

Analysis of Anti-Allergic Activities by Chaff Vinegar Liquor

Sang-Han Lee*

Food & Bio-Industry Research Institute, and Department of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received February 4, 2010 / Accepted May 17, 2010

To evaluate whether chaff vinegar liquor (CVL) has potential in ameliorating allergic symptoms in mice, we tested the anti-allergic activities with a DNFB (dinitrofluorobenzene)-induced allergic mouse model. The DNFB-induced allergic symptoms were reduced by 20% compared to the control by chaff vinegar liquor supplemented with *Perilla frutescens* var. *acuta*. Allergic symptoms were examined by measuring the width of epidermis swelling. The hematoxyline & eosin (H&E) staining also revealed that the chaff vinegar liquor dramatically decreased the allergic symptoms in the epidermis of the ear. These results collectively suggest that the chaff vinegar liquor supplemented with *P. frutescens* var. *acuta* has potential in ameliorating allergic symptoms, showing that the liquor could be a useful bio-material(s) for the nutraceutical or cosmetic industries.

Key words : Allergy, chaff, liquor, *Perilla frutescens* var. *acuta*, extraction

서 론

Allergy란 선천적 또는 후천적으로 면역기능의 현상으로서, allergen이라 불리는 외부 물질과의 접촉에 의하여 발생하는 과민한 반응을 나타내는 것으로, 이에 대한 질환으로는 anaphylaxis, allergic rhinitis, asthma, atopic dermatitis, 곤충 allergy, 식품 allergy, 약물 allergy 및 두드러기(urticaria) 등이 있다[9,13]. Dinitrofluorobenzene (DNFB)는 지연형 접촉성 피부염을 일으키는 대표적인 물질로 DNFB의 반복 노출 시 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 매개성 염증세포의 침윤(infiltration)에 의한 피부 부종과 피부 조직의 비후가 초래되는 것으로 알려져 있으며, DNFB 유발 접촉성 피부염 동물모델은 현재 가장 널리 이용되고 있는 allergy 동물 모델 중 하나이다[1,7]. Allergen이 IgE에 의해 인식되면 Langerhans cell 표면 IgE 부착 Fc수용체에 부착되어 T림프구에 항원을 전달함으로써 T림프구가 활성화되게 된다. 다른 피부질환과 달리 아토피 피부염의 피부병변에 침윤되는 염증세포는 주로 Th2세포로서 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 과다하게 생성하여 혈중 IgE의 상승을 촉진하고 eosinophil의 증가를 유도하며, cAMP phosphodiesterase가 상승되어 있는 아토피 피부염의 비정상적인 monocyte에 의해 prostaglandin E의 생성이 증가하게 되고, 이로 인해 Th1 림프구의 침윤이 억제된다. 또한 Th1 림프구는 아토피 피부염에서 쉽게 활성화되는 spleen cell로부터 유리된 TNF (tumor necrosis factor)에 의해서도 억제된다. 결국 아토피 피부염에서 Th1 증식을 억제하고, 세포매개성 면역

의 저하를 초래한다. 각종 사이토카인(cytokines)은 혈관 내피 세포를 활성화하여 여러 세포유착분자의 발현을 유도하거나 증가시켜 기억 T림프구의 복귀를 촉진시킴으로써 습진성 병변을 유발한다[3].

왕겨는 벼의 껍질로, 쌀 가공과정에서 생겨나는 가장 많은 양의 부산물로서 벼 중량의 20%를 차지한다. 국내 왕겨 생산량은 2007년 기준으로 보면, 연간 약 120만톤의 왕겨가 생산이 되고 있으며, 주로 에너지원으로서 적당한 특성을 가지고 있지만, 폐기물로 분류되어 있는 실정이다. 왕겨의 내피나 외피는 구조로 치밀하게 피복되어 있어서 부식이나 소화 효율이 낮기 때문에 퇴비나 가축의 사료로는 부적합한 것으로 알려져 있다. 이러한 왕겨의 주요 구성성분은 탄수화물이 27~30%, 조섬유질 35~46%, 조회분 13~21%, 조단백 2~3% 그리고 조지방 0.3~0.8% 정도로 들어 있으며, 조회분의 주성분은 구조로 알려져 있다 [8]. 이와 같은 특성을 지닌 왕겨는 다른 용도도 없고 마땅한 처리방법도 없어서 왕겨의 합리적인 이용 및 폐기물을 이용하여 고부가가치화는 농가의 소득증진에도 매우 의미가 있다.

