

고욤(*Diospyros lotus* L.)잎 추출물의 항알레르기 및 항가려움 효과

김현수¹ · 전인화² · 목지예¹ · 강현주¹ · 신준호² · 박용균^{2,3} · 정승일⁴ · 장선일^{1,2*}

¹전주대학교 보건관리학과, ²(주)아토피엔에이, ³전주비전대학교, ⁴전주생물소재연구소

Anti-Allergy and Anti-Pruritic Effects of *Diospyros lotus* L. Leaf Extract

Hyeon Soo Kim¹, In Hwa Jeon², Ji Ye Mok¹, Hyun Ju Kang¹, Jun Ho Shin²,
Young Kyun Park^{2,3}, Seung Il Jeong⁴ and Seon Il Jang^{1,2*}

¹Department of Health & Science, Jeonju University, Jeonbuk 560-759, Korea

²Ato Q&A Incoperation, Jeonbuk 560-759, Korea

³Jeonju Vision University, Jeonbuk 560-760, Korea

⁴Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju 561-360, Korea

Abstract – The worldwide prevalence and severity of allergic diseases including atopic and contact dermatitis has increased dramatically over the past decade, especially in developed countries. Mast cells are important effector cells in allergic reactions. The purpose of this study was undertaken to investigate the anti-allergic and anti-pruritic effects of *Diospyros lotus* leaf extract (DLE). DLE was prepared by extracting with distilled water. In the present study, we investigated the effect of DLE on the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 α) and histamine in rat peritoneal mast cells (RPMCs), and on the skin lesion, leukocyte infiltration and scratching behavior in mice. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus calcium ionophore A23187 significantly increased TNF- α and IL-1 β production compared with media control. However, TNF- α and IL-6 production increased by PMA plus A23187 treatment were significantly inhibited by DLE in a dose-dependent manner. DLE also inhibited the histamine release from RPMCs stimulated by compound 48/80, which promotes histamine release. Moreover, DLE administration had an inhibitory effects on the scratching behavior induced by pruritogen (compound 48/80, histamine) in ICR mice. Furthermore, DLE inhibited the skin lesions, inflammatory and mast cells in hairless mice sensitized by 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB). DLE administration reduced the IL-4 and IgE production induced by DNFB sensitization in hairless mice. These results suggest that DLE has a potential use as a herb medicine for treatment against allergy and pruritus-related disease.

Key words – Anti-allergy, Anti-pruritus, *Diospyros lotus* leaves, Rat mast cells, Mice

알레르기성 질환(allergic disease)은 자가면역질환(auto-immune disease), 교원병(collagen disease) 등을 포함하여 아나필락시스쇼크, 천식, 알레르기성 비염 및 알레르기성 피부질환(allergic skin disease)등이 이에 해당 되는데, 전 세계적으로 22%가 알레르기성 질환에 노출되어있다.^{1,2)} 이와 같이 알레르기성 질환이 폭발적으로 증가하는 이유는 환경 오염, 식생활 및 생활환경의 변화로 인한 알레르겐(allergen)의 증가요인을 들 수 있는데,³ 알레르겐에 감작(sensitization)되어 일어날 수 있는 피부질환은 접촉피부염(contact dermatitis), 아토피피부염(atopic dermatitis), 지루성피부염

(seborrheic dermatitis) 및 건조피부염(xerotic dermatitis) 등 습진(eczema)을 비롯한 두드러기(urticaria)을 대표적으로 들 수 있다.⁴⁻⁷⁾ 특히 유아 및 어린이에 알레르겐이 피부에 감작되면, 가려움증과 염증을 동반할 수 있는데, 계속적으로 알레르겐에 감작되면, 그 증상이 악화화 완화가 반복적으로 일어나는 아토피 피부염으로 진행되어 신체 및 심리 발달 장애를 유발할 수 있다.³⁻⁵⁾

어린시기에 유발되는 아토피 피부염은 적절한 예방과 관리가 이루어지지 않으면, 아토피 또는 알레르기 행진(atopic or allergic march)이라 하여 알레르기성 비염, 천식 및 결막염 등 알레르기성 질환으로 이어질 수 있다.⁴⁾ 즉, 피부에 알레르겐이 감작되면, 피부발진과 가려움을 통해 염증반응이 가속되어 아토피 피부염이 유발될 수 있는데, 계속적으로

*교신저자(E-mail): sonjjang@jj.ac.kr
(Tel): +82-63-220-3124

피부와 호흡기에 알레르겐이 감작되면 천식을 비롯한 알레르기성 비염 등 호흡기 질환이 발생될 수 있으며, 안구주위에 전이되어 알레르기성 결막염을 야기할 수 있다.³⁻⁵⁾

이러한 알레르기성 피부염의 면역학적 특징은 type 2 helper T (Th2) 세포와 같은 협조유도 세포의 편향된 발달을 비롯한 비만세포(mast cells)의 과도한 활성화 등 면역불균형(immune disorder)에 의한 급성 및 만성 염증반응(acute/chronic inflammatory response)을 일으키는 것으로 알려져 있다.³⁻⁶⁾ 아토피 피부염은 염증유발과 동시에 심한 가려움증을 동반하면서 피부장벽을 붕괴하여 그 증상을 더욱 악화시키는데 문제가 있다.

알레르겐에 의해 활성화된 비만세포는 아토피 피부염을 비롯한 대부분의 알레르기성 질환에서 급성 및 만성 염증 질환을 일으키는데 있어 핵심적으로 참여한다.⁸⁾ 비만세포가 활성화되면, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1)과 IL-6 등 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)의 생성뿐만 아니라 histamine과 같은 가려움 유발물질(pruritogen)을 방출한다.⁹⁻¹¹⁾ 이와 같이 비만세포 유래 염증성 사이토카인은 염증반응을 더욱 촉진시키는 동시에 histamine과 같은 물질을 방출함으로써 가려움증을 더욱 촉진시켜 피부장벽을 붕괴시키는 원인이 된다.^{1,4,10)} 따라서 부작용 없이 염증성 사이토카인과 가려움 매개물질을 억제시킬 수 있는 물질을 발굴한다면, 아토피 피부염을 비롯한 각종 알레르기성 질환을 제어하는데 효과적일 것이다.

