

항 아토피 화장품이 아토피 동물모델 Hairless Mice에 미치는 영향

권택관 · 임건빈* · 김진철†

강원대학교 바이오산업공학부 생물소재공학전공, *화인코주식회사
(2010년 11월 8일 접수, 2010년 11월 24일 채택)

The Effect of Anti-atopic Cosmetic in Hairless Mice

Taek Kwan Kwon, Kun Bin Lim*, and Jin-Chul Kim†

Division of Biotechnology & Bioengineering and Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University,
Kangwon-do 200-701, Korea

*FineCo Ltd., Bio Venture Plaza, Kangwon-do 200-160, Korea
(Received November 8, 2010; Accepted November 24, 2010)

이 연구는 아토피 피부염이 유발된 hairless mice에 항 아토피 제품 처리를 통해 아토피 증상 개선 효과에 대해 알아본 실험이다. 항 아토피 물질인 ceramide와 astaxanthin을 melt-homogenization 방법을 이용해 고형 지질 나노입자를 제조하고 입자 주위에 silk fibroin을 코팅시켰다. 동시에 고형 지질 나노입자를 함유하는 항 아토피 로션(lotion)과 크림(cream)을 만들어 타 사의 항 아토피 제품과 비교하였다. 아토피 피부염이 유발된 마우스의 외형적인 모습 관찰을 통해 ceramide와 silk fibroin을 함유한 항 아토피 제품인 FL과 FC는 아토피 피부염으로 손상된 피부 장벽을 재생 시키는 것을 확인하였고, 아토피 피부염이 유발된 피부 두께 역시 감소됨을 알 수 있었다. 면역학적 평가를 통해 silk fibroin과 astaxanthin 이 Th2 cytokine인 IgE와 IL-4의 발현을 억제하고 IFN- γ 의 발현을 증가시켜 Th cell 사이의 균형을 이루게 하는 것이 밝혀졌다. 또한, 비장수치를 통해 T 림프구의 따른 IgE, IL-4 발현 억제능, 그리고 IFN- γ 발현을 확인하였다.

The efficacies of anti-atopic preparations were investigated in hairless mice suffering from 2,4-dinitro-chlorobenzene (DNCB)-induced atopic dermatitis-like lesion. Solid lipid nanoparticle (SLN) containing ceramide and astaxanthin was prepared by a melt-homogenization method using Aminsoft-CT 12 (Cocoyl glutamate) as an emulsifier. And then, the SLNs were coated with silk fibroin (SF) by taking advantage of an electrostatic interaction between the surface of SLNs and SF. SLNs were included in lotion (FL) and cream (FC) types of preparations. Anti-atopic efficacies of the preparations were investigated in terms of appearance of skin surface, spleen index, serum IgE level, and serum cytokine level. SLN-containing preparations suppressed IgE production and IL-4 expression, but promoted IFN- γ expression.

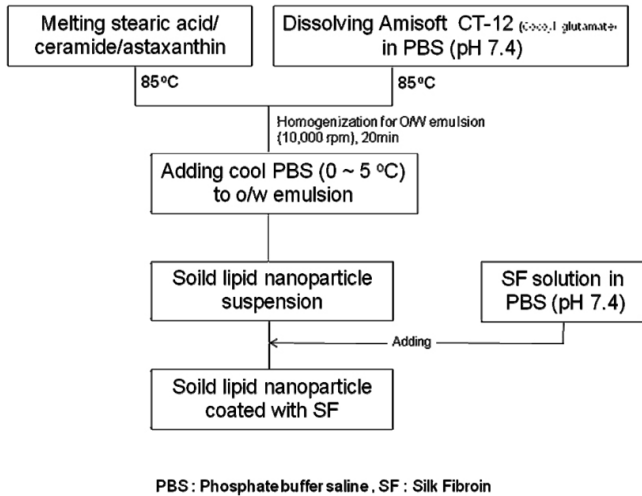
Keywords: ceramide, astaxanthin, atopic dermatitis (AD), immunoglobulin E, cytokine