이에 본 연구는 이 왕겨를 재료로 하여 제조된 왕겨 증류액이 DNCB에 의해 유발되는 접촉성 피부염 allergy 질환 동물 모델에 적용하였을 때, 환부조직에서 allergy 반응의 주된 항체인 IgE의 생성을 억제하고, 진피, 상피 및 피부의 전체 두께를 감소시킴을 확인함으로써, anti-allergy 효과를 확인하였으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

왕겨초 증류액(CVL) 제조

본 실험에 사용한 왕겨초 증류액(chaff vinegar liquor;

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-7754, Fax : +82-53-950-6772

E-mail : sang@knu.ac.kr

CVL)은 다음과 같이 제조하였다. 먼저, 산산 미곡종합처리장으로부터 제공받은 왕겨 400 kg을 탄화기(DCH-600, 대원GSI)를 사용하여 직화식 탄화법에 의하여 왕겨초 증류액을 포집하고, 왕겨를 500°C에서, 60분 동안 탄화 처리한 뒤, 상기 탄화 처리 중에 배출되는 연기를 응축시켜 조왕겨초 증류액(80 kg, 20%)을 얻었으며, 이 조왕겨초 증류액을 감압하여 50°C의 온도에서 왕겨초 증류액(CVL) 50 kg을 수득하였다. 왕겨초 증류액(CVL)은 식염수를 사용하여 1/10 농도로 희석하여 사용하였으며[12], 산썩과 자소엽은 2% 농도로 첨가하였는데 이는 왕겨초액 특유의 이취를 제거할 목적으로 첨가하였다. 대조군은 식염수를 사용하였다.

실험동물 준비 및 관리

6주령 된 C57B/L 마우스를 샘타코(주)에서 공급받아 마우스용 케이지 (220×200×145 mm)에 넣어 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용하였다. 동물실험실의 환경은 온도 22°C (2°C 오차), 상대습도 55% (5% 오차), 환기횟수 12 회/시간, 조명주기 12시간, 조도 200 lux로 조절되었다. 실험동물용 pellet형 고형 사료인 Purina Rat Chow를 Nestle Purina PetCare Korea Ltd. (Seoul, Korea)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다[5].

접촉성 피부염(아토피) 실험

Allergy 반응 억제효과를 측정하기 위해서, 다음과 같은 실험동물의 care하에서 수행하였다[11]. 사육한 마우스는 제모제를 충분히 사용하여 등 부위를 넓게 제모하고 24시간 후 올리브 오일과 아세톤을 3:1로 배합한 용액에 0.5%의 농도로 조제한 DNFB 100 ul를 취하여 처음 3일은 sensitization을 위하여 매일 동일한 시간에 도포하여 피부염을 유발하였다. 이후 DNFB는 0.2%로 농도를 조정하여 100 ul 씩 취하여, 왕겨초 증류액(CVL) 혹은 식염수(대조군)와 동시에 2주 동안 격일로 동일한 시간에 도포하였다. 2주 후, 실험 24시간 전부터 절식시키고 가벼운 에테르 마취상태에서 복개 후 심장에서 혈액을 채취하고, 간과 피부조직을 적출하여 중량을 측정 후 냉동보관하였다. 귀의 피부조직은 절개하여 포르말린에 고정시키고 H&E 염색을 수행하였다[4].

통계학적 분석

실험결과에 대하여 one-way analysis of variance, ANOVA를 실시하여 유의차가 5% 미만($p < 0.05$)일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다[2].

