

# 티올키토산으로 피복된 EPA (Eicosapentaenoic acid) 함유 리포솜의 제조 및 아토피 감염 쥐에 대한 면역 특성

정효연<sup>1</sup> · 김진<sup>2</sup> · 이용욱<sup>4</sup> · 이기영<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 공과대학 향장품학협동과정, <sup>2</sup>신화학소재공학과, <sup>3</sup>응용화학공학부 & 촉매연구소, <sup>4</sup>(주)켄포트

## Preparation of Thiol-chitosan Coated EPA-containing Liposome and Immune Response in Mouse Model of Atopic Dermatitis

Hyo-Yun Jung<sup>1</sup>, Jin Kim<sup>2</sup>, Yong-Wook Lee<sup>4</sup>, and Ki-Young Lee<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program of Perfume and Cosmetics Graduate School, Chonnam National University, Gwang-ju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Department of Advanced Chemicals & Engineering Graduate School, Chonnam National University, Gwang-ju, 500-757, Korea

<sup>3</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwang-ju 500-757, Korea

<sup>4</sup>Chemport Inc., Naju, Jeollanam-do 520-330, Korea

**Abstract** The enhancement of immunity for atopic dermatitis with application of eicosapentaenoic acid (EPA)-loaded liposome was evaluated on NC/Nga mice. The EPA-loaded liposome was coated with thiol-chitosan. The liposomes were characterized with transmission electron microscopy (TEM), surface zeta potential & particle size analyzer (Zeta-PSA) and differential scanning calorimetry (DSC). The loading efficiency of EPA in the liposome was about 4.7%. The particle size of the EPA-loaded liposome was about 230 nm. The values of Immunoglobulin E (IgE), interleukin-4 (IL-4), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were reduced significantly with application of the EPA-loaded liposome. The interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) value was increased with the application effect. It is concluded that EPA loaded liposome have immunity advancing effects in mouse model of atopic dermatitis.

**Keywords:** EPA, Atopic dermatitis, Immunity, IgE, IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$

### 서론

아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 진드기나 꽃가루, 애완동물의 털 등이 자극원으로 작용하는 만성 재발성 피부염으로 피부 건조화뿐 아니라 표피 과증식 (hyperkeratosis), 염증 등 여러 증상을 동시에 수반하는 피부 질환이다 [1]. 아토피에 의한 알레르기 질환으로 알레르기 피부염, 알레르기성 비염, 천식, 알레르기성 결막염, 아토피성 두드러기 등이 있으며 이들 질환은 단독 또는 여러 질환이 동시에 나타날 수 있다 [2]. 아토피는 알레르기 또는 즉시형 과민

반응 (immediate hypersensitivity)이라고도 한다. 전형적인 발생경과는 항원 노출, 항원 특이 Th2세포의 활성화, IgE 항체의 생산, 비만세포 (mast cell)의 Fc 수용체에 항체 결합, 항원의 재차 노출에 의한 비만세포의 자극으로 인해 비만세포의 매개자 방출이 일어나는 병리학적 반응으로 나타난다. 아토피 피부염의 정확한 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있지만 면역학적 특성으로는 혈중 IgE 항체가 늘어나고 비만세포로부터 알레르기 염증반응을 일으킬 수 있는 여러 종류의 사이토카인을 생산한다. 이러한 사이토카인으로 TNF, IL-4, IL-5 등이 유도된다. 반대로 Th1 세포에 의해 생산된 IL-12와 IFN- $\gamma$ 은 Th2에 의해 생산되는 IL-4과 IL-5의 생산을 억제한다 [3,4].

오메가-3는 불포화지방산 (PUFAs; polyunsaturated fatty acids)이며 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic

### \*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1843, Fax: +82-62-530-1819

e-mail: kilee@chonnam.ac.kr

acid (DHA) 등으로 구성된다. EPA는 5개의 이중결합을 가지며 DHA는 6개의 이중결합이 구조 내에 존재한다. 오메가-3는 항염증에 영향을 주는 효소와 관계되며 다양한 항염성 질병의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있을 뿐 아니라 심근경색, 동맥경화 및 고지혈증 등의 혈관장애를 예방하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다. EPA에는 항염증 작용, 면역조절 작용, 암 억제 등의 기능도 있다 [5,6]. 그러나, EPA는 지용성 액체이므로 취급하기 불편하고 어취가 심하기 때문에 식품, 외용 피부치료제, 기능성 화장품 등으로 활용하기 어렵다. 이러한 단점을 극복하고 약물로서 효과를 증진시키기 위하여 EPA를 리포솜 등으로 피복하는 기술에 관심이 모이고 있다.

