

기니피그 동물 모델에서 우방자와 홍화유의 표피 과증식 억제 효과 비교*

성경화¹⁾ · 김주영¹⁾ · 이주희²⁾ · 박성규³⁾ · 조윤희^{1)§}

경희대학교 동서의학대학원 임상영양학전공,¹⁾ 의과대학 병리학과,²⁾ 한의과대학 방제학교실³⁾

Arctii Fructus is a Prominent Dietary Source of Linoleic Acid for Reversing Epidermal Hyperproliferation of Guinea Pigs*

Seong, Kyunghwa¹⁾ · Kim, Juyoung¹⁾ · Lee, Juhie²⁾ · Park, Seongkyu³⁾ · Cho, Yunhi^{1)§}

Department of Medical Nutrition,¹⁾ Graduate School of East-West Medical Science,

Department of Pathology,²⁾ College of Medicine, Department of Prescriptionology,³⁾

College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Linoleic acid [LA; 18 : 2 (n-6)] is the most abundant polyunsaturated fatty acid in human skin. The exclusion of LA from diet induces epidermal hyperproliferation, which is reversible by the inclusion of LA in diet, and hence, LA is heralded as an essential fatty acid (EFA). Since safflower oil (SO) has been widely recognized as the major dietary source of LA and Arctii Fructus (*Arctium lappa* L.) is recently reported to contain high level of LA, we compared the antiproliferative effects of SO and Arctii Fructus in this study. Epidermal hyperproliferation was induced in guinea pigs by hydrogenated coconut oil (HCO) diet for 8 wk. During following 2 wk, EFA deficient guinea pigs were fed diets of safflower oil (group HS), water extract of Arctii Fructus (group AW) or organic extract of Arctii Fructus (group AO). Normal control group was fed SO containing diet (group SO) and EFA deficient group was fed HCO containing diet (group HCO) for 10 wk. Epidermal hyperproliferation was reversed in groups AO (55.9 % of group HCO) and HS (74.1 % of group HCO). However, the thymidine incorporation into epidermal DNA of group HS was greater than of normal control group SO. Epidermal hyperproliferation was not reversed in group AW. The accumulations of LA into phospholipids and ceramides, and of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE), the potent antiproliferative metabolite of LA in the epidermis of group AO were greater than of group HS. In contrast, the de novo synthesis of ceramides, the major lipids maintaining epidermal barrier, did not differ between all of groups. Together, our data demonstrate that organic extract of Arctii Fructus is more prominent than safflower oil in reversing epidermal hyperproliferation by inducing the higher accumulations of LA and 13-HODE in the epidermis of guinea pigs. (*Korean J Nutrition* 36(8): 819~827, 2003)

KEY WORDS : arctii fructus, safflower oil, epidermal hyperproliferation, linoleic acid, 13-HODE.

서 론

피부의 맨 바깥에 위치하는 표피는 외부 환경의 변화로 부터 인체를 보호하는 인체 방어의 역할을 하며, 표피의 제일 상층부인 각질층이 표피 장벽 (epidermal barrier)으로써 표피의 수분 증발과 손실 억제, 표피의 건조화 방지, 세

접수일 : 2003년 8월 7일

채택일 : 2003년 10월 17일

*This work was supported by the Korea Food & Drug Administration (03052건식안 113-8-1).

†To whom correspondence should be addressed.

균, 곰팡이, 바이러스 등의 피부 침범을 방지하는 인체 방어 기전의 제일선의 역할을 한다. 각질층의 표피장벽은 각질 세포에서 분비된 인지질, 콜레스테롤, 세라마이드 등의 지질 혼합체로 층상구조 (intercellular lamella sheets)를 이루고 있으며 이 여러 자질들은 정상적인 층상 구조의 유지를 위해 불포화 지방산을 함유하고 있다.¹⁾

Linoleic acid (LA: 18 : 2n-6), γ -linolenic acid (GLA: 3n-6), arachidonic acid (AA: 20 : 4n-6)는 표피의 주요 불포화 지방산이며 이중 linoleic acid는 표피 전체 지방산의 38%를 차지하는 가장 대표적인 불포화 지방산이다.^{2,3)} 이들 불포화 지방산들은 표피 기저층에서는 주로 인

지질에 함유되어 있으나 각질 세포가 분화함에 따라 세라마이드로 이동되어 acylceramide를 형성한다.⁴⁾ 장기간의 linoleic acid을 비롯한 불포화 지방산 결핍 식이는 성장지연, 생식 기능의 저하와 더불어 표피의 과증식, 염증 및 표피를 통한 극심한 수분 손실을 초래하는 것이 1930년대 Burr의 연구에 의해 보고된 후⁵⁾ linoleic acid가 표피의 정상적인 층상 구조 유지에 중요함이 인식되었다.^{6,7)} 또한 표피 장벽의 지질 층상 구조가 손상되어 있는 전선염이나 아토피 환자의 각질층에서 linoleic acid의 수치가 감소되어 있음이 보고되어,^{8,9)} linoleic acid를 다량 함유한 홍화유 등의 식이 공급을 통해 표피 과증식을 수반한 여러 피부 질환을 치료하려는 시도가 이루어지고 있다.^{10,11)}

표피에서의 linoleic acid 대사는 체내의 다른 조직과 상이한데, 이는 desaturase의 부재와 elongase의 강한 활성으로 설명된다.²⁾ 즉 홍화유 등에서 공급된 linoleic acid는 표피에서 Δ6 desaturase 과정이 요구되는 γ-linolenic acid나 arachidonic acid로 전환되지 않는다. 반면에 linoleic acid는 탄소수가 20개가 아님에도 15-lipoxygenase (15-LOX)의 기질로써 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE)로 대사되고,¹²⁻¹⁴⁾ 인체의 표피에서 13-HODE는 linoleic acid의 주요 대사체로써 표피의 과증식을 억제하는 생리 활성이 보고되어 있다.¹²⁾

Linoleic acid 주급원 유지로 미국, 멕시코, 호주, 중국, 인도 등지에서 대량 생산되는 홍화유가 널리 소비되고 있는 반면,^{10,15)} 국내 자원 식물 중 우방자 (牛蒡子, *Arctii Fructus*)에서도 다량의 linoleic acid가 검출되었다.¹⁶⁾ 우방자에서 α-linolenic acid, γ-linolenic acid 등의 다른 불포화 지방산은 검출되지 않았다.¹⁶⁾ 우방자는 국화과에 속하는 2년생 초본인 우엉 (*Arctium lappa* L.)의 종실로 한의학과 민간요법에서 유래되어 여러 피부 질환 치료에 이용되어 왔으며 현재에도 아토피 피부염을 비롯하여 마진 (麻疹), 풍진 (風疹), 단독 (丹毒), 옹종 (癰腫), 창독 (瘡毒) 등의 피부 증상을 치료하는데 사용되고 있으나^{17,18)} 효능에 대한 연구는 *in vitro* 세포 모델을 이용한 항알러지 작용에 한정되어 있을 뿐¹⁹⁾ 피부를 모델로 한 관련 연구는 미약한 실정이고 특히 표피의 주요 불포화 지방산인 linoleic acid의 관점에서 우방자의 표피 과증식 억제 효과에 대한 연구는 전무하다.