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 재료는 왕겨를 직화식 탄화에 의하여 왕겨초 증류액을 얻었으며, 이를 사용하여 다음과 같은 동물실험

험을 통하여 접촉성 피부염 활성을 예비검증하였다. 본 실험에 사용한 동물은 외부의 allergen으로서 DNFB를 처리한 마우스로서 피부조직에서 조직병리학적 염색과 피부 중 가장 민감한 귀의 표피의 부종(swelling)의 감소를 측정하는 것으로 접촉성 피부염 효과를 확인하였다.

DNFB는 지연형 접촉성 피부염을 일으키는 전형적인 물질로 DNFB의 반복 노출 시, CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포 매개성 염증세포의 침윤(infiltration)에 의한 피부 부종과 피부 조직의 비후가 초래되는 것으로 알려져 있으며, DNFB 유발 접촉성 피부염 동물모델은 현재 가장 널리 이용되고 있는 실험동물 모델 중 하나이다[1,7]. 조직학적으로 현저한 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 비후가 관찰되는 것으로 알려져 있으나 [6], 본 실험에서는 염증세포의 침윤은 비교적 약하게 일어난 반면, 현저한 상피층(epidermis)의 비후로 인한 피부 두께의 증가가 관찰되었다. 한편, C57B/L 마우스는 외부의 화학물질에 의한 아토피 완화의 유도가 잘 알려져 있으며 [10], 본 실험의 결과에서도 피부상피 두께가 대조구에 비교하여 7.8배 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 한편 마우스의 등 부위에 일차적인 감각화로 접촉성 피부염이 유발되지만(data not shown), 재감작에 의하여 보다 확실한 차이를 얻을 수 있었다. 재감작은 귀 부위를 선택하였으며 이 경우에는 비교적 약한 농도의 0.2% DNFB로 재감작시켰고, 재감작 후, 격일로 2주간 CVL 또는 산썩과 자소엽 처리의 CVL 추출물을 처리하였다. 그 결과, 아주 흥미롭게도 DNFB 처리에 의해 상피, 진피 및 피부 전체 두께가 현저하게 감소하였다(data not shown). 특히 상피의 두께는 여러 가지 진피 내부의 면역세포가 표피로 이동하여 이들 표피의 두께의 비후정도가 상이하게 되므로 이의 두께 정도를 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 접촉성 피부염 유발군보다 1차 왕겨초액 처리군에서는 약 20%의 수준으로 급격하게 감소하였다. 왕겨초액은 그 특유의 이취가 특이하므로 이를 제거하고자 스크리닝을 수행하여 산썩과 자소엽을 첨가한 왕겨초액의 향알리지 활성도 동시에 확인하여 보았다. 그 결과, 산썩은 효과가 없었으나 자소엽은 활성도 있으며(대조군의 약 18% 수준), 자소엽의 첨가로 인한 masking 효과는 이들을 이용한 향장소재 개발시 매우 유용한 자료로 사용될 수 있다고 판단된다.

Fig. 1의 결과를 바탕으로 피부상피를 직접 조직염색학적인 소견을 살펴 본 바, Fig. 2에서 보는 바와 같이 접촉성 피부염 유발군에서는 상피조직의 비후정도가 현저히 발달되어 있었으나 CVL 등 몇 가지 샘플 처리로 인하여 이의 비후정도가 상당 수준 감소함을 알 수 있었다(약 18-31%). 이 표본에서 직접 eosinophil의 수적 감소 여부를 살펴 본 결과도 표피의 비후정도가 감소하는 것과 상당히 유사함을 알 수 있었다(data not shown).

