

## ICR mouse에 있어 UVB 조사로 유도된 접촉 과민반응에 대한 EGb 761의 억제 효과

최옥희 · 안형수\* · 안령미†

동덕여자대학교 보건관리학과, \*약학과

## Prevention of Ultraviolet B Radiation (280-320 nm) Induced Contact Hypersensitivity by EGb 761

Wookhee Choi · Hyoungsoo Ann\* · Ryoungme Ahn†

Department of Health Science, Dongduk Women's University

\*Department Pharmacology, Dongduk Women's University

(Received January 17, 2005; Accepted March 3, 2005)

### ABSTRACT

Exposure of skin to UVB radiation can cause the induction of inflammation and impairment of contact hypersensitivity(CHS) response. Several studies have shown that polyphenolic compounds isolated from EGb 761 afford protection against UVB. In this study, we demonstrated that topical application of EGb 761, before 1MED(1.4 KJ/m<sup>2</sup>), 1.5MED (2.1 KJ/m<sup>2</sup>), 2MED (2.8 KJ/m<sup>2</sup>) of UVB exposure to ICR mice prevented UVB-induced inflammation and inhibition of the contact hypersensitivity response. The skin-fold swelling from 1MED, 1.5MED, 2MED of UVB exposure highly significantly increased after twice irradiation. Topical application of EGb 761(0.1%, 1%, 4%), 5 days prior to UVB exposure reduced skin thickness compared to non-treated mice. Exposure of shaved abdominal skin of mice to 1MED, 1.5MED and 2MED of UVB radiation resulted in suppression of contact sensitization through the skin to 56.23%, 65.12%, 74.02%, compared to normal unirradiated skin. Topical application of EGb 761(0.1%, 1%, 4%), 5 days prior to or 5 days after exposure to 1MED and 2MED of UVB resulted in protection against suppression of contact hypersensitivity in mouse dorsal skin. These protective effects were dependent on the dose of EGb 761 employed. The present study show that EGb 761 protect UVB-induced inflammation and immune suppression. Also, we suggest that EGb 761 can provide protection from photoimmunosuppression.

**Keywords:** EGb 761, UVB, inflammation, contact hypersensitivity, photoimmunosuppression

### I. 서 론

자외선은 적당한 양에 노출 시 인체의 비타민 D 생성을 증가시켜 구루병을 예방하고, 살균작용을 하며, 건강한 피부를 유지시켜 준다. 그러나 과잉 노출 시 피부 노화의 원인이 되며, 홍반, 부종 등을 유발하고, 피부암의 발생을 촉진시켜 건강의 위협을 가하기도 한다.<sup>1,2)</sup> 최근 자동차 배기가스로 인한 다량의 일산화탄소 발생,<sup>3)</sup> 냉매제인 염화불화탄소(CFC) 등의 증가와 각종 화학물질로 인하여 유해한 파장의 자외선을 차단하는

오존층이 파괴<sup>4)</sup>되고 있다. 또한 백열등, 형광등, 레이저 등의 인공 자외선 발생원의 사용이 급증함에 따라 자외선에 쉽게 노출될 위험이 커져 그 심각성이 확대되고 있다.

자외선 중 광 생물학적으로 인체에 가장 영향을 많이 미치고 피부에 광손상을 일으키는 파장은 UVB(280~320 nm)이다. UVB는 피부의 핵산, 단백질 등의 합성을 억제시키고, 화상을 입히며, 새로운 색소를 만들어 색소 침착을 유발하는가 하면, 면역학적 기능을 저하시켜 세포성 매개 면역에 심각한 장애를 일으킨다. 따라서, 오랜 기간 UVB에 노출되었을 때 야기되는 만성광손상은 피부의 광노화와 암유발을 촉진시키며, 여러 가지 접촉성 항원 물질 및 다양한 감염증에 대한 피부 면역 기능을 억제시킨다.<sup>5)</sup>

†Corresponding author : Department of Health Science, Dongduk Women's University  
Tel: 82-2-940-4481, Fax: 82-2-940-4193  
E-mail : lucia@dongduck.ac.kr

Reeve 등<sup>6)</sup>의 연구에 의하면, 지속적인 UVB와 SSUV (solar-simulated UV)의 노출이 T-cell 매개 면역 기능을 억제시켜 접촉성 과민반응(Contact hypersensitivity)을 감소시키는 것을 볼 수 있다.

접촉성 과민반응(Contact hypersensitivity)이란 이러한 자외선으로 인한 항원 특이적 면역 반응을 측정하는데 가장 유용하게 쓰이는 체내 분석법이다. 접촉성 과민반응의 원인은 대부분 니켈, 크롬, 코발트 등의 단순한 화학물질이나 유기화합물 등이 항원으로 작용한다. 이러한 항원의 지속적인 자극으로 이후 동일한 자극물질에 대한 기억 T-cell이 분열하여 림포카인을 분비, 피부의 염증 반응을 유발한다. 자외선 조사는 피부 내 면역 세포를 손상시켜 이러한 접촉성 과민반응을 억제시킨다.<sup>7)</sup>