리포솜은 인지질이라는 생체 구성성분으로 이루어져 생체 내에서 분해가 가능하고 독성이 없다. 포집물질이 약물일 경우 특정 조직에 표적이 가능하여 약물의 치료 효과를 높이고 약물을 거의 모든 경로(경구, 피하, 정맥, 근육 주사 또는 복강주사)로 투여할 수 있는 등 많은 장점이 있다. 리포솜은 여러 약물을 함유할 수 있고, antigen-presenting cell에 의하여 효과적으로 흡수된다 [7,8]. 하지만 이러한 리포솜이 약물 전달체로 사용될 경우 표면이 견고하지 못하고 점막 부착성이 낮은 단점이 있다.

키토산은 점막 점착성이 우수하고 독성이 없다. 키토산은 세포를 활성화하여 노화를 억제하고 면역력을 강화시키며 질병을 예방해 주는 특성이 있다. 또한 생체의 자연적인 치유 능력을 활성화하는 기능과 함께 생체 리듬을 조절해 주는 기능도 있는 것으로 알려져 있다 [9]. 일반적으로 인체에는 세포를 이물질로부터 보호하는 수많은 방어물질들이 존재하는데 그 중의 하나가 세포 내 티올(intracellular thiols)이다. 티올은 핵 친화성을 띠고 있으며 전자 친화성을 가진 중금속이나 알킬화 약물(alkylating agents)을 비롯한 여러 가지 항암제, 그리고 유해한 화합물들과 결합하여 무해한 수용성 물질로 전환시키는 역할을 한다. 리포솜의 점막 점착성을 더욱 높이기 위해 티올화 키토산을 피복하여 약물 전달체로 적용하는 연구도 보고된 바 있다 [10,11].

이 연구에서는 티올 키토산으로 코팅하여 리포솜의 점막 부착성과 안정성을 향상시킨 EPA 함유 리포솜을 제조하였다. EPA가 함유된 리포솜의 아토피 피부염에 대한 면역 증진 효과를 조사하기 위해 아토피 피부염이 유발된 마우스를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 면역특성을 조사하였다. 키토산 유도체로 코팅한 리포솜에 EPA를 포집시켜 마우스에 도포 처치한 후 아토피 증상에 대한 개선 효과를 혈청 면역 지표(IgE, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) 측정을 통해 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

2-iminothiolane hydrochloride, 키토산 (low molecular

weight), L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (PC)와 콜레스테롤은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 EPA는 (주)캠포트 (Korea)에서 공급받아 사용하였다.

### 아토피 유발 실험

마우스의 아토피 유발 축진을 위해 6주령 (20g, body weight)인 아토피 피부염 모델 NC/Nga mice를 (주)오리엔트 바이오 (Korea)로부터 공급 받아 Mills 등 [12]의 연구에 서와 같이 1주일 동안 주위 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 아토피 유발을 위해 dinitrochlorobenzene (DNCB) 200  $\mu$ L를 일주일 2번, 2주간 마우스의 등 부위에 도포하였다. DNCB용액은 아세톤과 올리브유를 3:1 (v/v)의 비율로, 총 20 mL 만든 후, DNCB 0.2 g을 첨가하여 제조하였다. NC/Nga 마우스는 specific pathogen free (SPF) 환경에서는 정상이지만, 일반 환경에서는 3~4주 후 가려움증을 수반하여 아토피 피부염이 유발된다. 실험기간 동안 사육실의 온도는 25°C, 습도는 55% 전후로 유지했으며, 광주기와 암주기를 12시간으로 조절하였다.

### 티올키토산의 제조 및 티올기 정량

1% 초산 용액 100 mL에 키토산 (1 g)을 실온에서 충분히 녹였다. 이 키토산 용액에 1 M 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 6.5로 조절하였다. 여기에 2-iminothiolane HCl를 첨가한 후, 상온에서 12시간 교반하였다. Table 1에 제시한 바와 같이 조성이 다른 완충용액을 이용하여 하루 간격으로 5일간 투석시킨 다음, 동결 건조하여 티올키토산을 얻었다. Ellman 시약을 사용하여 티올키토산에 함유된 티올기의 양을 측정하였다 [13].