이상의 결과로서 본 왕겨초액의 증류액 CVL 및 산썩이나 자소엽 처리액은 DNFB 처리에 의한 마우스에서의 접촉성 피

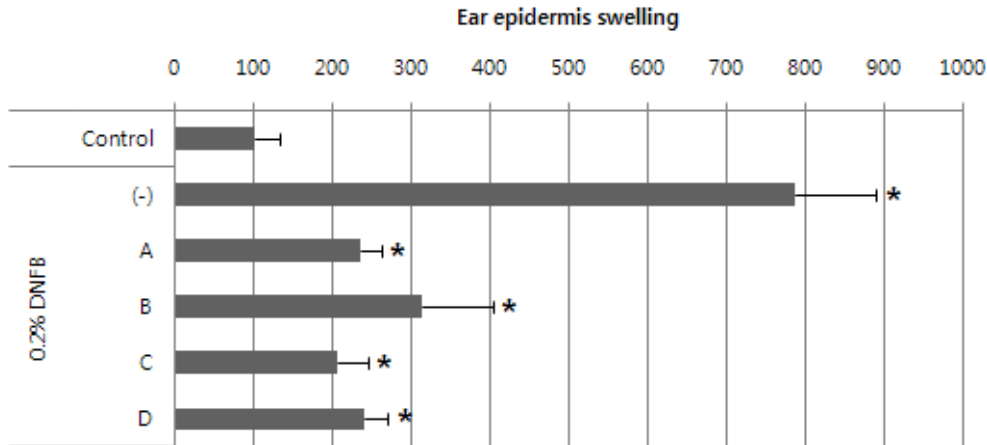


Fig. 1. Amelioration of the ear epidermis swelling by chaff vinegar liquor in a DNFB-induced allergic mouse model. DNFB (100 ul of 0.5% DNCB/dorsal area) was spread on the back of each mouse per day for 3 days in order to induce allergic sensitization. Resensitization was carried out to induce allergic responses with DNFB (100 ul of 0.2 %), and treated to mice with (A-D) or without (NT, and -) chaff vinegar liquor on every 2 days for 2 weeks. NT, not treated; -, 0.2% DNFB alone; A, 1st purified chaff vinegar liquor; B, 1st purified chaff vinegar liquor supplemented with of *Artemisia montana* Pampan; C, 1st purified chaff vinegar liquor supplemented with of *Perilla frutescens* var. *acuta*; D, 2nd purified chaff vinegar liquor. Data denote the mean±SD. *, $p < 0.05$ compared with 0.2% DNFB alone.

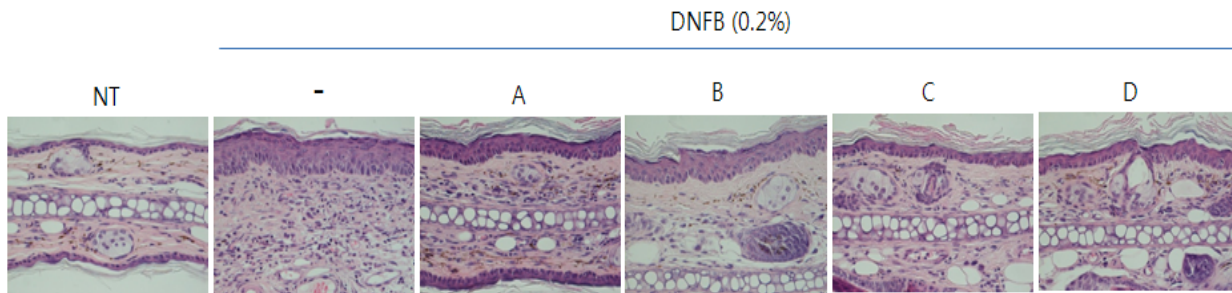


Fig. 2. Histochemical analysis of skin epidermis by chaff vinegar liquor treatment. DNFB (100 ul of 0.5% DNCB/dorsal area) was treated as shown in Fig. 1. H&E staining was carried out as shown in Materials and method section. NT, not treated; -, 0.2% DNFB alone; A, 1st purified chaff vinegar liquor; B, 1st purified chaff vinegar liquor supplemented with of *Artemisia montana* Pampan; C, 1st purified chaff vinegar liquor supplemented with of *Perilla frutescens* var. *acuta*; D, 2nd purified chaff vinegar liquor. Data was represented with a classical observation of the three samples.

