

두충 추출물이 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염과 산화적 손상에 미치는 영향

손미예¹ · 남상해^{2*}

¹경상대학교 식품영양학과
²진주산업대학교 식품과학과

Effect of *Eucommia ulmoides* Extracts on Allergic Contact Dermatitis and Oxidative Damage Induced by Repeat Elicitation of DNCB

Mi-Yae Shon¹ and Sang-Hae Nam^{2*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
²Dept. of Food Science, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

Abstract

Inhibitory effects of allergic contact dermatitis of hot water extract of *Duchung* (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaf, bark and stem growing at Sancheong-gun were investigated for female BALB/c mouse induced by repeat elicitation of DNCB (2,4-dinitro-chlorobenzene). Skin reactions, consisting of increased ear thickness and the presence of ear inflammation, were observed in mice treated with DNCB and *Duchung*. Weight of lymph node, spleen and thymus in mice treated with *Duchung* extracts were lower than that of mouse treated with DNCB. Ear weight of mouse treated with *Duchung* extracts was decreased by increasing the concentration of sample as compared to control group and dropped as low as control level at 1,000 mg/kg. Ear thickness became thinner as test time on *Duchung* extract progressed. MDA (malondialdehyde) contents in liver tissue were not different in sample group with DNCB group, but were different in ear tissue. NO (nitric oxide) contents was decreased in *Duchung* extract groups at serum and ear tissues as compared to 1% DNCB group. In the present study, the results suggested that *Duchung* extract inhibits inflammatory response and oxidative damage induced DNCB allergen.

Key words: DNCB allergen, *Eucommia ulmoides* Oliver, *Duchung*, MDA, NO

서 론

환경의 오염, 식생활의 변화, 복잡한 사회구조로 인한 스트레스의 증가 등은 새로운 질병의 원인을 제공하게 되므로 과거와는 달리 당뇨병, 고혈압, 알레르기, 만성 스트레스 등과 연관되는 질병들이 현대인에게 가장 빈번히 발생하고 있다(1). 특히 알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 비염, 아토피성 피부염 그리고 알레르기성 결막염 등이 있는데, 산업의 발달로 인공화학 합성물의 범람과 환경오염이 가속화되면서 각종 면역과민성 질환을 유발시키는 알레르겐(allergen)이 급증하는 추세이다(2). 그리고 알레르기 유발 물질들은 주로 소화기, 피부 및 중추 신경계 등으로 나타나며, 특히 피부과 질환 중에서 가장 많이 볼 수 있는 것은 접촉성 피부염으로 화학물질, 약물, 식물 및 기타 자극물에 의해 피부의 알레르기성 반응에 의하여 유발되는 질환이다(3). 알레르기성 피부염의 치료제로 부신피질 호르몬제 및 항히스타민제가 사용되고 있으나 이러한 치료제를 장기간 투여할 경우

여러 가지 부작용이 보고되고 있어 이에 대한 새로운 치료제의 개발이 필요한 실정이며, 특히 항 알레르기제의 개발과 관련된 재료로서 천연재료인 약용식물이 우선적으로 선택되고 있다(4).

두충(杜仲, *Eucommia ulmoides* Oliver)은 중국의 호북, 사천성 등지가 원산지로서 알려져 있는 두충나무과(Eucommiaceae)에 속하는 낙엽교목으로서 생약학에서는 여러 해 목은 두충나무의 나무껍질을 벗겨 말린 것을 말한다(5). 대한약전에 강장, 진정, 진통작용 등이 있는 것으로 기록되어 있고, 혈압강화작용이 있어 고혈압 등의 질병을 예방하는데 사용된다고 기재되어 있으며, 우리나라는 잎을 차로 많이 음용하는데 두충의 잎에는 비타민 C가 63 mg% 정도 들어있다고 한다(6).

두충에 관한 연구로는 일반성분(7,8)과 콩나물 세균 형성 및 생장억제(9), 저혈당 및 간 보호작용이 있는 geniposide(10)를 포함한 Grb2-Shc결합(11) 및 monoamine계 신경전달물질 분해효소인 monoamine oxidase B(MAO-B) 저

*Corresponding author. E-mail: shnam@jinju.ac.kr
Phone: 82-55-751-3274, Fax: 82-55-751-3279

해물질의 분리(12)에 대한 보고가 있으며, 또한 그 외의 생리 활성에 대한 연구로는 항염증·항산화(1,13,14), 지질대사(5,15), 혈압강하 소재탐색(16-18), 암세포 증식억제(13,19), 항당뇨(20), 흰쥐의 골다공증(21) 및 중금속 감소 완화효과 등(22,23)이 보고되어 있다. 그러나 두충의 각 부위별 추출물이 접촉성 피부염 치료에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB)로 유발된 알레르기성 접촉피부염은 비만세포에서 염증관련 물질을 분비하며(24), 염증관련 물질인 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 생체대사의 한 부분이나 과도하게 생성되었을 경우에는 조직 손상, 지질 과산화, DNA 손상 그리고 효소 불활성화를 유발하며 만성, 급만성 스트레스와 충격, 염증 등의 복잡한 조건들과 연관되어 있다(25,26).