고욤나무(*Diospyros lotus* L.)은 우리나라와 중국을 비롯한 아시아에서 자연적으로 자생하는 낙엽성 식물로 직접 과일을 섭취하거나 잎을 차로 가공하여 먹을 수 있다는 점과 생육이 좋고 기후환경에 강하여 감점을 불쳐 감나무를 생산할 수 있기 때문에 많은 나라에서 재배하고 있다. 전통의 약분야에서는 성숙한 과일인 고욤은 진정, 진통, 수렴 및 변비치료에 사용되어 왔다. 고욤의 생화학적 성분은 지방산, 당, 플라보노이드 및 비휘발성 물질이 보고되었고, 최근에는 혈액의 항응고, 뇌세포 보호 작용, 항산화 및 항암효과에 대한 보고가 있다.¹⁴⁻¹⁸⁾ 그러나 고욤잎 추출물(*D. lotus* leaf extract, DLE)을 대상으로 항알레르기 및 항가려움증 등에 대한 보고는 없다.

그러므로 본 연구는 DLE를 대상으로 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 calcium ionophore A23187로 활성화된 랫트 복강 비만 세포(rat peritoneal mast cells, RPMCs)의 전염증성 사이토카인의 생성과 compound 48/80으로 활성화된 RPMCs에서 histamine의 방출에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 DLE가 compound 48/80 또는 histamine 유도 가려움증에 미치는 영향을 조사하였다. 더불어 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)로 유도된 피부병변, 염증세포와 비만세포 침윤 및 과민반응 매개물의 생성에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 - TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 histamine 등 ELISA kit은 R&D Systems사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였으며, compound 48/80, histamine, percoll, compound 48/80, PMA, calcium ionophore A23187, DNFB, dimethyl sulfoxide (DMSO), penicillin/streptomycin, hematoxylin & eosin (H&E), toluidine blue, methysergide maleate (MM)와 기타 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

실험재료 - 실험에 사용한 고욤(*D. lotus* L.)은 전라북도 진안군 부귀면 수향리 신기마을에서 2012년 6월 30일에 채취하였다. 고욤잎의 동정은 마을 주민으로부터 고욤나무를 확인한 후 최종적으로 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수님으로부터 동정을 받았다. 고욤잎 표본(#2012-0630)은 전주대학교 대체의학대학 보건관리 연구실에 보관하고 있다. 채취된 고욤잎은 즉시 증류수로 세척한 후 5분간 증기찜을 한 후 실온에서 선풍기를 활용하여 건조하였으며, 최종적으로 건조기에서 40°C로 12시간 동안 건조하였다. 건조된 고욤잎은 200 g으로 정량하여 증류수 2,000 mL를 주입하고 5분간 끓인 후 추출물은 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과하고 동결건조기(Model, EYELA FDU-2100, Japan)에서 건조하여 19.5 g의 DLE를 회수한 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험동물 - 무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 hairless와 ICR 마우스 그리고 10주령의 Sprague Dawley 랫트는 중앙 실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20-22°C)와 습도(50-60%)는 일정하게 유지하였으며, 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험하였다.

RPMCs 분리 및 약물처리 - 건강한 수컷 Sprague Dawley 랫트로부터 RPMCs의 분리는 Martynova 등¹⁹⁾의 방법에 따라 분리하였다. 요약하면, 에테르(ether)로 마취시킨 다음 calcium-free HEPES-Tyrode buffer (10 mM Hepes, 113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.13 mM MgCl₂, 0.6 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, pH 7.4)를 10 mL를 복강에 주입시켜 약 90 초간 복강을 부드럽게 마사지 한 후 복강을 주의 깊게 열어 Pasteur pipette을 사용하여 세포부유액을 얻어 percoll density gradient법으로 RPMCs를 얻었다. 특별히 본 실험 목적에 따라 충분한 세포를 확보하기 위해서 5-10마리 랫트에서 얻은 RPMCs를 혼합하여 사용하였다. 여러 가지 농도의 DLE는 RPMCs (5 \times 10⁵)에 10분 또는 2시간 동안 전처리한 후 compound 48/80이나 PMA와 A23187로 자극하여 histamine과 전염증성 사이토카인 측정에 사용하였다.

MTT Assay - RPMCs 세포 생존율은 MTT assay 방법에

의해 측정하였다. 요약하면, RPMCs (5×10^5 /mL) 세포를 24 well 배양용기에 접종하고 상기와 같이 여러 가지 농도로 DLE를 처리한 후에 PMA 및 A23187를 자극한 후 12시간 후에 MTT 용액(5 mg/mL)을 주입하고 4시간동안 37°C에서 방치한 후 상층액을 제거하고 formazan 산물을 DMSO로 용해하여 96 well plate로 옮겨 540 nm ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하였다.

RPMCs에서 Histamine 방출량의 측정 - RPMCs (5×10^5 cells/mL)는 여러 가지 농도(50-200 μ g/mL)의 DLE를 37°C에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80 (0.5 μ g/mL)으로 자극하여 30분간 방치 반응을 중지시키기 위하여 배양튜브를 빙수에 넣어 충분히 냉각시킨 후 1,200 rpm으로 15분간 원심침전시키고 상층액을 얻고 histamine을 측정하였다. 요약하면, anti-histamine antibody (ab)를 활용하여 상기와 같이 얻은 상층액 시료에 반응시키고, anti-histamine ab에 특이적으로 작용하는 기질효소가 부착된 2차 항체를 주입한 후 발색시켜 R&D Systems사가 제공하는 방법에 따라 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 측정하였으며, histamine의 정량은 농도별로 histamine을 처리하여 반응시킨 후 표준곡선을 정하여 계산하였다.

사이토카인 및 IgE의 측정 - RPMCs로부터 사이토카인의 측정은 DLE (50-200 μ g/mL)를 2시간동안 전 처리한 후 PMA (30 ng/mL)와 A23187 (10 μ M)로 동시에 자극한 다음 12시간 후에 세포 상층액으로부터 TNF- α 와 IL-1 β 측정하였다. 한편 DNFB로 감작한 마우스의 IL-4와 IgE 측정은 추출물 투여 종료 후 5시간에 혈청을 취하고 혈청으로부터 측정하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-4와 IgE 등은 anti-mouse TNF- α , anti-mouse IL-1 β , anti-mouse IL-4와 anti-mouse IgE 등 항체를 사용하여 각각에 특이적으로 작용하는 ELISA kit을 사용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에 준하여 측정하고 정량하였다. 요약하면, 세포상층액 또는 5배 희석 혈청 100 μ L을 각각의 항체가 코팅된 plate에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA reader로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 양을 계산하였다.