1. 서 론

아토피 피부염은 심한 가려움증과 피부 건조증 등을 동반하는 재발성, 만성적 알레르기 습진을 말한다. 아토피는 혈액 내에서 높은 IgE 발현량과 호산구의 증가와 같은 특징을 가진다[1-3]. 최근 아토피 피부염은 전체인구의 약 10~20%에게서 발병하고 있는 것으로 추산되고 있으나, 완치시킬 수 있는 뚜렷한 치료법이 없는 실정이다. 아토피 피부염은 T 림프구의 활성화, cytokine 체계의 이상 세포 매개성 면역의 감소, IgE의 증가와 같은 면역학적 이상과 생리학적 요인 그리고 피부의 생화학적 결함과 같은 많은 요소로 인해 야기된다[4]. 이전의 연구를 통해 아토피 피부염은 IFN- γ 에 대한 IL-4의 비율의 증가 때문이라고 정의하였다[5]. 또한 아토피 피부염 환자의 단핵세포에서 정상적인 사람에 비해 IL-4, IL-5 그리고 IL-13과 같은 cytokine을 많이

생성한다[6]. 아토피 피부염은 피부의 수화를 감소시키고, 인설, 가피, 태선화와 같은 거친 피부를 가진다[7]. Ceramide는 피부 각질층을 구성하는 각질 세포 간 지질 중 40%를 차지하며, 수분 증발을 억제하는 지질 방어벽 역할과 각질층의 정연한 구조를 유지하게 하는 기능을 가지고 있다[8]. 아토피 피부염은 피부 표면의 장벽기능이 허물어져 외부 알레르겐이 피부 속으로 들어와 전신으로 알레르기를 일으킨다. 이러한 아토피 피부염에 ceramide는 피부의 각질층을 보호함과 동시에 피부의 수분기능을 유지하면서 항 아토피 작용을 한다고 알려져 있다[9]. Astaxanthin은 카로티노이드계 색소로 주로 붉은색을 띄며 주로 새우, 게 등의 갑각류를 비롯하여 수생동물에 널리 분포한다[10]. 이전 연구를 통해 astaxanthin은 지질 과산화억제 효능이 뛰어나 β -carotene, rutin, zeaxanthin보다 강하고 vit. E의 활성과 비교해서 100배 이상으로 알려져 있다[11]. 이와 같이 탁월한 항산화능과 항염증 작용으로 인해 아토피 피부염 치료개선에 효과적인 것으로 알려져 있다[12]. 아토피 피부염 증상 완화를 위해 여러 가지 치료 보조제가 가

† 교신저자(e-mail: jinkim@kangwon.ac.kr)



Scheme 1. Schematic representation of melt-homogenization method.

발, 판매되고 있으나 항아토피 성분과 같은 생리활성 물질은 보통 화학적으로 불안정하고 생체 이용률이 낮다는 단점이 있다. 그래서 항아토피 물질을 빛, 산소, 수분, pH 등의 외부환경으로부터 보호함으로써 유효성분의 파괴 및 손실을 예방하고 안정성을 향상시킬 수 있는 제형의 필요성이 대두되었다[13].

본 논문에서는 생체 적합성이 우수한 지방산인 stearic acid를 이용한 고흥 지질 나노입자를 이용해 항아토피 물질성분인 ceramide와 astaxanthin을 함유 하였으며, 입자 주위에 silk fibroin의 코팅을 통해 피부 재생력과 적합성을 향상시켰다. 동시에 silk fibroin이 코팅된 고흥 지질 나노입자를 함유한 항아토피 로션(lotion), 크림(cream) 제품을 개발하였다. 이와 같이 개발된 항아토피 제품의 효능 평가를 위해 타사의 아토피 제품과 함께 아토피 피부염을 유발시킨 마우스 모델에 처리함으로써 아토피 피부염 증상에 대한 개선 효과를 외형적인 관찰과 면역학적 지표(IgE, IL-4 IFN- γ) 측정을 통해 평가하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시약

지방산(stearic acid)과 아토피 피부염 유발을 촉진시키기 위해 사용한 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)는 sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ceramide (N-Oleoyl-phytosphingosine, Contents > 90% by HPLC), astaxanthin 그리고 silk fibroin은 화인코(주)(강원도 춘천시 후평동, 대한민국)에서 제공받았다. 면역 실험에 사용된 시약 중 monoclonal 항체는 ID Labs Inc. (Ontario Canada)에서 구입하였으며, IgE와 관련된 항체들과 biosource international (Comarillo, CA, USA)에서 구입하였다. IL-4, IFN- γ 와 관련된 항체들은 ID Labs Inc.에서, IL-4, IFN- γ 와 관련된 시약은 Kirkegaard Perry Laboratory, Inc. (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 항 아토피 제품은 시중 약국에서 구입하였으며 phosphate buffered saline (PBS)은 Bio-Rad Laboratories, Inc. (California, USA)에서 구입하였다.