접촉성 과민반응에 대한 연구는 이러한 자외선에 의한 면역 억제를 감소시킬 수 있는 물질 개발에 대한 연구가 계속되고 있는데, 대부분 항산화제로 알려져 있는 합성 항산화제  $\alpha$ -tocopherol,<sup>8)</sup> Vit. C,<sup>9)</sup> carotenoids,<sup>10)</sup> flavonoids,<sup>11)</sup> tannic acid<sup>12,13)</sup> 등과 같은 일부 천연물질에 대한 연구가 많이 보고되고 있다. 이러한 항산화 효과를 가진 물질들은 자외선으로 인한 피부 염증과 면역 억제를 감소시키는 것으로 보고되었으며, 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 염증 반응의 감소와 면역 반응의 변화가 관련이 있을 것으로 보고되었다.<sup>14)</sup>

Ginkgo biloba extract (EGb 761)는 Ginkgo biloba Linne의 건조시킨 잎을 acetone과 물로 추출한 것으로 24%의 flavonoid glycosides (ginkgo-flavone glycosides)와 6%의 terpene lactones (ginkgolides, bilobalide)을 함유하고 있고, 그 외 proanthocyanidin과 organic acids 등의 성분을 가지고 있다.<sup>15)</sup>

Ginkgo biloba extract는 또한 primary 및 secondary free radical scavenger로서 항산화 작용을 갖고 있는데, Ginkgo가 함유하고 있는 flavonoid 성분에 의한 것이다. Flavonoid는 폐놀성 화합물로서 식물계에 널리 분포되어 있으며, 다른 항산화제와는 달리 매우 융통성이 크다. Flavonoid의 항산화 작용은 직접 활성 산소종과 반응하여 이들을 제거함으로써 활성산소에 의한 조직 손상을 막아줄 수 있으며, 활성산소를 생성시키는 생체 내 산화효소와 작용을 저해시킴으로써 활성산소의 생성을 막아주는 작용이 있다.<sup>16-18)</sup> 이러한 항산화 작용으로 은행잎 추출액은 주로 말초 및 뇌혈관 순환장애와 같은 질환의 치료제로 사용되었다. 그러나 최근 새로운 혈소판 응집촉진물질이 발견되면서 은행잎과 은행나무 뿌리에 소량함유 되어있는 Ginkgolides의 연구가 진행되고 있으며, 그 결과 현재 항알레르기, 면역기능 증

가, Prostaglandin 생성저해 등의 영역에 효과가 있을 것으로 기대되어지고 있다.<sup>19)</sup>

그러나 현재에 이르기까지 EGb 761의 면역 조절에 관한 연구는 드물었다. Tian 등<sup>20)</sup>은 비장의 T cell에 관한 EGb 761의 antiapoptotic action을 증명하였고, Puebla-Perez 등<sup>17)</sup>의 연구 결과에서는 항산화 작용으로 인한 면역 반응 향상을 DTH(delayed-type hypersensitivity)로 설명하였다.

이는 주로 in vitro에서의 실험이 주가 된 것으로 EGb 761의 생체 내 효과는 검증된 자료가 드물다. 따라서 본 논문에서는 피부에 광손상을 유발하는 UVB를 ICR mouse에 조사하여 피부의 염증 반응과 면역 억제 반응을 알아보려고 하였으며, EGb 761의 피부 도포가 UVB로 인한 이러한 손상을 감소시킬 수 있는지 조사하였다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물의 사육 및 자외선 조사

실험동물은 (주)샘타코 Bio Korea에서 분양받아 사육한 약 8~10주령 된 ICR mouse(female)를 사용하였으며, 사육조건은 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대 습도  $55 \pm 5\%$ 의 항온 습실에서 사료와 식수를 자유로이 공급하였다.

정상쥐군은 "Normal 군"으로 표기하여 1주일간 정상 사육하였으며, 자외선 조사군은 대조군으로 하였다. Normal군과 대조군은 자외선 조사 24시간 전에 등 부위를 clipper로 shaving하였으며, 10마리를 한 군으로 하였다. Normal군을 제외한 나머지 군은 등 부위만 노출되도록 자체 고안한 cage에 넣은 후, 자체 제작한 조사기에 cage를 넣고 UVB(312 nm)를 조사시켰다.

자외선 조사기에는 총 4개의 UVB lamp(philips)를 설치하였으며, mouse는 자외선 lamp로부터 20 cm 떨어진 곳에서 조사되었다. UVB 실험 농도는 ICR mouse의 등 부위에 UVB를 조사하여 조사영역 대부분에 홍반을 나타내는 최소한의 자외선량을 최소홍반량(Minimal Erythema Dose, MED)으로 하였으며, 본 실험에서는  $1.4 \text{ KJ/m}^2$ 를 1MED로 하였다. 자외선 조사는 radiometer(6501-54 VLX-3W, France)를 사용하여 약 3분간 UVB를 조사하였다.

### 2. EGb 761 처치

Base lotion은 Polyethylene(PEG) 8000과 PEG 400의 1:2 혼합액을 water bath에서  $60^\circ\text{C}$ 로 천천히 녹여 3차 증류수와 섞어 사용하였다.<sup>21)</sup> EGb 761 powder를

섞어 0.1%, 1%, 4% lotion을 조제하여 사용하였다. 실험동물은 자외선 조사 5일 전부터 0.1%, 1%, 4% EGb 761 lotion을 등 부위에 200  $\mu$ 씩 도포하였다. 또한 자외선 조사 후에도 등 부위에 200  $\mu$ 씩 도포하였다.

