으로 사용되었다(21). 최근, 이 같은 허브성분의 생리활성을 더욱 강화시켜 보다 효율적인 치유효과를 나타낼 수 있는 향기치료(aromatherapy) 방법의 하나로 서로 다른 두 개 이상의 정유를 혼합한 블렌딩 기법(blending method)이 고안되면서 이들 혼합성분에 의한 시너지 효과를 극대화 할 수 있는 치유방법이 관심을 끌고 있다(22). 그러나, 오일의 블렌딩에 대한 효능검

정에 대해서는 몇몇 연구를 통해서 알려져 있을 뿐 아직까지 많이 이루어져 있지 않은 실정이다(23, 24).

허브 중 헬리크리섬(*Helichrysum italicum*, *Helichrysum*: HC)은 국화과(Asteraceae)에 속하는 식물로 북아프리카, 이탈리아, 스페인, 프랑스가 원산지이며 정유는 꽃 또는 윗부분의 줄기를 수증기증류법에 의해 추출한다. 오일은 황색에서 붉은색을 띠고 있으며 오래전부터 천식이나 만성 기관지염, 두통, 독감, 간염 및 우울증 등에 사용되어 왔다. 또한 화상이나 상처치료, 알레르기, 버짐 등의 치료에 사용되었고(25), 비강의 점액, 재채기, 가려운 피부 발진과 관련된 증상에 효능을 보인다(26). 오일에는 neryl acetate를 비롯한 γ -limonene, italdione, myrcene, α -terpinene, curcumene, α -pinene, linalol, terpinen-4-ol, guaiol 등과 같은 다양한 성분들이 함유되어 있으며, 특히, α -terpinene, curcumene, α -pinene, linalol, terpinen-4-ol과 같은 성분은 항산화나 항균, 항염에 매우 효과적인 성분으로 알려져 있어서(27) 아토피 피부염과 같은 피부질환 개선기능에 긍정적인 가능성을 유추할 수 있다.

헵프씨드(*Cannabis sativa*, Hemp seed oil: HS)는 뽕나무과(Moraceae)로서 유럽이나 아시아, 미국, 캐나다, 칠레가 원산지이며 씨를 냉압착하여 오일을 추출한다. 오랫동안 섬유 작물로 재배되었으며 종실의 기름함량이 많고 불포화지방산의 비율이 높아 식용유 원료작물로도 유망하나 이용 역사가 짧은 우리나라에서는 정보부족으로 인하여 소비자 기호도가 낮은 편이다(28). 오일은 진한 황녹색으로 palmitic acid와 stearic acid와 같은 포화지방산을 비롯하여, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid와 같은 불포화 지방산을 포함하고 있으며 중성 및 건성, 민감성 피부치료에 효과적인 것으로 알려져 있다(29).

그러나, 아토피 피부염에 대한 이들 각 오일의 효능에 대한 연구는 드물며(30), 전통적으로 사용되어 온 헬리크리섬의 약리적 활성에 비해 과학적인 입증은 소수에 불과하고(31) 더욱이, 두 오일을 혼합한 블렌딩 오일에 대한 연구는 더욱 그러하다(32).

따라서 본 연구는 헵프씨드 오일(HS) 및 헬리크리섬 오일(HC)과 헵프씨드 오일(HS)을 혼합한 오일(HH)을 이용하여 NC/Nga mice를 대상으로 산화적 손상에 대한 항산화 효과, NO (nitric oxide) 생성 억제능에 의한 항염 효과, 콜라겐 밀도 변화 측정을 통한 피부장벽 회복효과, 사이토카인인 TNF- α 의 변화측정을 통해 염증매개물질에 대한 효과분석 및 IgE 측정에 의한 면역효

과를 조사하였으며, 또한 피부염으로 유발된 긁기 행동관찰과 피부의 병변상태를 형태 또는 정량적으로 분석함으로써 천연소재, 특히 식물성 오일과 에센셜 오일을 대상으로 하여 아토피 피부염의 증상 개선 및 유용성 있는 치료적 대체물질을 탐색하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

A. 실험동물

실험동물은 태령 6주된 NC/Nga 마우스를 한일실험동물사(Seoul, Korea)에서 구입하였으며 각각 케이지에 넣은 후 고형사료(Samyang Co, Korea)와 물을 충분히 공급하였다. 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $58\pm 12\%$ 로 조절하였으며 밤과 낮의 길이는 12/12 간격으로 조절하였다. 위의 조절환경에서 1주일 동안 적응시킨 다음 본 실험에 사용하였다. 실험을 위하여 대조군(Acetone-Olive oil)을 비롯한 아토피 피부염 유발군, 헴프씨드 오일(HS) 처리군, 헬리크리섬(HC)-헴프씨드(HS) 오일을 혼합한 2% 블렌딩 오일(HH) 처리군으로 나누었으며, 동물은 Festing (33)의 오차유도 공식에 따라 각 군당 6마리씩 무작위로 배정하였다.

B. 세포주

본 실험에 사용한 NIH3T3 섬유모세포와 Raw 264.7 대식 세포주는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하여 사용하였다.

C. 세포배양

세포배양은 Michikawa 등(39)의 방법에 따라 배양 용기에 부착된 세포를 효소해리술에 의해 0.025% trypsin으로 세포를 분리시킨 다음 10% FBS가 혼합된 배양액에 넣어 well당 세포밀도가 1×10^5 이 되도록 산정하여 분주하였다. 분주 후 세포를 5% CO_2 로 조절된 정온기(Forma, USA)에서 72시간 동안 배양한 다음 실험에 사용하였다.

D. 실험재료

1. 시료

본 실험에 사용한 *Cannabis sativa* (Hemp seed oil)와 *Helichrysum italicum* (Helichrysum Essential oil)은 스킨메이트사(Skin-Mate.co.kr)가 수입한 오일을 제공받아 사용하였다.

2. 시약

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), aceton, dimethylsulfoxide (DMSO), XTT, ethanol, isopropanol, trypsin, nitroblue tetrazolium (NBT), xanthine, HCl, xylen, analine blue, hydrogen peroxide는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, fetal bovine serum (FBS), minimum essential medium (MEM)은 Gibco사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 또한, olive oil (Beksul Co., Korea)과 IgE ELISA kit (Komabiotech, Korea)를 구입하여 사용하였다.

3. DNCB 제조

DNCB제조를 위하여 아세톤과 올리브 오일(3:1)의 혼합액을 만든 다음, 혼합액 100 ml에 1 g의 DNCB를 정량하여 녹인 후 냉암소에 넣어 보관 사용하였다.

4. 시료 오일 성분

헴프씨드 오일(Hempseed, HS)과 헬리크리섬 오일(Helichrysum, HC)의 성분은 각각 Table 1과 2와 같다.

Table 1. The component of Hempseed (*Cannabis sativa*) oil

Components	Fatty Acid		content (%)
saturated fatty acid	C16.0	palmitic	6.0
	C18.0	stearic	2.0
simple unsaturated fatty acid	C18.1	oleic	14.0
poly unsaturated fatty acid	C18.2	linoleic	58.0
	C18.3	linolenic	20.0

Table 2. The component of *Helichrysum italicum* oil

Components	Element	Concent (%)
Monoterpene Hydrocarbons	α -pinene	12.4
	β -pinene	0.29
	α -terpinene	0.12
	γ -terpinene	0.26
	limonene	2.33
	paracymene	0.11
Sesquiterpene Hydrocarbons	β -caryophyllene	3.28
Monoterpene Alcohols	linalol	0.88
	terpinen-4-ol	0.33
Esters	neryl acetate	27.05
Oxides	1,8-cineol	0.20
Ketones	α -fenchene	0.31
	italidione I + II	3.98
	italidione III + neryl valerate	1.69
	Cis α -bergamotene	1.02
Coumarins	Trans α -bergamotene	0.78
Aldehydes	γ -curcumene	12.72
	Ar-curcumene	2.08
The others	alpha copaene	1.38
	italicene	2.97
	β -selinene	3.81
	α -selinene	2.63
	neryl propionate	1.00
	trans nerolidol	0.15

E. 실험방법

1. 블랜딩 오일 제조

두 오일의 혼합을 위한 2% 블랜딩 오일(Hempseed + Helichrysum, HH)의 제조는 Battaglia (34)의 오일 사용지침에 따라 헴프씨드 오일 100 ml에 2 ml의 헬리크리섬오일을 넣고 흔들어서 균일하게 만든 후 사용하였다. 제조된 오일은 즉시 차광병에 넣어 냉암소에서 보관하여 사용하였다.

2. 피부염 유발 및 오일 도포

아토피 피부염 유발을 위하여 Hirochi (35)의 방법에 따라 NC/Nga 마우스의 등과 다리의 털을 제모기를 이용하여 깨끗하게 제거한 다음 24시간 동안 안정시켰다. 안정화가 끝난 후 1% DNCB를 등과 다리에 각각 200 ul 도포한 다음 4일 후에 0.2% DNCB 용액 150 ul를 일주일에 2회씩 3주간 도포하여 가피가 벗겨지고 긁는 행동이 심화되면 도포를 중단하였다. 아토피 피부염이 유발된 직후 헬리크리섬 오일(HC)과 헴프씨드 오일(HS)의 2% 블랜딩오일(HH)을 150 ul씩 매일 2회, 6일 동안 도포하였으며 오일을 도포하는 동안 피부상태 변화와 긁는 행동에 대한 관찰을 시행하였다.

3. 피부등급 평가

Dong (36)의 방법에 따라 아토피 피부염이 유발된 직후 6일간 오일을 도포하는 동안 피부변화에 대한 등급을 점수화하여 등급지수로 평가하였다. 즉, 증상이 전혀 없는 경우를 0점으로 하였으며, 매우 적게라도 피부염 증상이 있는 경우는 1점, 각 부위에 1/3정도의 피부염 증상이 있는 경우는 2점, 2/3정도의 피부염 증상이 있는 경우는 3점, 부위 전체에 피부염 증상이 있는 경우를 4점으로 각각 평가하였다. 따라서 도포 6일 동안 6마리의 총점수를 144 점, 등급지수를 4.0으로 하여 판정하였다.

4. 굽기에 대한 행동학적 관찰

Dong (36)의 방법에 따라 도포 6일 동안 각 실험군에서 마우스가 다리를 굽는 횟수를 매일 20분 동안 3번씩 총 18회를 관찰하였다. 이를 위하여 마우스의 발목에 아토피 피부염 유발과 동일하게 처리하였으며, 대조군에는 아세트톤 : 올리브 오일(3:1)을 처리하였다. 행동지수는 6일 동안 각 실험군의 개체가 굽는 총 횟수를 18회로 나눈 평균값을 산정하였다.