2.2. 항 아토피 물질을 함유한 고흥 나노입자 제조

항아토피 효능을 나타내는 ceramide와 astaxanthin을 포집시키기 위해 stearic acid 고흥 지질 나노입자(Solid lipid nanoparticle, SLN)를 제조하였다(Scheme 1)[14].

2.3. 항 아토피 화장품 제조

Silk fibroin이 코팅된 고흥 지질 나노입자를 함유한 로션과 크림, 제품의 제조방법을 다음과 같다. 로션제품 제조를 위해 수상인 보습제인 glycerin과 water 그리고 점증제로서 xanthan gum (2% solution)을 혼합하여 75~80 °C에서 용해하였다. 다음 오일상인 cetyl alcohol 지방산과 oil류인 squalane, medowfoam seed oil을 혼합하여 75~80 °C에서 용해하였다. 수상을 homogenizer로 5000 rpm으로 교반 하면서 오일상을 서서히 가하고 7 min 간 유희를 시켰다. 45 °C에서 천연 추출물인 grapefruit ext., ginseng ext., ginkgo ext., 그리고 silk fibroin이 코팅된 고흥 지질 나노입자를 첨가하고 냉각을 시켜 제조하였다. 크림 제품 제조를 위해 로션 수상에서 보습제인 glycerin과 정제수로 Water 그리고 점증제로서 xanthan gum (2% solution), algine을 혼합하여 75~80 °C에서 용해하였다. 동일한 방법으로 오일상인 cetyl alcohol 지방산과 oil류인 squalane, jojoba oil을 마지막으로 왁스류인 bees wax를 혼합하여 75~80 °C에서 용해하였다. 수상을 homogenizer로 5000 rpm으로 교반하면서 오일상을 서서히 가하고 7 min 간 유희를 시켰다. 45 °C에서 천연 추출물인 aloe vera gel, green tea., ginseng ext., 그리고 silk fibroin이 코팅된 고흥 지질 나노입자를 첨가하고 냉각을 시켜 제조하였다.

2.4. 실험동물

본 실험에서 사용한 실험동물은 6 주령된 암컷 hairless mice (26 ± 2 g)로, 오리엔트바이오(주)(Sungnam, Korea)에서 공급받아 실험동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 중 사료와 물은 자유로이 섭취시켰으며 사육실의 온도는(22 ± 2 °C), 상대 습도(55 ± 5%)와 명암은 12 h 주기를 유지하였다. 실험 시작일 하루 전 실험동물의 귀 부분에 ear punch를 통해 실험군 마다 표지를 시켰다. 이 동물실험은 국립수의과학 검역원의 동물실험지침에 의거하여 수행되었다.

2.5. 시료 준비

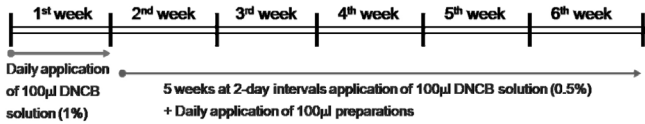
실험에서 사용한 아토피 유발 시약인 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)를 1%와 0.5%의 농도가 되도록 acetone에 용해하여 제조하였다[15]. 대조군으로서 N사에서 판매중인 항 아토피 크림(NC)과 B사에서 판매중인 항아토피 크림(BC), 화인코(주)에서 만든 항아토피 로션(FL), 항아토피 크림(FC)을 사용하였고 마지막으로 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS)은 pH 7.4로 유지하였다.