이에 본 연구에서는 지방산 대사 측면에서 인간의 피부와 유사한 기니 피그에²⁰⁾ 불포화 지방산 결핍 식이에 의한 표피 과증식을 유도한 후 우방자 추출물 또는 홍화유의 식이 공급에 따른 표피 과증식의 억제 효과 및 인지질과 세라마이드에 함유되어 있는 linoleic acid 수준과, 13-HODE

생성을 비교·분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 2주령 Hartley종 수컷 기니피그 50마리를 구입하여 (샘타코, 한국) 실험 식이로 사육하기 전 1주 동안 고형배합 사료로 적응시켰다. 표피 과증식을 유도하기 위해 8주 동안 불포화 지방산이 결핍된 코코넛 유지를 식이로 공급하였고 유도된 표피 과증식의 억제 효과를 비교하기 위해 체중에 따라 난괴법으로 군을 나누어 홍화유 또는 우방자 추출물을 함유한 실험 식이로 2주간 사육하였다. 식이는 매일 40 g으로 일정량 공급하였고 0.05%의 vitamin C를 함유한 물을 자유롭게 섭취케 하였다. 실험 동물은 10주 동안 stainless-steel wire cage에서 한 마리씩 사육하였다. 사육실의 온도는 22 ± 1°C, 습도 60 ± 5%로 유지하였고 매일 광주기, 암주기를 12시간이 되도록 조절하였다.

2. 우방자 추출

실험에 사용한 우방자는 경상북도 영주에서 2001년 수확하여 건조시킨 것을 구입하여 열탕 추출물과 유기 추출물을 모두 준비하였다. 우방자의 linoleic acid 성분은 유기 용매를 이용한 추출이 효율적이었으므로¹⁶⁾ 분쇄한 우방자에 10배량의 Folch 용액 [Chloroform/Methanol (2 : 1 v/v)]과 2배량의 0.1 M KCl을 가하고 원심분리 (800 × g, 10분) 한 후 하층액을 취하여 간접 농축하고 72시간 동안 동결 건조하여 분말 형태의 우방자 유기추출물을 제조하였다. 그러나 한의학과 민간요법에서 유래되어 여러 피부 질환 치료에 이용되어온 우방자의 복용은 관행적인 열탕 방법에 의해 이루어지고 있으므로 열탕 추출물에서 검출된 linoleic acid의 함량이 유기추출물에 비해 1/10수준으로 현저히 낮음에도 불구하고¹⁶⁾ 우방자의 현실적인 섭취방법을 연구에 적용하는 차원에서 우방자 열탕 추출물 또한 준비하였다. 즉 분쇄한 우방자에 20배량의 증류수를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 가열 전탕한 후 얻어진 용액을 간접 농축하고 72시간 동안 동결 건조하여 분말 형태의 우방자 열탕 추출물을 제조하였다. 추출 및 동결 건조 과정 후 분말 형태의 우방자 유기 추출물 및 열탕 추출물의 수득율은 최초 시료 무게를 기준으로 각각 23.5%와 15% 이었다.

3. 식이 구성

각 실험군의 식이 조성은 Table 1과 같으며 기니 피그 기본 식이 기준에 준하여¹³⁾ 식이 지방을 식이 무게의 6%로

Table 1. Diet composition of experimental groups

Composition	SO/HS	Dietary groups		
		HCO	AO	AW
g/kg dry diet				
Coconut oil ¹		60	60	60
Safflower oil	60			
Casein (vitamin free) ²	300	300	300	300
Cornstarch ²	257.98	257.98	246.23	250.48
Sucrose ³	100	100	100	100
Cellulose ⁴	130	130	130	130
Mineral mix ⁵	60	60	60	60
Vitamin mix ⁶	40	40	40	40
Agar ⁷	20	20	20	20
DL-Methionine	2	2	2	2
Potassium acetate	25	25	25	25
Magnesium oxide	5	5	5	5
Zinc carbonate	0.02	0.02	0.02	0.02
Extract of Arctii Fructus		11.75	7.5	

¹The oils added were safflower (100%) for groups SO and HS, hydrogenated coconut oil (100%) for the groups AO, AW, and HCO

²Kyungdong, Sungbookgu, Seoul, Korea

³Cheiljedang Ltd, Seoul, Korea

⁴Sigma, St. Louis, MO

⁵Briggs chick salt mixture A, contained in (g/kg) mix: CaCO₃, 250; Ca₃(PO₄)₂ · 5H₂O, 233; CuSO₄ · 5H₂O, 0.3; ferric citrate · 5H₂O, 6.7; MgSO₄ · 7H₂O, 83.3; MnSO₄ · 4H₂O, 7.0; KI, 0.7; K₃HPO₄, 150; NaCl, 146.7; Na₂HPO₄, 121.7; ZnCO₃, 0.3; ICN Biomedicals, Aurora, OH

⁶Vitamin mix provided the following (mg/kg) of complete diet: D- α -tocopherol, 134; L-ascorbic acid, 1,800; choline chloride, 30,000; D-calcium pantothenate, 120; inositol, 200; menadione, 90; niacin, 180; β -aminobenzoic acid, 200; pyridoxine HCl, 40; riboflavin, 40; thiamin HCl, 40; retinyl acetate, 10.8; biotin, 0.8; folic acid, 3.6; cyanocobalamin, 0.054; ICN Biomedicals, Aurora, OH

