

감잎(*Diospyros kaki folium*) Polyphenol 화합물군이 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향

박무희·최 청·배만종*†

영남대학교 식품가공학과
*경산대학교 생명자원공학부

Effect of Polyphenol Compounds from Persimmon Leaves (*Diospyros kaki folium*) on Allergic Contact Dermatitis

Mu-Hee Park, Cheong Choi and Man-Jong Bae*†

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungbuk 712-749, Korea

*Faculty of Life Resources and Engineering, Kyungsan University, Kyungbuk 712-230, Korea

Abstract

This study was to investigate anti-allergic contact hypersensitivity of the polyphenol fractions isolated from persimmon leaves (*Diospyros kaki folium*). The result of the allergic contact dermatitis is a common skin disease resulting from specific immunologic sensitization due to topically applied allergens. Here the contact hypersensitivity was assayed and abdominal skin morphological changes including mast cells were examined. At contact hypersensitivity assay, less right ear swelling occurred in the polyphenol fraction I, II and III groups compared to the control group. The number of mast cells was significantly decreased in the sample groups than the control group.

Key words: persimmon leaves, polyphenol fraction, contact dermatitis, mast cells

서 론

최근 산업발달로 인하여 인공화학 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 각종 면역과민성 질환을 유발시키는 allergen이 급증하는 추세이다(1). 알레르기 유발물질들은 주로 소화기, 눈, 피부, 위장관 및 중추신경계 등으로 나타나며 특히 피부과 질환 중에 가장 많이 볼 수 있는 것으로는 화학물질, 약물, 식물 및 기타 자극물에 의해 피부의 알레르기성 반응으로 야기되는 접촉성 피부염이다(2).

알레르기성 접촉피부염은 항원이 되는 물질이 피부를 통해 침투하여 운반단백질과 결합한 후 Langerhans 세포와 접촉하면서 감각과정을 거치게 되고, 감각된 사람이 재차 allergen에 접촉하면 피부에 염증을 일으키는 질환으로(3), Lee 등(4)에 의하면 우리나라 성인 알레르기 환자를 대상으로 조사한 연구에서 알레르기의 주된 증상이 기관지, 피부, 코 및 눈의 순이며 37.7%가 유발원인이 밝혀지지 않았으나, 그 발병의 원인으로는 대기오염으로 인한 인체의 감염, 기후의 변화, 심인성 및 항원(꽃가루, 집먼지, 비듬, 유기 화합물)과 식량·영양사정이 호전됨에 따

름 불균형, 불량 가공식품의 증가 및 수입농산물의 증가 등을 들 수 있다고 보고하고 있다(5,6)

알레르기성 피부염의 치료제로 부신피질 호르몬제, 항-히스타민제가 사용되고 있으며, 근래에는 cyctoclosporin A, FK 506 등과 같은 면역억제제가 이용되고 있으나 이러한 치료제를 장기간 투여할 경우 여러 가지 부작용이 보고되고 있어 이에 대한 새로운 치료제제의 개발이 필요한 실정이며, 특히 항알레르기제의 개발과 관련된 재료로서 민간요법에서 사용되고 있는 약용식물이 선택되어지고 있다(7,8).

최근 차(茶)에 존재하는 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (+)-catechin (C) 및 (-)-gallocatechin gallate (GCG) 등이 항원과 보체가 결합함으로써 chemical mediator가 방출되어 즉시 염증을 유발하는 즉시형 과민증인 제 I형 알레르기 반응과 항원과 입파구의 반응에 의한 조적상해를 일으키는 제 IV형 알레르기 반응인 지연형과민증을 억제시키는 것으로 보고되고 있다(9,10).

본 연구에서는 한국산 감잎으로부터 폴리페놀 화합물

† To whom all correspondence should be addressed

균을 분리하여 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)로 감작시켜, 세포성 면역과민반응의 저해와 염증반응을 관찰한 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 재료는 경상북도 청도군의 청도 반시 품종의 감나무잎(*Diospyros kaki* folium)을 개화 전 5월 초순에 채집하여 세척한 후 음지에서 건조시켜 실험재료로 사용하였다.

시료추출 및 정제

감잎 10 kg을 추출 탱크에서 60% 아세톤에 침지하여 상온에서 24시간 방치한 후 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 침전물은 다시 위와 같은 조작을 4회 반복하여 상등액을 모아 감압 농축하여 아세톤을 증발시킨 후 수용성 성분만을 회수하기 위하여 증류수로 용해하였다. 용해한 후 여과하여 클로로필을 제거한 다음, 여액을 회수하여 분리용 시료로 사용하였다.