### 3. Edema response 측정

UVB에 의한 edema reaction 측정은 skin-fold thickness를 측정하여 알아보았다.<sup>22)</sup> 등 부위를 shaving한 ICR mouse에 자외선을 조사한 후, micrometer (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 mid-dorsal 부위의 피부 두께를 측정하였으며, 오차를 줄이기 위하여 3번 반복 측정하였다.

Shaving한 mouse를 1MED(1.4 KJ/m<sup>2</sup>), 1.5MED(2.1 KJ/m<sup>2</sup>), 2MED(2.8 KJ/m<sup>2</sup>)의 UVB에 5일간 조사시킨 후, 피부 두께의 변화를 매 24시간 후마다 측정하였다.

### 4. Contact hypersensitivity reaction 측정

Contact hypersensitivity를 유도하기 위해 shaving된 mouse의 등 부위를 5일간 1MED(1.4 KJ/m<sup>2</sup>), 1.5MED(2.1 KJ/m<sup>2</sup>), 2MED(2.8 KJ/m<sup>2</sup>)의 UVB를 조사시켰다.

Sensitizer를 접촉시키기 24시간 전 mouse 배 부위를 shaving 한 후, 8일과 9일째 되는 날에 2% oxazolone을 sensitizer로 100  $\mu$ 씩 shaving된 mouse의 배에 발랐다. 15일째 되는 날 mouse 귀의 두께를 micrometer로 측정하고, 2% oxazolone을 양쪽 귀에 각각 5  $\mu$ 씩 바른 후 18시간 후에 귀부종의 두께를 micrometer로 측정하였다.<sup>14)</sup>

이때 EGb 761이 자외선에 의해 유도되는 immunosuppression을 억제할 수 있는지 알아보기 위해 자외선 조사 5일전부터 실험동물의 등 부위에 EGb 761이 농도별(0.1%, 1%, 4%)로 함유되어 있는 lotion을 200  $\mu$ 씩 도포(1일 1회, 총 5회)하였다.

한 군당 10마리의 실험동물을 사용하였으며, 각 군의 5마리는 UVB를 5일간 조사시켰으며, 나머지 5마리는 UVB에 대한 대조군으로 남겨두었다. 자외선 조사군과 대조군은 UVB 조사가 끝난 직후, 전처치와 동일한 방법으로 EGb 761이 함유된 로션 200  $\mu$ 를 후처치 하였다.

Contact hypersensitivity에 대한 recovery 백분율은 다음과 같이 계산하였다.

(%) Suppression =

$$100 - \left( 100 \times \frac{\text{Net ear swelling of UVB mice}}{\text{Net ear swelling of control mice}} \right)$$

## 5. 실험 데이터 검정

실험 데이터의 통계처리는 SAS를 사용하여 실시하였으며, 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. UVB에 의한 Edema response 측정

본 실험에서는 UVB에 의한 Edema response를 유도하기 위해 1MED(1.4 KJ/m<sup>2</sup>), 1.5MED(2.1 KJ/m<sup>2</sup>), 2MED(2.8 KJ/m<sup>2</sup>)의 UVB를 shaving한 등 부위에 하루에 한 번, 일정한 시간에 연속하여 5일간 같은 시간에 자외선을 조사시켰다. 매 자외선 조사 전에 시간별로 skin thickness를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

첫 번째 조사 후, 24시간 지난 다음 측정된 결과에서는 조사 전에 비해 22.6%, 28.8%, 18.2%의 증가율을 보였으며(p<0.01), 두 번째 조사(2d) 후 측정된 결과에서는 조사 전과 비교하여 보았을 때, 1MED, 1.5MED, 2MED 조사군 모두에서 103.1%, 118.2%, 109.4%의 통계적으로 유의한 증가를 보여, UVB가 염증 반응으로 피부의 edema reaction를 증가시킴을 알 수 있었다(p<0.001).

1.5MED의 조사군이 계속되는 자외선 조사로 인하여 피부의 edema가 지속적으로 증가하는 반면, 저농도인 1MED와 고농도인 2MED 조사군에서는 자외선 조사 횟수가 늘어날수록 skin swelling 증가 정도가 감소하는 것을 볼 수 있었다.

피부에는 활성 산소종을 제거하는 항산화방어계가 있다. 이러한 피부 항산화 방어는 낮은 수준의 자외선으로도 손상을 받으며 높은 수준의 자외선에선 몇 가지 항산화제들이 완전히 파괴된다. 결국 산화적 손상을 억

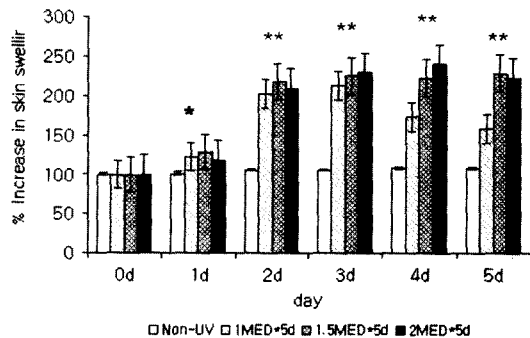


Fig. 1. Cumulative % increase in skin swelling, measured by mid-dorsal skinfold thickness, following exposure of ICR mice(n=10) to UVB dose-response.