추출물 처리 및 가려움증 유발 시험 - 스트레스가 해소된 ICR 마우스는 실험군당 5마리의 마우스를 각각 투명 아크릴 케이지(20 \times 26 \times 13 cm)에 한 마리씩 넣고, 안정을 위해 30분 동안 동일한 실험환경에 방치하였다. 그 후 대조군은 생리식염수를 경구투여 하였고, 실험군은 DLE (50-200 mg/kg)과 양성대조군인 MM (10 mg/kg)을 경구투여하고 60분 후에 compound 48/80 (50 μ g/site) 또는 histamine (100 μ g/site)의 농도로 100 μ L씩 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에

에 피하주사 하였다.

가려움증 판정 시험 - 가려움증 유발물질을 주사한 마우스는 곧바로 Mihara²⁰⁾의 방법을 따라 micro-camera (ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발물질이 주입된 부위를 굽는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다. 각 유발물질에 따른 실험은 각각 다른 날에 진행되었으며 매 실험에 사용된 마우스는 1회 사용되었다.

DNFB 유도 피부염 모델 - 화학항원 유도 아토피 피부염 모델 동물을 유도하기 위해서 acetone과 olive 오일을 3:1로 제조된 용매에 0.15% DNFB를 제조하여 1일과 4일에 각각 등 쪽 피부(100 μ L)에 감작하였다. 두 번째 감작일인 4일부터 대조군은 생리식염수 만 복강에 하루에 한번 실험 종료일까지 주사하였고, 실험군은 추출물을 복강에 하루에 한번 실험 종료일인 13일까지 주사하였다. 첫 번째 감작일로부터 7일, 10일과 13일에 3일 간격으로 0.2% DNFB를 감작시킨 부위에 같은 용량으로 공격(challenge)을 하였다.

혈청 채취와 피부조직 두께 측정 - 마지막 공격 후 5시간 후에 마우스의 간 문맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 얻고, 등 피부조직의 두께는 digital caliper (Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

피부병변의 평가 - 피부상태는 시작일로부터 1주 간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스킨링(scaling) 그리고 미란(erosion), 찰과상(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한상태를 3점(severe)을 주었고 각 단계별로 총점수부여하여 평가하였다.

피부조직 - 실험 과정에 따라 대조군과 실험군을 대상으로 희생시키고, 피부조직 약 5 \times 5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde (pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5 μ m 간격으로 피부조직을 종단면으로 절편 하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해 H&E 또는 toluidine blue로 염색하고 저배율(\times 40)에서 관찰하고, 40 또는 400배 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해 400배 현미경 시야에서 검경하였다(Olympus, Japan).

통계처리 - 모든 실험값은 평균 \pm 표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 $p < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

비만세포 생존율에 미치는 DLE의 효과 - 본 연구는 DLE가 RPMCs의 생존율에 미치는 영향과 PMA와 A23187로 자극한 RPMCs의 영향을 알아보았다. 그 결과 Fig. 1A와

같이 본 연구에서 사용한 DLE는 세포독성이 없었다. RPMCs 활성물질로 알려진 PMA와 A23187로 처리할 경우 약 83%로 정상대조군에 비해서 세포 생존율이 저하 되었으나 ($p < 0.01$), DLE를 처리할 경우 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가 되었다(Fig. 1B). 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 DLE 농도에서는 94% 이상으로 세포 생존율이 증가 되었다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

DLE의 전염증성 사이토카인 생성 억제 효과 - 본 연구는 DLE가 활성화된 RPMCs의 전염증성 사이토카인의 생성 억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 RPMCs를 접종하고 DLE (50-200 $\mu\text{g/mL}$)를 2시간 전 처리한 다음 PMA (30 ng/mL)와 A23187 (10 μM)을 동시에 처리하고 12시간 후

배양액에 측정된 TNF- α 와 IL-1 β 양을 측정하였다. 그 결과 PMA와 A23187를 처리한 대조군은 정상 대조군에 비해서 TNF- α (Fig. 2A)와 IL-1 β (Fig. 2B)의 생성이 각각 $1,420 \pm 95 \text{ pg/mL}$ 과 $480 \pm 34 \text{ pg/mL}$ 로 현저히 증가($p < 0.001$)한 반면, DLE를 처리한 실험군은 농도 의존적으로 TNF- α 와 IL-1 β 생성이 억제되었다. TNF- α 의 경우 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 억제 효과가 없었지만, 100 $\mu\text{g/mL}$ 과 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 각각 34%와 51%가 억제되는 유의한 효과가 있었다 ($p < 0.05$ 와 $p < 0.01$). IL-1 β 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 약 33% 억제되었고($p < 0.05$), 100 $\mu\text{g/mL}$ 과 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 각각 51%와 71%가 억제되는 유의한 효과가 있었다($p < 0.01$ 과 $p < 0.001$).

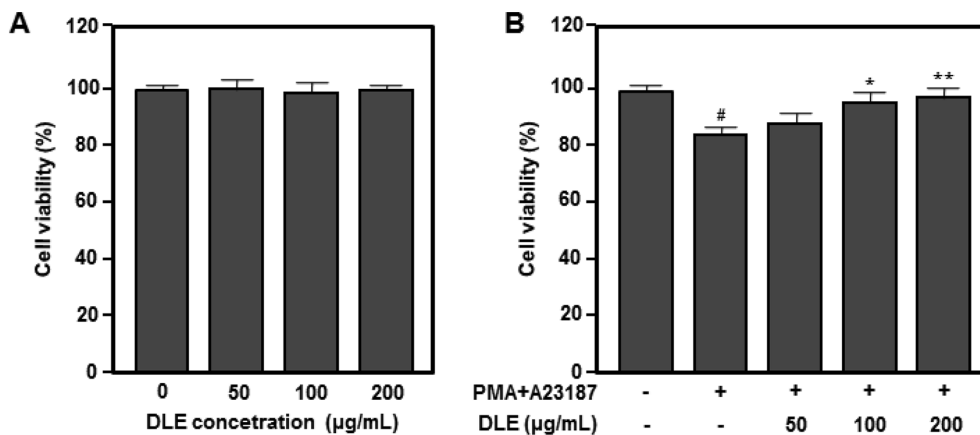


Fig. 1. Effect of *Diospyros lotus* extract (DLE) on cell viability. RPMCs ($5 \times 10^5/\text{mL}$) were pre-treated with or without DLE at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without PMA (20 nM) plus A23187 (1 μM) for 12 h. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. (A) Cells non-treated with PMA plus A23187. (B) Cells treated with PMA plus A23187. Values represent the means \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.01$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control group treated with PMA plus A23187 alone.