5. 햄프씨드 오일과 헬리크리섬 오일 및 햄프씨드-헬리크리섬 혼합 오일 세포독성과 세포생존률 측정

오일의 독성측정은 Doyle 등 (37)의 변형된 방법에 따라 0.5% DMSO에 용해시킨 2%와 3%의 블랜딩 오일(HH), HC, HS 각각을 DMEM 배양액으로 희석하여 2% 오일(HC, HS, HH) 및 3% 오일(HC, HS, HH)을 만들었다. 이들 오일 150 ul를 각 배양 세포에 3-12시간 동안 처리한 후 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

세포생존율은 Mosmann (38)의 방법에 따라, 배양 중인 세포에 오일을 농도별로 처리한 다음 실험 전날 제조한 XTT 50 ug/ml를 well당 20 ul씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후에 isopropanol을 첨가한 다음 실온에서 10분 동안 정제하였다. 정제 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. 오일의 항산화 측정

항산화 측정은 Kim (40)의 방법에 따라 superoxide anion-radical (SAR) 소거능을 측정하였으며, 오일 용액은 독성이 없는 2% 블랜딩 오일 HH와 HC, HS 용액을 30, 70, 110 ul의 저장액으로 각각 만들어 사용하였다. 측정을 위해 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원방법에 의해, 0.1 ml 오일용액과 0.1

M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.4 mM xanthine과 NBT를 첨가한 다음 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 NHCl 1ml를 넣어 반응을 정지시켜 반응 중 생성된 SAR양을 ELISA reader로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감수율을 백분율로 나타냈으며, vitamin E를 양성대조군으로 하여 비교 조사하였다.

7. NO 생성 억제능 측정

항염 측정을 위하여 Wang (41)의 방법에 따라 염증물질인 nitric oxide (NO) 생성에 대한 억제능을 측정하였다. 이를 위해 독성이 없는 2% 오일용액(HC, HS, HH)을 30, 70, 110 ul의 농도로 각각 만든 다음 Raw 264.7 배양세포에 2시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml의 LPS로 18시간 동안 세포를 배양하였다. 배양 완료 후 배양액 50 ul와 동량의 Griess reagent를 넣고 10분 동안 상온에서 반응시킨 다음 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO는 대조군에 대한 백분율로 나타냈다.

8. 혈청 내 IgE 측정

소양감의 증감과 연관이 있는 IgE의 변화 측정을 위한 실험으로 채혈을 위하여 통상적인 방법에 따라, 마우스의 눈자위에 있는 혈관으로부터 1.5 ml의 혈액을 채취하여 capillary tube에 넣어 4°C, 3,000 rpm에서 30분간 원침하였다. 원침 완료 후 상등액을 취하여 -70 °C에 보관하였다. 혈청 내 IgE의 측정은 IgE ELISA kit (Komabiotech, Korea)의 분석방법에 따라 검체 용액을 1차 항체가 처리된 well plate에 넣은 후 2차 항체인 HRP-conjugated goat anti mouse IgE (1:10,000)로 처리한 다음 발색을 유도 후 반응을 정지시켜 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IgE양은 대조군에 대한 실험군의 백분율로 나타냈다.

9. 총 콜라겐 밀도 측정

피부장벽 회복 효과를 확인하기 위한 콜라겐의 밀도 측정을 위해 Masson trichrome 염색을 시행하였다. 즉, 10% neutral buffered formalin (NBF)에 고정된 조직에 파라핀 포맷을 시행한 후 4 um 두께로 절편하였다. 절편된 조직은 탈 파라핀과 alcohol의 함수과정을 거친 후 증류수로 세척하였다. 세척 후 Bouin용액에 1시간 동안 매염한 후 alcohol순으로 탈수하였다. 탈수 후 Weigert iron hematoxylin 용액과 Biebrich scarlet-acid fuchsin 용액, aniline blue 용액으로 처리한 다음 탈수, 투명과정을 거쳐 봉입하고 광학현미경 (Olympus BX 50, Japan)으로 관찰하였다. 검정한 염색조직은 영상카메라로 포착하여 TIF(tagged image file)에 저장한 후 영상분석프로그램을 이용하여 영상을 얻었으며, 얻은 영상은 450 MHz 펜티엄 프로세서와 영상보드(Media Cybernetics, USA)가 장착된 컴퓨터시스템을 이용하여 단위면적당 염색된 콜라겐 밀도를 산출하였다. 밀도산출은 각 실험군의 개체 조직으로부터 단위면적($372,559.7 \text{ um}^2$)의 범위 내에서 한 개체 당 무작위로 표본을 3회 관측하여 합산한 값에 대한 중앙값으로 표시하였으며 동시에 단위면적에 대한 백분율로 표시하였다.

10. TNF- α 밀도 측정

염증매개 물질에 대한 효과분석을 위해 TNF- α 의 밀도 측정을 면역조직화학염색을 이용하여 시행하였다. 즉, 4 um의 파라핀 절편을 58°C에서 건조시킨 후 xylen과 alcohol의 농도순으로 탈파라핀과 함수과정을 거쳤다. 수세 후 3% hydrogen peroxide로 5분간 처리하여 내인성 과산화효소활성을 제거한 후 1차 항체인 anti-rabbit polyclonal TNF- α antibody (AbCam, Cambridge, UK)를 1:50으로 희석 처리하였다. 수세과정을 거쳐 Envision detection kit (Dako, Denmark)를 이용하여 처리하고 DAB에 의한 발색과 Gill's hematoxyrin으로 대조 염색한 다음 탈수, 투명과정을 거쳐 봉입 후 광학현미경(Olympus BX 50, Japan)으로 관찰하였다. 검정조직은 콜라겐 측정과 같이 영상분석프로그램과 450 MHz 펜티엄 프로세서와 영상보드(Media Cybernetics, USA)가 장착된

컴퓨터시스템을 이용하여 단위면적당 염색된 TNF- α 의 밀도를 산출하였다. 밀도산출은 각 실험군의 개체 조직으로부터 단위면적($370,735 \text{ um}^2$)의 범위 내에서 한 개체 당 무작위로 표본을 3회 관측하여 합산한 값에 대한 중앙값으로 표시하였으며 동시에 단위면적에 대한 백분율로 표시하였다.

11. 통계처리

본 실험의 자료는 SPSS 12.0 program으로 처리하였으며, 군간 차이값의 비교를 위하여 ANOVA를 실시하였고 사후 검정은 Tukey's post-hoc test에 의하였다. 또한, P 값은 0.05미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

A. 피부등급 평가

피부등급 평가에 있어서 오일 도포 6일 동안 등급 총점수인 144점 중 아토피 피부염 유발군은 138점으로 등급지수 3.8로 나타난 반면, 오일 도포 중 Hempseed oil (HS)은 74점으로 등급지수 2.1로 나타났다. 또한, HS와 Helichrysum oil (HC)과의 혼합 오일인 2% 블랜딩 오일(HH)은 50점, 등급지수 1.4로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 두 오일 모두 유의한 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Table 3). 동물실험에 대한 사진 결과도 위와 일치함을 알 수 있다 (Fig. 1).

Table 3. Effect of HS and HH oil on skin lesions in NC/Nga mice

Treated days	Total score	DNCB - induced AD group,	oil	
			HS	HH
1	24	23	21	20
2	24	23	17	13
3	24	23	14	8
4	24	23	11	6
5	24	23	7	2
6	24	23	4	1
Total	144 (4.0±0.000)	138 (3.8±0.378)	74 (2.1±1.145) ^{***}	50 (1.4±1.178) ^{***}

AD-induced mice were treated with Hempseed oil (HS) and 2% blending oil [Helichrysum (HC)+Hempseed (HS), HH]. The data was represented mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from AD-induced group. ^{***} $p < 0.001$

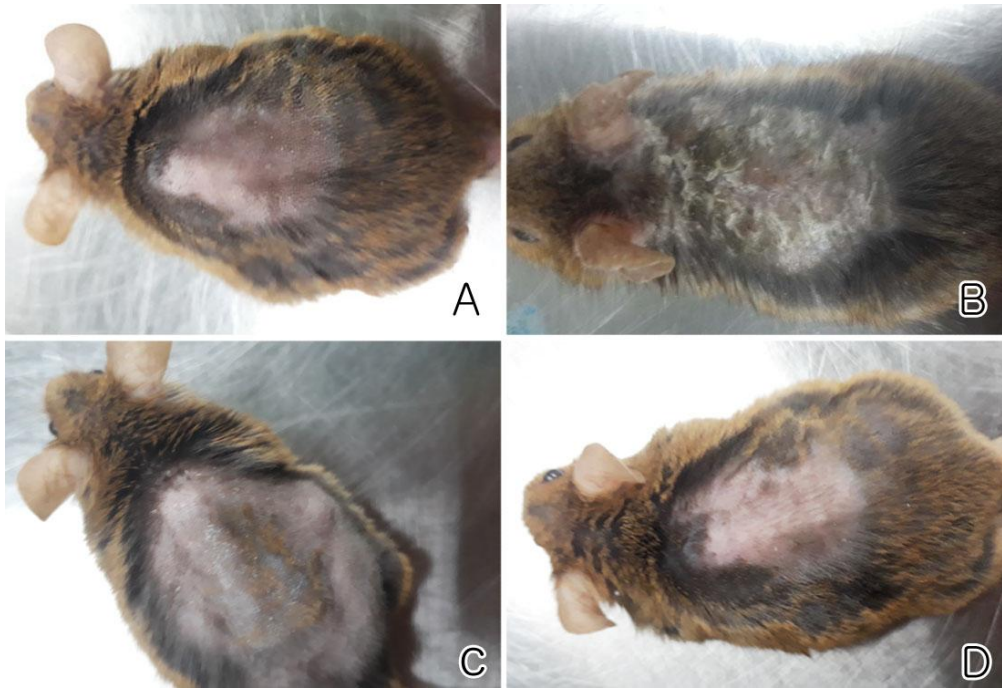


Fig. 1. Skin lesions

A: Acetone-olive oil induced group

B: DNCB - induced AD group.

C: Hempseed oil (HS)-treated group,

D: 2% Blending oil (HH)-treated group.

B. 행동학적 관찰 평가

6일 동안의 오일 도포에 있어서 마우스의 다리 긁기에 대한 행동학적 관찰 결과 acetone-olive oil 혼합용액(3:1)만을 처리한 대조군(V-C)에서는 긁는 총 횟수가 54회로 행동지수 3이 나온 반면, 아토피 피부염 유발군에서는 총 횟수 234회, 행동지수 13으로 높게 나타났다. 이에 비하여 HS 처리에서는 총 횟수 126회, 행동지수 7로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 보였으며($p<0.001$), 특히 2% 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 총 횟수 90회, 행동지수 5로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 매우 유의한 행동지수의 감소를 나타냈다($p<0.001$) (Table 4).

Table 4. Effect of HS and HH oil on scratching behavior in NC/Nga mice

Treated days	V-C	DNCB - induced AD group,	oil	
			HS	HH
1	8	36	33	26
2	7	32	25	18
3	7	36	21	15
4	9	40	19	13
5	9	44	15	10
6	14	46	13	8
Total	54(3±1.318)	234(13±2.656)	126(7±2.549) ^{***}	90(5±2.267) ^{***}

AD-induced mice were treated with Hempseed oil (HS) and 2% blending oil [Helichrysum (HC)+Hempseed (HS), HH]. Control group (V-C) was treated with acetone-olive oil. The data was represented mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from AD-induced group.