\*p<0.01, \*\*p<0.001: significantly different from non-UVB

제하는 피부의 능력은 크게 감소되어 지질, 단백질, 핵산 등과 같은 피부 세포 성분들이 손상된다.

따라서, 본 연구의 결과 피부의 edema reaction이 증가된 것은 자외선 조사로 인한 피부의 항산화 능력이 감소된 것으로 설명된다.

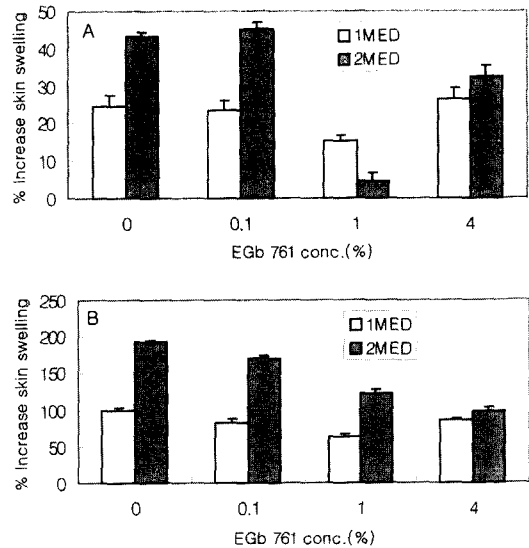
Katiyar SK. 등<sup>12)</sup>의 연구결과에 의하면, 0.7, 1, 1.4, 2, 2.8 KJ/m<sup>2</sup>의 UVB를 1회 조사시킨 후, 24, 48, 72 시간 후의 피부 변화를 살펴보았을 때, 피부 두께가 조사 전에 비해 UVB 농도 의존적으로 증가하였으며, 조사 후 48시간에 염증 반응이 최대치를 나타냈으며, 이후 점차적인 감소를 보였다. UVA과 UVB를 순서를 달리하여 조사한 보고<sup>9)</sup>에 따르면 홍반을 유발하는 UVB에 대해 UVA 조사가 아무런 영향을 미치지 않는다는 연구결과가 있는 반면, 최근 연구 결과에 의하면 UVA가 UVB로 인한 erythema, melanogenesis, photocarcinogenesis를 억제하는 효과가 있음을 증명하기도 하였다. 이러한 자외선 종류별에 따른 지속적인 연구가 계속된다면 적절한 자외선 조사로 인한 치료 효과도 얻을 수 있으리라 사료된다.

## 2. EGb 761의 항염증 효과

본 실험은 EGb 761의 항염 효과를 알아보기 위해 0.1%, 1%, 4%의 EGb 761이 함유된 로션을 처치한 후, control과 자외선 조사 군의 skin thickness 변화를 측정하였다. 또한 EGb 761의 효과를 적절히 비교할 수 있는 1MED와 2MED의 UVB 농도를 선택하여 실험하였다.

UVB 조사 전 lotion treatment 전 처치 과정 동안의 EGb 761에 의한 skin thickness 변화를 알아보기 위해 5일간 lotion를 200  $\mu$ l씩 등 부위에 도포한 후, skin thickness를 측정하였다. 측정 결과, Normal군과 비교하여 보았을 때, 1%와 4% 처치군의 skin thickness 측정치는 유의성 있는 감소( $p < 0.01$ )를 보였으며, EGb 761의 농도가 높을수록 피부 두께의 감소 효과는 컸으나, 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. 이러한 결과는 EGb 761이 자연적인 피부 증가를 감소시키는 효과를 가지고 있음을 보여주는 것으로 이후 장기간의 피부 변화 측정을 통한 감소효과의 가능성도 생각할 수 있다(data not shown).

조사 전 EGb 761의 처치 효과를 보기 위하여 1MED, 2MED의 UVB를 조사하여 24시간 후 피부 두께의 변화를 살펴보았다(Fig. 2, Panel A). 저농도인 1MED에서는 1%, 0.1%, 4%의 처리순으로 피부 두께의 감소를 보여주었으며, 고농도인 2MED에서도 역시 같은 순으로 감소효과를 보여주었다. 두 조사군 모두



**Fig. 2. Panel A.** Protective effect EGb 761 on UVB-induced edema. ; Groups of mice were exposed 1MED UVB ( $=1.4$  KJ/m<sup>2</sup>), 2MED UVB ( $=2.8$  KJ/m<sup>2</sup>). Mice were treated topical application of EGb 761(0.1, 1, 4%) 5 days prior to UVB exposure. The average dorsal skin swelling was measured at 24 h after UVB irradiation. **Panel B.** The average dorsal skin swelling was measured after 5th UVB irradiation. After irradiation, each groups of the mice were treated with 200  $\mu$ l lotions on 5 consecutive days. The data was determined by the same methods described in Panel A.