부염 반응을 효과적으로 완화시켜 주는 효과를 확인할 수 있었다. 향후 접촉성 피부염에 관련된 cytokine (IL-4, IL-13, IL-25 등)이나 CCL7 등 chemotactic factors의 발현여부와 matrix metalloproteinase (MMPs)-2, -3, -9의 발현에 대한 mRNA 수준에서의 양적변화에 대한 비교실험의 결과는 왕겨초액을 이용한 향장소재화에 도움이 되리라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 지경부 지역산업 선도기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사드립니다. 본 연구에 여러 가지 자료의 분석을 지원하여 준 허진철박사와 왕겨초액의 시료를

제공하여 준 대원GSI(주)에 감사드립니다.

References

1. Bergstresser, P. R. 1989. Sensitization and elicitation of inflammation in contact dermatitis. *Immunol. Ser.* **46**, 219-245.
2. Falkeholm, L., C. A. Grant, A. Magnusson, and E. Moller. 2001. Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. *Lab Invest.* **81**, 1213-1221.
3. Gantner, F., H. Tenor, V. Gekeler, C. Schudt, A. Wendel, and A. Hatzelmann. 1997. Phosphodiesterase profiles of highly purified human peripheral blood leukocyte populations from normal and atopic individuals: a comparative

- study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 527-535.
4. Heo, J. C., J. R. Rho, T. H. Kim, S. Y. Kim, and S. H. Lee. 2008. An aqueous extract of green tea *Camellia sinensis* increases expression of Th1 cell-specific anti-asthmatic markers. *Int. J. Mol. Med.* **22**, 763-768.
 5. Hwang, Y. K., J. S. Chun, P. D. Yoo, J. Y. Ma, B. H. Hyun, S. U. Kim, K. T. Chang, and S. H. Lee. 2004. Occlusal reduction of unilateral molars influences change of stress-related hormones in rats. *Scand. J. Lab. Animal Sci.* **31**, 73-77.
 6. Jörundsson, E., C. M. Press, M. Ulvund, and T. Landsverk. 1999. Prominence of gammadelta T cells in the elicitation phase of dinitrochlorobenzene-induced contact hypersensitivity in lambs. *Vet. Pathol.* **36**, 42-50.
 7. Kimber, I., J. S. Pichowski, C. J. Betts, M. Cumberbatch, D. A. Basketter, and R. J. Dearman. 2001. Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicol. In Vitro* **15**, 307-312.
 8. Meng, F., Y. Wei, and X. Yang. 2005. Iron content and bio-availability in rice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **18**, 333-338.
 9. Miller, J. S. and L. B. Schwartz. 1989. Human mast cell proteases and mast cell heterogeneity. *Curr. Opin. Immunol.* **1**, 637-642.
 10. Morioka, Y., K. Yamasaki, D. Leung, and R. L. Gallo. 2008. Cathelicidin antimicrobial peptides inhibit hyaluronan-induced cytokine release and modulate chronic allergic dermatitis. *J. Immunol.* **181**, 3915-3922.
 11. Pokharel, Y. R., S. C. Lim, S. C. Kim, T. H. Heo, H. K. Choi, and K. W. Kang. 2008. Sopungyangjae-tang inhibits development of dermatitis in Nc/Nga mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* **5**, 173-180.
 12. Seo, Y. K., I. K. Lee, and S. H. Kim. 2009. Chaff-vinegar liquor exhibiting anti-allergic activities and compositions thereof. Korea Patent 10-0931529.
 13. Wuthrich, B. 1989. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **90**, 3-10.

초록 : 왕겨초액의 추출물에 의한 아토피 완화 효과 비교

이 상 한*

(경북대학교 식품생물산업연구소 및 식품공학과)

왕겨를 증류하여 생성된 왕겨초 증류액을 이용하여 접촉성 피부염에 어떤 영향이 있는지를 검토하였다. 왕겨초 증류액(2%)에 자소엽을 첨가한 샘플은 dinitrochlorobenzene에 의해 유발된 접촉성 피부염 질환 동물모델에서 피부상피조직의 비후정도를 약 20%정도의 수준으로 완화시키며, 이는 면역조직화학적 방법으로 확인하였다. 이 결과로, 왕겨초 증류액은 아토피 완화 효과를 가지므로 이들의 적합한 조건을 확립한다면 향장소재 또는 이의 조성물로 유용하게 이용될 수 있다고 판단된다.