2.6. 아토피 피부염 유발 및 시료처리

모든 동물군에는 자유로운 식이와 식수를 제공하였다. 실험동물은 총 28마리를 사용하였으며 7군으로 나누어 각 실험군을 4마리씩 cage에 배정하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상군 4마리, DNCB를 도포한 대조군 4마리, DNCB를 도포하며 인산완충용액(pH 7.4) 100 μ L를 처리한 실험군 4마리, DNCB를 도포하며 NC를 100 μ L 처리한 실험군 4마리, DNCB를 도포하며 BC를 100 μ L 처리한 실험군 4마리, DNCB를 도포하며 FL를 100 μ L 처리한 실험군 4마리, DNCB를 도포하며 FC를 100 μ L 처리한 실험군 4마리를 사용하였다. 아토피 피부염 유발은 다음과 같은 실험과정을 따라 시행하였다(Scheme 2).

2.6.1. 아토피 피부염 증상 관찰 및 피부 두께 측정

실험 시작과 함께 아토피 피부염이 유발된 마우스 dorsal skin의 외형적인 변화(홍반, 인설, 가피)를 digital camera (SONY Cyber-shot



Scheme 2. Schematic diagram of experimental protocol. Atopic dermatitis-like skin lesion was induced on dorsal skins of 6-week-old female hairless mice with daily application of 100 mL DNCB solution (1%) for the first one week and five weeks at two-day intervals application of 100 µL DNCB solution (0.5%) for subsequent five weeks.

DSC-W320)과 skin diagnosis system (Aramo TS, Aram HUVIS Co., Ltd. Sungnam, Korea)을 통해 관찰하면서 아토피가 유발된 피부의 두께를 digimatic indicator (No. 99MAH007B, Series No. 543)를 통해 6주간 관찰하였다.

2.6.2. 면역학적 평가

시료수집은 실험 종료일에 마우스를 heparinized capillary tube와 주사기를 이용해 안와와 심장에서 채혈하였다. 혈액을 채취하여 10000 rpm, 4 °C에서 30 min 간 원심 분리를 하여 혈청을 분리한 후 분석 시까지 -70 °C deep freezer에 보관하였다. 이후 경추탈골을 통해 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 그 무게를 analytical balances (Sartorius/Cp324s, USA) 통해 측정하였다.

2.6.3. Immunoglobulin E (IgE) 농도 측정

실험동물의 심장과 안와로부터 채취한 혈액을 원심분리 한 후 혈청 IgE 농도를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 각 96 well plates에 마우스에서 취한 혈청 5 µL와 dilution buffer 45 µL를 혼합하여 각각의 well에 50 µL를 분주하고 실온에서 shaker에 올려 2 h 동안 방치한 후 washing buffer solution으로 3회 세척하였다. 다시 biotin-conjugated anti-IgE를 넣고 2 h 실온에 incubation 한 후에 다시 3회 세척하였다. HRP-conjugated avidin 50 µL를 넣고 실온에서 shaker에 올려 1 h incubation 한 후 다시 세척하였다. Chromogenic substrate (TMB) reagent 50 µL를 넣고 5 min 간 incubation한 후 50 µL의 stop solution을 넣고 ELISA reader (450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

2.6.4. Cytokine 농도 측정

실험동물의 심장과 안와로부터 채취한 혈액을 원심분리 한 후 혈청 IL-4, IFN-γ의 농도를 enzyme immunometric assay kit (Assay Designs, Inc. USA)을 이용해 측정하였다. 시료를 96 well plate에 PBS로 180배 희석한 capture antibody를 100 µL씩 분주하여 실온에서 overnight 시킨 후, block buffer 300 µL를 분주하여 최소 1 h 실온에서 반응시켰다. 다음 reagent diluent로 희석한 각 샘플과 표준액을 100 µL씩 분주한 후, 실온에서 2 h 반응시켰다. Streptavidin-HRP를 working dilution으로 희석하여 100 µL씩 각 well에 분주하여 실온에 20 min 반응시킨 후, substrate solution을 100 µL씩 분주하고 다시 실온에 20 min 반응시켰다. 각 단계는 0.05% PBS-Tween으로 세척하였으며 마지막으로 발색 후 2N H₂SO₄를 50 µL씩 넣고 반응을 정지시켰다. 동일한 과정을 통하여 purified cytokine을 표준으로 하여 ELISA reader (450 nm)로 측정하였다.

2.7. 통계분석

모든 실험결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's t-test로 처리하였다(n = 4).