^{***} $p<0.001$

C. 오일의 세포독성 측정

오일의 세포독성 조사를 위하여 배양 세포에 오일을 각각 3-12시간 동안 처리한 결과는 Table 5, 6과 같다. 먼저 2% HC 처리에 있어서 세포생존율은 대조군인 100%에 비하여 3시간 처리에서 98.5%로 나타난 반면, 6시간 처리에서는 97.1%, 12시간 처리에서는 96.7%로 각각 나타났다. 한편, 2% HS 처리에 있어서 세포생존율은 3시간 처리에서 대조군에 비하여 96.4%로 나타났으며 6시간 처리에서는 96.3%, 12시간 처리에서는 95.2%로 각각 나타났다. 이에 비하여 블랜딩 오일인 2% HH 처리에 있어서, 세포생존율은 대조군인 100%에 비하여 3시간 처리에서 98.8%로 나타난 반면, 6시간 처리에서 98.2%, 12시간 처리에서 97.1%로 각각 나타났다(Fig. 2). 한편, 3% HC인 경우 세포생존율은 대조군인 100%에 비하여 3시간 처리에서는 96.7%로 나타난 반면, 6시간 처리에서는 96.5%, 12시간 처리에서 95.9%로 각각 나타났다. 3% HS의 경우, 세포생존율은 3시간 처리에서 대조군에 비하여 96.2%로 나타났으며 6시간 처리에서는 96.3%, 12시간 처리에서는 95.3%로 각각 나타났다. 이에 비하여 블랜딩 오일인 3% HH 처리에 있어서, 세포생존율은 대조군인 100%에 비하여 3시간 처리에서 97.9%, 6시간 처리에서는 96.8%, 12시간 처리에서 96.4%로 각각 나타났다(Fig. 3). 따라서 2%와 3%의 HC, HH 및 HS 간의 세포생존율에 있어서 모두 대조군에 비하여 유의한 차이가 없었다.

Table 5. The cytotoxicity of 2% HC, 2% HS, 2% HH by XTT assay

Treated time (hours)	XTT assay (450 nm) % (Mean±SD)		
	2% HC	2% HS	2% HH
Acetone-olive oil induced group	100 (1.315±0.075)	100 (1.207±0.144)	100 (1.157±0.140)
3	98.5 (1.295±0.020)	96.4 (1.164±0.091)	98.8 (1.143±0.064)
6	97.1 (1.277±0.089)	96.3 (1.162±0.111)	98.2 (1.136±0.110)
12	96.7 (1.272±0.049)	95.2 (1.149±0.064)	97.1 (1.123±0.100)

Cells were pretreated with 2% each oil (HC, HS, HH) for 2 hours. The data was represented mean±SD for triplicate experiments. There was no significant difference between control and experimental group.

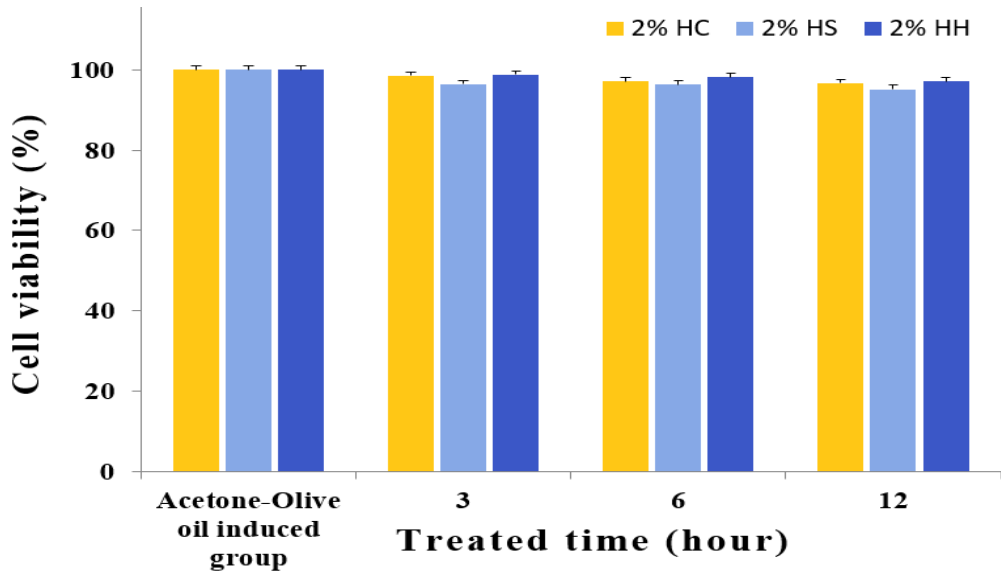


Fig. 2. The cytotoxicity of 2% oils [Helichrysum oil (HC), Hemp seed oil (HS), blending oil (HC+HS, HH)] . Cells were preincubated with each oil for 2 hours before the cell incubation for 3, 6 and 12 hours. The data represent as percentage of control for triplicate.

Table 6. The cytotoxicity of 3% HC, 3% HS, 3% HH by XTT assay

Treated time (hours)	XTT assay (450 nm) % (Mean±SD)		
	3% HC	3% HS	3% HH
Acetone-olive oil induced group	100 (1.036±0.089)	100 (1.106±0.114)	100 (1.264±0.154)
3	96.7 (1.002±0.085)	96.2 (1.064±0.052)	97.9 (1.237±0.075)
6	96.5 (1.000±0.141)	96.3 (1.065±0.070)	96.8 (1.224±0.072)
12	95.9 (0.994±0.238)	95.3 (1.054±0.090)	96.4 (1.218±0.104)

Cells were pretreated with 3% each oil (HC, HS, HH) for 2 hours. The data was represented mean±SD for triplicate experiments. There was no significant difference between control and experimental group.

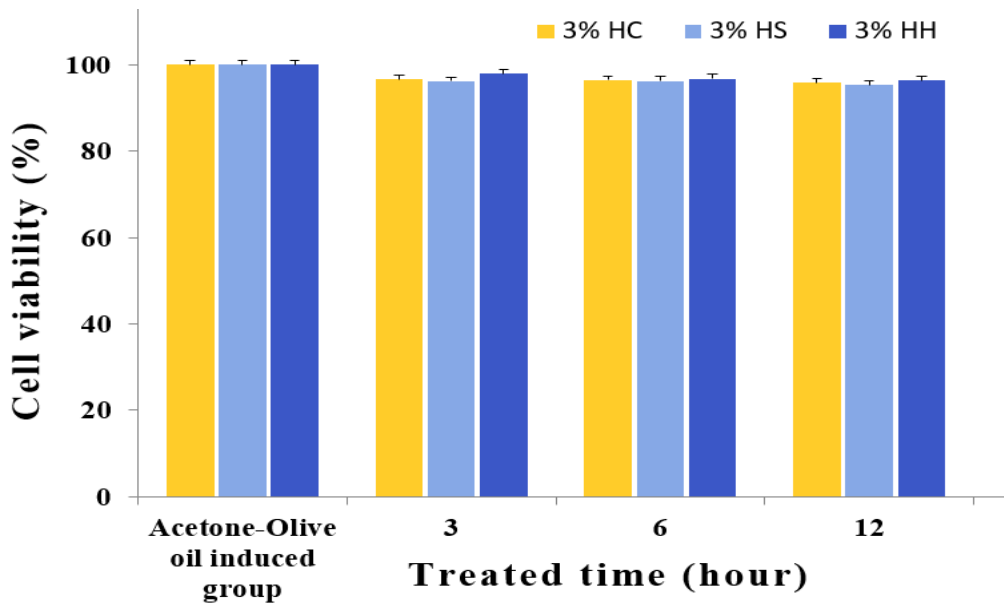


fig. 3. The cytotoxicity of 3% oils [Helichrysum (HC), Hemp seed (HS), blending oil (HC+HS, HH)] . Cells were preincubated with each oil for 2 hours before the cell incubation for 3, 6 and 12 hours. The data represent as percentage of control for triplicate.

D. 오일의 항산화 측정

항산화 측정을 위하여 superoxide anion-radical (SAR) 소거활성을 조사한 결과는 Table 7과 같다. HC의 30 ml 농도에서의 SAR 소거활성은 대조군인 100%에 비하여 89.4%로 나타났으며, 70 ul 농도에서는 83.1%로 나타났다. 또한, 110 ul 농도에서 소거활성은 71.5%로 나타났다(Fig. 4). 따라서, HC의 소거능은 30, 70, 110 ul 농도에서 각각 10.6%, 16.9%($p < 0.01$), 28.5%($p < 0.001$)로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다. 특히, 110 ul 농도에서의 소거능은 양성대조군인 vitamin E 소거능값(85.8%)의 33% 이상인 것으로 나타났다. 한편, HS의 소거활성에 있어서, 30 ul 농도에서 대조군인 100%에 비하여 92.8%로 나타났으며, 70 ul와 110 ul 농도에서는 각각 89.8%과 82.6%로 나타났다(Fig. 5). 따라서, HS의 소거능은 30, 70, 110 ul 농도에서 각각 7.2%, 10.2%, 17.4%($p < 0.05$)로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다. 특히, 110 ul 농도에서의 소거능은 양성대조군인 vitamin E 소거능값(87.3%)의 19% 이상인 것으로 나타났다. 한편, 2% 블렌딩 오일인 HH의 SAR 소거활성은 대조군인 100%에 비하여 85.0%로 나타났으며, 70 ul 농도에서는 75.6%로 나타났다. 또한, 110 ul 농도에서 소거활성은 58.2%로 나타났다(Fig. 6). 따라서, HH의 소거능은 30, 70, 110 ul 농도에서 각각 15.0%($p < 0.05$), 24.4%($p < 0.01$), 41.8%($p < 0.001$)로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다. 특히, 110 ul 농도에서의 소거능은 양성대조군인 vitamin E 소거능값(86.4%)의 48% 이상인 것으로 나타났다.

Table 7. Effect of several oils (HC, HS, HH) on superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity

Concentration of oil	superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity (560 nm) % (Mean±SD)		
	HC	HS	HH
Acetone-olive oil induced group	100 (0.302±0.010)	100 (0.236±0.009)	100 (0.213±0.011)
30vitamin E	14.2 (0.043±0.007)***	12.7 (0.030±0.003)***	13.6 (0.029±0.008)***
30 ul	89.4 (0.270±0.015)	92.8 (0.219±0.022)	85.0 (0.181±0.021)*
70 ul	83.1 (0.251±0.021)**	89.8 (0.212±0.014)	75.6 (0.161±0.004)**
110 ul	71.5 (0.216±0.010)***	82.6 (0.195±0.009)*	58.2 (0.124±0.008)***

SAR scavenging activity was performed on several oils [HC, HS, HH (HC+HS)]. Vitamin E was used as positive control. The data represent mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

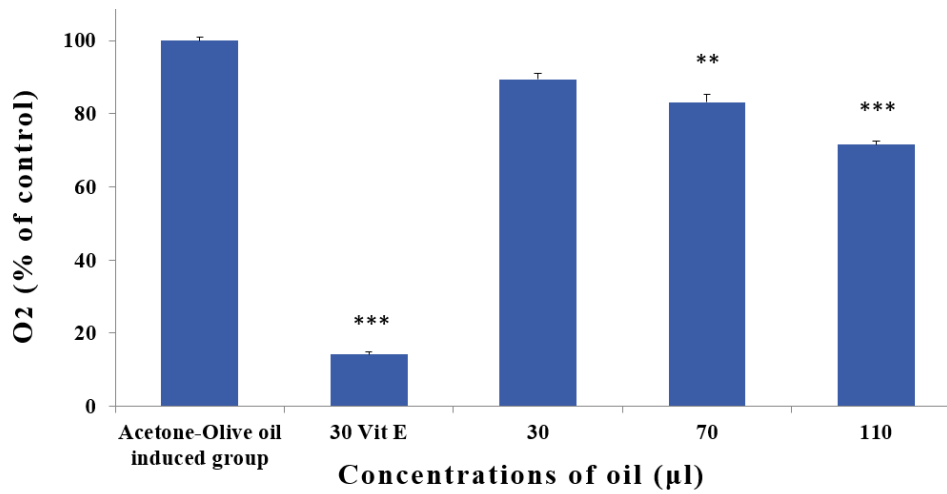


Fig. 4. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of HC oil. HC oil was accessed at the concentrations of 30, 70 and 110 ul. Vitamin E was used as positive control. The data represent mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

