산·학·연 논단

미생물 발효차의 Theaflavin · Thearubigin에 의한 옻 알레르기성 접촉피부염에 미치는 영향

손미예[1,2] · 남상해[1,3] · 박석규[1,4†]

[1]한국전통발효식품연구소
[2]경상대학교 식품영양학과
[3]진주산업대학교 식품과학과
[4]순천대학교 식품영양학과

Effect of Theaflavin and Thearubigin from Microbial Fermented Teas on Urushiol Allergic Contact Dermatitis

Mi-Yae Shon[1,2], Sang-Hae Nam[1,3] and Seok-Kyu Park[1,4†]

[1]*Korea Fermented Food Research Institute, Jinju 660-840, Korea*
[2]*Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[3]*Dept. of Food Science, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea*
[4]*Dept. of Food and Nutrition, Sunchon National University, Suncheon 540-741, Korea*

서 론

알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 비염, 아토피성 피부염 및 알레르기성 결막염 등이 있는데, 산업발달로 인하여 인공화학 합성물질의 무분별한 사용과 환경오염이 가속화되면서 다양한 면역과민성 질환을 유발시키는 allergen이 급증하는 추세이다(1). 알레르기 유발 물질들은 주로 소화기, 눈, 피부 및 중추 신경계 등으로 나타나며, 특히 피부과 질환 중에서 가장 많이 볼 수 있는 것으로는 화학물질, 약물, 식물 및 기타 자극물에 의해 피부의 알레르기성 반응으로 유발되는 접촉성 피부염이다(2). 우리나라도 인구의 약 12~20% 정도가 알레르기성 질환에 반응을 보이고 있는 실정이다.

알레르기성 접촉피부염은 항원이 되는 물질이 피부를 통해 침투하여 운반 단백질과 결합한 후 Langerhans 세포와 접촉하면서 감작과정을 거치게 되고, 감작된 사람이 재차 allergen에 접촉하면서 피부에 염증을 일으키는 질환으로(3) 알레르기의 주된 증상이 기관지, 피부, 코 및 눈의 순이며 37.7%가 유발 원인이 밝혀지지 않았으나(4), 그 발병의 원인으로는 대기오염으로 인한 인체의 감염, 기후의 변화, 심인성 및 항원(꽃가루, 집 먼지, 유기화합물)과 영양의 불균형, 불량 가공식품 및 수입농산물의 증가 등을 들 수 있다고 보고하고 있다(5,6). 한편, 이러한 알레르기성 질환의 치료약으로 화학적 전달물질의 유리억제 및 길항작용이 있는 disodium cromoglycate(DSCG), tranilast, ketotifen 등이 사용되고 있으며(7-9), 다양한 새로운 약제의 개발이 시도되고 있다. 특히 식물 유래의 민간약 및 천연물을 이용한 항알레르기 물질의 탐색과 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

옻나무(*Rhus veniciflua*)는 생체에 다양한 기능성 효과를 지니고 있는 것으로 알려지고 있다. 사람의 위장에서 소화기능을 돕고 심장에서의 혈액순환을 용이하게 하는 것으로 알려져 있으나, 옻의 알레르기 유발 특성으로 인하여 사람들이 멀리하고 있다. 본 연구에서는 국산 미생물 발효차를 이용한 한국 원주산, 중국산 및 일본산 옻에 대한 항알레르기 활성, 옻의 알레르기 유발 특성과 피부염증 반응 특성을 실험하였다.

재료 및 방법

옻과 DNCB 조제

1차 감작과 2차 감작반응 실험에 사용할 옻 추출물 농축액 및 DNCB(2,4-dinitro-chlorobenzene)를 아세톤과 올리브 오일 혼합 용액으로 용해하여 각각 5%(1차, 25 μL), 2.5%(2차, 4 μL)농도로 제조하여 사용하였다.