Table 1. Composition of buffer solutions

Buffer solution	Composition
1st buffer solution	5 mM HCl
2nd, 3rd buffer solution	5 mM HCl + 1% NaCl
4th buffer solution	5 mM HCl
5th buffer solution	0.4 mM HCl

### 티올키토산으로 피복된 EPA 함유 리포솜의 제조

면역증진효과가 기대되는 EPA를 입자화 하기 위해 리포솜을 제조하였다. PC, 콜레스테롤 및 EPA 혼합물 (몰 비율 7:3:1)을 메탄올과 클로로포름의 혼합용매 (몰 비율 1:9)에 녹여 인지질 용액을 만들고, 동일한 비율로 EPA를 첨가한 인지질 용액을 각각 60°C에서 2시간 동안 회전증발농축기를 사용해 유기용매를 증발시켜 박막을 제조하였다. 완전히 건조되어 층이 형성된 둥근 바닥 플라스크에 티올키토산 0.1%가 첨가된 PBS saline buffer (pH 7.4) 3 mL를 넣어 수화시켰다. 이를 초음파분산기 (Sonics & Material

Inc. USA)를 이용하여 4°C에서 90초 동안 초음파를 가하여 리포솜을 제조하였다.

**리포솜의 특성**

제조된 리포솜의 형태는 투과전자현미경 (TEM; JEM-200 FX II JEOL Ltd., Japan)으로 확인하였다. 제조된 리포솜의 입자크기 분포와 표면 전하는 입도분포측정기 (Zeta-PSA; OTUSUKA Electronics, Japan)를 이용하여 측정하였다. 문헌에 따라 시차주사열량계 (DSC; 2920, TA Instruments, Delaware, NC, USA)를 이용하여 리포솜에 함유된 EPA의 함량을 확인하였다 [14,15].

**in vivo 실험을 위한 혈청 분리**

DNCB 도포에 의한 아토피 발병을 확인한 후, 리포솜을 도포 처치하지 않은 마우스 (control)와 EPA가 없는 리포솜 (liposome) 및 EPA 함유 리포솜 (EPA-loaded liposome)의 세 군으로 나누어 실험하였다. 투여를 시작하기 전 날과 투여를 시작한지 7, 14, 21일 후에 실험동물로부터 혈액을 채취하였다. 모든 혈액 샘플은 마우스의 안와정맥총 (Orbital venous plexus)을 통하여 총 4회에 걸쳐 채취하였다. 마우스 안와정맥에서 heparinized capillary관을 이용하여 100 µL의 혈액을 채혈한 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 채취한 혈액은 10,000 rpm으로 15분간 원심분리를 하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -20°C에서 보관하였다.

**IgE, IL-4, IFN-γ, TNF-α 측정**

혈청 중 IgE 및 IL-4, IFN-γ, TNF-α 등의 농도 측정은 sandwich ELISA 법을 이용하여 측정하였다. 일차 항체가 코팅되어 있는 ELISA 용96 well plate kit (GenWay, Mouse IgE ELISA kit, 40-374-130049, R&D systems, Mouse IL-4 Immunoassay M4000B, Mouse IFN-γ Immunoassay MIF00, USA, Biosource, Mouse TNF-α ELISA kit, KMC3011, USA)를 사용하였다. 희석하여 준비해 놓은 표준시료와 샘플을 각각 100 µL/well 씩 분주하고, 상온에서 반응시켰다. 세척과정을 4회 반복한 후 Enzyme-Antibody conjugate를 각각의 well에 100 µL 씩 첨가하였다. 실온에서 다시 반응시키고 4회의 세척과정을 거쳐 TMB substrate solution을 100 µL 씩 첨가하여 10분 동안 어두운 실내에서 반응시켰다. 10분 후 각 well에 stop solution 100 µL 씩을 첨가한 후, ELISA Reader (BioTek, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계분석**

모든 실험 결과는 평균값 (mean)과 표준편차 (standard

deviation, SD)로 표시하였다. 각 Group 간의 통계적 검정에는 SPSS프로그램의 t-test를 이용하여 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**티올기 정량**

L-cystein hydrochloride hydrate를 표준물질로 사용하여 UV/VIS 스펙트럼으로 확인하였다. Ellman 시약의 흡광도가 가장 높은 470 nm를 기준 파장으로 정하여 티올 키토산의 흡광도를 측정한 후 키토산 내 티올기의 함량을 계산한 결과 약 1 wt%였다.