본 연구에서는 이런 점을 고려하여 두충차로 많이 응용되는 국산 두충 잎, 껍질, 줄기를 볶음 전, 볶음 후로 추출하여 DNCB로 알레르기성 접촉 피부염을 유발시킨 생쥐에게 투여시킨 후 항염증 반응과 염증 관련 반응 물질들에 관한 억제능을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)은 경남 산청 지리산 자락에서 재배되는 것을 농가로부터 자연 건조된 두충의 잎, 껍질, 줄기를 각각 10 kg씩 공급받아 그 중에서 5 kg씩은 200°C의 오븐에서 볶은 후 실험에 사용하였다.

두충시료 및 DNCB 조제

두충 시료 및 지연형 과민반응의 항원인 DNCB를 1차 감작과 2차 감작반응 실험에 사용하기 위하여 조제하였다. 사용할 DNCB는 acetone과 olive oil 혼합 용액으로 0.5%와 1%의 농도로 용해한 후 사용하였으며, 복강 주사용의 두충 시료는 0.1% saline 용액으로 360, 1,000 mg/10 mL 농도로 조제하여 200 µL씩을 투여하였다.

실험동물

실험동물은 4주령 된 BALB/c mice(초기 체중 18~20 g) 암컷을 효창 SCIENCE에서 분양 받아 실험동물 사육실에서 2주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도(22±2°C)와 상대습도(60±5%)를 알맞게 유지하고, 명암(06:00 AM~18:00 PM)은 12시간 주기로 조절하였다.

실험계획 및 시료투여

실험 동물은 총 105마리를 사용하였으며, 7마리를 한 실험군으로 분리하여 실험하였다. 알레르기 유발 및 억제 실험을

위하여 대조군 그룹(자유로운 식이; 1차와 2차 알레르기 반응을 실시하지 않음), 음성 대조군(DNCB) 그룹(자유로운 식이; DNCB에 의한 알레르기 발현을 실시함), 시료(두충 추출물 투여) 그룹(자유로운 식이; DNCB에 의한 알레르기 발현과 시료를 복강 투여함; 360, 1,000 mg/kg)으로 나누어 실시하였다. 시료의 농도는 예비실험에서 100, 360, 1,000 mg/kg을 복강 투여하여 효과가 측정되었던 360, 1,000 mg/kg을 본 실험에 사용하였다. 실험 진행은 5일 동안 0.5% DNCB로 알레르기 감작을 시켰으며 5일간 적응을 시킨 후 연이어서 3일 동안 1% DNCB로 2차 알레르기 감작과 동시에 시료를 복강에 투여하였다. 2차 감작 후, 염증 발현 정도를 24, 48 및 72시간에 측정하였으며, 3일 후에 실험 동물의 몸무게를 측정하였다. 또한 장기 무게 변화와 생화학적 분석을 위하여 실험동물들을 ether 마취하여 심장 채혈로 혈액을 수집하고, 중요 장기들을 적출하였다. 채취한 혈액은 4시간 동안 냉장고에 두어 응고시킨 후, 원심분리(3,000 rpm)하여 혈청을 얻었으며, 혈청과 적출한 장기는 일산화질소(nitric oxide, NO), 과산화지질(malondialdehyde, MDA) 등을 측정하기 위하여 냉동보관(-80°C)하였다.

알레르기 유발과 조직변화 측정

1차 감작으로 대조군을 제외한 나머지 실험군들의 털을 제거한 mice의 상복부에 0.5% DNCB 50 µL를 지름 0.8 cm 크기로 5일간 도포하였으며, 5일 후 1% DNCB 용액 25 µL를 3일간 오른쪽 귀에 도포하여 2차 감작을 시키면서, 동시에 두충 추출물을 복강에 3일간 계속 투여하였다(27). 2차 감작과 시료 투여한 후, 24, 48 및 72시간에 오른쪽 귀의 두께를 vernier calipers(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

혈청과 조직의 MDA 측정

MDA(malondialdehyde)의 함량은 thiobarbituric acid (TBA)를 사용하여 측정하였다(28). 즉 증류수 1 mL와 acetic acid에 녹인 29 mM TBA 1 mL에 혈청과 조직 시료에 50 µL 첨가하여 95°C에서 1시간 반응한 후에 식힌 다음 5 mM HCl을 25 µL 첨가하였다. 여기에 3.5 mL의 n-butanol을 첨가하여 추출하고 butanol 층은 1,500×g에서 5분 동안 원심분리하여 모은 후에 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 이용하여 작성하였으며, MDA의 농도는 µM/g, wet tissue로 환산하여 나타내었다.