분리에 사용된 크로마토그래피 고정상은 Nonaka(11)의 방법에 준하여 Fig. 1과 같이 행하였다. 즉, 분리용 column은 Sephadex LH-20 (12.0×120 cm)에 60% 아세톤으로부터 농축된 2.5 L의 분리용 시료를 loading하고,

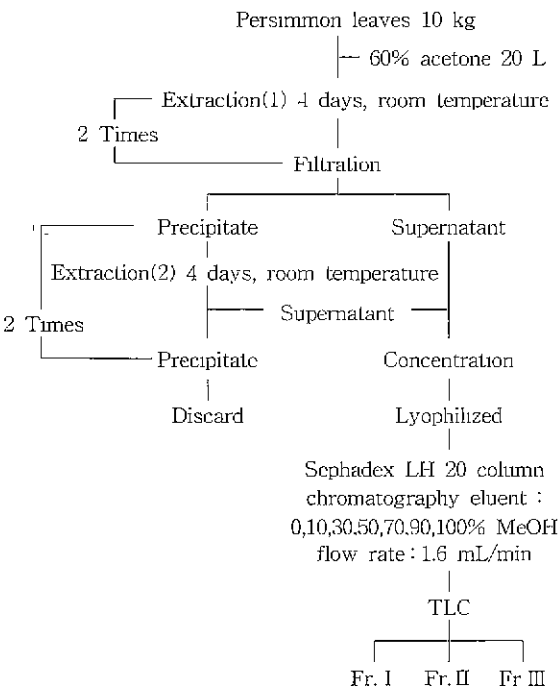


Fig. 1. The procedure for isolation of condensed polyphenol compound from persimmon leaves.

전기용메로는 메탄올을 사용하여 메탄올 : 증류수(0 : 1→1 : 0)로 전개하면서, fraction collector에 100 mL씩 분리시킨 후, silicagel TLC(Thin Layer Chromatography; 5.0×5.0 cm) 상에서 An 등(12)이 분리한 폴리페놀성 화합물군과 반응식과 Rf 값과 비교하여 polyphenol 화합물군을 분획하였다. 분획된 폴리페놀 fraction을 분류하여 fraction I, II 및 III를 분류하여 동결건조시킨 것을 냉동보관하면서 공시재료로 사용하였다.

실험동물

실험동물은 4주령된 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 흰쥐는 S.D.계(200±2 g)를 분양받아 사육실에서 2주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험기간 중 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도(22±2°C) 및 명암은 12시간 주기(06 : 00~18 : 00)로 조절하면서, 7마리를 한 군으로 분리하여 실험하였다.

DNCB에 의한 ear swelling 반응

지연형 과민반응의 항원으로서는 DNCB(2, 4-dinitrochlorobenzene)를 아세톤과 올리브 오일에 혼합된 용액에 5%가 되게 용해한 후, 오른쪽 살바위 쪽 복부 2 cm²에 도포하여 1차 면역시켰다. 1차 면역 후 7일이 경과하였을 때, 오른쪽 귀에 2.5% DNCB 4 μL를 도포하여 2차 면역을 행하였으며, 2차 항원 부여 후 48시간이 경과했을 때 오른쪽 귀의 두께를 vernical calipers (Mitutoyo, Japan)로 측정 후 ear swelling 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였다(13).

피부의 조직표본 제작

항원을 투여하지 않은 정상군과 DNCB만을 단독 처리한 대조군, DNCB 처리 후 감잎으로부터 분리된 fraction I, II 및 III를 부여한 군에 2.5% DNCB 4 μL를 왼쪽 살바위 쪽 복부에 도포하여 2차 감작한 후 24, 48 및 72시간에 마우스를 경추 탈골사시킨 후 DNCB로 처리된 부위에서 피부조직을 적출하였다. 적출된 피부 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 고정 후 통상적인 방법으로 paraffin에 고정하고 5 μm 두께로 연속 절편을 만들어 Hematoxylin과 Eosin(H & E) 혼합 염색을 실시하여 표본을 제작하였다(14).

피부 비만세포 분포변화

복부의 피부 진피층에 나타나는 비만세포의 분포 변화를 관찰하기 위해서 5 μm 두께의 연속절편을 Luna's method(15)에 따라 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 후, Weighert's iron hematoxylin과 methyl orange solution에 각각 1분, 5분 동안 대조 염색하여 광학현미경으로 관

찰하였다.