**리포솜의 특성**

EPA가 PC 리포솜의 형성에 미치는 영향을 TEM을 통해 관찰하고 Fig. 1에 나타내었다. 티올키토산에 의한 변형 없이 두 가지 경우 모두 양호 하게 리포솜이 형성된 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 EPA가 함유되지 않은 리포솜은 입자크기가 크며 불균일한 모양으로 관찰되었으며 (화살표), Fig. 1(b)는 EPA가 함유된 리포솜으로 입자의 크기는 EPA가 함유되지 않은 리포솜에 비해 작고 균일한 모습을 나타냈다. 입자들은 negative staining에 의해서 하얗게 보이는 구형으로 나타났다. 이는 EPA가 친유성이므로 EPA를 첨가하여 리포솜을 제조하면 입자크기가 더 작고 균일하게 되는 것으로 판단되었다. Zeta-PSA로 측정한 결과를 Table 2에 보였다. 평균 입자 크기는 각각 약 574.2 ± 10.8 nm와 231.8 ± 2.3 nm이었으며, 표면 전하는 약 -10.6 mV와 -23.33 mV이었다. EPA가 함유된 리포솜의 전하의 값이 두 배 이상 높은 결과를 나타냈고 더 균일한 분포를 가졌음을 확인할 수 있었다. 또한 DSC를 이용하여 리포솜 내의 EPA 함유율을 측정한 결과 리포솜 내의 EPA 함유량은 약 4.7%이었다.

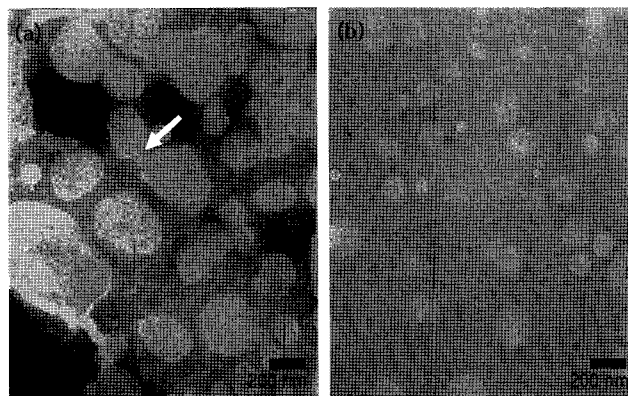


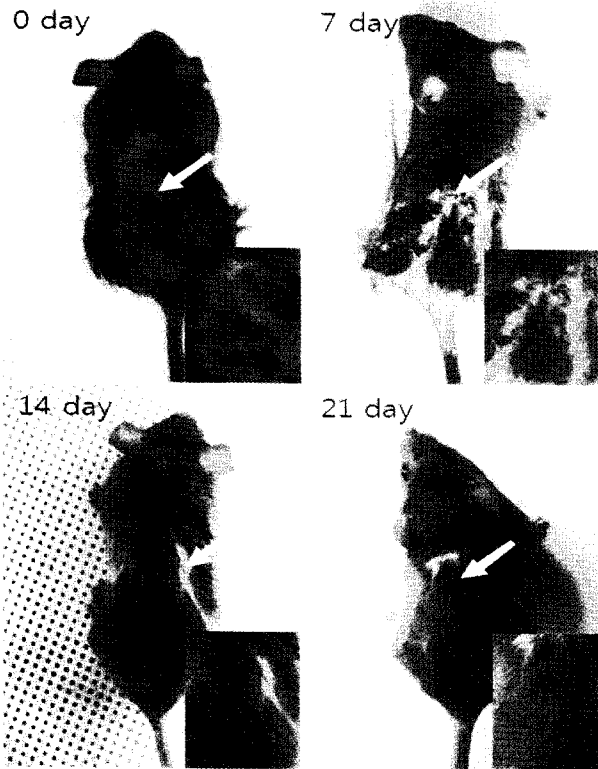
Fig. 1. TEM photograph of negatively stained liposomes (a) only thiol chitosan entrapped liposome, (b) thiol chitosan-EPA-liposome.