혈청과 조직의 NO 측정

NO(nitric oxide) 함량은 안정된 NO 산화물인 NO₂⁻(nitrite)를 Griess 반응을 이용하여 측정하였다(29). EDTA가 들어 있는 50 mM potassium phosphate buffer로 조직을 마쇄한 후에 4°C, 10,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 조직의 상층액과 혈청 100 µL 각각을 96 well plate에 넣고, 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine/H₂O :

1% sulfanilamide/5% H₂PO₄ = 1 : 1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻은 표준곡선과 비교하여 표현하였다.

통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 평균치±표준편차로 나타내었으며, SPSS 12.0 program을 이용하여 ANOVA test를 행한 후, 각 시험군간에 신뢰수준 95%(p<0.05)에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 통계적 유의차를 평가하였다.

결과 및 고찰

알레르기 관련 기관들의 무게 변화

알레르기 반응이란 항원과 면역 글로불린이 반응하여 방출하는 화학전달 물질이나 또는 T 임파구에 의해 발생하는 각종 화합물로 인하여 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증 등이 유발되는 것이다(30). 일반적으로 알레르기 반응은 일으키는 기전에 따라 4가지 유형으로 분류되는데 이 중 제 IV형은 항원과 임파구의 반응에 의하여 조직상해를 일으키는 것으로 보고되어 있다(31,32). 제IV형의 병리기전은 비교적 잘 밝혀져 있어 두충 추출물에 의한 효능 관찰은 적절하다고 사료된다. 두충 추출물의 알레르기 억제 반응을 측정하기 위하여 DNCB로 알레르기 피부염을 유발시킨 후에 알레르기를 유발하지 않은 대조군과 두충 추출물을 투여한 군과의 비교실험을 수행하였다. Balb/c mice에서 림프절과 B세포 지역이 DNCB 투여에 의해서 증가된다고 보고되어 있다(33). 면역에 관계하는 기관들로는 일차 림프기관과 이차 림프기관으로 구별될 수 있는데, 흉선(thymus)은 일차 림프기관으로 이곳에서 림프구의 성숙이 일어나며, 림프절(lymph node)과 비장(spleen)은 이차 림프기관으로 이곳에서 항원이 수집되고 성숙한 림프구가 항원과 작용한다. 흉선은 T세포 발생과 성숙 장소이며 감염에서 몸을 보호할 T세포를 생성하고 선택한다. 비장은 혈류속의 항원에 대한 면역반응을 유발시키는데 중요한 역할을 수행하는 곳이며 따라서 전신성 감염에 반응하는 곳이다(34-36).

그래서 DNCB에 대한 mice의 면역 반응 결과를 면역에 관계하는 기관들을 대조군, DNCB 대조군 및 두충 투여군과 비교하여 무게 변화를 측정하였으며(Table 1), 그 결과 DNCB와 두충 투여군에서 몸무게의 변화는 나타나지 않았다(data 미표시). 흉선, 비장 및 림프절의 각각 무게는 대조군과 비교하여 DNCB 대조군과 두충 투여군에서 모두 높게 나타났으나, 두충 투여군과 DNCB 대조군과의 비교에서는 두충 투여군이 낮게 측정되었다. 이러한 결과는 DNCB를 투여할 때, 면역에 관계하는 기관들이 활발하게 항원을 수집하고 T세포와 B세포를 발생시키며 그에 따른 면역 반응을

Table 1. Change of organ weight in spleen, thymus and lymph node of mice treated with DNCB, LW, LT, BW, BT, SW, and ST (g/kg)

Groups ¹⁾	Concentration (mg/kg)	Spleen	Thymus	Lymph node
	Control	7.62±0.47 ^{a2)}	3.61±0.13 ^a	0.35±0.03 ^a
DNCB	0.5%	11.18±0.17 ^e	10.10±0.04 ^f	0.81±0.01 ^e
	1%	12.69±0.83 ^f	13.02±0.04 ^g	0.95±0.03 ^f
LW	360	10.33±0.15 ^d	8.19±0.06 ^{df}	0.40±0.00 ^d
	1000	8.38±0.04 ^b	5.21±0.04 ^{ac}	0.37±0.01 ^{ac}
LT	360	9.52±0.19 ^c	7.03±0.02 ^{bc}	0.39±0.01 ^{bd}
	1000	8.30±0.20 ^{ab}	5.71±0.37 ^{ac}	0.36±0.02 ^{ab}
BW	360	9.77±0.29 ^{cd}	7.48±0.06 ^{ef}	0.41±0.01 ^d
	1000	8.21±0.13 ^{ab}	5.09±0.02 ^{ad}	0.36±0.01 ^{ab}
BT	360	9.86±0.25 ^{cd}	7.28±0.06 ^{ce}	0.40±0.02 ^d
	1000	8.18±0.04 ^{ab}	4.61±0.02 ^{ab}	0.36±0.03 ^{ab}
SW	360	9.36±0.44 ^c	8.32±0.03 ^{df}	0.39±0.01 ^{cd}
	1000	8.44±0.29 ^b	5.81±0.08 ^{bd}	0.36±0.02 ^a
ST	360	9.86±0.22 ^{cd}	9.39±0.07 ^{ef}	0.41±0.01 ^d
	1000	8.32±0.06 ^{ab}	5.91±0.03 ^{ad}	0.36±0.03 ^{ab}