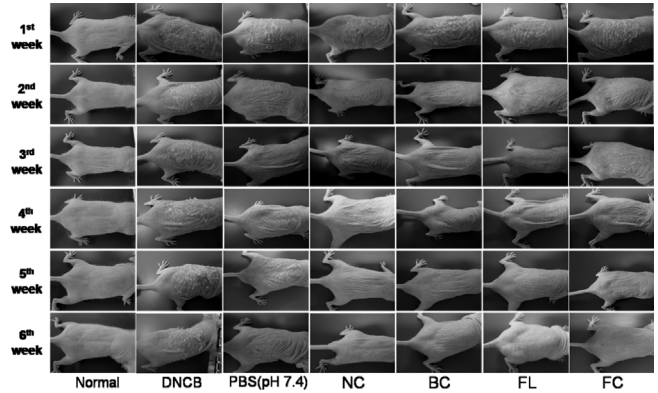


Figure 1. Effect of anti-atopic dermatitis preparations on dorsal skin features of DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS (pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC.

3. 결과 및 고찰

3.1. 아토피 피부염이 유발된 마우스의 외형 관찰

Figure 1은 아토피 피부염이 유발된 마우스의 외형적인 사진이다. 정상군은 1주차와 6주차에서 크게 차이가 없었다. 반면에 대조군 1주차에서 6주차로 갈수록 아토피 피부 개선의 효과 없이 계속 아토피가 유발 된 것으로 관찰 되었다. 또한 피부에서 홍반, 인설, 가피, 태선화 등 다양한 아토피 증상이 나타났다[6,16]. 아토피의 유발로 피부의 탈수 현상이 일어나 경피수분손실도(Transepidermal water loss, TEWL)가 큰 것으로 관찰되었다[17]. 인산완충용액을 처리한 실험군에서는 0주차 때 홍반과 가피, 인설 등 아토피 증상이 나타났다. 5주차로 갈수록 인설, 가피는 없어진 것처럼 보이나, 아토피로 인한 홍반은 여전히 남아 있었다. NC, BC, FL, FC와 같은 항아토피 제품에서는 모두 아토피 피부염 증상 완화 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 특히 FL과 FC 같은 경우엔 3주차 때부터 효과를 나타내기 시작하였으며, 최종적으로 6주차 때 정상적인 실험쥐 피부처럼 깨끗한 피부를 얻을 수 있었다.

Figure 2는 아토피 피부염이 유발된 부위를 diagnosis system을 이용해 관찰한 것이다. 정상군은 Figure 1에서와 같이 크게 차이가 없었다. 반면에 대조군은 1주차에서 6주차로 갈수록 아토피 피부 개선의 효과 없이 아토피 피부염이 유지되었다. 60배와 200배로 확대한 상태에서 정상군과 비교를 통해 얼마나 많은 각질과 인설, 태선화와 같은 다양한 아토피 증상이 나타난 것으로 확인할 수 있었다. Figure 1에서는 인산완충용액을 처리한 경우 각질이 많이 없어지고 증상완화에 효과가 있는 것으로 보였으나, Figure 2에서 보듯이 피부조직은 수분이 손실되어 갈라져 있는 것을 확인할 수 있었다. NC, BC, FL, FC와 같이 항아토피 제품이 처리된 실험군에서는 diagnosis system 상에서도 모두 아토피 피부염 개선에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 최종적으로 6주차가 되었을 때 정상군처럼 깨끗한 피부가 관찰되었다. FL과 FC 제품에는 피부 재생효과와 보습력이 탁월한 silk fibroin과 ceramide의 효과로 실험군에 비해 아토피 피부염 개선에 효과가 나타난 것으로 확인되었다[18].

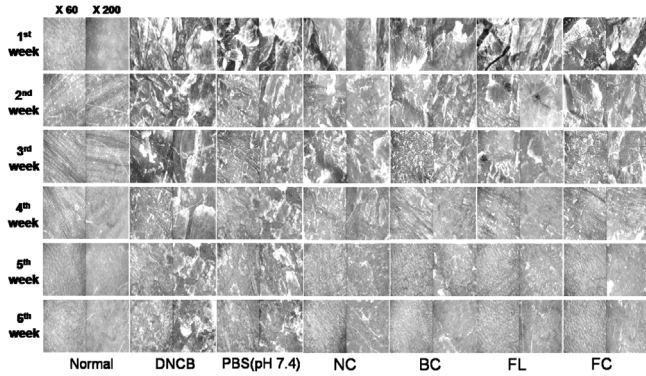


Figure 2. Effect of Anti-atopic dermatitis preparations on dorsal skin appearance of DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS (pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC. Magnification of left and right side in each column was 60 and 200 times, respectively.