⁷Becton Dickinson, Sparks, MD

고정시켰다. 표피 과증식을 유도하기 위해서는 코코넛 유지(hydrogenated coconut oil: HCO)를, 유도된 표피 과증식의 억제를 위해서는 홍화유(safflower oil: SO) 또는 우방자 열탕 및 유기 추출물을 식이에 첨가하였다. 8주간의 코코넛 유지의 식이 급여에 의한 불포화 지방산 결핍 및 표피 과증식 유도는 gas chromatography를 이용한 eicosatrienoic acid (20 : 3n-9) (불포화 지방산 결핍의 생화학적 지표)의 표피에서의 측정²⁰⁾ 및 조직학적 분석에 의해 사전에 검증되었다.^{13,15)} 계속된 2주간의 홍화유 식이 급여에 의한 불포화 지방산 결핍의 회복 및 표피 과증식 억제 또한 사전에 검증되었다.^{13,15)} 코코넛 유지를 식이에 8주간 공급한 후 나뉘어진 실험군에게 각각 코코넛 유지(HCO군), 홍화유(HS군), 또는 전체 식이 무게의 5%에 상응하

Table 2. Fatty acid composition of dietary oils

Fatty acid ¹	SO ²	HCO ³	g/100 g total fatty acids
8 : 0			7.1
10 : 0			6.5
12 : 0			51.2
14 : 0			17.5
16 : 0			5.7
18 : 0			2.6
18 : 1n-9			14
18 : 2n-6			77.7

¹Only the major fatty acids are listed

²SO: Safflower oil

³HCO: Hydrogenated coconut oil

는 우방자를 열탕(AW군) 또는 유기 추출(AO군)한 건조 분말을 식이에 혼합하여 2주간 공급하였다. 동결 건조한 우방자 추출물의 사용에서 생기는 건분 식이의 무게 차이는 옥수수 전분 무게에서 감하여 조정하였다. 8 + 2주간의 코코넛 유지를 공급하는 실험군(HCO군)은 표피 과증식 억제에 대한 음성 대조군의 역할을 하였다. 또한 8 + 2주간 홍화유를 공급하는 실험군(SO)은 정상 대조군이었다. 코코넛 유지와 홍화유의 지방산 조성은 Table 2와 같았다. Pellet 형태의 식이 무게를 기준으로 하여 SO/HS 식이에 의해 공급된 linoleic acid는 4,662 mg/kg diet이었고 우방자에서 검출된 linoleic acid의 함량을 기준으로 하여 (유기 추출: 588.7 mg/g, 열 추출: 61.4 mg/g)¹⁶⁾ AO 및 AW 식이에 의해 공급된 linoleic acid는 각각 6,917 mg/kg diet와 460.5 mg/kg diet이었다. SO/HS 식이 및 AO 식이에서 공급된 linoleic acid의 양은 식이로 공급하는 linoleic acid의 적정 수준(식이 칼로리의 1 - 2% = 3.5 - 7.05 g)²¹⁾이었으나 AW 식이에서 공급된 linoleic acid 양은 적정 수준보다 현저히 낮았다. 전체 식이 무게를 기준으로 홍화유의 사용 중량이 (60 g/kg diet) 우방자 사용 중량에 (식이 무게 5%: 50 g/kg diet) 비해 많으나 linoleic acid 공급량은 우방자 유기 추출액이 가장 많았다.

4. 체중 변화 측정

체중은 1주간의 적응 시기 후 실험 식이를 공급한 첫 날을 초기 체중(0 week)으로 하였고 10주까지 매주 체중을 일정한 시간에 측정하였다.

5. 표피 증식 측정

1) 조직학적 평가

표피의 증식 정도를 가시적으로 측정하기 위해 4 mm²의

표피 조직을 등 부위에서 채취하여 6 μm 로 절단한 후 hematoxylin과 eosin (H & E)으로 고정 및 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

2) Thymidine incorporation

DNA의 증가는 세포 증식의 지표이므로 DNA의 구조물인 [^3H]Thymidine의 병합을 이용하여 표피 증식 정도를 측정하였다.¹⁵⁾ 6 mm^2 biopsy punch로 표피 조직을 채취하여 1 × DMEM에서 [^3H]Thymidine (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; 5 ml)과 함께 37°C에서 3시간 동안 항온 배양하고 DNA의 합성 억제를 위해 액체 질소에 보관하였다. 해동한 표피 조직에 2 ml의 0.5 M NaOH를 가하고 95°C에서 30분간 가열하여 DNA를 조직에서 유리하고 그 일부를 1% trichloroacetic acid 처리가 된 cellulose filter에 점적하여 scintillation counter로 방사활성을 측정하였다. DNA가 유리된 용액의 일부를 취하여 단백질 양을 bovine serum albumin을 표준으로 한 Bio-rad protein assay를 이용하여 정량하고 Thymidine incorporation을 [^3H]Thymidine/ μg protein으로 나타내었다.

6. 표피 지질 분획 및 지방산 분석

기니피그 표피 4 cm^2 를 polytron (PT-2100, Kinematica, Swiss)으로 분쇄한 후 Folch 용액을 이용하여 지질을 추출하였다. 이를 질소 가스로 건조시키고 100 μl 의 Folch 용액에 녹인 후 HP-TLC (high performance thin layer chromatograph: silica gel 60Å, 200 μm thickness, Whatman, U.S.A.)에 점적하여 1차 전개액 Chloroform: Methanol: Acetone (76:20:4, v/v/v), 2차 전개액 Chloroform: Acetone: Methanol (80:10:10, v/v/v) 그리고 3차 전개액 Chloroform: Ethylacetate: Ethylether: Methanol (76:20:6:2, v/v/v/v)을 순서대로 이용하여 인지질 및 세라마이드 지질을 분획하였다.²²⁾

각각의 분리된 지질을 박층으로부터 긁어낸 다음 Folch 용액으로 지질을 추출한 후 6% HCl을 함유한 methanol을 이용하여 지방산을 methylation하였다.²³⁾ Fatty acid methyl ester는 Omegawax 320 Fused Silica Capillary column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Supelco, U.S.A.)을 장착한 Gas chromatograph (5890 series II Gas chromatograph, Hewlett packard, U.S.A.)에 주입하여 각 분획물의 지방산 profile을 비교 분석하였다. 분석 조건은 250°C의 injector port와 260°C의 detector (flame ionization detector) port에서 oven의 온도를 140°C로 5분간 유지시킨 후 4°C/min 비율로 온도를 상승시켜 240°C에서 10분 동안 유지시켰다. 이 때 Helium

gas (carrier gas)는 3 ml/min의 유량으로 흘려주었고 split ratio는 20:1인 조건에서 1 μl 의 시료를 주입하였다.