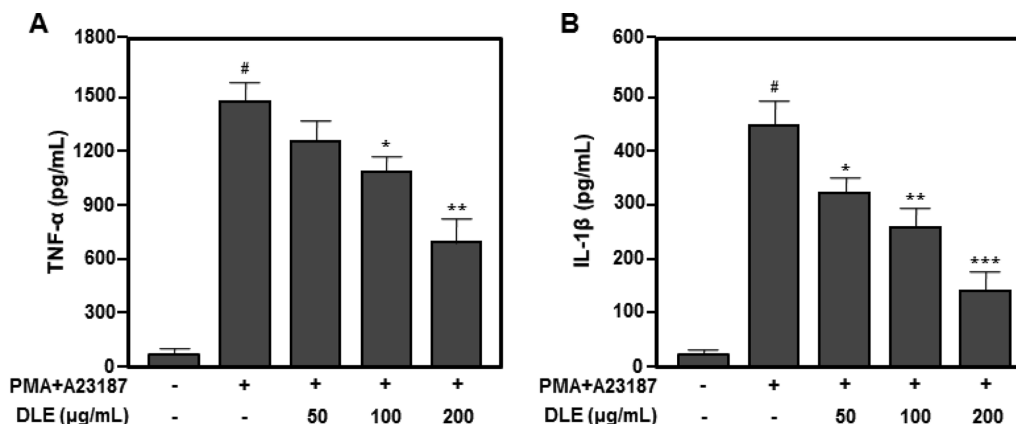


Fig. 2. Effect of DLE on PMA plus A23187-Induced TNF- α (A) and IL-1 β (B) production. RPMCs cells ($5 \times 10^5/\text{mL}$) were pre-treated with or without DLE at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without PMA (30 ng/mL) plus A23187 (10 μM) for 12 h. Cytokine concentrations were measured in cell supernatants using the ELISA method. Values represent the means \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus PMA plus A23187 alone group.

DLE의 Histamine 방출 억제 효과 - 한편 본 연구는 DLE가 가려움증 유발 핵심 물질인 histamine 방출에 대한 억제 영향을 알아보기 위하여 RPMCs를 접종하고 DLE (50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 주입하고 37°C에서 10분간 전 처리한 다음 compound 48/80 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 자극하여 histamine의 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 RPMCs를 compound 48/80로 자극할 경우 histamine 방출량은 $153.5 \pm 12.6 \text{ ng}/\text{mL}$ 으로 정상 대조군($8.5 \pm 1.9 \text{ ng}/\text{mL}$)에 비해서 현저히 증가하였다($p < 0.001$). 특히 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 histamine 방

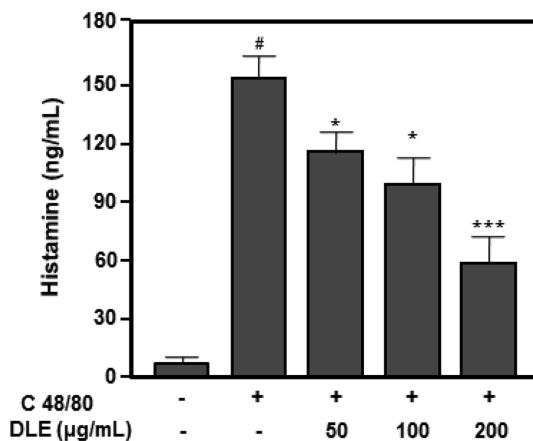


Fig. 3. Inhibitory effect of DLE on histamine release from RPMCs cells activated with compound 48/80 (C 48/80). RPMCs cells ($5 \times 10^5/\text{mL}$) were pre-treated with or without DLE at indicated concentrations for 2 h, and then stimulated with or without compound 48/80 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Histamine assay was performed by ELISA method on supernatant from RPMCs. Values represent the means \pm S.D. of three independent experiments. # $p < 0.001$ versus the non-treated control group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.01$ versus compound 48/80 alone group.

출이 62%로 억제되는 우수한 효과가 있었다($p < 0.001$).

DLE의 가려움증 억제효과 - 본 연구는 DLE가 가려움증 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLE (50-200 mg/kg)을 ICR 마우스에 경구투여하고 1시간 후에 가려움 유발 물질을 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사 하였다. 그 결과 compound 48/80 (Fig. 4A) 또는 histamine (Fig. 4B)을 피하에 주입한 결과 각각 238.5 ± 20.1 회와 93.2 ± 12.5 회로 정상 대조군(15.1 ± 3.2 회와 5.1 ± 1.7 회)에 비해서 급는 횟수가 현저히 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 DLE 처리 실험군은 농도에 의존적으로 compound 48/80 또는 histamine이 유도하는 가려움증을 농도에 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 특히 200 mg/kg 투여군에서는 compound 48/80 또는 histamine이 유도하는 가려움 횟수가 각각 61%와 72%로 MM 투여군(각각 48%와 44%) 보다 우수한 효과를 보였다($p < 0.01$ 과 $p < 0.001$).

DNFB 염증모델 마우스에서 DLE의 피부병변 개선 및 염증 억제 효과 - 본 연구는 DLE가 DNFB 유도 알레르기 모델 마우스에서 피부병변 억제 및 관련 매개물질의 생성 억제효과가 있는지 알아보았다. DNFB로 첫째 날과 4일에 감작한 후 DLE (50-200 mg/kg)을 하루에 1회씩 시험 종료 시까지 투여하였다. 그리고 첫 번째 감작한 후 7일부터 3일간격으로 DNFB로 공격하였다. 최종 약물과 공격 후 6시간 지난 후 마우스 피부병변의 조사와 함께 피부조직을 H&E 및 toluidine으로 조직을 염색하여 면역세포의 침윤상태를 조사하였으며, 혈청으로부터 IgE와 IL-4의 생성량을 조사하였다. 그 결과 정상대조군은 실험 종료 후 피부조직의 변화가 없었지만, DNFB로 감작과 공격한 대조군에서는 심각한 피부병변과 염증이 동반되어 있었고(Fig 5A와 Fig. 6A), 피부조직은 극세포증(acanthosis), 각질증식증(hyperkeratosis),