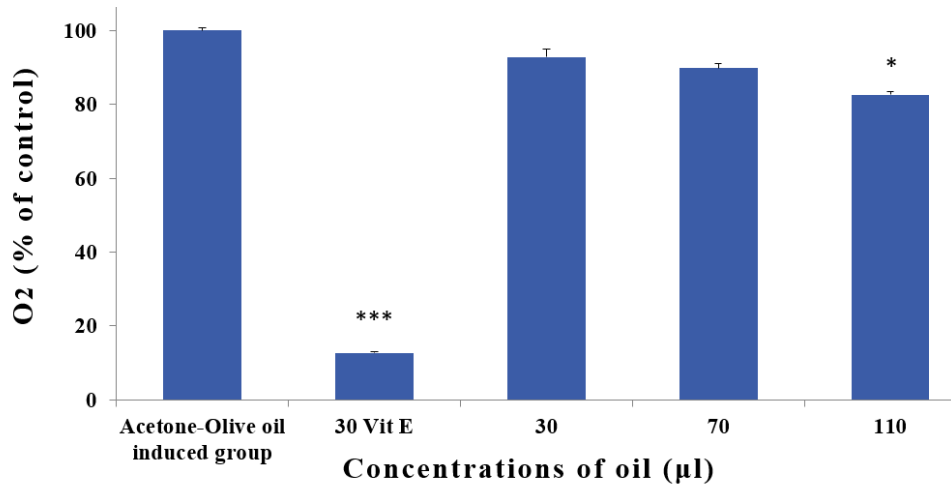


Fig. 5. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of HS oil. HS oil was accessed at the concentrations of 30, 70 and 110 µl. Vitamin E was used as positive control. The data represent mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

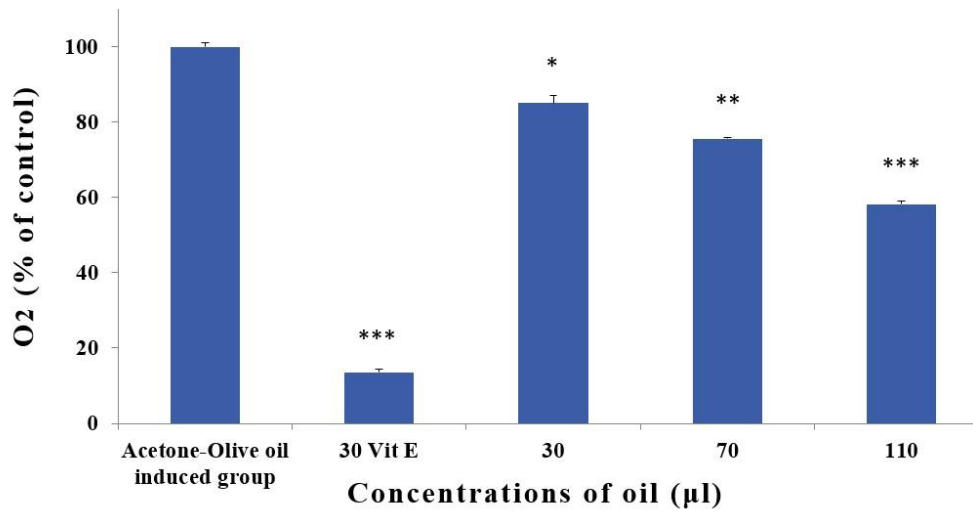


Fig. 6. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of HH oil. HH (HC+HS 2% blending) oil was accessed at the concentrations of 30, 70 and 110 ul. Vitamin E was used as positive control. The data represent mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

E. NO생성을 통한 항염 측정

항염 측정을 위하여 NO생성에 대한 저해활성을 조사한 결과는 Table 8과 같다. 먼저 2% HC의 30 ul 농도의 오일을 전 처리한 실험군(30+LPS)에서는 대조군(0+LPS)에 비하여 89.6%로 나타났으며, 70 ul(70+LPS)와 110 ul(110+LPS) 농도에서는 NO 저해활성이 각각 56.3%로 38.9%로 나타났다(Fig. 7). 따라서, 2% HC 30, 70, 110 ul 농도에서의 NO생성 저해능은 각각 10.4%, 43.7($p<0.001$), 61.1%($p<0.001$)로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의한 저해능의 증가를 나타냈다. 한편, 2% HS에 대한 저해활성은 30, 70, 110 ul 농도에서 대조군에 비하여 각각 93.8%, 67.6%, 54.8%로 나타났다(Fig. 8). 2% HS의 NO 저해능은 각각 6.2%, 32.4%($p<0.001$), 45.2%($p<0.001$)로 나타나 대조군에 비하여 유의한 저해능의 증가를 보였다. 또한, 2% 블렌딩 오일인 HH에 대한 NO 저해활성은 대조군에 비하여 30, 70, 110 ul 농도에서 각각 86.6%, 40.8%, 27.9%로 나타났다(Fig. 9) 따라서, 2% HH 저해능은 13.4%($p<0.05$), 59.2% ($p<0.001$), 72.1%($p<0.001$)로 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 저해능의 증가를 보였다.

Table 8. Effect of several oils (HC, HS, HH) on nitric oxide (NO) production

Concentration of oil (ul)	Inhibitory activity of NO production (540 nm) % (Mean±SD)			
	2% HC	2% HS	2% HH	P-value
0 + LPS	100 (1.756±0.044)	100 (1.913±0.096)	100 (1.842±0.081)	
30 + LPS	89.6 (1.573±0.157)	93.8 (1.794±0.122)	86.6 (1.596±0.026)*	p<0.05
70 + LPS	56.3 (0.989±0.126)***	67.6 (1.293±0.123)***	40.8 (0.752±0.082)***	p<0.001
110 + LPS	38.9 (0.683±0.160)***	54.8 (1.048±0.102)***	27.9 (0.513±0.090)***	p<0.001

The inhibitory activity of NO production was performed on several oils (2% HC, 2% HS, 2% HH). Cells were sensitized by LPS. The data represented mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control (0+LPS). *p<0.05, ***p<0.001

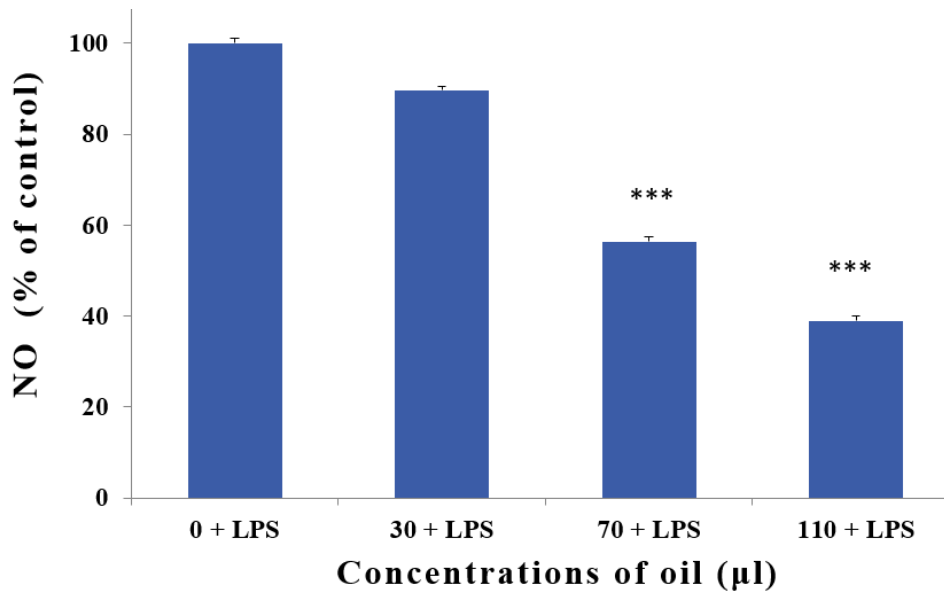


Fig. 7. NO inhibitory activity of 2% HC oil at the concentrations of 30, 70 and 110 µl. Asterisks denote results significantly different from the control (0+LPS). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

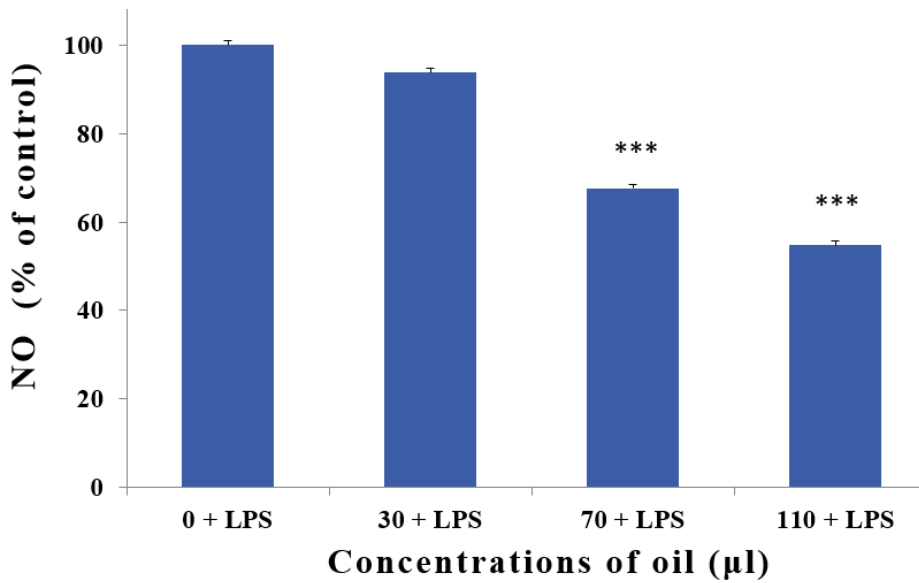


Fig. 8. NO inhibitory activity of 2% HS oil at the concentrations of 30, 70 and 110 ul. Asterisks denote results significantly different from the control (0+LPS). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

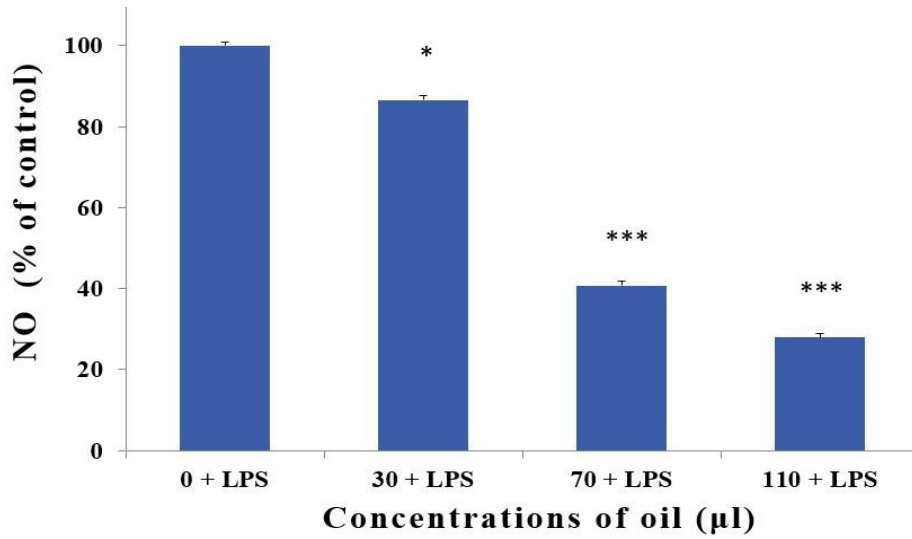


Fig. 9. NO inhibitory activity of 2% HH oil at the concentrations of 30, 70 and 110 µl. Asterisks denote results significantly different from the control (0+LPS). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

F. 혈청 내 IgE 변화

혈청 내 IgE의 변화에 대하여 조사한 결과는 Table 9와 같다. 아토피 피부염 유발군은 대조군인 100%에 비하여 149.3%로 많은 증가를 나타냈다. 이에 비하여 HS 처리군에서는 137.3%로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 감소를 보였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한, 2% 블렌딩 오일인 HH에서는 112.0%로 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$) (Fig. 10).