**Table 2.** Diameter and zeta potential of each liposome (Mean  $\pm$  SD)

Type of liposome	Mean diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Loading efficiency (%)
Liposome	574.2 $\pm$ 10.8	-10.6 $\pm$ 1.9	-
EPA-loaded liposome	231.8 $\pm$ 2.3	-23.3 $\pm$ 4.0	4.7%

**in vivo 실험 결과**

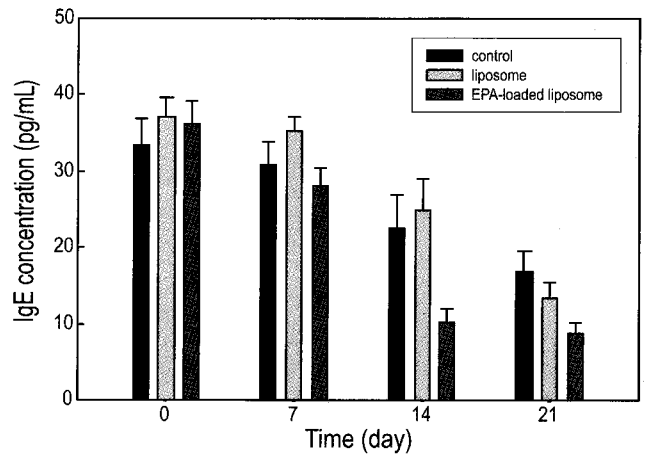
Fig. 2는 EPA 함유 리포솜을 도포 처치한 후 0, 7, 14, 21일에 마우스 피부 표면을 육안으로 관찰한 사진이다. 김 등 [16]의 연구와 같이 DNCB 처치로 인한 아토피 발병에 의해 마우스 피부 표면이 손상된 것을 확인할 수 있었다. 그 후 EPA 함유 리포솜의 도포 처치함에 따라 염증 부위에 털이 다시 나고 피부 손상이 개선되었다.



**Fig. 2.** Representative clinical skin features.

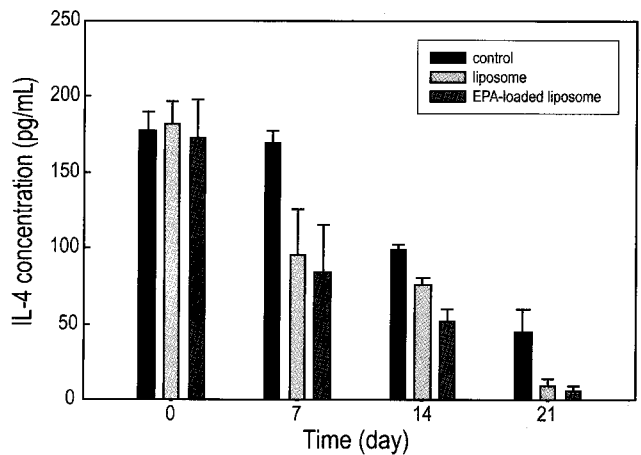
EPA 함유 리포솜의 성능을 평가하기 위해 혈청면역지표 (IgE, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )의 증감 정도를 측정하였다. Fig. 3은 ELISA 기법으로 마우스 혈중의 IgE 항체 농도를 측정된 결과이다. 아토피 발병으로 인해 증가되었던 IgE가 DNCB 도포 처치를 중지하였기에 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. Control군, liposome군의 IgE 항체 수준에 비해 EPA가 함유된 리포솜을 도포 처치한 실험군의 IgE 항체 농도가 더욱 가파르게 줄어들었다. 이와 같은 결과는 아토피 동물 모델인 NC/Nga 마우스와 아토피 피부염 환

자에서 혈청 IgE농도가 높게 측정된다는 Jujo 등의 연구 [17,18]와 일치한다. 이는 아토피 피부염이 발병된 마우스에 EPA를 투여하면 아토피 피부염에 대한 면역력이 증가한다는 것을 의미한다.