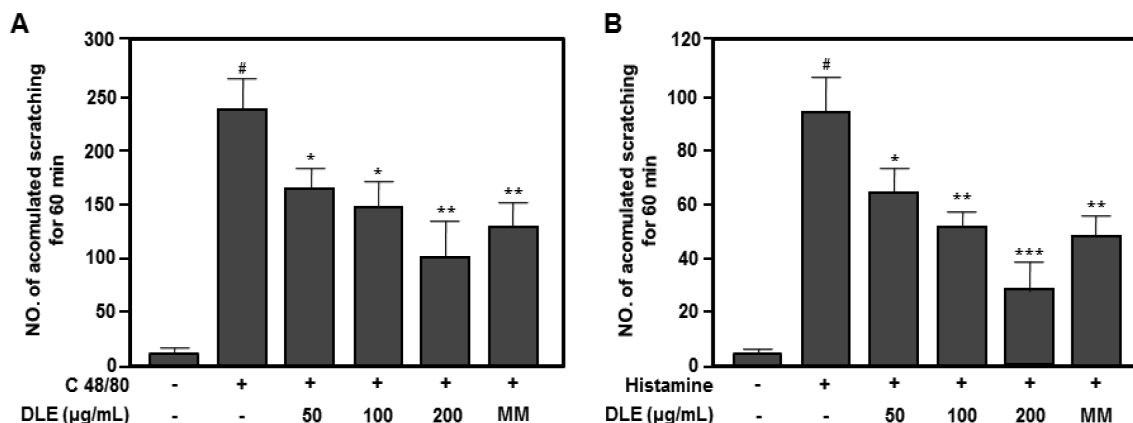


Fig. 4. Anti-pruritic effects of DLE extract on the scratching behavior induced by compound 48/80 (A) or histamine (B) in ICR mice. DLE (50-200 mg/kg) was administered orally 1 hour before the pruritogen injection and then 50 $\mu\text{g}/\text{site}$ compound 48/80 (C 48/80) or 100 $\mu\text{g}/\text{site}$ histamine was injected into rostral back. The scratching of the injected site by the hind paw was counted for 1 h. Values represent the means \pm S.E. of 5 individuals. # $p < 0.001$ versus normal control group. * $p < 0.01$, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ versus C 48/80 or histamine alone group.

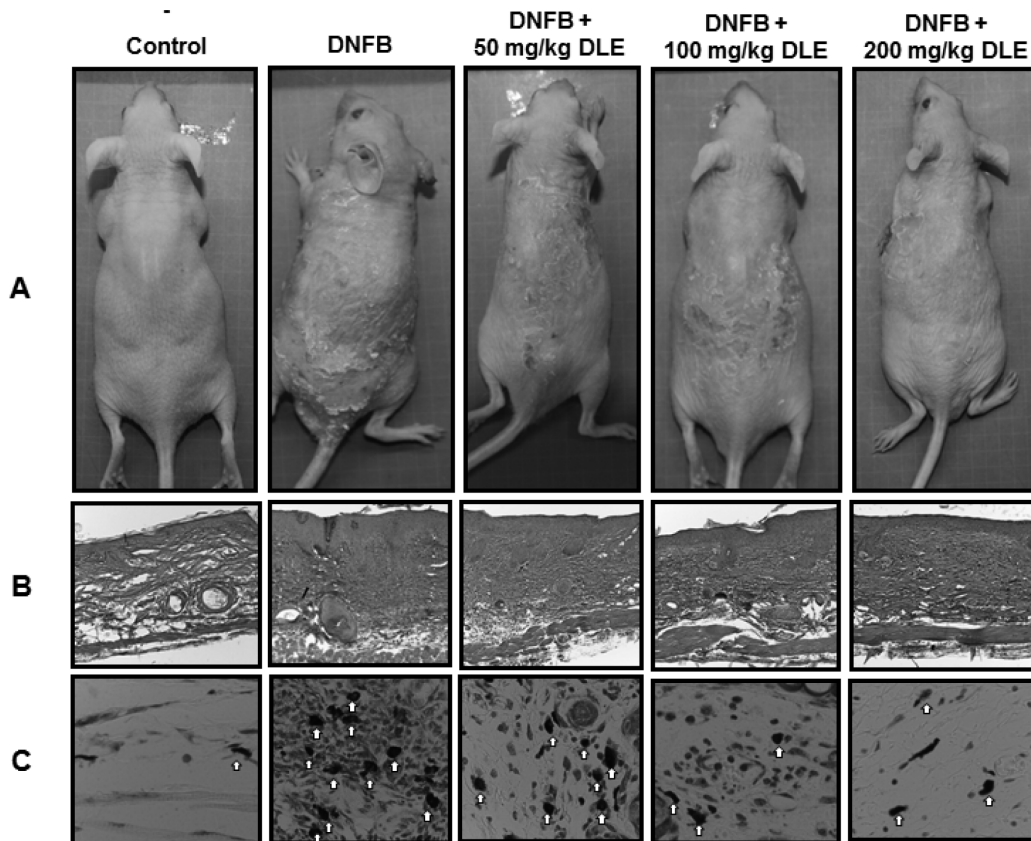


Fig. 5. Inhibitory effects of DLE on DNFB-induced skin damage and inflammation in hairless mice. Mice were sensitized on skin with and without 100 μ L (dorsal skin) of 0.15 % DNFB on day 1 and 4. On day 7, 10, and 13, mice were challenged with or without 100 μ L (dorsal skin) of 0.2 % DNFB on the dorsum of dorsal skin. Control group received only saline with intraperitoneal injection (ip) for 10 days from 4 to 13 days. Experimental groups received DLE (50-200 mg/kg) with ip for 10 days from 4 to 13 days. (A) Mouse morphology, (B) Skin tissues stained with H&E and (C) Mast cells (head arrow) stained with toluidine blue. Magnification: $\times 100$ (H&E), $\times 400$ (toluidine blue).

상처 및 출혈 수준이 매우 심각하였고(Fig. 5) 그 두께가 현저히 증가되었다(Fig. 6B). 그러나 DNFB로 유도되고 DLE가 투여된 실험군에서는 DNFB로만 감각한 대조군에 비해서 그 증상이 완화되었다. 특히 200 mg/kg DLE를 투여한 실험군은 그 증상이 60% 이상 현저히 개선되는 효과가 있었다($p < 0.001$). 또한 백혈구 및 비만세포 침윤에 미치는 DLE의 효과를 알아보기 위해 H&E와 toluidine blue로 조직을 염색하여 400배 현미경 시야에서 검경한 결과 DNFB로만 감각한 대조군은 백혈구 침윤(Fig. 5B)과 비만세포의 활성화 및 탈과립(Fig. 5C)이 매우 높았으나, DLE를 처리한 실험군은 백혈구 침윤과 비만세포 활성화가 억제되었다. 특히 200 mg/kg DLE를 투여한 실험군은 백혈구 침윤과 비만세포 활성화 및 탈과립이 각각 51%와 62%로 현저히 억제되는 우수한 효과가 있었다($p < 0.001$).

마지막으로 DLE가 DNFB 유도 염증 모델 마우스에서 혈청으로부터 염증 및 과민반응 주요물질인 IL-4와 IgE 생성 억제에 대한 상승효과가 있는 지 알아보았다. 그 결과 Fig.