¹⁾DNCB: 2,4-dinitro-chlorobenzene, LW: leaf extract, LT: roasted leaf extract, SW: stem extract, ST: roasted stem extract, BW: bark extract, BT: roasted bark extract.
²⁾Data represent mean±SD (n=7). Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

발생시킨 결과이며, DNCB를 처리하지 않을 경우에는 B세포 지역에서 림프절이 증가하지 않는 것으로 보고되어 있다(34-36). 그에 따른 흉선, 비장 및 림프절의 각각 무게가 증가하였으며, 두충 추출물에 의해서 알레르기 반응이 유의적으로 감소되는 것이 측정되었다.

귀의 무게와 두께 변화

DNCB로서 1차, 2차 감각반응을 일으켜 mice의 귀를 swelling 시킨 후에 두충 추출물을 360, 1,000 mg/kg의 농도로 투여하여 귀의 무게와 귀의 두께에 발생한 swelling의 감소효과를 조사한 결과는 Table 2, 3 및 4와 같다. 두충 부위별 추출물을 처리한 두충 투여군에서 귀의 무게 변화(Table 2)는 8.8~11.6 mg으로 측정되었으며, 1% DNCB 대조군은 13.8 mg으로 측정되었다. 따라서 두충 투여군에서 감소하는 경향을 보였으며, DNCB 대조군과 비교하여 유의적인 무게 함량의 변화를 나타내었다. 즉 두충의 부위별 추출물을 360 mg/kg 투여하였을 때에는 대조군에 비하여 귀의 무게가 왼쪽과 오른쪽 모두 높았으나, 1,000 mg/kg의 농도로 처리하였을 때에는 귀의 무게가 LT(7.5 mg), BT(7.4 mg) 및 ST(7.8 mg)는 상당히 감소하여 거의 대조군과 유사한 수준까지 낮아졌다.

한편 두충의 부위별 추출물을 각 농도별로 투여하여 귀에 발생한 swelling의 감소효과를 조사하기 위하여 귀의 두께를 측정한 결과(Table 3, 4), 두충 추출물을 투여한 군에서 시간이 경과할수록 귀의 두께는 얇아져서 알레르겐에 의한

Table 2. Change of ear weights of mice treated with DNCB, LW, LT, BW, BT, SW, and ST

Groups ¹⁾	Concentration (mg/kg)	Ear thickness (mm)	
		24 hr	48 hr
	Control	0.018±0.002 ^{ad2)}	0.013±0.002 ^{ab}
DNCB	0.5%	0.061±0.014 ^{il}	0.058±0.004 ^{hl}
	1%	0.083±0.003 ^m	0.071±0.002 ^{km}
LW	360	0.068±0.032 ^{lm}	0.045±0.001 ^{ej}
	1000	0.035±0.014 ^{bh}	0.032±0.001 ^{af}
LT	360	0.023±0.004 ^{ae}	0.023±0.003 ^{ae}
	1000	0.031±0.007 ^{af}	0.025±0.001 ^{af}
BW	360	0.043±0.018 ^{di}	0.004±0.001 ^{ci}
	1000	0.055±0.014 ^{el}	0.048±0.004 ^{fk}
BT	360	0.043±0.018 ^{di}	0.018±0.003 ^{ac}
	1000	0.043±0.011 ^{di}	0.045±0.014 ^{ej}
SW	360	0.033±0.004 ^{ag}	0.028±0.004 ^{af}
	1000	0.025±0.007 ^{af}	0.033±0.011 ^{ad}
ST	360	0.037±0.016 ^{bi}	0.021±0.005 ^{ad}
	1000	0.028±0.004 ^{af}	0.035±0.021 ^{bh}

¹⁾Refer footnote to Table 1.