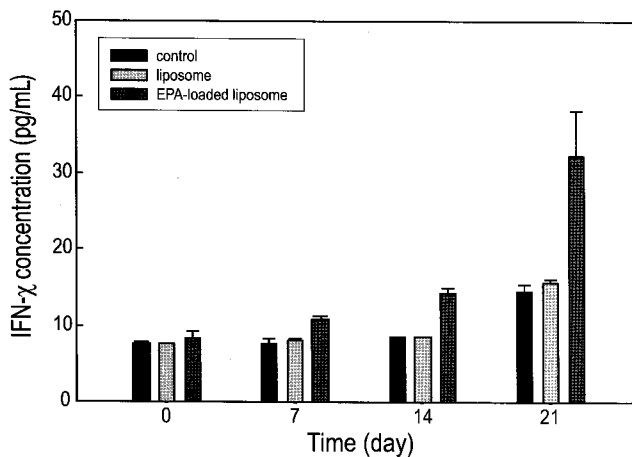


**Fig. 3.** Effect of the liposome on serum IgE level in mice. The data were obtained from the treatment of liposome for 3 weeks. Data were presented as means  $\pm$  SD.

Renz 등 [18,19]은 IL-4가 IgE의 생산을 유도하고 아토피 피부염의 진행과정에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Fig. 4에 나타난 혈중IL-4의 농도는 EPA 함유 리포솜의 도포 처치에 의해 IL-4가 감소됨을 보였다. IFN- $\gamma$ 는 IL-4에 의해 유도되는 IgE의 합성을 억제하는 작용을 하며 IFN- $\gamma$ 의 분비가 감소한 경우 아토피 피부염의 발생빈도가 높아지는 것으로 알려져 있다 [20]. Fig. 5는 마우스 혈중 IFN- $\gamma$ 의 농도를 측정된 결과이다. 아토피 발병으로 인해 감소되었던 IFN- $\gamma$ 가 시료처리에 의해 증가하였다. 아토피 발병으로 인해 낮아졌던 IFN- $\gamma$ 의 농도가 EPA 함유 리포솜을 처치함에 따라 EPA가 함유되지 않은 두 그룹에 비해 높아졌다.

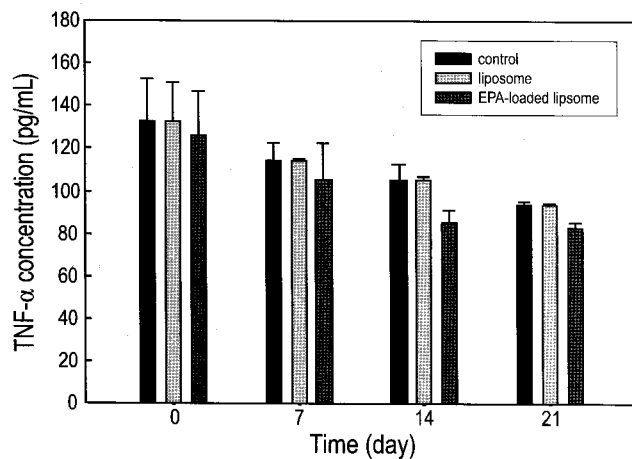


**Fig. 4.** Effect of the liposome on serum IL-4 level in mice. The data were obtained from the treatment of liposome for 3 weeks. Data were presented as means  $\pm$  SD.



**Fig. 5.** Effect of the liposome on serum IFN- $\gamma$  level in mice. The data were obtained from the treatment of liposome for 3 weeks. Data were presented as means  $\pm$  SD.

비만세포 (mast cell)의 분비물이 염증과 소양증을 유발하는 것 이외에 아토피피부염 피부의 표피증식을 유발할 수 있다고 알려져 있으며 비만세포에서 분비된 TNF- $\alpha$ 는 Th1세포의 증식을 억제한다고 알려져 있다. 실제로 아토피피부염 환자의 혈청에는 TNF- $\alpha$ 가 증가되어 있다 [21]. 아토피 발병으로 인해 증가되었던 마우스 혈중 TNF- $\alpha$  농도가 Fig. 6에 나타난 그래프와 같이 EPA 함유 리포솜을 처리함에 따라 감소하였다.



**Fig. 6.** Effect of the liposome on serum TNF- $\alpha$  level in mice. The data were obtained from the treatment of liposome for 3 weeks. Data were presented as means  $\pm$  SD.