7. 불포화 지방산 Lipoxygenase 대사체의 분석 및 측정

기니피그 표피 4 cm^2 에 RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 3.0, 150 mM NaCl, 10 mM NaPO₄, 10% glycerol, 100 μM Na₃VO₄, 100 μM ammonium molybdate, 1% NP-40, 0.1% SDS)를 가하고 polytron으로 분쇄하였다. 동량의 Folch 용액을 가하고 원심분리한 후 (3000 rpm, 5분) 하층을 취하여 질소 가스로 건조시키고 methanol에 녹였다.

이를 HPLC (Waters 1500 series HPLC: 1525 binary HPLC pump, 2487 Dual λ Absorbance detector, U.S.A.)에 주입하여 불포화 지방산 대사체를 비교 분석하였다.¹⁵⁾ 이때 ODS 18 column (reverse phase, 25 cm × 4.6 μm i.d., Beckman, U.S.A.)을 이용하여 237 nm에서 분석하였고 용매 (flow rate: 1 ml/min)는 Methanol: 0.08% acetic acid를 함유한 H₂O (76:26, v/v)를 사용하였다. 이와 같이 HPLC를 이용한 불포화 지방산 lipoxygenase 대사체의 분리는 Fig. 1과 같다.

8. 세라마이드 양 측정

기니피그 표피 (0.5 g)를 5 ml Krebs bicarbonate buffer에서 세라마이드 생성의 기본 구조 물질인 [^{14}C]Serine (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)과 함께²⁴⁾ 37°C에서 16시간 동안 항온 배양

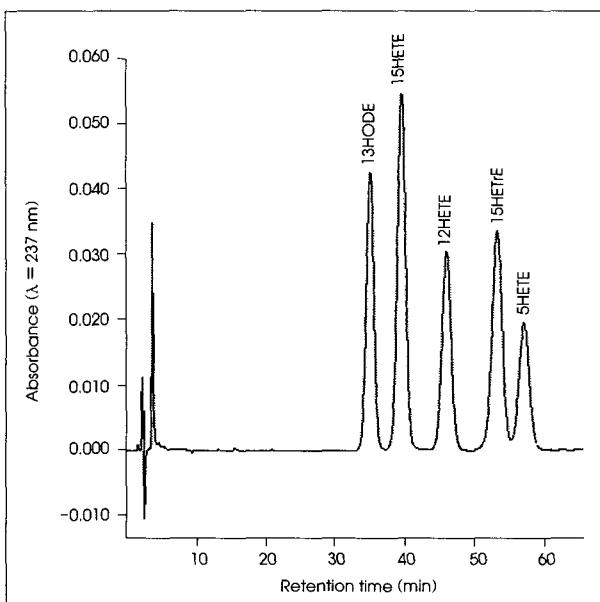


Fig. 1. A typical chromatogram of hydroxy fatty acid standards separated by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (HODE: hydroxyoctadecadienoic acid, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, HETrE: hydroxyeicosatrienoic acid).

하여 세라마이드를 포함한 스팽고지질에 metabolic labeling을 한 후 polytron으로 표피를 분쇄하고 Folch 용액을 이용하여 지질을 추출하였다.¹⁵⁾ 이를 질소 가스로 건조시키고 100 μl의 Folch 용액에 녹인 후 표피 지질 분획 및 지방산 분석 방법에서 언급한 HP-TLC와 전개용매를 이용하여 세라마이드를 분리하였다. 분리된 세라마이드는 박층으로부터 끌어낸 다음 scintillation counter로 방사활성을 측정하였다. Metabolic labeling 후 분쇄된 표피를 함유한 용액의 일부를 취하여 bovine serum albumin을 표준으로 한 Bio-rad protein assay를 이용하여 단백질 양을 정량하고 세라마이드 양을 [¹⁴C] serine/μg protein으로 나타내었다.

9. 통계 분석

본 연구의 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고 SAS program을 이용하여 실험군 간의 유의성은 one-way ANOVA로 검증한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교 분석하였다.²⁵⁾

결과 및 고찰

1. 우방자와 흥화유 식이 급여가 체중 증가에 미치는 영향

코코넛 유지, 흥화유 및 우방자의 식이 급여에 의한 체중 증가는 Fig. 2와 같다. 8주간 코코넛 유지를 식이 급여한 HCO군의 체중 증가는 흥화유를 식이 급여한 정상 대조군(SO군)에 비해 유의적으로 낮았다. 8주간의 코코넛 유지 급여 후 계속된 2주간의 흥화유 및 우방자 추출물의 식이 급여는 모두 체중을 증가시켜 10주후의 HS, AO, AW군의 체중 증가는 SO 군과 유의적인 차이가 없었고 HCO군에 비해서는 현저히 높았다. HS, AO 및 AW 군의 체중 증가는 서로간의 유의적인 차이는 없었다.

Linoleic acid를 비롯한 불포화 지방산은 성장 발달 및 체중 증가에 매우 중요한 역할을 한다.²⁶⁾ 또한 필수지방산이 결핍될 경우 동물의 체중이 감소하고 성장이 지연되며

식이 첨가에 의해 필수지방산을 공급한 경우 체중의 증가 및 성장이 유도된다고 보고되었는데²⁷⁾ linoleic acid를 다량 함유한 흥화유 및 우방자의 식이 급여에 의한 체중 증가는 이 보고와 일치하는 것으로 보인다.