결과 및 고찰

DNCB에 의한 ear swelling에 미치는 영향

지연형 과민 반응에 관한 항원으로서 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)를 아세트산과 올리브 오일 혼합액에 용해시켜 마우스의 오른쪽 살타위 복부에 도포하여 인위적인 접촉성 과민반응을 유발시킨 후, 마우스의 오른쪽 귀 피부의 swelling 정도를 측정하여 접촉성 과민반응을 측정 한 결과는 Table 1과 같다.

DNCB만을 처리한 대조군의 귀의 부종 두께는 $14.12 \pm 0.57 \times 10^{-3}$ mm이었으나, DNCB 처리 후 감잎의 폴리페놀 화합물을 복용 투여한 fraction II 군에서는 $5.18 \pm 6.93 \times 10^{-3}$ mm 및 fraction III에서는 $1.35 \pm 1.15 \times 10^{-3}$ mm로 대조군에 비하여 현저하게 ($p < 0.01$) 낮은 수치를 나타내었으나, fraction I은 $14.20 \pm 0.12 \times 10^{-3}$ mm로 유의성을 나타내지 않았다.

DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염은 비만세포에서 염증관여 물질이 분비되어, 림프구를 비롯한 염증관련 세포의 혈관 투과성을 증가시켜 발생하는 것으로 알려져 있으며, 알레르기성 접촉 피부염은 항원이 되는 물질이 피부를 통해 침투하여 운반 단백질과 결합한 후 Langerhans 세포와 접촉하면서 감작과정을 거치게 되고, 감작된 사람이 재차 allergen에 접촉하면 피부에 염증을 일으키는 질환이다(16). 이러한 접촉성 과민반응을 실험한 결과 DNCB만을 도포한 대조군보다 실험군에서 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다.

비만세포의 분포변화

염증반응에서 중요한 기능을 담당하고 있는 비만세포

Table 1. The inhibition effect of ear swelling in mouse intraperitoneally injected with polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves after secondary sensitization by 2.5% DNCB painting in mice

Group	No of animals	Route	Ear swelling (10^{-3} cm)
CON	7	i.p.	14.12 ± 0.57
I	7	i.p.	14.20 ± 0.12
II	7	i.p.	$5.18 \pm 6.93^{**}$
III	7	i.p.	$1.35 \pm 1.15^{**}$

DTH: Delayed-type hypersensitivity BALB/c mice were intraperitoneally injected with saline and polyphenol fraction I, II and III extracted from persimmon leaves for 7 days. The BALB/c mice was immunized with the hypodermic injection of 50 μ l DNCB at hindfoot before assay. P-value was determined by t-test. Values are means \pm S.D. of 7 mice. ** $p < 0.01$. CON: Control. I: Polyphenol fraction I from persimmon leaves. II: Polyphenol fraction II from persimmon leaves. III: Polyphenol fraction III from persimmon leaves.

의 상대적 분포 변화를 관찰한 결과 아세트산과 올리브 오일을 항원으로 감작시킨 정상군에서는 비만세포의 분포가 거의 이루어지지 않았으나, DNCB만을 항원으로 처리한 대조군에서는 2차 항원으로 감작된 후의 비만세포의 분포양상은 실험기간 동안 변화 없이 비만세포의 빈도수가 많은 것으로 나타났다. 그러나 DNCB로 감작시킨 후 감잎에서 분리·정제된 폴리페놀 화합물 I, II 및 III은 시간이 경과함에 따라 비만세포의 분포양상이 정상수준에 가깝게 감소되는 것으로 관찰되었다(Table 2).

피부 비만세포의 관찰

비만세포의 분포 변화를 확인하기 위하여 복부 조직을 절편하여 Luna's 법에 따라 염색한 후 비만세포의 분포 변화를 관찰한 결과 정상군은 분비과립을 함유한 방추형의 비만세포가 진피 부분에 극소수 관찰되었으며 선명한 과립상이 관찰되었다(Fig. 2-a). 대조군에서는 항원으로 감작된 후, 정상군과는 달리 비만세포의 수가 2차 감작 후 매우 증가하였으며, dermis 심부에서 무리 지어 탈과립 소견을 나타내면서 비만세포가 다수 관찰되었다(Fig. 2-b). 한편, 실험군에서는 대조군에 비하여 비만세포 수가 감소되는 경향을 나타내었으며, 모든 실험군에서는 대조군에 비하여 비만세포 수가 감소되는 현상을 보였다(Fig. 2-c, d, e).