†Corresponding author. E-mail: bestmeju@sunchon.ac.kr
Phone: 061-750-3652, Fax: 061-750-3650

실험동물

실험동물은 4주령 된 BALB/c mice를 효창 science에서 분양 받아 사육실에서 2주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도(22±2℃) 및 명암은 12시간 주기로 조절하면서, 7마리를 한 군으로 구분하여 실험하였다. 대조군, DNCB 처리군 및 옻 처리군으로 나눈 후 시간의 경과에 따라서 24, 48 및 72시간으로 세분시켰으며, 각 시간별로 귀의 두께와 무게를 측정하였다.

DNCB에 의한 ear swelling 반응

지연형 과민반응의 항원으로는 DNCB를 아세톤과 올리브 오일에 혼합된 용액으로 5%가 되게 용해한 후, 오른쪽 살 바위 쪽 복부 2 cm^2에 25 μL를 도포하여 1차 감작시켰다. 1차 감작 후 7일이 경과하였을 때, 오른쪽 귀에 2.5% DNCB 4 μL를 도포하여 2차 감작을 행하였으며, 2차 항원 투여 후 24, 48 및 72시간이 경과했을 때 오른쪽 귀의 두께를 vernical calipers(Mitutoyo, Japan)로 측정한 후 ear swelling 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였으며, 또한 오른쪽 귀의 무게를 측정하여 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였다(10).

옻에 의한 ear swelling 반응

지연형 과민반응의 항원으로는 옻을 아세톤과 올리브 오일에 혼합된 용액으로 5%가 되게 용해한 후, 오른쪽 살 바위 쪽 복부 2 cm^2에 25 μL를 도포하여 1차 감작시켰다. 1차 감작 후 7일이 경과하였을 때, 오른쪽 귀에 2.5% 옻 4 μL를 도포하여 2차 감작을 행하였으며, 2차 감작시 TF와 TR도 동시에 복강에 투여하였다. 2차 항원 투여 후 24, 48 및 72시간이 경과했을 때 오른쪽 귀의 두께를 vernical calipers(Mitutoyo, Japan)로 측정한 후 ear swelling 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였으며, 또한 오른쪽 귀의 무게를 측정하여 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였다.

Theaflavin와 thearubigin의 분리

Theaflavin과 thearubigin은 국산 미생물 발효차를 이용하여 Xie 등(11)의 방법에 따라서 분리하였다. 즉 발효차 10 g에 끓는 물 250 mL을 첨가하여 열수 추출한 후 chloroform으로 caffeine을 제거하였으며, ethyl acetate 층과 n-butanol 층에서 HPLC, column chromatography 및 TLC를 이용하여 theaflavin와 thearubigin을 분리하였다.

Urushiol congeners의 HPLC 분석

옻칠의 생산지별(한국 원주산, 중국산, 일본산)로 allergy 유발 주성분인 urushiol의 함량과 그 동족체의 성분 함량을 비교하기 위하여 HPLC로 분석하였다. 이때의 HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for urushiol congeners

Analytical parameters	Instrumental conditions
Instrument	Shimadzu LC-10A
Analytical column	C_{18} ODS (3.9×300 mm)
Mobile phase	Acetonitrile:0.002% acetic acid=80:20
Detector	UV 254 nm
Flow rate	1 mL/min
Sample injection	10 μL

결과 및 고찰

지연형 과민 반응에 관한 항원으로서 DNCB와 옻을 아세톤과 올리브 오일 혼합액으로 용해시켜 마우스의 오른쪽 살 바위 복부에 도포하여 인위적인 접촉성 과민 반응을 유발시킨 후, 마우스의 오른쪽 귀 피부의 swelling과 weight를 측정하여 접촉성 과민 반응과 억제반응을 측정한 결과는 Table 2~5와 같다.