2. 우방자와 흥화유 식이 급여가 표피 증식에 미치는 영향

H & E 염색을 이용한 표피 증식의 조직학적 평가 결과 코코넛 유지 공급을 통한 불포화 지방산 결핍에 의해 (HCO군) 표피층이 두꺼워짐 (acanthosis)을 나타내었다 (Fig. 3). 이는 불포화지방산 결핍으로 인해 피부조직의 수분장벽이 파괴되고 sterol esters의 과도한 생성과 함께 표피 세포의 과도한 증식 및 각질화가 진행되기 때문이다.²⁸⁾ 우방자 추출물의 식이 급여는 표피 과증식을 억제하였는데, 특히 우방자 유기 추출물을 식이 급여한 AO군에서 과증식이 가장 현저히 감소하였고 그 정도는 SO군과 유사하였다. HS 및 AW군에서도 표피 과증식이 억제되었으나 SO군에 비

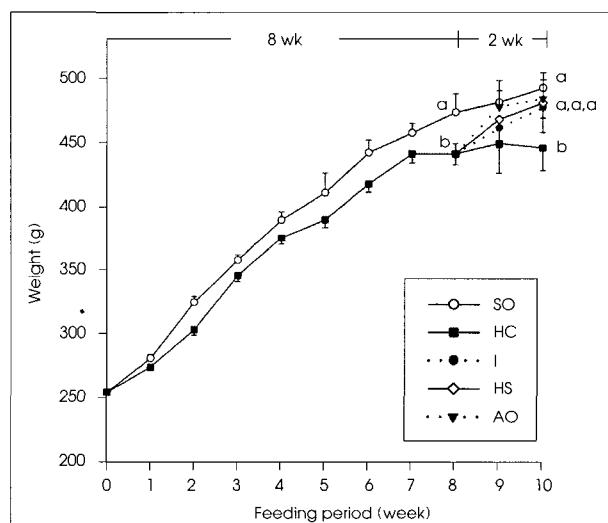


Fig. 2. Weight gain of control guinea pigs fed safflower oil (SO) diet for 10 wk, and EFA deficient guinea pigs fed hydrogenated coconut oil (HCO) diet for 10 wk or for 8 wk followed by 2 wk of feeding diets containing safflower oil (HS), organic extract of *Arctii Fructus* (AO) or water extract of *Arctii Fructus* (AW). Values are mean \pm SD ($n = 10$). Means with different letters differ $p < 0.05$.

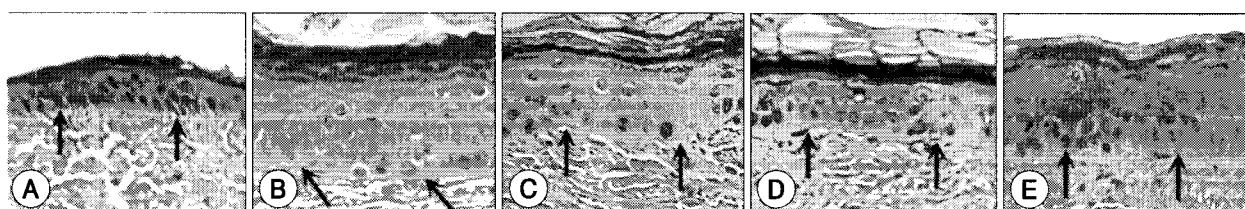


Fig. 3. Histological appearance of epidermal proliferation in control guinea pigs fed safflower oil (SO) (A) diet for 10 wk, and EFA deficient guinea pigs fed hydrogenated coconut oil (HCO) diet for 10 wk (B) or for 8 wk followed by 2 wk of feeding diets containing safflower oil (HS) (C) organic extract of *Arctii Fructus* (AO) (D) or water extract of *Arctii Fructus* (AW) (E). Arrows indicate the stratum corneum of epidermis and epidermal proliferation is correlated with the epidermal thickening from the arrow to the top. Note acanthosis (epidermal thickening) in epidermis of group HCO.

해 표피가 두꺼웠다.

[³H]Thymidine Incorporation을 이용하여 각 실험군에서 표피 증식 정도를 생화학적으로 평가하였다 (Fig. 4). HCO군에서의 thymidine 병합율이 가장 높았으며 이 결과는 표피의 과증식은 DNA 합성 증가와 병행됨을 의미한다. 우방자 유기 추출물을 식이 급여한 (AO군) 후의 thymidine 병합율이 가장 현저히 감소되었으며 그 수준은 SO군과 유사하였다. 반면에 우방자 열탕 추출물의 식이 급여 (AW군) 후의 thymidine 병합율은 HCO군과 유사하였다. Linoleic acid를 비롯한 불포화 지방산 결핍 식이뿐 아니라,^{5~7)} 탈지 분유를 섭취한 영아나 지질이 결여된 경장 영양을 실시한 경우 성장의 저하와 함께 표피 탈락, 표피 과증식이 나타난다고 보고되었는데^{27,28)} HCO군에서의 표피의 과증식은 이 보고들과 일치하였다. 유도된 표피의 과증식은 홍화유 또는 우방자 유기 추출액의 급여에 의해서만 증식이 억제되었고 우방자 유기 추출액의 효과가 더욱 커지는

데 이 결과는 식이를 통한 적정 수준의 linoleic acid 공급(식이 칼로리의 1~2% = 3.5~7.05 g)²¹⁾은 유도된 표피의 과증식을 억제하며 그 억제 효과는 적정 수준 범위에서 linoleic acid의 공급량이 많을수록 억제 효과가 큼을 의미한다. 조직학적 평가와 생화학적 평가를 종합하여 볼 때 우방자 열탕 추출물의 식이 급여는 표피의 과증식을 억제하지 못하였으며 이는 linoleic acid의 식이 급여 부족에서 기인된 것으로 여겨진다.

3. 우방자와 홍화유 식이 급여가 표피의 지방산 조성에 미치는 영향

불포화 지방산은 표피의 주요 지질 성분인 인지질 및 세라마이드에 결합하여 표피의 정상적인 층상 구조를 유지하는 역할을 한다.¹¹⁾ 표피 내에 함유된 지질을 인지질과 세라마이드로 분획한 후 linoleic acid 및 linoleic acid에서 desaturation과 elongation 과정을 거쳐 생성되는 arachidonic acid의 함유량을 비교하였다 (Table 3). 정상 대조군인 SO 군의 표피에서 인지질 및 세라마이드에 함유된 linoleic acid의 수준은 arachidonic acid에 비해 현저히 높았으며 이 결과는 신체의 타 기관과 달리^{29,30)} linoleic acid가 표피의 주요 불포화 지방산 임을 다시 검증하여 주었다.²³⁾ HCO 군에서 인지질과 세라마이드에 함유된 linoleic acid의 수준은 SO군에 비해 현저히 낮았다. 표피 과증식이 유도된 기니 피그에 우방자 유기 추출액의 식이 급여는 (AO군) SO 군과 유사한 수준으로 인지질과 세라마이드에 대한 linoleic acid의 함유율을 증가시켰다. HS군과 AW군에서 인지질과 세라마이드에 대한 linoleic acid의 함유율은 HCO군과 유사하였다. AO군에서 인지질과 세라마이드에 함유된 arachidonic acid의 수준 또한 가장 높았으나 전반적으로 인지질과 세라마이드에 함유된 arachidonic acid의 수준이 낮았고 HCO군의 세라마이드 내의 현저히 낮은 arachidonic acid의 함유율을 제외하고 SO, HS, AW군 간의 차