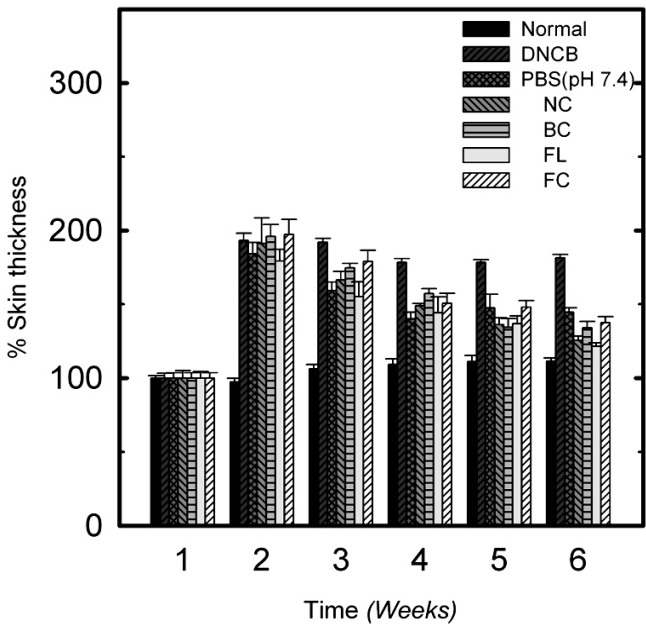


Figure 3. Effect of anti-atopic dermatitis preparations on dorsal skin thickness of DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS (pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC.

3.2. 아토피 피부염이 유발된 마우스의 피부두께 측정

Figure 3은 아토피 피부염이 유발된 부위의 피부두께를 측정하는 것이다. 각 주차마다 동일한 부위의 피부를 mm로 측정하였고, 1주차 아토피가 유발되지 않은 정상 쥐의 피부 상태를 100%로 정하고, 시간에 따라 얼마나 피부가 증가했는지를 %로 수치화 하였다. 피부 두께를 측정함으로써 아토피와 피부 두께의 상관관계에 대해 파악 할 수가

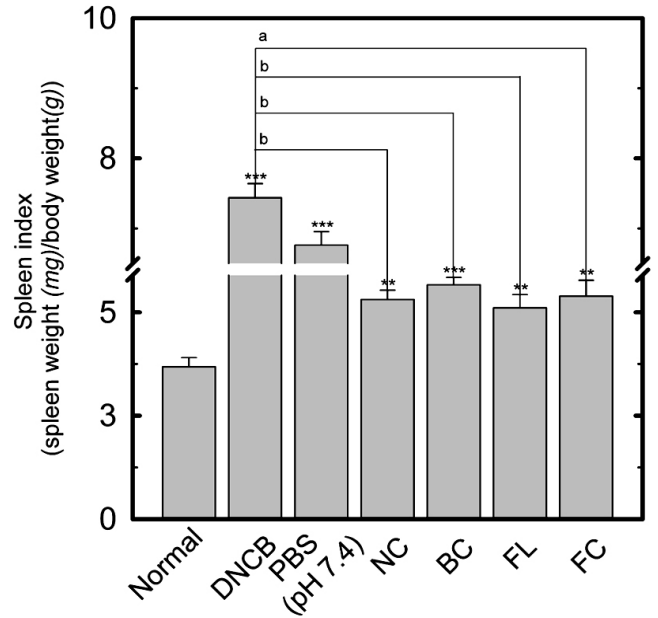


Figure 4. Effect of anti-atopic dermatitis preparations on spleen index of DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS (pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC. Values are means ± SEM. **p < 0.01, ***p < 0.001 versus normal group, ap < 0.05, bp < 0.01 versus DNCB group.