Table 9. The level of IgE of oils (HS, HH) in serum of NC/Nga mice

Experimental group	IgE level (Mean±SD)	P-value
Acetone-olive oil induced group	100 (0.075±0.007)	
DNCB - induced AD group,	149.3 (0.112±0.007)	
HS oil	137.3 (0.103±0.008)	
HH oil	112.0 (0.084±0.008)*	$p < 0.05$

The level of IgE in serum was assessed on HS (Hemp seed oil) and HH (HC+HS 2% Blending oil). The data represent as percentage of control for triplicate experiments. Significantly different from the positive control (AD). * $p < 0.05$

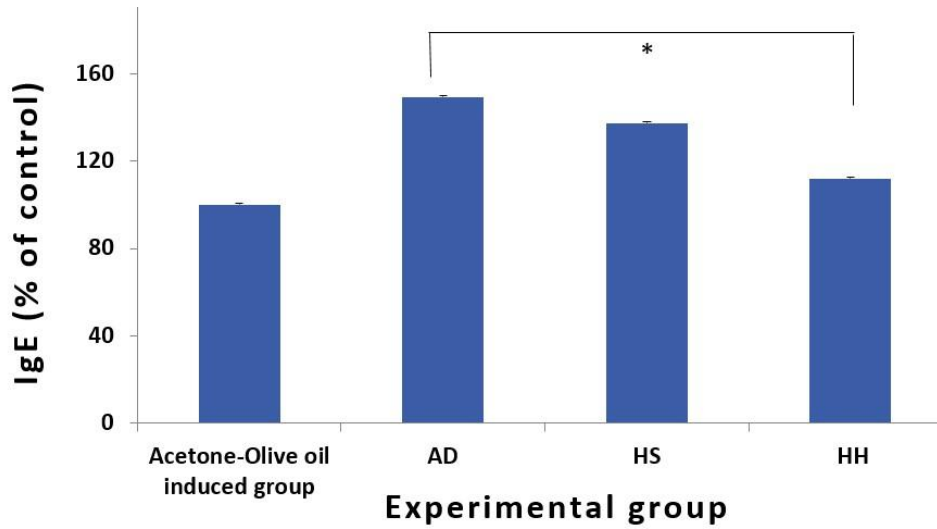


Fig. 10. The level of IgE in serum. AD mice were treated with Hempseed oil (HS) and 2% blending oil (HH). The data represent as percentage of control for triplicate experiments. Significantly different from the positive control (AD). * $p < 0.05$

G. 총 콜라겐 밀도 변화

콜라겐의 양적 변화에 대하여 조사한 결과는 Table 10와 같다. 아토피 피부염 유발군에서는 대조군인 100%에 비하여 186.0%로 많은 증가를 나타냈다. 이에 비하여 HS 처리군에서는 165.8%로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 보였다($p < 0.001$). 또한, 2% 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 145.6%로 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다 ($p < 0.001$) (Fig. 11). 콜라겐의 광학현미경적 관찰에 있어서 대조군(Fig. 12A)에 비하여 아토피 피부염 유발군에서는 진피와 피하조직 사이에 콜라겐의 밀도가 짙게 나타난 반면(Fig. 12B), HS 처리군(Fig. 12C)과 HH 처리군(Fig. 12D)에서는 아토피 피부염 유발군에 비하여 밀도가 매우 낮게 나타났다. 특히, HH 처리군에서는 HS 처리군보다 밀도가 더욱 낮게 나타났다.

Table 10. Total density of collagen of oils (HS, HH) in serum of NC/Nga mice

Experimental group	Total density of collagen (per 372,559.7 μm^2) Mean \pm SD	P-value
Acetone-olive oil induced group	100 (42,471.8 \pm 3,730.270)	
DNCB - induced AD group,	186.0 (78,997.5 \pm 2,588.564)	
HS oil	165.8 (70,413.8 \pm 1,218.892 ^{***})	$p < 0.001$
HH oil	145.6 (61,844.9 \pm 3,482.965 ^{***})	$p < 0.001$

Total density of collagen was assessed on HS (Hemp seed oil) and HH (HC+HS 2% Blending oil). The data represent mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the positive control (AD).

*** $p < 0.001$

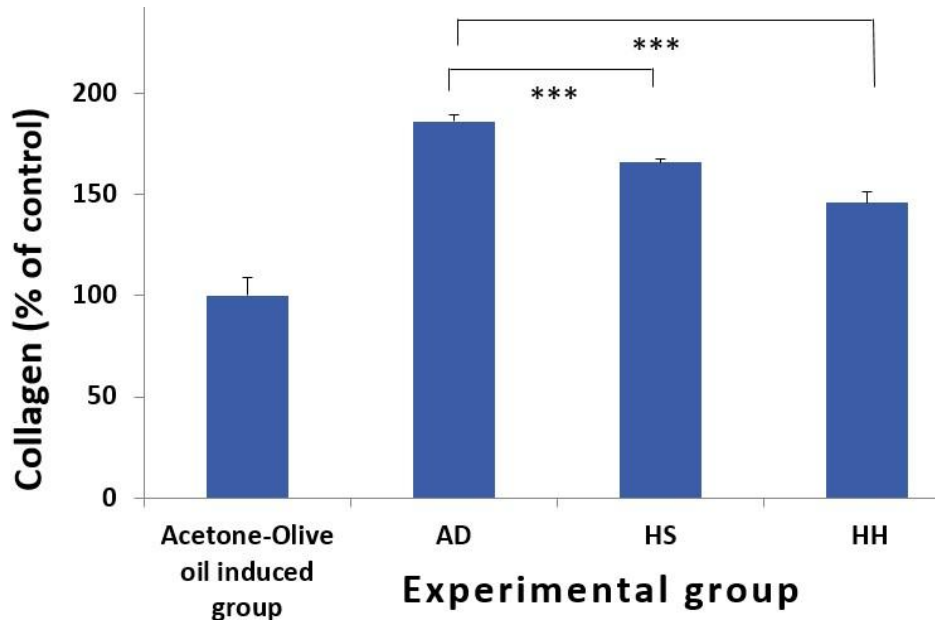


Fig. 11. Effect of Hempseed (HS) and 2% blending oil (HH) on total density of collagen. The data represent as percentage of control for triplicate experiments. Significantly different from the positive control (AD). *** $p < 0.001$

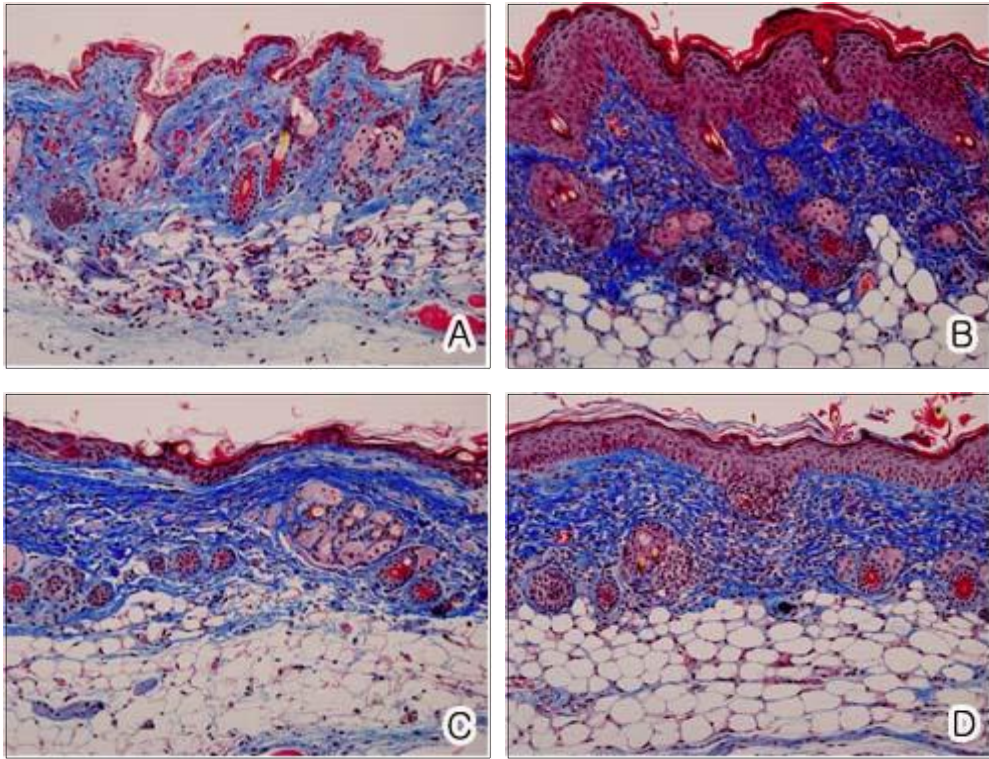


Fig. 12. The histological observation of collagen density in NC/Nga mice. A: Acetone-olive oil induced group, B: DNCB - induced AD group, C: HS oil-treated group, D: HH oil-treated group. x 200

H. TNF- α 밀도 변화

TNF- α 의 변화에 대하여 조사한 결과는 Table 11과 같다. 아토피 피부염 유발군에서는 대조군인 100%에 비하여 1022.80%로 많은 증가를 나타냈다. 반면, HS 처리군에서는 726.8%로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의하게 감소하였으며($p < 0.001$), HH 처리에 있어서도 593.2%로 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.001$) (Fig. 13). TNF- α 의 광학 현미경적 관찰에 있어서 아토피 피부염 유발군에서는 대조군(Fig. 14A)에 비하여 진피와 피하조직의 지방체 사이에 TNF- α 의 밀도가 짙게 나타난 반면 (Fig. 14B), 오일 처리군인 HS 처리군(Fig. 14C)과 HH 처리군에서는 아토피 피부염 유발군에 비하여 밀도가 매우 낮게 나타났다. 특히, HH 처리군에서는 HS 처리군보다 TNF- α 의 밀도가 더욱 낮게 나타났다(Fig. 14D).