7A와 B와 같이 DNFB로만 감각과 공격한 대조군에서는 IL-4와 IgE의 생성이 각각 855.2 ± 80.5 pg/mL과 $2,485 \pm 225$ ng/mL로 매우 증가한 반면, DLE가 투여된 실험군에서는 대조군에 비해서 IL-4와 IgE의 생성이 현저히 억제되었다. 특히 200 mg/kg DLE를 투여한 실험군은 IL-4와 IgE의 생성이 61%와 63%로 각각 억제되는 우수한 효과가 있었다($p < 0.001$).

고 찰

알레르기반응은 즉시형 및 지연형 과민반응으로 구분되는데, 비만세포는 이들 반응에 참여되는 핵심 세포로 알려져 있다.^{8,9)} 비만세포는 A23187, PMA, histamine과 compound 48/80과 같은 자극원에 의해 활성화 되면, TNF- α , IL-1 β , IL-6과 IL-8 등 염증성 사이토카인의 생성뿐만 아니라 histamine과 같은 가려움 유발물질을 방출하여⁹⁻¹¹⁾ 가려움증이 촉진되어 피부장벽을 붕괴시켜 염증반응을 더욱 악화시

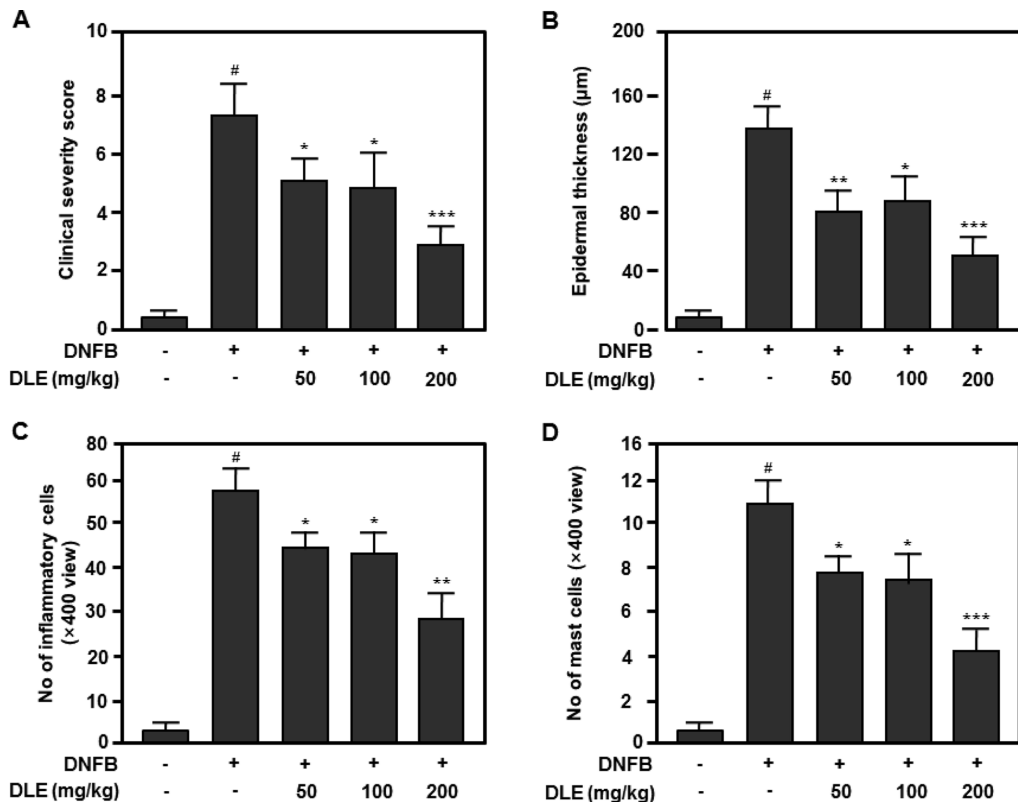


Fig. 6. Inhibitory effects of DLE on clinical severity, epidermal thickness, leukocyte infiltration induced by DNFB in hairless mice. Mice were sensitized on skin with and without 100 µL (dorsal skin) of 0.15 % DNFB on day 1 and 4. On day 7, 10, and 13, mice were challenged with or without 100 µL (dorsal skin) of 0.2 % DNFB on the dorsum of dorsal skin. Control group received only saline with intraperitoneal injection (ip) for 10 days from 4 to 13 days. Experimental groups received DLE (50-200 mg/kg) with ip for 10 days from 4 to 13 days. Clinical severity or epidermal thickness was measured by visual inspection or vernier calipers as described in the section of materials and methods. Epidermal skin tissue was stained by H&E or toluidine blue as described in the section of materials and methods. (A) Clinical severity, (B) Epidermal thickness, (C) Inflammatory cells, and (D) No. of mast cells. Values represent the means±S.E. of five individuals. [#] $p < 0.001$ versus the non-treated control group. ^{*} $p < 0.05$, ^{*} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ versus control group treated with DNFB alone group.

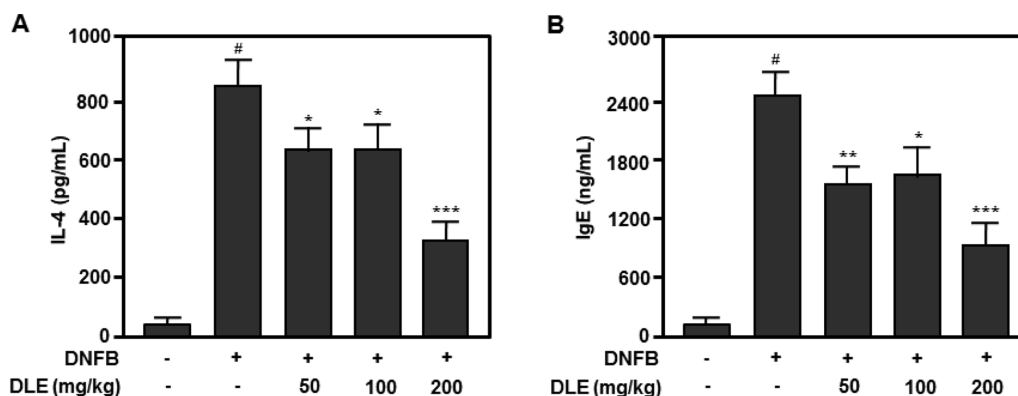


Fig. 7. Inhibitory effects of DLE on IL-4 and IgE production induced by DNFB in hairless mice. Mice were sensitized on skin with and without 100 µL (dorsal skin) of 0.15 % DNFB on day 1 and 4. On day 7, 10, and 13, mice were challenged with or without 100 µL (dorsal skin) of 0.2 % DNFB on the dorsum of dorsal skin. Control group received only saline with intraperitoneal injection (ip) for 10 days from 4 to 13 days. Experimental groups received DLE (50-200 mg/kg) with ip for 10 days from 4 to 13 days. IL-4 and IgE levels were measured in sera using the ELISA method. (A) IL-4 levels and (B) IgE levels. Values represent the means±S.E. of five individuals. [#] $p < 0.001$ versus the non-treated control group. ^{*} $p < 0.05$, ^{*} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ versus control group treated with DNFB alone group.