있었다. 정상군은 1주차에서 6주차로 갈수록 피부 두께는 큰 차이가 없었지만, 대조군은 정상군에 비해 피부 두께 수치가 2배 가까이 증가 하였다. 6주차로 갈수록 아토피 피부염이 유지되어 수치 또한 일정하게 유지 되었다. 실험군에서는 아토피가 유발된 2주차 때 정상군에 비해 수치가 2배 가까이 증가하였으나, sample을 처리를 시작한 3주차 때부터 6주차로 갈수록 수치는 점점 감소하는 경향이 보였다. 이처럼 아토피가 유발된 피부염에서는 경피수분손실도의 증가로 피부의 가피, 인설, 태선화 같은 경피의 각질층이 일어나 피부 두께가 증가하였으나, 실험군에서는 피부의 각질 정도가 감소를 하였고 따라서 정상군의 피부 수치 정도로 감소하였다[19]. 특히, FL과 FC 제품은 silk fibroin이 코팅된 고휘 지질 나노입자를 함유하고 있다. 그리고 지질 나노입자는 ceramide와 astaxanthin과 같은 항 아토피를 띠는 성분들로 구성되어 있다. 고휘 지질 나노입자의 코팅물질인 silk fibroin은 강력한 보습 작용과 생체 적합성이 우수 하고 피부세포 생성촉진 효과가 우수하다고 보고되어 있다[18]. 또한 아토피 피부염 유발로 건조해진 피부에서 보습작용으로 수분을 유지시켜 주고 피부세포를 생성시킴으로써 아토피 피부염의 증상을 완화 시킨다. Ceramide는 생체 내 피부장벽을 유지하고 있는 중요한 물질이다. 아토피 피부염으로 손실된 피부에 ceramide를 공급함으로써 아토피 피부염 증상 완화에 도움이 된다.

3.3. 아토피 피부염이 유발된 마우스의 비장수치(Spleen Index)

Figure 4 DNCB에 대한 마우스의 면역반응을 검토하기 위하여 실험종료일에 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 무게를 측정하였다. 비장수치(spleen index)는 아토피 피부염 마우스의 비장 무게(mg)를 실험 종료일 마우스의 body weight (g)로 나눔으로써 얻을 수 있었다.

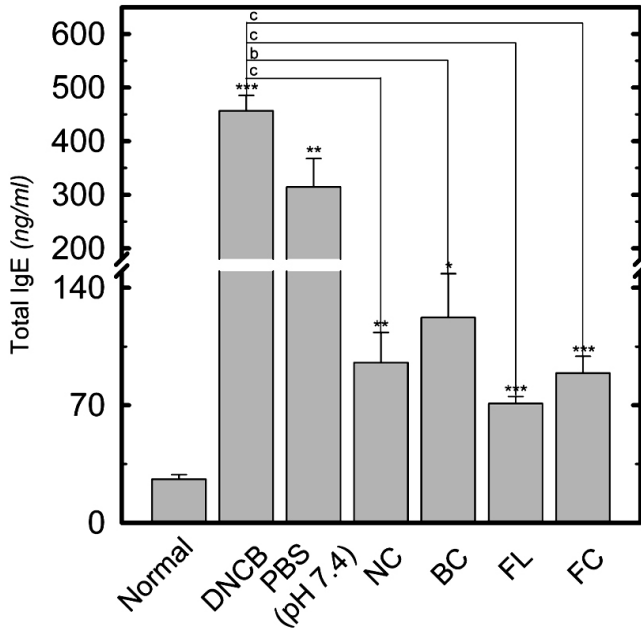


Figure 5. Effect of anti-atopic dermatitis preparations on serum IgE level in DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS (pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus normal group, bp < 0.01 , cp < 0.001 versus DNCB group.