Acetone과 olive 용액을 도포한 대조군에서는 실험기간 동안 오른쪽 귀두께 변화가 나타나지 않았지만, DNCB 처리군과 생 옻 처리군에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다. DNCB 처리군에서 일어난 ear swelling의 변화를 살펴보면, 알레르기성 접촉피부염 유발 후 24시간이 경과 했을 때 오른쪽 귀의 두께는 0.4±0.05 mm로 대조군의 0.19±0.02 mm에 비해 증가된 양상으로 관찰되었고, 48시간이 되었을 때 가장 큰 증가인 0.45±0.10 mm로 측정되었다. 이런 증가는 72시간이 되었을 때는 오히려 0.25±0.02 mm로 감소되는 경향을 보였으나, 여전히 대조군에 비해서는 증가된 값으로 측정되었다. 또한 생 옻 처리군에서 일어난 ear swelling의 변화를 살펴보면, 알레르기성 접촉피부염 유발 후 24시간이 경과 했을 때 RC, RK 및 RJ에서 측정된 값은 오른쪽 귀의 두께는 0.14±0.01 mm, 0.15±0.01 mm 및 0.14±0.02 mm로 대조군의 0.19±0.02에 비해 증가된 양상으로 관찰되었고, 48시간이 경과하였을 때의 측정값은 0.41±0.01 mm, 0.39±0.01 mm 및 0.32±0.06 mm로 측정되었다. 이런 변화는 72시간 후의 측정값보다 증가된 값으로 나타났다. 그리하여 DNCB와 옻의 처리군에서 귀의 부종 두께는 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이로 측정되었다(Table 2).

DNCB와 옻을 처리한 후 복강 주사로 theaflavin과 thearubigin을 처리한 후의 귀의 부종 두께는 대조군과 비교하여 현저한 두께 감소 효과를 보였다. thearubigin을 복강투여한 경우에 48시간이 경과하였을 때의 측정값은

Table 2. The ear swelling effect of RC, RK and RJ in allergic contact dermatitis elicited mice

Groups	Ear swelling (mm)		
	24 hr	48 hr	72 hr
NOR[1)]	0.19±0.02	0.20±0.01	0.18±0.03
DNCB[2)]	0.40±0.05	0.45±0.10	0.25±0.02
RC[3)]	0.14±0.01	0.41±0.01	0.26±0.01
RK[4)]	0.15±0.01	0.39±0.01	0.21±0.01
RJ[5)]	0.14±0.02	0.32±0.06	0.25±0.01

After allergic contact dermatitis, the mean of ear swelling began to increase at 24 hr and reach a peak at 48 hr.
[1)]NOR: Normal (Acetone and olive oil solution immunized group).
[2)]DNCB: Control (Only DNCB immunized group).
[3)]Raw Chinese lacquer. [4)]Raw Korean lacquer. [5)]Raw Japanese lacquer.

Table 3. The inhibition effect of ear swelling in mouse intraperitoneally injected with theaflavin and thearubigin from microbial fermented tea after secondary sensitization by 2.5% DNCB, RC, RK and RJ in allergic contact dermatitis elicited mice

Groups	Ear swelling (mm)		
	24 hr	48 hr	72 hr
DNCB+TF[1)]	0.15±0.02	0.15±0.01	0.18±0.03
DNCB+TR[2)]	0.14±0.01	0.14±0.01	0.17±0.03
RC[3)]+TF	0.14±0.01	0.27±0.03	0.27±0.01
RC+TR	0.14±0.01	0.22±0.03	0.25±0.01
RK[4)]+TF	0.14±0.01	0.24±0.01	0.19±0.01
RK+TR	0.15±0.01	0.19±0.01	0.25±0.01
RJ[5)]+TF	0.14±0.01	0.20±0.01	0.25±0.01
RJ+TR	0.14±0.01	0.20±0.01	0.26±0.01

After allergic contact dermatitis, the mean of ear swelling began to increase at 24 hr and reach a peak at 48 hr.
[1)]TF: theaflavin. [2)]TR: thearubigin.
[3)]Raw Chinese lacquer. [4)]Raw Korean lacquer. [5)]Raw Japanese lacquer.