²⁾Data represent mean±SD (n=7). Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. Change of left ear thickness of mice treated with DNCB, LW, LT, BW, BT, SW, and ST

Groups ¹⁾	Concentration (mg/kg)	Ear thickness (mm)		
		24 hr	48 hr	72 hr
	Control	0.018±0.002 ^{ad2)}	0.013±0.002 ^{ab}	0.009±0.001 ^a
DNCB	0.5%	0.061±0.014 ^{il}	0.058±0.004 ^{hl}	0.048±0.004 ^{fk}
	1%	0.083±0.003 ^m	0.071±0.002 ^{km}	0.075±0.001 ^{lm}
LW	360	0.068±0.032 ^{lm}	0.045±0.001 ^{ej}	0.028±0.003 ^{af}
	1000	0.035±0.014 ^{bh}	0.032±0.001 ^{af}	0.021±0.001 ^{ad}
LT	360	0.023±0.004 ^{ae}	0.023±0.003 ^{ae}	0.023±0.011 ^{ae}
	1000	0.031±0.007 ^{af}	0.025±0.001 ^{af}	0.028±0.004 ^{af}
BW	360	0.043±0.018 ^{di}	0.004±0.001 ^{ci}	0.035±0.014 ^{bh}
	1000	0.055±0.014 ^{el}	0.048±0.004 ^{fk}	0.058±0.002 ^{hl}
BT	360	0.043±0.018 ^{di}	0.018±0.003 ^{ac}	0.023±0.004 ^{ae}
	1000	0.043±0.011 ^{di}	0.045±0.014 ^{ej}	0.038±0.025 ^{bi}
SW	360	0.033±0.004 ^{ag}	0.028±0.004 ^{af}	0.025±0.001 ^{af}
	1000	0.025±0.007 ^{af}	0.033±0.011 ^{ad}	0.018±0.004 ^{ac}
ST	360	0.037±0.016 ^{bi}	0.021±0.005 ^{ad}	0.021±0.005 ^{ad}
	1000	0.028±0.004 ^{af}	0.035±0.021 ^{bh}	0.023±0.003 ^{ae}

¹⁾Refer footnote to Table 1.

²⁾Data represent mean±SD (n=7). Values with different superscripts within the same column significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

알레르기 반응이 소멸되는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 LT, SW 및 ST 추출물의 360과 1,000 mg/kg을 처리한 투여군에서는 시간이 경과함에 따라 알레르기의 진정되는 속도가 매우 빠르게 진행되었다. 이와 같은 결과는 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉피부염은 항원이 되는 물질이 피부를 통해 침투하여 운반단백질과 결합한 후 감각과정을 거치게

Table 4. Change of right ear thickness of mice treated with DNCB, LW, LT, BW, BT, SW, and ST

Groups ¹⁾	Concentration (mg/kg)	Ear thickness (mm)		
		24 hr	48 hr	72 hr
	Control	0.017±0.003 ^{ac2)}	0.015±0.002 ^{ab}	0.009±0.001 ^a
DNCB	0.5%	0.055±0.007 ^{gi}	0.056±0.003 ^{fi}	0.045±0.005 ^{eh}
	1%	0.083±0.004 ^l	0.072±0.002 ^{ji}	0.072±0.002 ^{ji}
LW	360	0.063±0.003 ^{hj}	0.042±0.007 ^{ch}	0.043±0.003 ^{af}
	1000	0.035±0.002 ^{bg}	0.023±0.004 ^{ae}	0.020±0.003 ^{ad}
LT	360	0.018±0.004 ^{ac}	0.021±0.007 ^{ad}	0.020±0.002 ^{ad}
	1000	0.025±0.007 ^{ae}	0.023±0.004 ^{ae}	0.028±0.003 ^{af}
BW	360	0.030±0.007 ^{af}	0.035±0.002 ^{bg}	0.025±0.007 ^{ae}
	1000	0.045±0.021 ^{eh}	0.038±0.011 ^{bg}	0.051±0.007 ^{fi}
BT	360	0.043±0.018 ^{dh}	0.015±0.002 ^{ab}	0.028±0.011 ^{af}
	1000	0.038±0.011 ^{bg}	0.040±0.007 ^{ch}	0.038±0.014 ^{bg}
SW	360	0.020±0.007 ^{ad}	0.028±0.004 ^{af}	0.025±0.002 ^{ae}
	1000	0.025±0.014 ^{ae}	0.020±0.004 ^{ad}	0.015±0.003 ^{ab}
ST	360	0.032±0.016 ^{ag}	0.015±0.005 ^{ab}	0.021±0.005 ^{ad}
	1000	0.025±0.009 ^{ae}	0.035±0.021 ^{bg}	0.022±0.007 ^{ad}

¹⁾Refer footnote to Table 1.

²⁾Data represent mean±SD (n=7). Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

되고 감각된 생체가 재차 알레르겐에 접촉하면 피부에 염증을 일으킨 결과로 나타난다고 보고되어 있으나(24), 염증 유발 인자와 두층 추출물이 포함하고 있는 생리활성 물질과의 결합으로 인하여 염증 반응이 소거되는 것으로 추측된다. 또한 Park 등(37)에 의한 한국산 감잎 폴리페놀 성분에 의한 DNCB로 유발된 염증에 대한 항염증반응이 보고되어 있다.