Table 11. The change of TNF- α on oils (HS, HH) in NC/Nga mice

Experimental group	TNF- α (per 370,735 μm^2) Mean \pm SD	P-value
Acetone-olive oil induced group	100 (1,631.2 \pm 83.524)	
DNCB - induced AD group,	1022.80 (16,683.9 \pm 791.077)	
HS oil	726.8 (12,442.8 \pm 1,987.600 ^{***})	$p < 0.001$
HH oil	593.2 (9,676.3 \pm 762.748 ^{***})	$p < 0.001$

Total density of TNF- α was assessed on HS (Hempseed oil) and HH (HC+HS 2% Blending oil). The data represent mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the positive control (AD).

*** $p < 0.001$

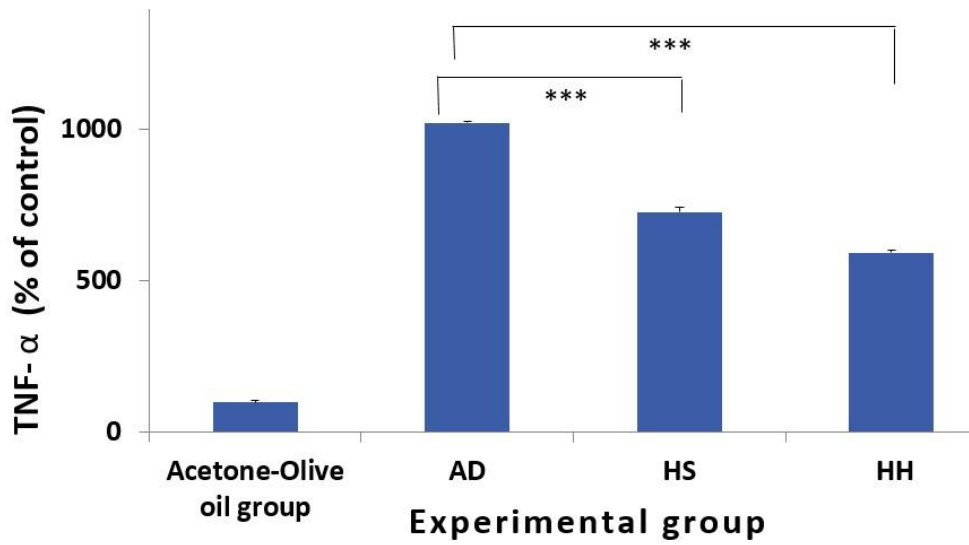


Fig. 13. Effect of Hempseed (HS) and 2% blending oil (HH) on TNF- α . The data represent as percentage of control for triplicate experiments. Significantly different from the positive control (AD). *** $p < 0.001$

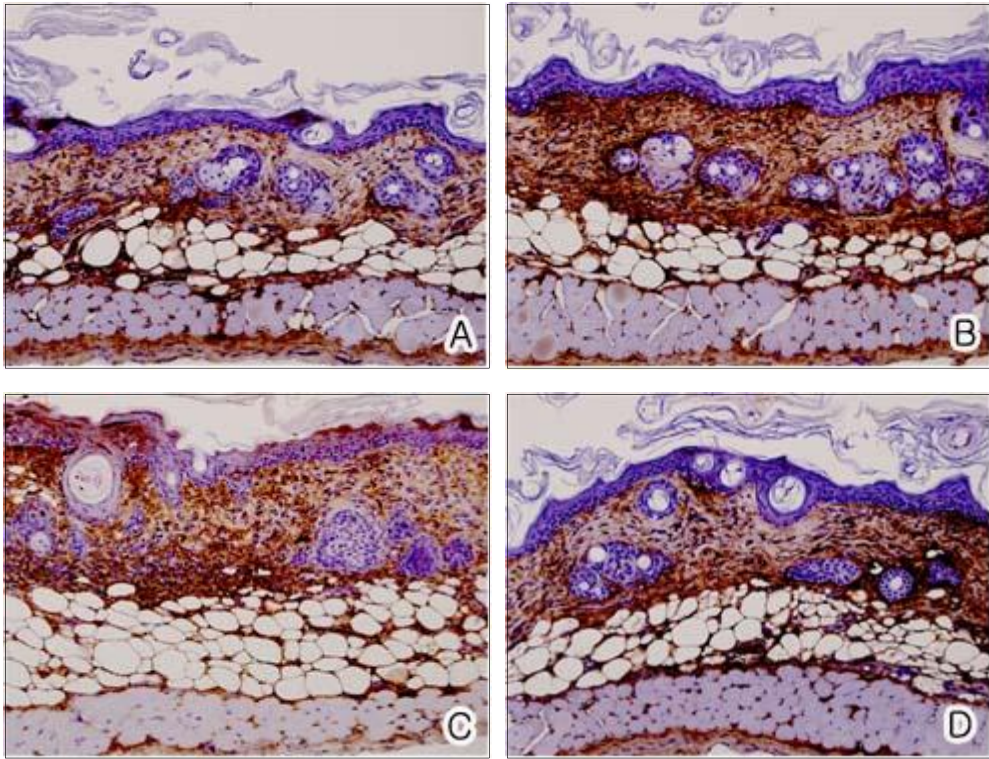


Fig. 14. The histological observation of TNF- α in NC/Nga mice. A: Acetone-olive oil induced group, B: DNCB - induced AD group, C: HS oil-treated group, D: HH oil-treated group. x 200

IV. 고 찰

아토피 피부염은 세계적으로 이환율이 급증하는 만성 피부질환으로(42) 알레르기 질환 특성상 원인을 한가지로 규정할 수 없으며, 호전과 악화를 반복하는 만성 질환이기 때문에 장기간의 꾸준한 치료가 필요하다(43). 이 때 장기치료에 대한 약물의 부작용이나 병변의 예후에 있어 치료적 한계가 보고된다(9).

향기 요법은 식물에서 추출한 휘발성 향류를 이용하여 질병을 예방하고 심신을 건강하게 하는 요법으로 그 기본원리는 코와 피부를 통해 향을 뇌에 전달하여 치료효과를 가져오는 것이다(44). 식물에서 추출한 오일은 세포 내 기관들을 둘러싸고 있는 막의 주된 구성 성분으로 1개의 지방과 1개의 산(酸), 두 부분으로 구성된 지방산으로 이루어져 있으며(45) 에센셜 오일 성분을 인체 내로 흡수시키는데 중요한 역할을 한다. 에센셜 오일은 식물의 다양한 부분에서 발견되는 물질이며 식물의 생명주기와 발아과정에 중요한 역할을 담당하고 질병에 대항하는 힘을 갖는다(46). 식물성 오일에 의해 인체 내에 흡수된 에센셜 오일의 향분자는 모세혈관에 흡수되어 체액의 흐름과 함께 신체의 각 기관과 조직에 확산되어 장기나 호르몬 작용에 영향을 주고 면역기능을 높인다(47). 본 연구에서는 식물성 오일과 에센셜 오일이 아토피 피부염의 병인에 미치는 영향을 조사하고자 NC/Nga 마우스를 대상으로 HS oil과 HC-HS 2% 블렌딩 오일(HH)의 치료효과를 측정하였다. 먼저, 손상된 피부장벽에 대해 오일이 미치는 효과를 알아보기 위하여 아토피 피부염이 유발된 마우스에 6일 동안 HS 오일과 HH 오일을 도포한 결과 아토피 피부염 유발군에서 피부등급지수가 3.8인 반면, HS와 HH의 처리에서는 각각 2.1과 1.4로 나타나 모두 유의한 등급감소를 보였다. 특히, 2% 블렌딩 오일인 HH는 HS보다 17% 이상 높은 등급을 보였다. 본 결과는 HS와 HH가 AD의 피부장벽 보호에 효과가 있다는 것을 말해주고 있으며 이 같은 치료효과는 이들 오일과 공동으로 함유된 pinene이나 linalol, terpinen-4-ol과 같은 염증치료에 효과적인 항균이나 항산화 성분들에 의한 것으로 생각된다(48).

한편, 굽기에 의한 행동학적 관찰에 있어서, Acetone-olive 혼합오일 처리군에서는 굽는 총 횟수가 54번으로 행동지수인 평균값이 3회로 나타난 반면, 아토피 피부염 유발군에서는 234번, 행동지수 13회로 높게 나타났다. 이에 비

하여 HS와 2% 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 각각 126번으로 행동지수 7회, 90번으로 행동지수 5회로 나타나 이는 모두 아토피 피부염 유발균에 비하여 유의한 행동지수의 감소를 나타냈다. 특히, 2% 블렌딩 오일(HH)은 단일 오일인 HS보다 효과가 65% 이상으로 나타나 높은 상승효과를 보였다. 본 연구 결과는 오일 도포가 아토피 피부염의 치료에 효과가 있음을 제시하고 있으며, 더욱이 단일오일 처리보다는 각각 서로 다른 두 종류의 혼합 오일이 더욱 효과적인 것으로 나타났다(22). Yamashita 등(49)은 굵기와 같은 소양감은 IgE와 밀접한 관련이 있다고 시사하였으며, Kotani 등(50)도 IgE나 IL-4, IL-13과 같은 사이토카인이 밀접한 관련이 있다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에 있어서도 오일 처리에 의한 IgE의 감소 결과와 일치한 것으로 보아 HS와 HH오일이 행동학적 관찰에 영향을 준 것으로 생각된다.

오일의 세포독성 조사에서는 2%와 3%의 HC, HS 및 HH에 대한 세포생존율이 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않음으로서 오일에 의한 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 단, HC의 경우 세포독성이 없는 것으로 알려져 있으나 선별된 암세포에서 세포사멸을 유도했다는 보고가 있어 항암치료를 위한 적용 시에는 주의가 필요한 것으로 알려져 있으며(51), HS는 식물성 캐리어 오일로 독성은 없으나 linoleic acid나 linolenic acid와 같은 지방산들이 다량 포함되어 있어 열과 빛에 노출된 경우 산패에 의해 독성을 초래함으로써 보관에 유의하여야 한다(29).

한편, 오일 자체의 항산화능을 측정하기 위하여 superoxide anion-radical (SAR)의 소거능을 조사하였다. 그 결과 HC와 HS 및 HH의 소거능은 각각 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 세 종류 오일의 110 ul 농도에서는 각각 소거능이 대조군에 비하여 28.5% ($p < 0.001$), 17.4% ($p < 0.05$), 41.8% ($p < 0.001$) 로 나타남으로서 모두 유의한 증가를 나타냈다. 특히, 2% 블렌딩 오일인 HH는 HS에 비하여 거의 25% 더 높은 소거능을 보였다. 이는 단일 오일보다는 혼합 오일이 더욱 효과가 높은 것을 제시하고 있다. 따라서, 본 연구 결과는 각 오일이 항산화능을 가지고 있음을 말해주고 있으며, 이는 HC가 높은 DPPH 소거와 같은 항산화능을 가지고 있다는 보고와도 일맥상통함을 알 수 있었다(47). 또한, HS의 경우에 있어서도 고혈압쥐 (SHR)에서 HS가 혈장 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 효소활성을 증가시킴으로서 항산능이 있다는 것을 보고한 연구 결과와도 일치하였다(52).