Table 4. The ear weight increased effect of RC, RK and RJ in allergic contact dermatitis elicited mice

Groups	Ear weight (mg)
	72 hr
NOR[1)]	6.47±0.05
DNCB[2)]	8.60±0.02
RC[3)]	7.67±0.05
RK[4)]	7.37±0.03
RJ[5)]	7.43±0.05

After allergic contact dermatitis, the mean of ear weight determined at 72 hr.
[1)]NOR: Normal (Acetone and olive oil solution immunized group).
[2)]DNCB: Control (Only DNCB immunized group).
[3)]Raw Chinese lacquer. [4)]Raw Korean lacquer. [5)]Raw Japanese lacquer.

Table 5. The inhibition effect of ear weight increasing in mouse intraperitoneally injected with theaflavin and thearubigin from microbial fermented tea after secondary sensitization by 2.5% DNCB, RC, RK and RJ in allergic contact dermatitis elicited mice

Groups	Ear weight (mg)
	72 hr
DNCB+TF[1)]	7.67±0.05
DNCB+TR[2)]	7.03±0.04
RC[3)]+TF	7.63±0.05
RC+TR	7.60±0.01
RK[4)]+TF	7.27±0.05
RK+TR	6.90±0.14
RJ[5)]+TF	7.33±0.15
RJ+TR	7.17±0.01

After allergic contact dermatitis, the mean of ear weight determined at 72 hr.
[1)]TF: theaflavin. [2)]TR: thearubigin.
[3)]Raw Chinese lacquer. [4)]Raw Korean lacquer. [5)]Raw Japanese lacquer.

DNCB 처리군은 0.14±0.01 mm로 관찰되었고, RC, RK 및 RJ에서 측정된 값은 0.22±0.03 mm, 0.19±0.01 mm 및 0.2±0.01 mm로 측정되었다(Table 3).

피부의 외형적 형태 변화의 관찰에서 대조군에서는 정상적인 피부 상태가 실험기간 동안 유지되었다. 그러나 DNCB와 옻을 처리한 군에서는 다른 양상으로 관찰되었다. DNCB와 옻을 투여한 군에서는 알레르기성 접촉 피부염 유발 후 24시간이 경과되었을 때 피부 표면이 붉게 변하는 피부손상이 시작되었으며, 48시간이 경과 되었을 때는 그 생성 부위가 확산되고 안정된 모습으로 관찰되었다. 그러나 이러한 외형적 피부 손상은 72시간이 경과 되었을 때는 48시간 보다는 약화되는 것으로 나타났다. 그리하여 귀의 무게 변화를 측정한 값은 RC, RK 및 RJ에서 7.67±0.05 mm, 7.37±0.03 mm 및 7.43±0.05 mm로 측정되었고, DNCB 처리군과 대조군은 8.60±0.20 mm와 6.47±0.05 mm로 측정되었으며, 이러한 변화는 RC, RK 및 RJ가 DNCB와 유사한 피부 반응을 보이는 것으로 측정되었다(Table 4). 또한 복강 주사로 theaflavin과 thearubigin을 처리한 후, 귀의 무게 변화는 thearubigin을 복강 투여한 경우에 DNCB, RC, RK 및 RJ 처리군에서 각각 7.03±0.04 mm, 7.6±0.01 mm, 6.90±0.14 mm 및 7.17±0.01 mm를 나타내었으며, 대조군과 비교하여 차이가 있는 것으로 측정되었다. 그리고 귀의 무게 증가에 대한 억제 효과는 thearubigin이 theaflavin보다 약간 우수한 것으로 나타났다(Table 5).