NO 생성 변화

면역학적인 관점에서 NO 합성효소의 발현은 NO의 생성을 증가시키며 병리학적인 조직 손상을 나타내는 부위에는 NO의 함량이 증가되는 것으로 알려져 있다. 또한 진피 세포 내의 NO의 증가는 지질과산화물을 유발하는 ROS의 증가를 촉진시킨다(38,39). NO는 알레르기 및 천식과 같은 염증질환에 있어서 다량이 발현되어 염증을 유발시키는 인자이며 NO가 발현하는 기능의 다양성은 농도 및 표적세포의 활성화 여부 등에 따라 달라진다고 알려져 있다(40). 혈청, 간 및 조직에서의 NO 함량 변화는 두층 투여군 및 1% DNCB 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되었으며, 함량 변화를 Table 5에 나타내었다. 즉 NO 함량은 간의 경우 모든 시료에서 측정되지 않았으며, 1% DNCB 대조군의 경우 혈청과 귀에서 가장 높게 측정되었다. 다음으로는 LW와 LT 그룹에서 높게 나타났으며 전자가 후자보다 약간 높게 나타났다. 혈청과 귀의 경우 SW, ST 및 BT 그룹에서 염증이 억제되어 대조군과 마찬가지로 측정되지 않았는데, 이는 두층의 결합에는 항산화물질이 함유되어 있어서 NO 합성효소의 발현을 억제시킨 결과로 판단된다(39).

Table 5. Change of NO levels of mice treated with DNCB, LW, LT, BW, BT, SW, and ST

Groups ¹⁾	Concentration (mg/kg)	NO production (µM/g)		
		Serum	Liver	Ear
Control		ND ^{ab2)}	ND	0.08±0.004 ^{bd}
DNCB	0.5%	0.82±0.081 ^{cd}	ND	2.71±0.073 ^g
	1%	2.00±0.028 ^e	ND	4.08±0.024 ^h
LW	360	1.22±0.049 ^{de}	ND	0.88±0.041 ^{df}
	1000	1.25±0.067 ^{de}	ND	0.77±0.063 ^{cf}
LT	360	0.49±0.042 ^{bd}	ND	0.69±0.016 ^{cf}
	1000	0.91±0.018 ^{cd}	ND	0.61±0.049 ^{cf}
BW	360	1.45±0.028 ^{de}	ND	1.45±0.029 ^f
	1000	0.48±0.035 ^{bd}	ND	0.48±0.036 ^{ce}
BT	360	ND ^{ab}	ND	ND ^{ab}
	1000	ND ^{ab}	ND	ND ^{ab}
SW	360	ND ^{ab}	ND	0.06±0.007 ^{bd}
	1000	ND ^{ab}	ND	ND ^{ab}
ST	360	0.03±0.002 ^{ac}	ND	ND ^{ab}
	1000	ND ^{ab}	ND	1.05±0.032 ^{ef}

¹⁾Refer footnote to Table 1.

²⁾Data represent mean±SD (n=7). Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

MDA 생성 변화

알레르겐의 투여로 인하여 NO 발생을 유도하게 되면 NO와 주변의 활성산소에 의하여 세포의 지질 과산화를 유도하여 MDA와 같은 산화반응 물질을 생산한다(6). MDA는 산화반응에 의한 다가불포화지방산의 산화물로서 조직세포의

Table 6. Change of MDA levels of mice treated with DNCB, LW, LT, BW, BT, SW, and ST

Groups ¹⁾	Concentration (mg/kg)	Liver	Ear
		(µM/g wet tissue)	(µM/g wet tissue)
Control		3.21±0.13 ^{ab2)}	2.70±0.16 ^{ac}
DNCB	0.5%	2.97±0.18 ^{ab}	3.20±0.16 ^{ef}
	1%	3.31±0.15 ^{ab}	3.38±0.18 ^f
LW	360	3.54±0.11 ^{ad}	2.73±0.29 ^{ad}
	1000	3.64±0.07 ^{bd}	2.81±0.02 ^{ad}
LT	360	4.19±0.028 ^{de}	2.96±0.14 ^{ce}
	1000	5.07±0.52 ^f	2.89±0.04 ^{bd}
BW	360	3.28±0.16 ^{ab}	2.67±0.08 ^{ab}
	1000	3.42±0.58 ^{ac}	2.54±0.14 ^a
BT	360	4.11±0.58 ^{ce}	2.59±0.17 ^a
	1000	3.28±0.30 ^{ab}	2.67±0.17 ^{ab}
SW	360	4.48±0.44 ^{ef}	2.99±0.13 ^{de}
	1000	4.64±0.45 ^{ef}	2.75±0.21 ^{ad}
ST	360	4.62±0.70 ^{ef}	2.62±0.03 ^{ab}
	1000	2.83±0.37 ^a	2.53±0.11 ^a

¹⁾Refer footnote to Table 1.