최근 알레르기성 접촉피부염의 치료제로 부신피질 호르몬제나 항히스타민제 등이 이용되고 있으나, 이러한 부신피질 호르몬제는 급성부신기능부전증을 유발시키고, 장기간 투여 때에는 세균의 감염에 대한 저항력이 약화되고, 소화성궤양, 골다공증 및 백내장 등의 부작용을 일으

Table 2. The effect of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves on relative frequencies of the mast cells occurring on the mice painted with DNCB

Group	24	48	72 hr
NOR	\pm		
CON	+++	+++	+++
I	++	--	+
II	++	+	+
III	++	\pm	\pm

BALB/c mice were intraperitoneally injected with saline and polyphenol fraction I, II and III extracted from persimmon leaves for 7 days. The BALB/c mice were immunized with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). Immunization was induced 2 times (1st and 2nd). \pm : rare, -: few, ++: moderate, +++: numerous. NOR: Normal (Acetone and olive oil solution immunized group), CON: Control (Only DNCB immunized group), I: Polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves was intraperitoneally injected after DNCB immunization, II: Polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves was intraperitoneally injected after DNCB immunization, III: Polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves was intraperitoneally injected after DNCB immunization.

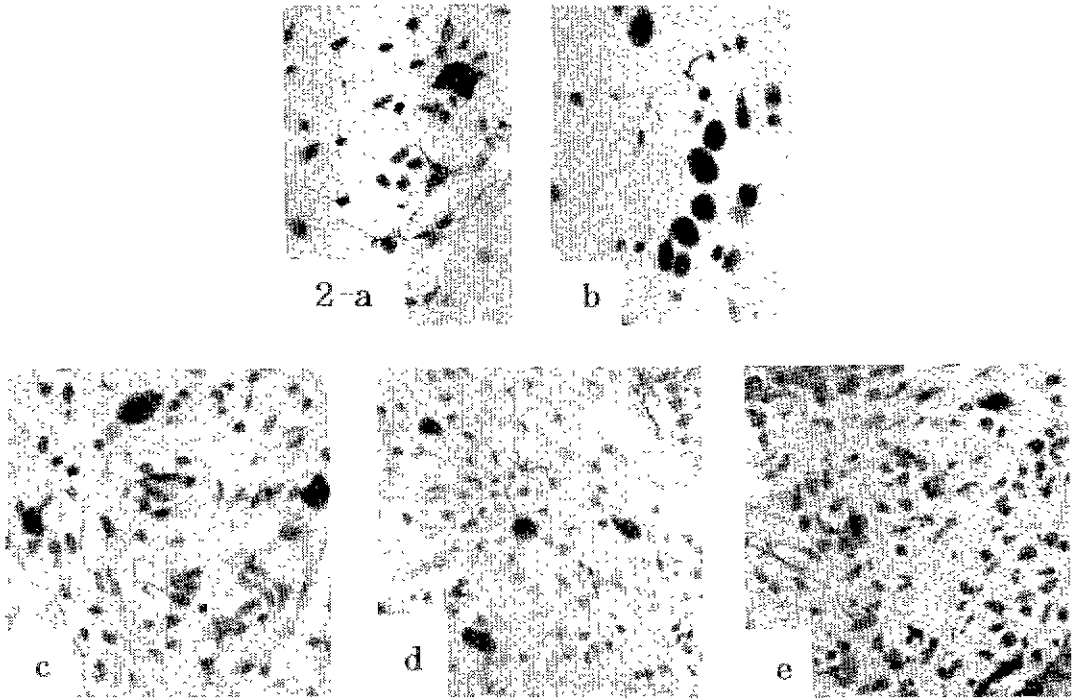


Fig. 2. a, The mast cell (redish purple) of abdominal skin in mouse by acetone and olive oil painting Luna's method $\times 240$; b, The distribution of mast cell in mouse at 48 hr after secondary immunized by DNCB painting Luna's method $\times 240$; c, The distribution of mast cell in mouse at 48 hr after secondary immunized by DNCB painting with i.p. polyphenol fraction I from persimmon leaves Luna's method $\times 240$; d, The distribution of mast cell in mouse at 48 hr after secondary immunized by DNCB painting with i.p. polyphenol fraction II from persimmon leaves Luna's method $\times 240$. e, The distribution of mast cell in mouse at 48 hr after secondary immunized by DNCB painting with i.p. polyphenol fraction III from persimmon leaves Luna's method $\times 240$.