아토피 면역특성으로 알려진 혈중 IgE 항체 농도는 상승하였고 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 값도 상승한 반면 IFN- $\gamma$ 값은 저하된다는 것을 확인하였으며, Table 3에 증감 정도를 나타내었다. 아토피 피부염은 IL-4에 의해 촉진되며, IFN- $\gamma$ 에 의해서는 억제된다는 보고가 있다 [22]. 이들의 상관관계를 IL-4 / IFN- $\gamma$ 를 통해 나타내었으며, 혈청 총 IgE 항체 값과 혈청 IL-4 / IFN- $\gamma$  비 사이에는 유의한 상관관계가 있었다.

본 실험 결과는 조 등 [22]의 아토피 환자에서의 IgE항체 생성 조절기전에 관한 연구결과와 같은 경향을 보였다.

**Table 3.** Weekly serum levels of IgE and cytokines in the experimental groups (Mean  $\pm$  SD)

		0 day	7 day	14 day	21 day
IgE	control	33.4 $\pm$ 3.5	30.9 $\pm$ 3.1	22.71 $\pm$ 4.2	16.9 $\pm$ 2.7
	liposome	37.2 $\pm$ 2.3	35.2 $\pm$ 1.8	24.9 $\pm$ 4.2	13.3 $\pm$ 2.2
	EPA liposome	36.3 $\pm$ 3.0	28.0 $\pm$ 2.3	10.2 $\pm$ 1.9	8.8 $\pm$ 1.3
IL-4	control	177.0 $\pm$ 13.2	169.2 $\pm$ 8.3	99.4 $\pm$ 2.7	45.2 $\pm$ 14.3
	liposome	182.4 $\pm$ 14.8	96.1 $\pm$ 29.5	75.6 $\pm$ 5.7	9.7 $\pm$ 4.7
	EPA liposome	172.8 $\pm$ 25.6	84.3 $\pm$ 30.5	51.9 $\pm$ 7.7	6.0 $\pm$ 3.2
IFN- $\gamma$	control	7.6 $\pm$ 0.2	7.7 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.1	14.5 $\pm$ 0.9
	liposome	7.6 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.4	8.5 $\pm$ 0.1	15.7 $\pm$ 0.4
	EPA liposome	8.4 $\pm$ 0.8	10.9 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 0.7	32.2 $\pm$ 6.2
TNF- $\alpha$	control	132.6 $\pm$ 25.7	114.5 $\pm$ 17.0	105.5 $\pm$ 12.2	93.9 $\pm$ 5.3
	liposome	138.5 $\pm$ 28.8	115.8 $\pm$ 12.5	95.5 $\pm$ 2.8	86.7 $\pm$ 3.5
	EPA liposome	126.2 $\pm$ 34.5	105.7 $\pm$ 22.4	85.9 $\pm$ 9.7	82.6 $\pm$ 3.8
IL4 / IFN- $\gamma$	control	23.3	21.97	11.69	3.1
	liposome	24	12.01	8.9	0.62
	EPA liposome	20.57	7.73	3.65	0.19

The data present the mean values  $\pm$  SD, n = 3, p < 0.01 by t-test.

### 결론

본 연구를 통해 EPA가 함유된 리포솜을 통해 아토피 피부염에 대한 면역 활성 증진효과를 규명하였다.

티올키토산으로 코팅된 리포솜과 EPA를 함유한 티올키토산 코팅 리포솜을 도포처리한 후 마우스 혈청을 채취하고 ELISA를 이용하여 IgE와 IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  농도를 측정하였다. EPA 함유 리포솜의 도포 결과에서 IgE, IL-4, TNF- $\alpha$ 의 감소와 IFN- $\gamma$ 의 증가는 아토피성 피부염의 개선에 대한 면역수치의 변화 결과로서 육안적 관찰과 부합한다. 이로부터 리포솜에 EPA를 함유시켜 피부에 도포하면 아토피 피부염에 대한 면역력을 증대시킬 수 있음을 알 수 있었다.