²⁾Data represent mean±SD (n=7). Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

산화적인 손상(염증)의 증거로 알려져 있다. 따라서 이 실험에서는 피부 조직 손상의 정도를 MDA 함량을 측정하여 평가하였다(Table 6). 그러나 간 조직에서의 MDA 함량 변화는 두충 투여군 및 DNCB 대조군과 비교하여 차이가 나타나지 않았으나, 귀 조직에서 MDA 함량 변화는 LT와 SW의 360 mg/kg 그룹을 제외한 모든 두충 투여군의 경우, DNCB 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되었다(p<0.05). 이와 같은 결과는 부종과 염증 반응을 보인 귀조직의 병리학적 세포 반응에 의한 MDA 함량이 증가되었으며, 두충추출물에 의하여 세포의 지질 과산화를 억제하였음을 나타낸다.

요 약

두충(잎, 껍질, 줄기)의 추출물이 DNCB로 감작된 4주령 BALB/c mouse 암컷에 유도된 접촉성 피부염의 억제효과를 조사하였다. 림프절, 비장 및 흉선의 무게는 두충 투여군이 DNCB 대조군보다는 낮게 나타났다. 두충 부위별 추출물을 투여한 군에서 귀의 무게는 두충 추출물의 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였으며, 대조군과 비교하여 무게에 함량 변화가 있었다. 두충의 부위별 추출물을 1,000 mg/kg 농도로 투여하면 귀의 무게는 대조군과 유사한 수준까지 낮아졌으며, 귀의 두께는 두충 추출물을 투여한 군에서 시간이 경과할수록 두께가 감소하는 경향을 나타내었다. MDA 함량은 DNCB 대조군과 두충 투여군을 비교하였을 경우에, 간 조직에서 차이가 나타나지 않았으나, 염증이 발생한 귀 조직에서는 차이가 나타났으며(p<0.05), NO 함량은 SW, ST 및 BT 그룹에서 염증이 억제되어 대조군과 마찬가지로 측정되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 2006년 산청군 약초신활력 사업비 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim MH, Kim MC, Park JS, Kim JW, Lee JO. 2001. The antioxidative effects of the water-soluble extracts of plants used as tea materials. *Korean J Food Sci Technol* 33: 12-18.
- Kang SY, Hue SH, Kim SI. 1978. Immunologic aspects of hypersensitivity disease in Korea. *Seoul J Medicine* 19: 45-53.
- Chio KU, Paek DM. 1995. Asthma and air pollution in Korea. *Korean J Epidemiology* 17: 64-75.
- Tasaka K. 1986. Antiallergic drugs. *Drugs of Today* 22: 101-133.
- Whang WK, Choi SB, Kim IH. 1996. Physiological activities of mixed extracts of *Acanthopanicis senticosi* Radicis Cortex and *Eucommiae* Cortex. *Kor J Pharmacogn* 27: 65-74.
- Choe YH, Seo JH, Kim JS, Heo JH, Kim SG, Choe SU, Kim YS, Kim YG, Yu SY. 2003. Inhibitory effects of the stem