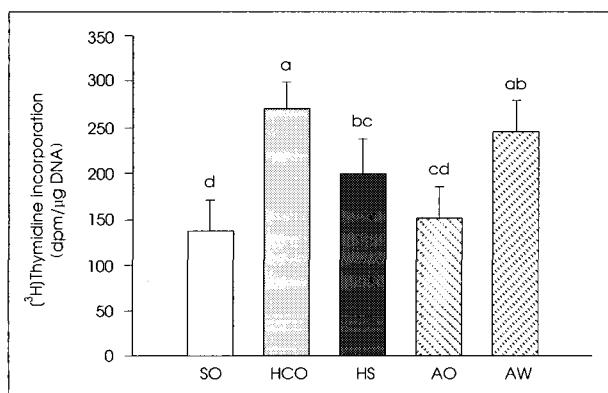


Fig. 4. [³H]Thymidine incorporation into epidermal DNA of control guinea pigs fed safflower oil diet for 10 wk (SO), and EFA deficient guinea pigs fed hydrogenated coconut oil diet for 10 wk (HCO) or for 8 wk followed by 2 wk of feeding diets containing safflower oil (HS), organic extract of *Arctii Fructus* (AO) or water extract of *Arctii Fructus* (AW). Values are mean \pm SD ($n = 10$). Means with different letters differ $p < 0.05$.

Table 3. Composition of linoleic acid and arachidonic acid incorporated into epidermal phospholipids and ceramides of guinea pigs¹

PUFA	Lipids	Dietary groups ²				
		SO ³	HCO	HS	AO	AW
18 : 2 (n-6)	PL ^{3,4}	12.04 \pm 1.53 ^{ab}	4.86 \pm 0.77 ^c	8.43 \pm 1.65 ^{bc}	16.25 \pm 1.40 ^a	7.16 \pm 1.60 ^{bc}
	CE	13.46 \pm 1.84 ^a	1.95 \pm 0.98 ^b	6.00 \pm 0.71 ^b	15.77 \pm 1.36 ^a	3.96 \pm 0.48 ^b
20 : 4 (n-6)	PL	4.48 \pm 0.58 ^{ab}	2.72 \pm 0.49 ^b	2.97 \pm 0.28 ^b	6.06 \pm 0.91 ^a	4.50 \pm 0.69 ^{ab}
	CE	3.50 \pm 0.72 ^{ab}	0.76 \pm 0.38 ^c	1.71 \pm 0.85 ^{bc}	4.44 \pm 0.11 ^a	3.68 \pm 0.99 ^{ab}

¹Values are mean \pm SD ($n = 10$). Means with different letters differ $p < 0.05$.

²Control guinea pigs were fed safflower oil diet for 10 wk (group SO), and EFA deficient guinea pigs fed hydrogenated coconut oil diet for 10 wk (group HCO) or for 8 wk followed by 2 wk of feeding diets containing safflower oil (group HS), organic extract of *Arctii Fructus* (group AO) or water extract of *Arctii Fructus* (group AW).

³Data logarithmically transformed before ANOVA

⁴PL: phospholipids, CE: ceramides

이는 미비하였다. 이 결과는 표피 과증식이 유도된 기니 피그에 우방자 유기 추출액의 식이 급여는 (AO군) 흥화유의 식이 급여보다도 (HS군) 더욱 현저하게 인지질과 세라마이드에 함유된 linoleic acid의 수준을 증가시켜 표피 과증식 억제 효과를 야기하였음을 의미한다.

4. 우방자와 흥화유 식이 급여가 표피의 불포화지방산 Lipoxygenase 대사체 생성에 미치는 영향

표피에서 linoleic acid의 15-lipoxygenase 대사체인 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE)의 생성량은 (Fig. 5) 인지질 및 세라마이드에 함유된 linoleic acid의 수준을 (Table 3) 반영하였다. 즉 AO군에서 13-HODE의 양이 유의적으로 가장 높았으며 그 수준은 정상대조군인 SO과 유사하였다. HS, AW, HCO군은 각 군간의 유의적인 차이는 없었다. Arachidonic acid의 15-lipoxygenase 대사체인 15-hydroxyeicosatrienoic acid (15-HETE)도 미비한 수준으로 측정이 되었으나 실험군간의 유의적인 차이는 없었다 (data not shown).

인체의 표피에서는 불포화 지방산 대사에 필요한 desaturase가 부재하여,²⁾ linoleic acid는 γ -linolenic acid나 arachidonic acid로 전환되지 않는 반면 15-lipoxygenase에 의해 13-HODE로 대사된다.¹²⁻¹⁴⁾ 표피에서 linoleic acid의 주요 대사체인 13-HODE는 세포막 지질의 주성분인 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI) 등의 인지질을 비롯하여 신호전달 체계에 관련이 있는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate에 결합한 후 인지질 분해효소인 phospholipase C에 의해 가수분해되어 13-HODE를 내포한 diacylglycerol (1-acyl-2-13-

HODE-glycerol)이 되며,³¹⁾ 이는 세포의 중식, 분화, 사멸 등에 관여하는 protein kinase C- β (PKC β)의 활성을 선택적으로 억제하여 표피 과증식 억제의 생리활성을 갖는다고 알려져 있다.³²⁾ Table 3과 Fig. 5의 결과는 linoleic acid의 공급량이 가장 많았던 우방자 유기 추출액의 식이 공급에 의해 표피 장벽유지에 중요한 지질 성분인 인지질에 함유된 linoleic acid의 수준이 가장 현저히 증가되었고 phospholipase C에 의해 가수분해된 후 항증식의 생리활성을 나타내는 13-HODE로 대사 되었음을 의미한다. 즉 표피에서 생성되는 13-HODE 수준은 기질인 linoleic acid의 공급량에 기인하며 우방자 유기 추출액이 흥화유보다 더욱 많은 양의 linoleic acid를 공급할 수 있는 식품 소재임을 제안한다. 우방자는 다량의 linoleic acid 이외에¹⁶⁾ terpenoid에서 유래된 arctiin, arctiol, lupeol 등의 lignan 성분을 함유하고 있고^{17,18)} 이들 성분들은 소량이나마 모두 지용성이므로 유기 추출물에 포함되어 표피 과증식 억제 효과를 초래하였을 가능성을 배제할 수는 없으나 이들 성분의 피부를 모델로 한 효능 연구는 전무한 실정이다. 세라마이드는 표피의 주요 지질로 불포화 지방산과의 결합이 표피의 정상적인 충상 구조의 유지를 위해 절대적으로 중요하나¹¹⁾ 세라마이드에 함유되어 있는 linoleic acid의 수준과 13-HODE의 생성과의 관련성에 대한 연구는 앞으로 행해져야 할 것이다.