킨다.³⁾ 그러므로 알레르기반응을 억제하기 위해서는 비만세포의 활성을 차단하는 물질이 필요하다.

고요나무 유래물질에 대한 연구는 주로 고요씨를 대상으로 전자공여능 소거 활성, 지질과산화 개선, metal chelation 및 reducing power에 대한 효과^{15,18)}와 적혈구 항산화 효과,¹⁶⁾ 뇌세포 보호 작용 및 암세포주(cancer cell line)에서 항암효과¹⁷⁾에 대한 보고가 있어 관심의 대상이 되고 있으나, 이들에 대한 연구는 초기상태다. 고요씨는 고요에 비해 항산화기능을 할 수 있는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 높은 것으로 알려져 있으나, 항알레르기 및 항 가려움증 등에 대한 보고는 전혀 없다. 그러므로 본 연구는 DLE를 대상으로 항알레르기와 항 가려움 효과를 처음 조사하여 보고하는 바이다.

이와 같이 본 연구는 비만세포의 활성을 차단할 수 있는 생약을 발굴하기 위해서 먼저 DLE가 RPMCs의 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 본 연구에서 사용한 DLE의 농도에서 세포독성이 없었고, PMA와 A2317로 자극된 세포독성을 소거하는 효능이 있었다.

다음은 DLE를 RPMCs에 전 처리한 후 PMA와 A2317로 자극하고 TNF- α 와 IL-1 β 생성 억제에 미치는 영향과 compound 48/80으로 자극하여 histamine 생성 억제에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 DLE는 TNF- α 와 IL-1 β 생성 억제뿐만 아니라 histamine 방출 억제에 농도에 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 생체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 사이토카인은 TNF- α 와 IL-1 β . TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에서 대량 생산되지만, 림포이드계의 세포(lymphoid cells), 비만세포, 내피세포(endothelial cells)를 비롯하여 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다.²¹⁾ IL-1 β 생체에서 매우 낮은 농도로 작용하는데, 낮은 농도에서는 세포 성장이나 체내 항상성 유지에 필요하지만, 염증반응이나 상처 또는 면역학적 자극을 주었을 때는 대량으로 생산되어 생체질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다.²²⁾ 특히 비만세포는 PMA와 A2317로 동시에 자극할 경우 TNF- α 와 IL-1 β 대량 생산되는 것으로 잘 알려져 있다.^{3,23)} 또한 compound 48/80은 비만세포를 활성화시키는 물질로 알려져 있는데, 활성화된 비만세포는 histamine, serotonin 또는 substance P와 같은 가려움증 매개물질을 분비한다.²³⁾ 이러한 비만세포에서 분비되는 물질로 인해 유발되는 가려움증은 아토피 피부염 등 알레르기성 피부질환 환자에서 흔히 발견되는 가려움증과 유사한 증상을 유발한다. DLE를 전 처리할 경우 전염증성 사이토카인뿐만 아니라 가려움 매개물질인 histamine 방출을 효과적으로 차단하는 물질임을 본 연구를 통해 처음으로 확인할 수 있었다(Fig. 1과 2).

한편 compound 48/80과 histamine을 생체에 투여하면, 피부가려움증이 유발되는데, 그 증상은 아토피 피부염 등 알

레르기성 피부질환 환자에서 흔히 발견되는 가려움증과 유사하다. 이러한 물질에 대한 가려움 유발 모델동물은 주로 ICR, ddY, NC/Nga, hairless 등의 마우스가 사용되고 있는데,²⁴⁾ 본 연구는 ICR 마우스를 선택하여 고요잎 추출물을 1시간 전에 경구투여한 후 compound 48/80 또는 histamine을 등쪽 피하에 주사하여 1시간동안 누적 뒷발로 긁는 횟수를 조사하였다. 그 결과 DLE는 농도에 의존적으로 compound 48/80 또는 histamine이 유도하는 가려움증을 억제하는 효과가 있었다. 특히 200 mg/kg 농도에서는 그 효과가 매우 우수하였다. 이러한 결과는 Takubo 등²⁴⁾의 연구에서 compound 48/80에 의한 가려움증을 억제시켰던 약물인 MM를 표준대조약물로서 사용하여 DLE와 가려움증 억제 효과를 비교하였을 때, DLE에 의한 가려움증 억제효과가 MM 보다 뛰어난 것으로 확인되었다. 이와 같이 본 연구는 DLE가 가려움증을 효과적으로 차단시킬 수 있는 물질임을 처음으로 제공하였다.

DNFB는 산업화된 환경에 산재되어 인체에 쉽게 노출될 수 있다.²⁵⁾ 이러한 DNFB가 인체의 피부에 잠작되면, 협조 유도세포의 편향된 발달을 비롯한 비만세포의 과도한 활성화 등 면역불균형에 의한 급성 및 만성 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 그러므로 본 연구는 인간의 피부와 유사한 구조로 알려진 hairless 마우스에 DNFB를 사용하여 감각과 공격을 통해 피부병변 및 염증을 유발하여 고요잎 추출물의 피부병변 개선과 항염증 효과에 대해서 알아보았다. 그 결과 정상대조군에 비해서 DNFB로 감각과 공격한 대조군은 극세포증, 각질증식증, 상처 및 출혈 등 심각한 피부병변과 염증이 동반되었다. 그러나 고요잎 추출물을 투여한 실험군은 피부병변, 염증세포와 비만세포 침윤을 억제시키는 우수한 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5와 6).