### 감사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과입니다. 또한 전남대학교 수의과대학 김성호 교수의 수의학적인 조언에 감사드립니다.

접수 : 2009년 12월 10일, 게재승인 : 2010년 1월 3일

### REFERENCES

1. Leng, D. Y. M., A. R. Rhodes, and R. S. Geha (2002) Atopic dermatitis. pp. 1464-1480. In: T. B. Fitzpatrick,

- I. M. Freedberg, A. Z. Eisen, K. Wolff, K. F. Austen, L. A. Goldsmith, S. I. Katz. *Dermatology in general medicine*. 5th ed., McGraw-Hill Book, New York, USA.
2. Ring, J., T. Bieber, D. Vieluf, B. Kunz, and B. Przybilla (1991) Atopic eczema Langerhans cells and allergy. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 94: 194-201.
3. Heusser, C. and P. Jardieu (1997) Therapeutic potential of anti-IgE antibodies. *Current opinion in Immunology* 9: 805-814.
4. Bos, J. D. and J. H. Sillevius Smitt (1996) Atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 7: 101-114.
5. Borsonelo, E. C. and J. C. F. Galduroz (2008) The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 78: 237-245.
6. Weldon, S. M., A. C. Mullen, C. E. Loscher, L. A. Hurley, and H. M. Roche (2007) Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18: 250-258.
7. Jin, B. S. and S. H. Han (2002) Preparation and stability of Sonicated Liposome with Phospholipid Mixture. *Dongduk Journal of Life Science Studies*. 7: 134-139.
8. Cho, E. C., H. J. Lim, J. W. Shim, J. O. Kim, and I. S. Chang (2007) Improved stability of liposome in oil/water emulsion by association of amphiphilic polymer with liposome and its effect on bioactive skin permeation. *Colloid and Surfaces*. 299: 160-168.
9. Borchard, G., H. L. Lueben, A. G. Boer, J. C. Verhoef, C. M. Leur, and H. E. Junginger (1996) The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions *in vitro*. *Journal of Controlled Release*. 39: 131-138.
10. Margit, D. H., E. K. Constantia, and B. S. Andreas (2003) *In vitro* evaluation of the viscoelastic properties of chitosan-thioglycolic acid conjugates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 55: 185-190.
11. Osuna, I., D. Teutonico, S. Arpicco, C. Vauthier, and G. Ponchel (2007) Characterization of chitosan thiolation and application to thiol quaternization onto nanoparticle surface. *International Journal of Pharmaceutics*. 340: 173-181.
12. Mills, L. B., L. J. Mordan, H. L. Roth, E. E. Winger, and W. L. Epstein (2000) Treatment of severe atopic dermatitis by topical immune modulation using dinitrochlorobenzene. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 42: 687-689.
13. Kast, C. E. and B. S. Andreas (2001) Thiolated polymers-Thiolmers: development and *in vitro* evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*. 22: 2345-2352.
14. Layre, A., R. Gref, J. Richard, D. Requier, H. Chacun, M. Appel, A. J. Domb, and P. Couvreur (2005) Nanoencapsulation of a crystalline drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 298: 323-327.
15. Schubring, R. (2009) Crystallisation and melting behaviour of fish oil measured by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 95: 823-830.
16. Kim, D. H., K. J. Lee, X. F. Qi, Y. M. Lee, Y. S. Yoon, J. L. Kim, B. S. Chang, and Y. S. Ryang (2008) The effects of magnesium rich sea mineral water on atopic dermatitis-like skin lesions in hairless mice. *Korean Journal of Microscopy*. 38: 167-174.
17. Grewe, M., C. A. B. Koomen, E. Schopf, T. Thepen, A. G. L. Wildschut, T. Ruzicka, and J. Krutmann (1998) A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunology Today*. 19: 359-361.
18. Jujo, K., H. Renz, J. Abe, E. W. Gelfand, and D. Y. Leung (1992) Decreased interferon  $\gamma$  and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 90: 323-331.
19. Renz, H., K. Jujo, J. Bradley, J. Dementico, E. W. Gelfand, and D. V. Leung (1992) Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon- $\gamma$ . *Journal of Investigative Dermatology*. 99: 403-408.
20. Hong, S., J. Y. Shim, J. K. Park, B. Yoo, and H. B. Moon (1997) Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells from atopic asthmatics. *Korean Journal of Allergy*. 17: 307-315.
21. Park, S. N., H. S. Jeong, and J. Y. Lee (2004) Effect of sopolungsan in BALB/C mouse model of atopic dermatitis. *Journal of Kyung Hee University Medical Center*. 20: 129-141.
22. Cho, S. H., S. H. Song, Y. K. Kim, Y. K. Jee, and Y. Y. Kim (1995) Regulation of IgE production in patients with atopic disease: Imbalance of IL-4 and IFN- $\gamma$  production. *Journal of Allergy*. 15: 205-215.