이 같은 현상은 HC에 함유되어 있는 linalol을 비롯한 terpinen-4-ol이나 curcumene과 같은 항산화 성분이나 HS에 포함된 필수지방산인 linoleic acid나 linolenic acid와 같은 성분들의 영향인 것으로 생각된다. 특히, 블랜딩 오일인 HH 처리에서는 HS에 비하여 거의 25% 이상 더 높은 소거능을 보였는데, 이는 두 오일 속에 포함된 성분들의 상호 상승작용에 의한 시너지효과에 기인한 것으로 생각된다.

본 실험에서는 오일의 항염증능을 알아보기 위하여 대표적인 염증물질의 하나인 NO 생성에 대한 억제능을 조사하였다. 그 결과 오일 처리에서는 농도 의존적으로 모두 NO생성을 억제하였다. 특히, 2% HC와 2% HH, 2% HS 오일의 110 ul 농도에 있어서의 NO생성에 대한 억제능은 각각 61.1%, 72.1%, 45.2%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 NO 억제능을 나타냈다 ($p < 0.001$). 특히, 110 ul 농도에 있어서 2% 블랜딩 오일인 HH처리에서 HS처리에 비해 25% 이상 더 높은 억제능을 보인 것은 아마도 단일 오일에 비하여 두 종류 오일 성분의 상승효과에 기인한 것으로 생각된다. 본 연구 결과는 HC나 HS, HH오일이 항염 효과가 있다는 것을 말해주고 있으며, 이는 HC에 함유된 pinene을 비롯한 limonene, nerol과 같은 항염 성분이나 또는 HS에 함유된 linoleic acid나 oleic acid 또는 palmitic acid와 같은 필수지방산 성분들의 영향 때문인 것으로 생각된다(25). 특히, 아토피 피부염 환자에 있어서 혈중 필수지방산의 농도가 낮게 나타남으로서 염증반응을 악화 내지는 병변을 가속화 시키는 요인으로 작용한다고 알려져 있기 때문에(53) 이 같은 결과는 개선의 의미가 있다고 하겠다.

IgE는 아토피 피부염에 있어서 비만세포와 함께 소양증을 유발하는 병인의 중요한 인자 중 하나로 알려져 있다(14). 따라서, 본 연구에서는 IgE에 대한 오일의 영향을 조사하였다. 그 결과, 아토피 피부염 유발군에서는 대조군(100%)에 비하여 149.3%로 높게 나타난 반면, HS 처리에서는 137.3%로 감소를 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한, HH 처리에서는 112.0%로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 IgE의 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$). 특히, 블랜딩 오일인 HH 처리는 단일 오일인 HS 처리에서 보다 25% 이상 더 많은 IgE의 양적감소를 보였다. 이 같은 결과는 각각의 라벤더 오일과 타임 오일 및 두 오일을 혼합한 블랜딩 오일을 아토피 피부염 유발쥐에 도포한 결과 모두 유의한 IgE 감소를 보고하였으며, 특히 블랜딩 오일의

처리에서는 단일 오일의 처리에서보다 더 높은 IgE의 억제능을 보였다는 연구 결과와도 일치함을 알 수 있었다(54). IgE는 아토피 피부염 유발 시 비만 세포에 위치하고 있는 FcεRI 수용체와 결합하여 비만세포로 하여금 탈과립 유도를 촉진시켜 극심한 소양증을 유발한다고 알려져 있다(12). 따라서, IgE의 양적감소는 소양증의 감소와 함께 피부장벽의 손상을 방어해 줌으로서 아토피 피부염 병변치료에 중요한 역할을 한다(55).

콜라겐 합성은 아토피 피부염 병변을 비롯한 창상이나 화상 등으로 인해 손상된 피부장벽을 재생 또는 회복시켜 주는데 있어 필수적인 과정이다(56). 본 연구에서는 오일이 총 콜라겐의 밀도 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 아토피 피부염 유발군에서는 대조군(100%)에 비하여 콜라겐이 186.0%로 매우 높게 증가한 반면, HS 처리에서는 165.8%로 나타나 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다($p < 0.001$). 또한, HH 처리에서는 145.6%로 나타나 이 역시 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 보였다($p < 0.001$). 특히, 블랜딩 오일인 HH 처리가 단일 오일인 HS 처리에 비하여 20% 이상 더 높은 양적 감소를 보였다. 광학 현미경적 관찰에 있어서도 위의 정량적 분석과 같이 아토피 피부염 유발군에서는 콜라겐 밀도가 매우 높게 나타난 반면, 오일 처리군에서는 아토피 피부염 유발군에 비하여 밀도가 유의하게 낮게 나타났다. 또한, 블랜딩 오일인 HH 처리에서는 단일 오일인 HS 처리에서보다 더 낮은 밀도를 나타냈다. 본 연구 결과에 있어서 오일도포가 아토피 피부염 유발에 의해 손상된 피부에 대응해 콜라겐 합성을 증가시킨 후 오일 도포와 함께 회복이 진행됨에 따라 점차 합성이 감소된 것을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 Park 등(57)이 세 종류의 허브오일을 블랜딩하여 아토피 피부염이 유도된 마우스에 적용한 결과 콜라겐의 양적감소와 함께 치료에 효과를 보였다는 연구 보고와도 일치하였다. 본 결과에서와 같이 오일이 콜라겐 합성을 유도하여 상처부위를 재생시키는 현상으로는, fibronectin에 의한 상처부위로의 섬유모세포 이동과 활성을 비롯한 hyaluronan 기질합성 및 육아조직 형성을 위한 TGF-β의 표현과 같은 다양한 인자들의 상호작용과 밀접한 관련이 있다는 것을 근거로 할 때(58), 본 연구에서도 오일이 위와 같은 인자들에 영향을 준 결과인 것으로 생각된다. 이 같은 증거의 하나로 아토피 피부염 유발쥐에서 세 종류의 혼합오일을 처리한 결과 아토피 피부염 유발군에 비하여 TGF-β의 양적감소 변화를 보고한 결과가 이를 증명하고

있다(59).

한편, TNF- α 는 Th1 세포에서 생산되는 사이토카인의 일종으로 염증반응에서 산소자유라디칼과 함께 중요한 역할을 한다(8). 특히, TNF- α 는 핵전사인자인 NF- κ B의 활성을 증가시킴으로서 비만세포의 탈과립과 caspase-3와 같은 세포 자멸사 인자를 자극하여 세포 사멸을 유도함으로써 병변을 더욱 악화시킨다고 알려져 있다(60). 본 연구에서는 오일 처리가 TNF- α 에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 아토피 피부염 유발군에서는 대조군(100%)에 비하여 1022.8%로 매우 높게 나타난 반면, HS 처리에서는 726.8%로 아토피 피부염 유발군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다($p < 0.001$). 또한, 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 593.2%로 이 역시 아토피 피부염 유발군에 비하여 매우 유의한 감소를 나타냈다($p < 0.001$). 이에 대한 광학 현미경적 관찰에 있어서도 아토피 피부염 유발군에서는 대조군에 비하여 TNF- α 발현이 매우 높게 나타난 반면, HS, HH 처리군에서는 아토피 피부염 유발군에 비하여 현저히 감소하였다. 또한, 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 단일 오일인 HS 처리에 비하여 발현이 더욱 낮게 나타남으로서 두 종류 오일 성분들의 상호작용으로 인한 상승효과에 기인한 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 오일이 TNF- α 의 발현을 억제하는 것을 암시하고 있으며, 실제로 아토피 피부염이 유발된 마우스에서 헬리크리섬과 헵프씨드 오일을 혼합한 블렌딩 오일(HH)을 처리한 결과 아토피 피부염 유발군에 비해 발현이 유의하게 감소되었다는 연구 결과와도 일치하였다. 이 같은 현상의 요인으로는 오일 속에 함유되어 있는 성분이 아토피 피부염 자극에 의하여 활성화된 Th 세포를 비감작화시킴으로서 Th 세포의 분화에 따른 TNF- α 의 분비저해를 유도한 동시에(61), 또한, Th1 세포에서 분비되는 IL-2에 의한 IL-5 생성을 억제함으로써 염증세포 형질막의 NADPH oxidase의 활성에 의해 산소 호흡 분출을 저해하여 이로 인해 TNF- α 생성 자극이 저해된 결과라고 생각된다(62).

따라서 본 연구를 통해 HS oil과 HH oil이 아토피 피부염의 병인에 미치는 영향을 다양한 측면에서 조사함으로써 이를 기초로 향후 아토피 피부염과 같은 만성 피부질환에 대한 치료를 식물성 오일과 에센셜 오일의 측면에서 접근할 수 있는 기초적 자료를 제시하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 Hempseed oil (HS)과 Hempseed oil-Henlichrysum 혼합 오일(HH)이 아토피 피부염의 병인에 대해 미치는 영향을 평가하고 아토피 피부염 치료 대체 물질로서의 유용성을 알아보기 위해 NC/Nga mice를 대상으로 피부등급 평가, 행동관찰, 항산화와 항염 측정, 그리고 혈청 내 IgE 변화 측정, 콜라겐과 TNF- α 밀도 등을 조사하였다. 실험 결과는 다음과 같다.

1. 본 연구의 피부등급평가와 행동학적 관찰에 있어서, 아토피 피부염 유발군에 비하여 오일 처리군(HS, HH)에서는 모두 유의한 등급감소와 긁는 행동의 행동지수 완화를 나타냈으며, 또한 HH처리에서는 HS처리에서 보다 낮게 나타남으로서 블랜딩 오일이 단일 오일에 비하여 성분들의 상승효과에 의해 효능이 더 높게 나타났다.

2. 오일의 세포독성 조사에 있어서 2%와 3%의 HC, HS 및 HH 처리에서는 대조군과 오일 처리군 간에 유의한 세포생존율의 차이가 없어 오일에 의한 세포독성이 없는 것으로 나타났다.

3. SAR 소거능에 의한 항산화능과 NO생성 억제에 의한 항염능의 측정에 있어서 HC, HS 및 HH처리에서는 모두 처리농도(30-110 μ l)에 의존적으로 대조군에 비하여 SAR 소거능과 NO생성 억제능의 유의한 증가를 보였으며, 특히 HH처리가 HC나 HS의 처리에 비하여 더욱 높은 소거능과 억제능을 보임으로서 단독 오일에서보다 블랜딩 오일에서 상승효과가 있는 것으로 나타났다.

4. 혈청 내 IgE의 수준을 조사한 결과 아토피 피부염 유발군에 비하여 오일 처리군에서 모두 유의한 IgE 감소를 나타냈으며, 특히 HH 처리에서는 HS 처리에서보다 더 높은 감소를 보임으로서 오일 혼합에 따른 성분들의 상승효과를 보였다.

5. 총 콜라겐의 밀도 변화에 있어서 아토피 피부염 유발군에 비하여 오일 처리군에서 모두 유의한 콜라겐의 밀도 감소를 나타냈으며, 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 단독 오일인 HS 처리에서보다 더욱 감소된 콜라겐의 밀도 변화를 보임으로서 상승효과를 나타냈다. 동시에 광학 현미경적 관찰에 있어서도 아토피 피부염 유발군에서 높은 콜라겐 밀도가 나타난데 비하여 오일 처리군에서는 현저히 낮은 밀도를 보임으로써 혼합 오일로 인한 개선효과를 나타냈다.