1% 처치군에서 비처리군과 비교했을 때, 상당한 수준의 감소 효과가 나타났으며, 저농도인 1MED에서 보다 고농도인 2MED에서 더 높은 효과를 나타냈다. 이러한 결과의 정확한 기전은 설명할 수 없으나 자외선에 대한 항염 작용을 나타내는 EGb 761의 농도는 1%에서 가장 효과가 컸으며, 자외선 조사 전 처리가 효과를 나타낸 것으로 보아 예방차원의 자외선 차단 효과를 볼 수 있으리라 생각된다.

5일간의 자외선 조사 후 EGb 761의 효과를 알아보기 위해, 매일 같은 시간에 5일간 자외선을 조사시킨 후, 즉시 로션 처리를 하였다. 지속적인 자외선 조사와 EGb 761의 후처리에 따른 피부 변화는 저농도인 1MED에서는 1%, 0.1%, 4% 처리순으로 피부 두께의 감소를 보여주었으며, 고농도인 2MED에서는 처치농도가 높을수록 감소효과가 두드러졌다(Fig. 2, Panel B). 저농도에서는 전처치와 후처치에 상관없이 같은 경향을 보인 반면, 고농도의 지속적인 자외선 조사에서는 처치농도가 높을수록 효과가 높았다. 이러한 결과의 정확한 원인은 증명할 수 없으나 EGb 761의 지속적인

자외선 조사로 인한 피부 염증이 조사 후 처치에 의해서도 차단될 수 있음을 보여주는 것으로 적절한 처치 농도가 주어진다면 자외선 조사 후의 피부손상을 치료할 수 있을 것으로 보인다.

자외선으로 인한 피부 염증에 대해 항산화제 물질 효과를 알아보는 대부분의 연구는 그러한 물질을 동물에게 장기간 응용시키거나, 자외선 조사부위에 일정량을 도포하여 그 효과를 증명하는 방법으로 이루어지고 있다. Green tea에 함유되어 있는 폴리페놀은 조사 30분 전, 후의 도포로 1.4, 2.8 KJ/m<sup>2</sup>의 UVB로 인한 염증 반응을 감소시켰으며,<sup>12)</sup> 피부에 도포하면 태양 광선에 의해 유발되는 일광화상의 염증 반응이 스테로이드 연고보다 더 효과적으로 치유된다고 보고<sup>23)</sup>된 바 있는 Indomethacin은 응용했을 때 역시 SSUV(solar-simulated UV) 조사로 인한 erythema를 억제한다는 연구 결과가 나왔다.<sup>24)</sup>

이런 점들을 고려해 볼 때 EGb 761의 효과 역시 도포에서 뿐만 아니라 응용에서도 그 효과를 발휘할 수 있으리라 생각되어지며, 건강식품으로서의 안정성이 고려된다면 자외선 치료제로서의 의약품으로도 그 기대 효과가 클 것으로 사료된다.

**3. UVB에 의한 면역 억제 반응**

UVB 조사에 의한 면역 억제를 알아보고자 UVB를 농도별로 5일간 조사시켰으며, 접촉 항원물질로는 2% oxazolone 사용하여, contact hypersensitivity response를 측정하였다(Fig. 3).

1MED, 1.5MED, 2MED를 5일간 shaving 한 ICR mice에 조사하여 CHS response를 측정한 결과 자외선 비조사군에 비해 56.2%, 65.1%, 74.0% 면역 억제가 일어났으며 UVB 농도가 증가할수록 CHS response가 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(p<0.001).

결과에서와 같이 5일간의 반복적 UVB 조사가

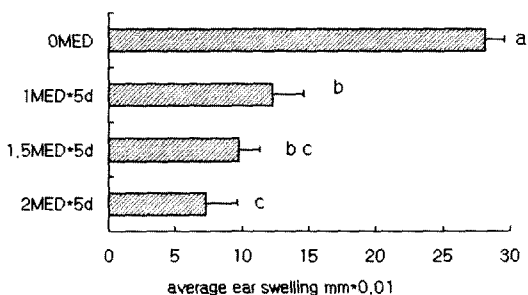


Fig. 3. Average ear thickness was measured pre-challenge(pre) and at 18h post-challenge(ch), p<0.0001 ; significantly different from 0MED.

mouse 피부의 면역 억제를 유도하는 것을 보여준다. 특히, 저농도의 조사군과 비교하였을 때, 고농도의 조사군에서는 높은 수준의 면역 억제가 나타났으며, 농도 의존적인 면역 억제를 보였다. 2.4 KJ/m<sup>2</sup>의 UVB를 3일간 조사시켜 자외선 조사부위에 항원을 접촉시킨 연구에서는 비조사군에 비해 41.4%의 면역 억제가 일어난 것으로 보고<sup>21)</sup>되었으며, 1MED의 SSUV(solar-simulated UV)를 3일간 조사시켜 자외선 비조사부위에 항원을 접촉시킨 연구에서는 54%의 면역 억제가 일어남이 보고된 바 있다.<sup>25)</sup>