5. 우방자와 흥화유 식이 급여가 표피의 세라마이드 생성에 미치는 영향

세라마이드의 생성은 SO > AO > AW > HS > HCO 순으로 나타났으나 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 6). 세라마

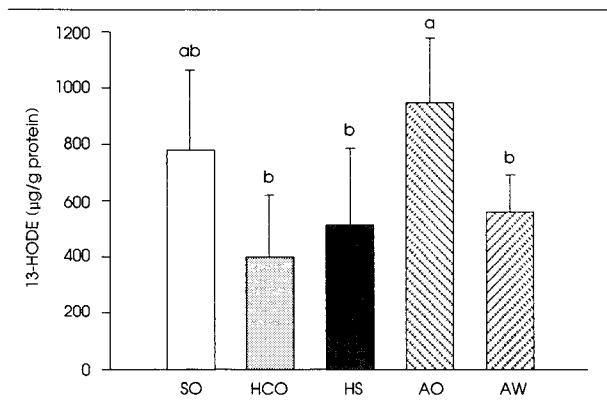


Fig. 5. Altered endogenous levels of 13-HODE in the epidermis of control guinea pigs fed safflower oil diet for 10 wk (SO), and EFA deficient guinea pigs fed hydrogenated coconut oil diet for 10 wk (HCO) or for 8 wk followed by 2 wk of feeding diets containing safflower oil (HS), organic extract of *Arctii Fructus* (AO) or water extract of *Arctii Fructus* (AW) diets. Values are mean \pm SD ($n = 10$). Means with different letters differ $p < 0.05$.

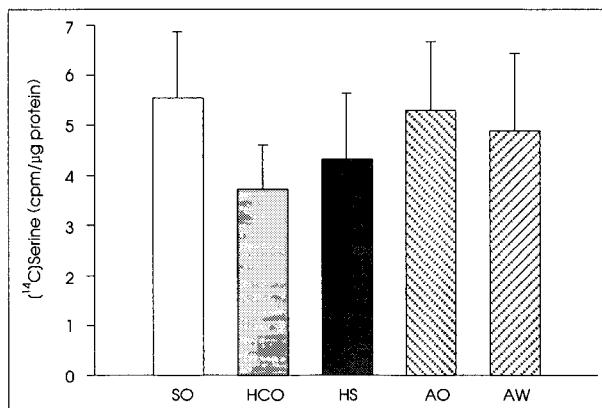


Fig. 6. Alteration of ceramide synthesis in the epidermis of control guinea pigs fed safflower oil diet for 10 wk (SO), and EFA deficient guinea pigs fed hydrogenated coconut oil diet for 10 wk (HCO) or for 8 wk followed by 2 wk of feeding diets containing safflower oil (HS), organic extract of *Arctii Fructus* (AO) or water extract of *Arctii Fructus* (AW). Values are mean \pm SD ($n = 10$). Means with different letters differ $p < 0.05$.

이드는 표피 장벽의 주요 지질 성분으로 표피의 정상 구조를 유지하는데 중요한 역할을 하며,¹⁾ 표피 장벽이 손상되어 있는 건선염 또는 아토피 피부염 환자의 표피에서는 세라마이드 생성이 감소 되어있음이 보고되어 있다.^{8,9)} 우방자 유기 추출물의 식이 급여에 의한 표피 과증식의 억제는 13-HODE의 생성 증가와 역의 상관관계를 나타내었으나 (Fig. 5) 세라마이드 생성과는 무관하였다.

요약 및 결론

불포화 지방산 결핍 식이에 의한 표피 과증식을 유도한 후 우방자 추출물 또는 홍화유의 식이 공급에 따른 표피 과증식의 억제 효과 및 인지질과 세라마이드에 함유되어 있는 linoleic acid 수준과 13-HODE 생성을 비교·분석하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 불포화 지방산 결핍 식이를 급여한 HCO군의 체중 증가는 홍화유를 식이 급여한 정상 대조군 (SO군)에 비해 유의적으로 낮았고 계속된 2주간의 홍화유 및 우방자 추출물의 식이 급여는 모두 체중을 증가시켜 10주 후의 HS, AO, AW군의 체중 증가는 SO군과 유의적인 차이가 없었다. 또한 HS, AO 및 AW군의 체중 증가는 서로간의 유의적인 차이는 없었다.

2) 표피 증식의 조직학적 평가 및 Thymidine Incorporation을 이용한 표피 증식의 생화학적 평가 결과 과증식을 유도한 HCO군에서 표피층이 두꺼워졌으며 thymidine 병합율 또한 가장 높았다. 우방자 유기 추출물을 식이 급여한 AO군에서 과증식이 가장 현저히 감소하여 thymidine 병합율은 SO군과 유사한 수준이었다. 조직학적 평가 결과 HS 및 AW군에서도 표피 과증식이 억제되는 것으로 나타났으나 thymidine 병합율은 HCO군과 유사하였다.

3) HCO군에서 인지질과 세라마이드에 함유된 linoleic acid 수준은 SO군에 비해 현저히 낮았다. 우방자 유기 추출액을 식이 급여한 AO군은 SO군과 유사한 수준으로 인지질과 세라마이드에 대한 linoleic acid의 함유율을 증가시켰다. HS군과 AW군에서 인지질과 세라마이드에 함유된 linoleic acid 수준은 HCO군과 유사하였다.

4) AO군에서 linoleic acid의 13-lipoxygenase 대사체인 13-HODE의 생성이 가장 높았으며 그 수준은 정상대조군인 SO군과 유사하였다. HS, AW 및 HCO군에서 13-HODE의 생성은 각 군간의 유의적인 차이가 없었다.