키고 있는 것으로 보고되고 있다(17,18). 뿐만 아니라, 항히스타민제는 일시적인 진정작용이 있지만, 염증환부에 근본적인 치료제로서는 부적합한 것으로 나타나고 있어서(2), 새로운 치료제로의 개발이 요구되고 있으며, 감염에서 분리·정제된 폴리페놀 화합물이 항원을 투여하지 않은 정상군과 유사한 피부조직을 갖는 결과를 볼 때 이러한 치료제로서의 가능성을 시사하는 것으로 사료되며, 예방·의학적인 측면을 강화하기 위하여 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

요 약

한국산 감염으로부터 폴리페놀 화합물군을 분리하여 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비해 폴리페놀 화합물군에서 ear swelling이 감소되었으며, 비만세포의 분포에서도 대조군에 비하여 감염 폴리페놀 화합물 투여군에서 매우 적은 수가 확인되었으며, 이러한 결과는 제4형 알레르기 반응을 지연 또는 예방할 수 있는 생약제로서의 가능성을 시사하는 것으로 보여진다.

문 헌

1. Kang, S.Y., Hue, S.H and Kim, S.I. Immunologic aspects of hypersensitivity disease in Korea. *The Seoul Journal of Medicine*, 19, 45-53 (1978)
2. Chio, K.U. and Paek, D.M. Asthma and air pollution in Korea. *Korean J. Epidemiology*, 17, 64-75 (1995)
3. Becker, D., Kolde, G., Reske, K. and Knop, J. An *in vitro* test for endocytotic activation of murine epidermal Langerhans cells under the influence of allergens. *J. Immunol. Methods*, 169, 195-204 (1994)
4. Lee, K.W., Myung, C.D., Nam, H.W., Hong, C.S. and Lee, Y.C. A study on nutritional status of allergic patients and food allergens in Korea. *Korean J. Dietary Culture*, 11, 123-130 (1996)
5. Rebeck, A.S. and Read, J. Assessment and management of severe asthma. *Am. J. Med*, 51, 788-798 (1971)
6. Anto, J.M., Sunyer, J., Rodriguez, R.R., Suarez, C.M. and Vazquez, I. The toxicoepidemiological committee, community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. *N. Engl. J. Med*, 320, 1097-1102 (1989)
7. Lauerma, A.I., Stein, B.H., Lee, C.H., Bloom, E. and Marbach, H.J. Topical FK506 suppression of allergic and irritant contact dermatitis in the guinea pig. *Arch. Dermatol. Res.*, 286, 337-340 (1994)
8. Chun, Y.T. and Sankawa, U. Screening of anti-allergic

- effect in traditional medicinal drugs and active constituents of auranti fructus unaturus. *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 314-323 (1989)
9. Ohmor, Y., Ito, M., Mizutani, H., Katada, T and Konishi, H. Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharm Bull.*, **18**, 683-686 (1995)
 10. Coombs. R.R.A., Gell, P.G.H and Lachman. P.J. : *Clinical aspects of immunology* Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.761-766 (1975)
 11. Nonaka, G.H Isolation and structure elucidation of tannins. *Pure and Appl. Chem.*, **61**, 357-360 (1989)
 12. An, B.J., Bae, M.J. and Choi, C. . Chemical structures and isolation of glucosyltransferase inhibitor from the leaves of Korean persimmon. *Food Sci. Biotechnol.*, **7**, 23-27 (1998)
 13. Kwon. O.S . The effect of Yunkyoaedocksan-gami on allergic contact dermatitis on mice induced by DNCB. *Ph.D. Dissertation*, Dongguk University (1996)
 14. Dezan, C and Sheehan, H.T : *Theory and practice of histotechnology* 2nd ed, The C.V. Mosby Company, London, p.282-283 (1980)
 15. Luna, L.G. (ASCP) . *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* McGraw Hill Inc, New York, p.12 (1968)
 16. Holliday, M.R., Dearman, R.J, Kimber, I. and Coleman, J.W : Sensitization of mice to chemical allergens modulates the responsiveness of isolated mast cell to IgE-dependent activation. *Immunology*, **78**, 508-510 (1993)
 17. John, J.C. . *Glucocorticoids. Encyclo. Immunol.* Academic Press Inc., London, p.616-617 (1992)
 18. Tachibana, T, Toda, K.I., Furukawa, F., Taniguchi, S. and Imamura, S. : Histamine metabolism in delayed type hypersensitivity comparative analysis with cellular infiltrates. *Arch. Dermatol. Res.*, **282**, 217-222 (1990)

(1999년 10월 5일 접수)