접촉성 과민반응은 특정 항원에 대한 인체의 면역 반응으로 동일한 항원에 대해 지속적으로 자극을 받았을 때 피부염을 유발한다. 그러나 자외선에 대한 노출은 피부 내 면역 세포를 손상시켜 피부의 보호 작용으로 일어나는 면역 반응을 억제한다.<sup>7)</sup>

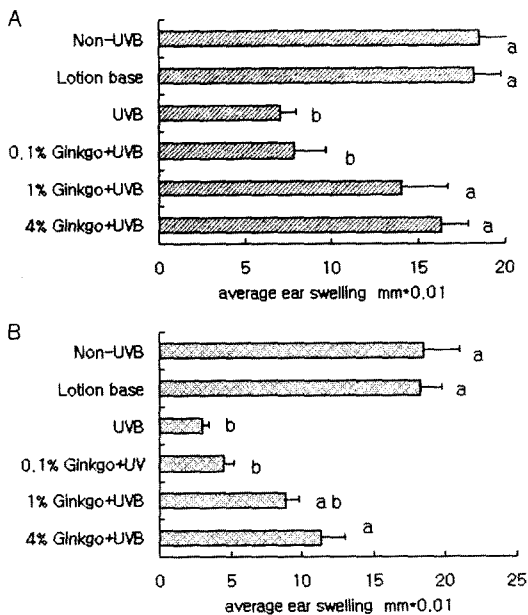
접촉성 과민반응은 자외선 노출 부분과 비노출 부분의 항원 접촉 여부에 따라 local과 systemic immunosuppression으로 나누어진다.<sup>12)</sup> Systemic immunosuppression은 자외선의 노출이 이루어진 부분과 떨어진 노출이 이루어지지 않은 부위에 항원을 접촉시켰을 때 반응하는 면역 감소를 측정하는 것을 의미한다. 이러한 Systemic immunosuppression은 TNF- $\alpha$ , interleukin(IL)-10, IL-1 등의 cytokine을 분비하는 것으로 알려져 있다.<sup>25)</sup>

본 실험은 자외선 비조사부위에 항원을 접촉시킨 Systemic immunosuppression의 방법으로 면역 억제 반응을 살펴본 연구로 5회의 지속적 UVB 조사가 ICR mouse에 면역 억제를 유발함을 알 수 있었으며, 추후 UVB 조사로 인한 keratinocyte의 손상과의 연관성을 살펴보는 연구가 필요하다고 생각되어진다.

**4. EGb 761의 면역 조절 효과**

EGb 761의 피부 도포가 UVB 조사로 유도된 면역 억제 반응에 미치는 영향을 알아보고자, EGb 761이 0.1%, 1%, 4% 함유된 로션을 자외선 조사 5일전 일정한 시간에 같은 양의 로션을 피부 도포하였으며, 같은 방법으로 자외선 조사 후에도 역시 EGb 761 로션을 피부 도포하였다. 또한 UVB 농도에 따른 CHS response를 비교하고자, 1MED와 2MED의 UVB 농도를 선택하여 실험하였다. CHS response를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

1MED 조사에서는 0.1%, 1%, 4% EGb 761 처치군이 control과 비교했을 때, 4.2%, 37.4%, 49.7%의 면역 억제(p<0.001)가 감소되었다(Fig. 4, Panel A). 또한 유의수준 1%에서의 Duncan 방법에 의한 다중비교 결



**Fig. 4. Panel A.** Prevention of 1MED UVB-induced suppression of CHS response by 0.1%, 1%, 4% EGb 761.  $p < 0.0001$ ; significantly different from non-UVB,  $p < 0.01$ ; significantly different from EGb 761 concentration. **Panel B.** Prevention of 2MED UVB-induced suppression of CHS response by 0.1%, 1%, 4% EGb 761.  $p < 0.0001$ ; significantly different from non-UVB,  $p < 0.05$ ; significantly different from EGb 761 concentration.

과, EGb 761의 농도가 높을수록 이러한 면역 억제 감소 정도는 컸으며, 4%, 1% 순이었다.

고농도인 2MED 조사에서는 control군에 비해 8.3%, 23.3%, 36.7%의 면역 억제( $p < 0.001$ )가 감소되었다(Fig. 4, Panel B) 또한 유의수준 5%에서의 Duncan 방법에 의한 다중비교 결과, EGb 761의 농도가 높을수록 면역 억제 감소 정도가 컸으며, 4%, 1% 순이었다.

이러한 결과는 EGb 761이 UVB에 의한 면역 억제를 저해시키는 효과를 가지고 있으며, 고농도인 2MED 보다는 저농도인 1MED에서 높은 효과를 가져올 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다. 또한 1MED와 2MED UVB 농도에서는 1% 이상의 EGb 761이 효과가 있다고 할 수 있다.