DNCB처리로 유발된 알레르기성 접촉피부염은 비만세포에서 염증관여 물질이 분비되어, 림프구를 비롯한 염증관련 세포의 혈관 투과성을 증가시켜 발생되는 것으로 알

려지고 있으며, 알레르기성 접촉피부염은 항원이 되는 물질이 피부를 통해 침투하여 운반단백질과 결합한 후 Langerhans 세포와 접촉하면서 감작 과정을 거치게 되고, 감작된 사람이 재차 항원(allergen)에 접촉하면 피부에 염증을 일으키는 질환이다(12). 이러한 접촉성 과민 반응을 실험한 결과 DNCB와 옻을 도포한 군이 대조군보다 유의적으로 피부 염증반응이 나타났다.

알레르기성 접촉피부염은 생활양식의 변화와 산업의 급속한 발달로 생성되는 다양한 항원들이 신체에 노출됨으로써 면역계의 방어 기능이 인체에 유해하게 작용하여 야기되는 피부염으로, 그 발병이 점차 증가되는 추세를 보이고 있다(13). 이러한 알레르기성 접촉피부염의 발병은 먼저 특정 항원에 대한 노출, 즉 감작 과정을 거쳐야 한다. 피부내의 항원 제공 세포인 Langerhans에서 내재화 과정을 거친 특정 외부 항원-low molecular weight, high reaction, lipid-soluble hapten과 epidermal carrier protein의 conjugator는 항원 노출 주변의 림프절의 곁 피질에서 CD4+T lymphocytes의 T cell receptor(TCR)에 의해 인식된다고 보고되어 있다(14). 외부 항원을 인식 한 후 도움 T 림프구는 autocrine인 interleukin 2 분비에 의해 면역활성화된 CD8+세포독성 T림프구/억제 T 림프구, 항원 특이성 기억 T 림프구는 혈관계를 통해 항원 노출 지역으로 이동하여 세포성 면역 반응에 의해 haptenized epidermal cell을 파괴시킨다고 보고되어 있다(14). 이미 감작된 특정 외부 항원에 재 노출 되었을 때 알레르기성 접촉 피부염이 유발되는데, 피부에 산재해 있던 기억 T 림프구가 항원 제공을 받게 됨으로써 피부에서 접촉피부염이 일어난다(14).

본 실험에서는 한국 원주산, 일본산 및 중국산의 생 옻으로부터 urushiol 동족체의 함량을 분석한 결과는 Table 6에 나타내었다. 즉 옻 allergy를 유발시키는 대표적인 urushiol은 U1와 U3, U4인 것으로 추정되었으며, 이들 3종의 urushiol 동족체의 함량은 전체의 80% 이상을 차지하였다. 이 중에서 함량이 가장 많은 U3은 분자량이 314이며, 측쇄에 15개의 탄소와 3개의 이중결합을 가지는 구조로서 분자량이 가장 작으며(결과 미표시), 옻 allergy의 유발에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 생각되는 물질로서 그 함량은 중국산에서 70.07%로 가장 많았으며, 국내의 원주산에서 66.82%이었으며, 일본산에서는 62.38%로 가장 적게 함유되어 있었다.

이 물질은 hydrocarbon chain의 C_{15}번과 C_{17}에 catechol ring으로 치환되어 있으며, 3번 혹은 4번 위치에 포화결합 혹은 1개에서 3개의 불포화결합을 가지고 있다(결과 미표시). Urushiol의 catecholic ring과 aliphatic chain은 알레르기성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 것으로 입증되었으며, urushiol의 이중 및 삼중불포화물질이 포화물질보다 더욱 높은 접촉성 알레르기를 유발하였다(결과 미표시).

U1은 분자량이 316이며, 측쇄에 15개의 탄소와 2개의 이중결합을 가지는 구조를 하고 있는데, 일본산에서 9.25%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 다음으로 국내산에서 4.28%, 중국산에서 3.09%가 함유되어 있었다. 한편 U4는 분자량이 342이며, 측쇄에 17개의 탄소와 3개의 이중결합을 가지는 구조를 하고 있는데(결과 미표시), 중국산에서 9.83%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 국내산과 일본산에서는 각각 8.60%와 8.34%를 함유하고 있었다.