6. TNF- α 의 측정에 있어서 TNF- α 밀도가 아토피 피부염 유발군에서 현저히 증가한 것에 반하여, 오일 처리에서는 모두 유의한 양적 감소를 보였다. 또한, 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 단독 오일인 HS 처리에 비하여 더욱 양적 감소를 보임으로서 두 종류의 오일 혼합에 따른 성분들의 상호 상승작용에 의한 시너지효과를 나타냈다. TNF- α 에 대한 광학 현미경적 관찰에 있어서 아토피 피부염 유발군에서는 TNF- α 발현이 높게 나타난데 비하여 오일 처리군에서는 모두 아토피 피부염 유발군에 비하여 현저히 낮게 발현되었으며, 또한 블렌딩 오일인 HH 처리에서는 단독 오일인 HS 처리에서보다 더욱 낮게 발현됨으로서 오일 성분의 상승효과를 나타냈다.

Hempseed Oil(HS) 및 Hempseed Oil-Hellechrysum 혼합 오일(HH)이 NC/Nga mice의 유발된 아토피 피부염에 미치는 영향을 조사한 결과 아토피 피부염 유발군에 비해 오일 처리군 특히 HH 오일 처리군에서 병인지표를 완화 내지는 억제시킬 수 있는 효능이 있음을 보여주었다. 따라서 아토피 피부염과 같은 만성 질환에 식물성 오일과 에센셜 오일을 이용한 향기 치료적 접근에 대해 유용한 정보를 제공하는데 의의가 클 것으로 생각된다.

이 연구의 제한점은 에센셜 오일을 효과적으로 인체 내 흡수시킬 수 있는 다양한 식물성 오일군을 비교하는 실험을 하지 못했다는 점이다. 향후 다양한 식물성 오일과 에센셜 오일의 임상적 실험에 대한 자료의 축적과 각 오일이 가지고 있는 화학적인 특성이 서로 혼합되었을 때 나타나는 반응에 대한 지속적이고 심화된 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. van Smeden J, Bouwstra JA.. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr Probl Dermatol*. 2016;49:8-26.
2. Searing, DA, & Leung, DYM. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunology and allergy clinics of North America*, 2010;30(3):397.
3. Lee YK, Kim YH, Kim KH, Lee CW. The Effect of Montelukast in the Treatment of Atopic Dermatitis through the SCORAD Index. *Korean Journal of Dermatology*, 2008;46(1):34-39.
4. Lee HR. Atopic Dermatitis. *Korean Journal of Pediatrics*. 2000;43(9): 1161-1167.
5. Smith CH. New approaches to topical therapy. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25:250-254.
6. David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1027:21-37.
7. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*. 2003;111(2):215-225.
8. Vestergaard C, Kirstejn N, Gesser B, Mortensen JT, Matsushima Kouji, Larsen Christian G. 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*. 2001;26(1):46-54.
9. Romagnani S. Immunologic influence on allergy and the TH1/TH2 balance. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*. 2004;113(3):395-400.
10. Peroni DG, Bodini A, Corradi M, Coghi A, Boner AL, Piacentini GL. Markers of oxidative stress are increased in exhaled breath condensates of children with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(4):839-843.
11. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998; 281: 1312-1316.
12. Metzger, H. The high affinity receptor for IgE, Fc ϵ RI . Novartis Found

- Sympton, 2004;257:51-59.
13. Jiang MZ, Tsukahara H, Ohshima Y, Todoroki Y, Hiraoka M, Maeda M, Mayumi M. Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF- α induced adhesion molecule expression and NF- κ B activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Science*. 2004;75(10): 1159-1170.
 14. Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Schölmerich J, Falk W. Nuclear factor- κ B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol*. 2000;120(1):59-65.
 15. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(2):153-162.
 16. Martinez-Ferrer M, Afshar-Sherif AR, Uwamariya C. Dermal transforming growth factor- β responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. *American Journal of Pathology*. 2010;176(1):98-107.
 17. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;113(1): 115-124.
 18. Oh YL, Choi YR, Chang BS, Jung Ij. Antioxidative Effect of *Portulaca oleracea* L. Extract on Allergic Contact Dermatitis- Induced Agent, Copper in Cultured Human Skin Fibroblasts. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2012;8:243-249.
 19. Cavanagh, HMA. Wilkinson. JM. Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Research*. 2002;16(4):301-308.
 20. Tisserand R. The art of aromatherapy. *Gul LEE RANG*. 1997:18-19
 21. Parviz O, Iraj R, Rasooli S, Hhoih S, Antistreptococcal and Antioxidant Activity of Essential Oil from *Matricaria chamomile* L. *Biological Sciences*. 2007;2(2):155-160.
 22. Wagner H, Ulrich-Merzenich. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009;16:97-110.
 23. Choi MO, Kim JY. The Effects of Abdominal Meridian Massage on the Body Composition and Body Change according to Essential Blending or Not. *Journal of The Korean Society of Cosmetology*. 2009;15(4):1220-1228.

24. Kim YI, Cha JH, Kim MJ, Kim HS. Effects of aromatherapy in blending oil of basil, lavender, rosemary, and rose on headache, anxiety and serum cortisol level in the middle-aged women. *Journal of Korean Biological Nursing Science*. 2010;12(3):133-139.
25. Han X, Cody B, Nicole S. Chemical composition analysis and in vitro biological activities of ten essential oils in human skin cells. *Biochim Open*. 2017;5:1-7.
26. Mojay. G. *Aromatherapy for Healing the Spirit*. Koonja Publishing Inc. 2006:79.
27. Decker, E.A.: The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr. Rev.*1995;53(3):49-58.
- 28.. Moon YH, Song YS, Kim KS, Lee JE, Yu GD, Lee YH, Lee KB, Choi IS, Cha YL,. *Journal of Oil & Applied Science*. 2017;34(3):666-672.
29. Incoronata G, Roberto R, Sergio M, Elena P, Ida MB, Giovanna B, remo R. Variability in seed traits in a collection of *Cannabis sativa* L. genotypes. *Front Plant science*. 2016;7:688
30. Bouzid D, Nouioua W, Soltani E, De-Haro JP, Angeles EM, Zerroug MM. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, filamentous fungi and candida albicans. *saudi Pharmacological Journal*. 2017;25(5):780-787
31. Antunes Viegas D, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez -de-Oliveira J , Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1): 54-65.
32. Soheila RF, Seyed RA, Mehrangiz EM, Mehdi F, Behzad B, Torbati MA, Fatemeh Z. Erythrocyte membrane fatty acids in multiple sclerosis patients and hot-nature dietary intervention with co-supplemented hemp-seed and evening-primrose oils. *Africa Journal of Traditional Complement Alternative Medicine*. 2013;10(6):519-527.
33. Festing MF, Baumans V, Combes RD, Halder M, Hendriksen CF, et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. *Altern Lab Anim*. 1998;26(3):283-301.

34. Battagila S. The Complete Guide to Aromatherapy. (Third Edition). Australia. Black Pepper Creative Pty Ltd.2018.;120
35. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 1997;9(3):461-466.
36. Dong W, Azcona-Olivera JL, Brooks KH, Linz JE, Pestka JJ. Elevated gene expression and production of interleukines2, 4, 5 and 6 during exposure to vomitoxin(deoxynivalenol) and cytoheximidw in the IL-4 thymoma. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1994;147:282-290.
37. Doyle A, Griffiths JB, Newell DG. *Cell & Tissue culture: Laboratory procedures.* Wiley. 1993.
38. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *Journal of Immunological Methods.* 1983;79:414-420.
39. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG. Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *Journal of Neuroscience Research.* 1994;37:62-70.
40. Kim DJ, Kim IT. Measurement of superoxide free radicals and xanthine oxidase in nasal polyps. *Korean Journal of ENT.* 1995;38(1); 75-79.
41. Wang S, Chen Y, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with Gastrodia and Uncaria decoction, a traditional Chinese formulation. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007;114(3):458-462.
42. Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation.* 2004;113(5): 651-657
43. Kim HB, Cho YJ, Yoo KH, Kim DY, Kim JK, Kim HJ, Park CH, Park HY, Park HW, Lee YW, Choi SH, Han KO, Park JA, Kim WK. Survey on the Management of Atopic Dermatitis. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2012;32:16-20
44. Oh HG. *Aromatherapy handbook.* Yangmoon. 2003;16
45. Battagila S. *The Complete Guide to Aromatherapy.* Hyunmoon.

- 2008.;381.
46. Lawless J. The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils. Hyunmoon. 2002.;13.
 47. Jo TD, Song JH. Herb & Aroma life. Daewonsa.2004;26
 48. Sandra G, Elsa M, Clara G, Paula BA, Patricia V, Anabela R. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in mediterranean diet. Journal of Food Science Technology. 2017;54(1):219-227.
 49. Yamashita H, Tasaki D, Makino T, Matsuoka K, Nose M, Inagaki N, The role of IgE and repeated challenge in the induction of persistent increases in scratching behavior in a mouse model of allergic dermatitis. European Journal of Pharmacology. 2009;605(1): 153-157.
 50. Kotani S, Matsumoto M, Fujita C. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. Journal of Allergy Clinical Immunology. 2000;106(1): 159-166.
 51. Ivana ZM, Ivana A, Zeljko Z, Vlatka V, Milka J, Slobodan M, Zorica DJ. In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. BMC Complement Altern Medicine. 2013;13:36
 52. Petruta A, Anca M, Adriana T, Alexandra B, Elvira G, Ana CA. Essential oils and their components as modulators of antibiotic activity against gram-negative bacteria. Medicines(Basel). 2016; 3(3):19
 53. Melnik BC, Plewig G. Is the origin of atopy linked to deficient conversion of omega-6-fatty acids to prostaglandin e1? Journal of American Academic Dermatology. 1989;21: 557-563.
 54. Seo YM, Jeong SH. Effects of blending oil of lavender and thyme on oxidative stress, immunity, and skin condition in atopic dermatitis induced mice. Journal of Korean Academy of Nursing. 2015;45(3): 367-377.
 55. Lee SH, Min KJ, Lee KO, Sin JS, Kim YC. Effect of German Chamomile Oil Application to Atopic Dermatitis Mice on the Change of Serum IgE Level. Journal of The Korean Society of Cosmetology. 2008;14(2); 337-345.
 56. Zhao M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. Seminars in Cell & Developmental Biology.

2009;20:674-678.

57. Park ST, Kim JW, Joung SH, Seo YM. The effect of extract from several herbs grown naturally in Namwon province on wound treatment. *Journal of Korean Biological Nursing Science*. 2012;14(2): 122-128.
58. Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ, Transforming growth factor β 1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgrad Medicinal Journal*. 2009;85(999):9-14
59. Seo YM. Recovery effect of blending oil on skin barrier damaged by atopic dermatitis. *Journal of East-West Nursing Research*. 2014; 20(1):57-62.
60. Jiang MZ, Tsukahara H, Ohshima Y, Todoroki Y, Hiraoka M, Maeda M, Mayumi M. Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF- α induced adhesion molecule expression and NF- κ B activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Science*. 2004;75: 1159-1170
61. Maggi E, Parronchi P, Manetti R. Reciprocal regulatory effects of INF- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of Immunology*. 1992;148: 2142-2147.
62. Zang WJ, Frei B. Intracellular metal ion chelators inhibit TNF- α -induced SP-1 activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003;34(6): 674-682.