마지막으로 본 연구는 DLE가 DNFB 유도 염증 모델 마우스에서 혈청으로부터 염증 및 과민반응 주요물질인 IL-4와 IgE 생성 억제에 대한 상승효과가 있는 지 알아본 결과 Fig. 7과 같이 DNFB로만 감각과 공격한 대조군에서는 IL-4와 IgE의 생성이 매우 증가한 반면, DLE를 투여한 실험군은 농도 의존적으로 IL-4와 IgE의 생성 억제에 대한 우수한 효과가 있음을 있었다. IL-4는 활성화된 Th2 세포에서 분비되어 B 세포를 자극하여 활성화 시키는 대표적인 사이토카인으로 알려졌으며, 활성화된 B 세포는 과민반응을 촉진하는 IgE를 생성하여 염증성 알레르기 반응을 야기하기 때문에 알레르기성 질환을 개선하기 위해서는 이들 매개물질을 효과적으로 억제하는 물질의 발굴이 필요하다. 이러한 측면에서 본 연구에서 처음 증명한 DLE의 항알레르기 및 항 가려움증에 대한 효과는 향후 분자기전 연구와 임상 연구가 이루어진다면, 알레르기와 가려움증 관련 피부질환을 개선 또는 치료하는데 유용한 물질로 사료될 수 있을 것이라 사

료된다.

이상의 결과를 종합해볼 때 DLE는 세포독성이 없을 뿐만 아니라 PMA와 A2317 처리에 의한 세포 손상을 보호하는 효과가 있었다. 또한 DLE는 PMA와 A2317 또는 compound 48/80으로 활성화된 RPMCs의 전염증성 사이토카인뿐만 아니라 가려움 유발 매개물질인 histamine 방출에 대한 억제 효과가 우수함을 확신할 수 있었다. 특히 compound 48/80 또는 histamine 등 가려움 유발 물질로 유도한 ICR 마우스에서 고요일 추출물은 가려움증을 효과적으로 차단할 수 있는 물질임을 확인할 수 있었다. 더욱이 고요일 추출물은 DNFB로 자극된 피부질환 모델 마우스에서도 염증 세포와 비만세포의 침윤을 억제함으로써 피부 병변과 염증 현저히 개선시키는 상승효과가 있을 뿐만 아니라 알레르기 반응을 악화시키는 IL-4와 IgE을 효과적으로 차단하는 효과가 있음을 본 연구는 처음으로 제시하였다.

사 사

이 논문은 2012년도 창업성장기술개발사업으로 중소기업청의 지원을 받아 연구되었다(S2004797).

인용논문

- Kay, A. B. (2009) Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future. *Br. Med. Bull.* **56**: 843-864.
- Warner, J. O., Kaliner, M. A., Crisci, C. D., Del, Giacco, S., Frew, A. J., Liu, G. H., Maspero, J., Moon, H. B., Nakagawa, T., Potter, P. C., Rosenwasser, L. J., Singh, A. B., Valovirta, E. and Van Cauwenberge, P. (2006) Allergy practice worldwide: a report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **139**: 166-174.
- Takai, T. and Ikeda, S. (2011) Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergol. Int.* **60**: 25-35.
- Spergel, J. M. (2010) Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **30**: 269-280.
- Hon, K. L., Yong, V. and Leung, T. F. (2012) Research statistics in atopic eczema: what disease is this? *Ital. J. Pediatr.* **38**: 26.
- Boguniewicz, M. and Leung, D. Y. (2010) Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: 4-13.
- Vitaliti, G., Morselli, I., Di Stefano, V., Lanzafame, A., La Rosa, M. and Leonardi, S. (2012) Urticaria and anaphylaxis in a child after inhalation of lentils vapours: a case report and literature review. *Ital. J. Pediatr.* **38**: 71.
- Nakae, S., Suto, H., Kakurai, M., Sedgwick, J. D., Tsai, M. and Galli, S. J. (2005) Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 6467-6472.
- Galli, S. J. (1993) New concepts about the mast cell. *N. Engl. J. Med.* **328**: 257-265.
- Mekori, Y.A. and Metcalfe, D.D. (2000) Mast cells in innate immunity. *Immunol. Rev.* **173**: 131-140.
- Hosoda, M., Yamaya, M., Suzuki, T., Yamada, N., Kamanakam, M., Sekizawa, K., Butterfield, J. H., Watanabe, T., Nishimura, H. and Sasaki, H. (2002) Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J. Immunol.* **169**: 1482-1491.
- Ahmet, F. A. and Kadioglu, A. (1998) Non volatile acid composition during fruit development of *Diospyros lotus* L. *Turk. J. Bot.* **22**: 69-72.
- Ayaz, F. A., Kadioglu, A. and Hayirlioglu, S. (1995) Determination of some mono- and disaccharides in the fruits of *Diospyros lotus* L. using gas chromatography. *Tr. J. Bot.* **19**: 493-495.
- Ayaz, F. A. and Kadioglu, A. (1999) Fatty acid compositional changes in developing Persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit. *New Zealand J. Crop. Hort. Sci.* **27**: 257-261.
- Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N.G. and Menichini, F. (2009) Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**: 264-270.
- Azadbakht, M., Hosseinimehr, S.J., Shokrzadeh, M., Habibi, E. and Ahmadi, A. (2011) *Diospyros lotus* L. fruit extract protects G6PD-deficient erythrocytes from hemolytic injury *in vitro* and *in vivo*: prevention of favism disorder. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**: 1270-1281.
- Moghaddam, A. H., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bigdellou, R., Mohammadzadeh, S. and Ebrahimzadeh, M. A. (2012) Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta. Pol. Pharm.* **69**: 687-692.
- Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Fazelian, M. and Eslami, B. (2009) In vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boissieriana* growing in Iran. *Pharmaco. Maga.* **5**: 122-126.
- Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Moiseeva, O. M., Evdoinin, A. L., Kondratov, K. A. and Medvedeva, N. D. (2005) The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. *Cell Res.* **15**: 811-816.
- Mihara, K., Kuratani, K., Matsui, T., Nakamura, M. and Yokota, K. (2004) Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br. J. Dermatol.* **151**: 335-345.
- Walsh, L. J., Trinchieri, G., Waldorf, H. A., Whitaker, D. and Murphy, G. F. (1991) Human dermal mast cells contain and

- release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 4220-4224.
22. Dinarello, C. A. (1994) The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 517-531.
23. Benyon, R. C., Robinson, C. and Church, M. K. (1989) Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Br. J. Pharmacol.* **97**: 898-904.
24. Takubo, M., Ueda, Y., Yatsuzuka, R., Jiang, S., Fujii, Y. and Kamei, C. (2006) Characteristics of scratching behavior induced by some chemical mediators in hairless mice. *J. Pharmacol. Sci.* **100**: 285-288.
25. Casset, A. and Braun, J. J. (2010) Relationships between indoor allergens, sensitization, and allergic asthma and rhinitis symptoms. *Rev. Mal. Respir.* **27**: 913-920.
- (2013. 2. 6 접수; 2013. 2. 26 심사; 2013. 3. 4 게재확정)