Table 6. Contents of estimated urushiol congeners from RC, RK and RJ

Estimated Urushiol congeners	Contents of urushiol congeners (%)		
	RC[1)]	RK[2)]	RJ[3)]
U1	3.09	4.28	9.25
U2	0.98	1.30	2.85
U3	70.07	66.82	62.38
U4	9.83	8.60	8.34
U5	1.54	2.48	2.63
U6	0.37	0.65	0.68
U7	0.36	0.41	0.48
U8	0.58	0.47	0.47
U9	0.87	0.76	0.63
U10	1.13	1.00	1.02

After allergic contact dermatitis, the mean of ear weight determined at 72 hr.
[1)]Raw Chinese lacquer. [2)]Raw Korean lacquer. [3)]Raw Japanese lacquer.

요 약

본 연구는 옻(*Rhus verniciflua*)에 대한 국산 미생물 발효차 폴리페놀물질인 theaflavin(TF)과 thearubigin(TR)의 항알레르기 효과를 조사하였다. HPLC, column chromatography 및 TLC로 이용하여, 한국 원주산, 일본산 및 중국산 락커(lacquer)로부터 아주 강한 알레르기를 유발하는 long chain alkylphenol을 함유하는 crude urushiol 성분을 분리하였다. 고분자 이중 및 삼중불포화물질의 함량은 중국산 라커의 crude urushiol에 가장 많이 포함되어 있었다. 중국산 라커의 crude urushiol에서 유발되는 접촉성 알레르기 피부염 발생은 5%농도에서 한국산이나 일본산 라커의 시료보다 높았으며, TF 및 TR를 처리한 모든 농도에서 접촉성 알레르기 피부염의 유의적인 감소를 나타내었다. 이들 결과로부터 발효차의 폴리페놀성 TF와 TR은 옻의 접촉성 피부염에 대한 유의적인 항알레르기 효과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Kang SY, Hue SH, Kim SI. 1978. Immunologic aspects of hypersensitivity disease in Korea. *Seoul J Medicine* 19: 45-53.
2. Chio KU, Paek DM. 1995. Asthma and air pollution in Korea. *Korean J Epidemiol* 17: 64-75.
3. Becker D, Kolde G, Reske K, Knop J. 1994. An in vitro test for endocytotic activation of murine epidermal Langerhans cells under the influence of allergens. *J Immuno Methods* 169: 195-204.
4. Lee KW, Myung CD, Nam HW, Hong CS, Lee YC. 1996. A study on nutritional status of allergic patients and food allergens in Korea. *Korean J Dietary Culture* 11: 123-130.
5. Rebuck AS, Read J. 1971. Assessment and management of sever asthma. *Am J Med* 51: 788-798.
6. Anto JM, Sunyer J, Rodriquiz RR, Suarez CM, Vazquez I. 1989. The toxicoepidemiological committee, community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. *N Engl J Med* 320: 1097-1102.
7. Tasaka K. 1986. Antiallergic drugs. *Drugs of Today* 22: 101-133.
8. Sakamoto K, Nagai M, Koda A. 1980. Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacology* 2: 139-146.
9. Kakegawa H, Matsumoto H, Matsumoto H, Satoh H. 1985. Activation of hyaluronidase by metalic salts and compounds 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem Pham Bull* 33: 642-646.
10. Kwon OS. 1996. The effect of Yunkyopaedocksan-gami on allergic contact dermatitis on mice induced by DNCB. *PhD Dissertation*. Dongguk University, Seoul.
11. Xie B, Shi H, Chen Q, Ho CT. 1993. Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas. *Proc Natl Sci* 17: 77-84.
12. Coombs RR, Gell A, Lachmam PJ. 1975. *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p 761-766.
13. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY. 1991. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatology mediators in BALF of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 88: 649-652.
14. Gleich GJ. 1990. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 85: 422-428.