5) 표피 장벽의 주요 지질 성분인 세라마이드 생성은 실험군 각 군간의 유의적인 차이가 없었다. 이상의 결과를 종합해보면 표피 과증식이 유도된 기니 피그에 우방자 유기

추출액의 식이 급여는 홍화유의 식이 급여보다 더욱 현저히 표피 장벽유지에 중요한 지질 성분인 인지질과 세라마이드에 함유된 linoleic acid의 수준 및 linoleic acid의 15-lipoxygenase 대사체로 항증식의 생리 활성을 나타내는 13-HODE의 생성을 증가시켜 표피 과증식의 억제하였다. 반면에 우방자 열탕 추출물의 표피 과증식 억제 효과는 미비하였다. 우방자 유기 추출액의 홍화유를 능가하는 표피 과증식 억제 효과는 우방자의 국내 유기 지원 및 피부 관련 건강 기능식품 소재로의 개발 가능성을 제안한다.

Literature cited

- Gray GM, Yardley HJ. Lipid compositions of cell isolated from pig epidermis, and rat epidermis. *J Lipid Res* 16: 434-440, 1975
- Chapkin RS, Ziboh VA, Marcelo CL, Voorhees JJ. Metabolism of essential fatty acids by human epidermal enzyme preparations: evidence of chain elongation. *J Lipid Res* 27: 945-954, 1986
- Yardley HJ, Summer R. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol Ther* 13: 357-383, 1981
- Wertz PW, Downing DT. Metabolism of linoleic acid in porcine epidermis. *J Lipid Res* 31(10): 1839-1844, 1990
- Burr GO, Burr MM. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem* 82: 345-367, 1929
- Burr GO, Burr MM. On the nature of the fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem* 86: 587-621, 1930
- Burr GO. Significance of the essential fatty acids. *Fed Proc* 1: 224-233, 1942
- Wertz PW, Swartzendruber DC, Abraham W, Madison KC, Downing DT. Essential fatty acids and epidermal integrity. *Arch Dermatol* 123: 1381-1384, 1987
- Elias PM, Brown BE. The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function in essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. *Lab Invest* 39: 574-583, 1978
- Ziboh VA, Chapkin RS. Biologic significance of polyunsaturated fatty acids in the skin. *Arch Dermatol* 123: 1686a-1690, 1987
- Ziboh VA. Implication of dietary oils and polyunsaturated fatty acids in the management of cutaneous disorders. *Arch Dermatol* 125: 241-245, 1989
- Cho Y, Ziboh VA. 13-Hydroxyoctadecadienoic acid reverses epidermal hyperproliferation via selective inhibition of protein kinase C-β activity. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 257-265, 1994
- Cho Y, Ziboh VA. Nutrition modulation of guinea pig skin hyperproliferation by essential fatty acid deficiency is associated with selective down regulation of protein kinase C-β. *J Nutr* 125: 2741-2750, 1995
- Wills AL. Nutritional and pharmacological factors in eicosanoid biology. *Nutr Rev* 39: 289-301, 1981
- Chung S, Kong S, Seong K, Cho Y. γ-Linolenic acid in borage

- oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs. *J Nutr* 132: 3090-3097, 2002
- 16) Cho Y, Seong K, Lee EJ, Ahn DK, Park SK. Analysis of linoleic acid on the extraction method of arcti Fructus. *Kor J Herbol* 17(2) : 11-17, 2002
- 17) Ahn D. Illustrated book of the Korean flora, pp.21. Kyo Hak Sa, Seoul, 1998
- 18) Faculties in college of oriental medicine. Herbology, pp.144. Young Lim Sa, Seoul, 1992
- 19) Yoo H, Kim S, Kim D. An experimental study of Arctii Fructus on the antiallergic effect. *Kor J Herbol* 16: 111-128, 2001
- 20) Mohrhauer H, Holann RT. The effect of dose level of essential fatty acids upon fatty acid composition of the rat liver. *J Lipid Res* 4: 151-159, 1963
- 21) National Research Council (NRC). Diet and Health: implications for reducing chronic disease risk. In: Report of the committee on diet and health, Food and Nutrition Board., pp.367, National Academy Press, Washington, DC., 1989
- 22) Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, Suzuki A, Elias P M, Holleran W M, Hamanaka S. Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* 41: 2071-2082, 2000
- 23) Tang W, Ziboh VA. Reversal of epidermal hyperproliferation in essential fatty acid deficient guinea pigs is accompanied by rapid generation of inositol triphosphate. *Arch Dermatol Res* 280: 286-292, 1988
- 24) Tohyama J, Oya Y, Ezoe T, Vanier MT, Nakayasu H, Fujita N, Suzuki K. Ceramide accumulation is associated with increased apoptotic cell death in cultured fibroblasts of sphingolipid activator protein-deficient mouse but not in fibroblasts of patients with Farber disease. *J Inher Metab Dis* 22: 649-662, 1999
- 25) Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Multivariate data analysis with readings, 4th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 1995
- 26) Rump P, Mensink RP, Kester AD, Hornstra G. Essential fatty acid composition of plasma phospholipids and birth weight: a study in term neonates. *Am J Clin Nutr* 73 (4) : 797-806, 2001
- 27) Hansen AE, Wiese HF, Boelsche AN, Haggard ME, Adam DJD, Davis H. Role of linoleic acid in infant nutrition: clinical and chemical study of 428 infants fed on milk mixtures varying in kind and amount of fat. *Pediatrics* 31: 171-192, 1963
- 28) Caldwell MD, Johnson HT, Othersen HB. Essential fatty acid deficiency in an infant receiving prolonged parenteral alimentation. *J Pediatr* 81: 894-898, 1972
- 29) Carver, JD, Benford, VJ, Han, B, Cantor, AB. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Res Bull* 56 (2) : 79-85, 2001
- 30) Yilmaz Ö, Özkan Y, Yıldırım M, Öztürk I, Erşan Y. Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione, malonaldehyde, and fatty acids levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats. *J Cell Biochem* 86: 530-539, 2002
- 31) Cho Y, Ziboh VA. Incorporation of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) into epidermal ceramides and phospholipids: phospholipase C-catalyzed release of novel 13-HODE-containing diacylglycerol. *J Lipid Res* 35: 255-262, 1994
- 32) Cho Y, Ziboh VA. Expression of protein kinase C isozymes in guinea pig epidermis: Selective inhibition of PKC- β activity by 13-hydroxyoctadecadienoic acid-containing diacylglycerol. *J Lipid Res* 35: 913-921, 1994