Yuen KS. 등의 연구 결과에 의하며, SSUV(Solar simulated UV)를 4주간 3일씩 조사했을 때, 5 mg의 Vitamin E는 55%의 면역 억제를 감소시켰으며, 항산화제로 널리 알려진 green tea polyphenol은 2 KJ/m<sup>2</sup>의 UVB를 한번 조사하고, 조사 30분 전, 후에 1 mg을 처리하였더니 CHS의 억제를 25% 방어하였으며, 70%의

edema 감소 효과를 보였다.<sup>12)</sup> 조사방법과 조사 농도, 처치군의 농도에 따라 다를 수 있으나, EGb 761의 이러한 자외선으로 인한 면역 억제 방어 효과는 기존의 알 수 없었던 생체 내 면역기능 효과를 보여주었다는 점에서 EGb 761의 면역조절 효과를 암시하며, 결과에 따른 생체 내 기전을 보다 연구하면 은행잎 추출물에 대한 새로운 물질의 발견도 가능하리라 생각된다. 또한 요즘 주로 나타나는 자외선에 의한 광 알레르기성 접촉성 피부염에 의한 피부 손상 및 시계, 금속, 약제서리 등과 같은 물질에 대한 면역 조절제로서도 사용 가능하리라 사료된다.

#### IV. 결 론

피부의 자외선 노출은 염증을 유발하고, 면역 관련 세포를 손상시켜 면역 기능을 억제시키며 피부노화를 촉진시킨다.

따라서 본 연구에서는 항산화제로 알려져 있는 EGb 761의 항염증 기능과 자외선으로 인한 면역 억제 방어 효과를 측정하여 EGb 761이 자외선으로 인한 피부손상을 방어하는 물질로서의 역할을 가지고 있음을 증명하고자 한다. 이에 본 연구자는 ICR mouse를 model로 하여 UVB로 인한 염증 반응과 면역 억제를 유도하였으며, EGb 761을 처리하여 항염증 작용과 면역 억제 방어 효과를 측정하고자 하였다.

면역 억제는 자외선 비조사 부위에 2% oxazolone을 접촉시켜 측정하였으며, 자외선 조사부위의 double skin-fold swelling을 측정하여 염증 반응을 관찰하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. UVB를 1MED(1.4 KJ/m<sup>2</sup>), 1.5MED(2.1 KJ/m<sup>2</sup>), 2MED(2.8 KJ/m<sup>2</sup>)의 농도로 일정한 시간에 연속하여 5일간 조사시켰다. 매 자외선 조사 전에 skin thickness를 측정하였다. 실험 결과, 두 번의 자외선 조사가 이루어진 후, 조사 전과 비교하여 103.1%, 118.2%, 109.4%의 유의한증가를 보였다( $p < 0.001$ ).

2. EGb 761(0.1, 1, 4%)을 5일간 처리하여 skin thickness를 측정한 결과, 로션 비처리군과 비교했을 때, 1% 이상의 처리군에서 농도 의존적인 감소를 보였다( $p < 0.01$ ). 자외선을 조사하기 전 5일간 EGb 761을 처리하고 1MED와 2MED의 자외선을 조사한 군에서는 1% 처치군이 높은 항염증 효과를 보였으며, 지속적인 자외선 조사와 후처치에 있어서도 1MED에서는 1% 처치군이, 2MED에서는 처치 농도가 증가할수록 그 효과는 증가하였다.

3. UVB를 1MED(1.4 KJ/m<sup>2</sup>), 1.5MED(2.1 KJ/m<sup>2</sup>),

2MED(2.8 KJ/m<sup>2</sup>)의 농도로 일정한 시간에 연속하여 5일간 조사시킨 후 CHS response를 측정한 결과 자외선 비조사군에 비해 56.23%, 65.12%, 74.02%의 농도 의존적인 면역 억제가 일어났다(p<0.001).

4. EGb 761(0.1, 1, 4%)을 UVB 조사 전 5일간 처리하고, UVB를 조사한 후 즉시 EGb 761을 처리한 후, CHS response를 측정한 결과, 저농도인 1MED에서는 4.2%, 37.2%, 49.7%의 면역 억제가 감소하였으며(p<0.001), 고농도인 2MED에서는 8.3%, 23.3%, 36.7%의 면역 억제가 감소하였다. 이러한 감소 효과는 EGb 761 농도에 의존적으로 나타났다.