- bark extract of *Eucommia ulmoides* on the proliferation of human tumor cell lines. *Kor J Pharmacogn* 34: 308-313.
7. Jang HJ, Ra DY, Kim OC, Park JY. 1990. Volatile components of *Du-Chung* barks. *J Korean Agric Chem Soc* 33: 116-119.
 8. Hwang JB, Yang MO, Shin HK. 1997. Survey for approximate composition and mineral content of medicinal herbs. *Korean J Food Sci Technol* 29: 671-679.
 9. Kang JH, Park CJ, Yoon SY, Jeon SH, Her CY. 2005. Growth and morphological characteristics of soybean sprouts treated with leaf extracts of *Thea sinensis* L. and *Eucommia ulmoides* Oliver. *Korean J Medicinal Corp Sci* 13: 11-16.
 10. Son KH, Lee JM, Chang SY, Lee KS. 2001. Isolation and quantitative determination of geniposide from the cortex of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor J Pharmacogn* 32: 89-92.
 11. Baek NI, Hahn JT, Ahn EM, Bang MH, Nam JY, Kwon BM. 1999. Isolation of Grb2-Shc interaction inhibitory compounds from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. *Kor J Pharmacogn* 30: 202-206.
 12. Baek NI, Ahn EM, Han JT, Lee DW, Sohn HO, Kwon BM. 1999. Isolation of monoamine oxidase B inhibitory compound from the leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 166-169.
 13. Choe SI, Lee YM, Heo TL. 2003. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 282-288.
 14. Kim NJ. 1995. Pharmacological activity of *Eucommia ulmoides*. *Kor J Pharmacogen* 26: 192-198.
 15. Kim JH, Wang SG. 1997. Effects of mugwort, dried orange peel and *Duchung* on lipid metabolism in hyperlipidemia rats. *Kor J Nutr* 30: 895-903.
 16. Yun JS, Jeong BH, Kim NY, Seong NS, Lee HY, Lee JH, Kim JD. 2003. Screening of 94 plant species showing ACE inhibitory activity. *Korean J Medicinal Corp Sci* 11: 246-251.
 17. Choi GP, Chung BH, Lee DI, Lee HY, Lee JH, Kim JD. 2002. Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. *Korean J Medicinal Corp Sci* 10: 399-402.
 18. Kim HY. 2000. Hypocholesterolemic and hypotensive activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Food Industry Nutr* 5: 27-28.
 19. Hwang WI. 1992. A study on the growth inhibition of human colon cancer cells by *Eucommia* leaf extract. *Korean J Food Nutr* 5: 13-21.
 20. Hong ND, Rho YS, Won DH, Kim NJ, Cho BS. 1986. Studies on the anti-diabetic activity of *Eucommia ulmoides* Oliver. The Abstracts of 17th Annual Convention of The Korean Society of Pharmacognosy. p 87.
 21. Oh HS, Kim HC, Lee SI, Ahn DK. 1995. Effects of *Eucommia* Cortex and Folium on the ovariectomized rat as the model of postmenopausal osteoporosis. *J Herbology* 10: 59-68.
 22. Lee IK, Kim JG. 2000. Effects of extract of *Eucommia ulmoides* Oliver on the reduction of lead and cadmium in organs of rats. *J Korean Public Health Assoc* 26: 22-28.
 23. Hong ND, Rho YS, Kim JW, Won DH, Kim NJ, Cho BS. 1988. Studies on the general pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor J Pharmacogn* 19: 102-110.
 24. Holliday MR, Dearman RJ, Kimber I, Coleman JW. 1992. Sensitization of mice to chemical allergens modulates the responsiveness of isolated mast cell to IgE-dependent activation. *Immunology* 78: 508-510.
 25. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna M, Schroder N, Quevedo J, Benfato MS, Moreira JC, Walz R. 2000. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Letter* 291: 179-182.
 26. Klamt F, Dal-Pizzol F, Frota MLC, Walz R, Andrades ME, Silva EG, Brentani R, Izquierdo I, Moreira JCF. 2001. Imbalance of antioxidant defence in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 30: 1137-1144.
 27. Kwon OS. 1996. The effect of Yunkyo-paedocksan-gami on allergic contact dermatitis on mice induced by DNCB. *PhD Dissertation*. Dongguk University.
 28. Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malondialdehyde precursor in tissue by TBA test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
 29. Chi YS, Cheon BS, Kim HP. 2001. Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cell. *Biochem Pharmacol* 61: 1195-1203.
 30. Ishizaka K. 1984. Regulation of IgE synthesis. *Annu Rev Immunol* 2: 159-162.
 31. Ohmori Y, Ito M, Mizutani H, Katada T, Konishi H. 1995. Antiallergic constituents from *Oolong* tea stem. *Biol Pharm Bull* 18: 683-686.
 32. Coombs RRA, Gell PGH, Lachman PJ. 1975. *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p 761-766.
 33. Arts JHE, Droge SCM, Bloksma N, Kuper CF. 1996. Local lymph node activation in rats after dermal application of the sensitizers 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *Food Chem Toxicol* 34: 55-62.
 34. Gerberick GF, Cruse LW, Ryan CA. 1999. Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Eur J Med Res* 19: 48-55.
 35. Sikorski EE, Gerberick GF, Ryan CA, Miller CM, Ridder GM. 1996. Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fundamental Appl Toxicol* 34: 25-35.
 36. Suda A, Yamashita M, Tabei M, Taguchi K, Vohr HW, Tsutsui N, Suzuki R, Kikuchi K, Sakaguchi K, Mochizuki K, Nakamura K. 2002. Local lymph node assay with non-radioisotope alternative endpoints. *J Toxicol Sci* 27: 204-218.
 37. Park MH, Choi C, Bae MJ. 2000. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (*Diospyros kakifolium*) on allergic contact dermatitis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 111-115.
 38. Fleming I, Busse R. 2004. The physiology of nitric oxide: control and consequences. *Curr Med Chem Anti-Allergy Agents* 3: 189-205.
 39. Dedon PC, Tannenbaum SR. 2004. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys* 423: 12-22.
 40. Hogg N, Kalyanaraman B, Darley-Usmar V. 1995. Oxidant and antioxidant effects of nitric oxide and superoxide in the vasculature. In *The Oxygen Paradox*. Cleup University Press, Paradona, Italy. p 158-163.

(2007년 9월 27일 접수; 2007년 12월 5일 채택)