이상 실험결과를 종합해 볼 때 EGb 761은 항염증 작용 자외선으로 인한 면역 억제 방어 효과를 모두 가지고 있는 것으로 보여지며 앞으로 UVB로 인한 광면역억제를 방지하는 천연물로서 주도적인 역할을 할 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 여자대학교 연구기반 확충 사업의 연구비(R06-2002-005-01004-0) 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 윤재일 : Effect of ultraviolet radiation on the skin. *J. Korean Asso. Radiat. Prot.*, **20**(3), 181-186, 1995.
- 최상준, 백남원, 윤종식, 김정환, 채현병 : 아크용접 작업 중 발생하는 자외선 노출에 관한 연구. *한국환경보건학회*, **25**(4), 51-58, 1999.
- 박성규, 김신도, 이정주 : 실시간 교통량을 이용한 고속도로 요금소 대기오염도 예측. *한국환경보건학회*, **26**(4), 134-140, 2000.
- 최금찬, 유수영, 전보경 : 부산지역의 입자상 대기오염 물질의 농도특성에 관한 연구. *한국환경보건학회*, **26**(2), 41-48, 2000.
- Kripke, ML. : Photoimmunology. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 919-924, 1990.
- Reeve, VE, Bosnic, M, Boehm-Wilcox, C, Nishimura, N and Ley, RD. : Ultraviolet A radiation (320-400 nm) protects hairless mice from immunosuppression induced by ultraviolet B radiation (280-320 nm) or cis-urocanic acid. *Int. Arch Allergy Immunol.*, **115**, 316-322, 1998.
- Watanabe, H, Unger, M, Tuvel, B, Wang, B and Sauder, DN. : Contact hypersensitivity : The mechanism of immune responses and T cell balance. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **22**, 407-412, 2002.
- Yuen, KS and Halliday, GM. :  $\alpha$ -tocopherol an inhibitor of epidermal lipid peroxidation, protects ultraviolet radiation from suppressing the skin immune system. *Photochem Photobiol*, Mar, **65**(3), 587-92, 1997.
- Nakamura, T, Pinnell, SR, Darr, D, Kurimoto, I, Itami, S, Yoshikawa, K and Streilein, JW. : Vitamin C abrogates the deleterious effects of UVB radiation on cutaneous immunity by a mechanism that does not depend on TNF-alpha. *J. Invest Dermatol*. Jul, **109**(1), 20-4, 1997.
- Reeve, VE, Bosnic, M and Rozinova, E. : Carnosine (beta-alanylhistidine) protects from the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet B (280-320 nm) radiation or by cis urocanic acid. *Immunology*. Jan, **78**(1), 99-104, 1993.
- Steenberg, PA, Garssen, J, Dortant, P, Hollman, PC, Alink, GM, Dekker, M, Bueno-de-Mesquita, HB and Van Loveren, H. : Protection of UV-induced suppression of skin contact hypersensitivity: a common feature of flavonoids after oral administration? *Photochem Photobiol*. Apr, **67**(4), 456-61, 1998.
- Katiyar, SK, Elmets, CA, Agarwal, R and Mukhtar, H. : Protection against ultraviolet-B radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema response in C3H/HeN mice by green tea polyphenols. *Photochem Photobiol*. Nov, **62**(5), 855-61, 1995.
- 이민경, 이세윤, 안형수, 안령미 : 자외선 B파로 유도된 Hairless mouse의 과산화지질 및 항산화 효소활성도와 탄닌의 효과. *한국환경보건학회*, **22**(4), 102-118, 1996.
- Reeve, VE. : Ultraviolet radiation and the contact hypersensitivity reaction in mice. *Methods*, **28**, 20-24, 2002.
- Gaudineau, C, Beckerman, R, Welbourn, S and Auclair, K. : Inhibition of human p450 enzymes by multiple constituents of the Ginkgo biloba extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **318**, 1072-1078, 2004.
- Shen, JG and Zhou, DY. : Efficiency of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in antioxidant protection against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Biochem Mol Biol Int.*, Jan, **35**(1), 125-34, 1995.
- Puebla-Perez, AM, Lozoya, X and Villasenor-Garcia, MM. : Effects of Ginkgo biloba extract, EGb 761, on the cellular immune response in a hypothalamic-pituitary- adrenal axis activation model in the rat. *International Immuno Pharmacology*, **3**, 75-80, 2003.
- Peng, ZF, Strack, D, Baumert, A, Subramaniam, R, Goh, NK, Chia, TF, Tan, SN and Chia, LS. : Antioxidant flavonoids from leaves of Polygonum hydro-piper L. *Phytochemistry*, **62**, 219-228, 2003
- No authors listed ; EGb 761 : ginkgo biloba extract, *Ginkgo Drugs R D*, **4**(3), 188-93, 2003.
- Tian, YM, Tian, HJ, Zhang, GY and Dai, YR. : Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on hydroxyl radical induced thymocyte apoptosis and on age-related thymic atrophy and peripheral immune dysfunctions in mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, **124**, 977-983, 2003.
- Lee, CK, Han, SS, Shin, YK, Chung, MH, Park, YI,

- Lee, SK and Kim, YS. : Prevention of ultraviolet radiation-induced suppression of contact hypersensitivity by Aloe vera gel components. *International Journal of Immunopharmacology*, **21**, 303-310, 1999.
22. Reeve, VE, Bosnic, M, Rozinova, E and Boehm-Wilcox, C. : A garlic extract protects from ultraviolet B (280-320nm) radiation-induced suppression of contact hypersensitivity. *Photochemistry and Photobiology*, **58**(6), 813-817, 1993.
23. 한승경, 박윤기 : Indomethacin 투여가 마우스의 접촉 과민 반응에 미치는 영향. *대한피부과학회지*, **28**(3), 278-282, 1990.
24. Reeve, VE, Matheson, MJ, Bosnic, M and Boehm-Wilcox, C. : The protective effect of indomethacin on photocarcinogenesis in hairless mice. *Cancer Letters*, **95**, 213-219, 1995.
25. Sime, S and Reeve, VE : Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Photochem Photobiol.*, **79**(2), 193-8, 2004.
26. Ichihashi, M, Ueda, M, Budiyanto, A, Bito, T, Oka, M, Fukunaga, M, Tsuru, K and Horikawa, T. : UV-induced skin damage. *Toxicology*, **189**, 21-39, 2003.