정상군, 대조군, 실험군의 인산완충용액 처리, NC 처리, BC 처리, FL 처리, FC처리 한 군에서 각각 3.68 ± 0.22 , 7.44 ± 0.20 , 6.76 ± 0.19 , 5.31 ± 0.22 , 5.66 ± 0.18 , 5.11 ± 0.32 , 5.39 ± 0.38 와 같은 수치를 얻을 수 있었다. Figure 4에서와 같이 정상군은 3.7정도의 수치가 나왔지만, 대조군은 정상군에 비해 2배가 증가한 수치를 얻었다. 또한 실험군인 인산완충용액을 처리하였을 때 정상군에 비해 상당히 높게 수치가 나왔다. 이것은 DNCB에 의한 비장 내의 T 림프구가 현저하게 증가하였음을 나타내고, 인산완충용액은 T 림프구의 증가를 제대로 억제하지 못한 것으로 볼 수 있다[6]. NC, BC, FL, FC와 같은 항 아토피 제품들은 T 림프구를 억제능이 우수하여 인산완충용액에 비해 비장의 수치가 더 낮게 나왔다. 특히 FL 제품은 NC, BC 제품에 비해 큰 유의차는 없으나 상대적으로 0.598, 0.156 수치로 나타나 다른 항아토피 제품에 비해 효능이 우수한 것으로 밝혀졌다. 이것은 FL 제품이 함유하고 있는 astaxanthin 때문이다. Astaxanthin은 앞에서와 같이 우수한 항산화능과 항염증을 나타낸다. 이 같은 효과로 인해 astaxanthin은 아토피 피부염의 주요 원인인 과발현 Th2 cytokine의 발현을 억제시켜 Th cell 사이의 균형을 이루게 함으로써 T 림프구를 감소시킬 수 있다 [19,20]. T 림프구가 감소함으로써 IgE의 발현량이 줄어들고 그 만큼 히스타민의 생성 억제되어 아토피 피부염 증상 완화에 효과가 있는 것으로 확인 되었다.

3.4. 혈청 IgE 농도

Figure 5는 아토피 피부염 마우스의 최종적인 IgE의 농도 측정된 결과이다. 실험 종료 후, 혈청 IgE 농도는 정상군, 대조군 그리고 실험군

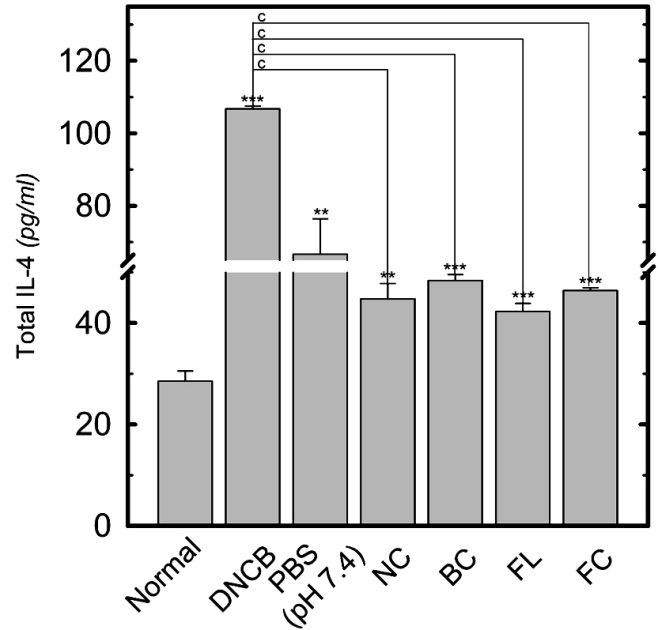


Figure 6. Effect of anti-atopic dermatitis preparations on serum IL-4 expression in DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS (pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC. Values are means \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus normal group, cp < 0.001 versus DNCB group.

의 인산완충용액 처리, NC 처리, BC 처리, FL처리, FC처리 한 군에서 각각 25.98 ± 2.70 , 456.45 ± 28.80 , 314.65 ± 52.92 , 95.46 ± 17.90 , 122.34 ± 26.03 , 71.02 ± 4.23 , 89.18 ± 9.98 ng/mL으로 각 군마다 유의차가 상대적으로 크게 나타난 것으로 확인 되었다. 정상군에 비해 아토피 피부염이 유발된 대조군 에서 18배나 많은 IgE가 발현이 되었다. 인산완충용액을 처리 하였을 경우 IgE의 억제율이 다른 항 아토피 제품에 비해 상당히 낮은 것으로 확인 되었다. 항 아토피 제품을 처리 하였을 경우 대조군과 인산완충용액에 비해 눈에 띄게 total IgE의 발현량이 줄어 든 것을 볼 수가 있다. 항아토피 제품 중 FL 제품은 NC, BC, FC에 비해 0.232, 0.099, 0.144 유의차를 가지고 있어 항아토피 제품 중 효능이 가장 우수한 것으로 밝혀졌다. FL은 고품질 지질 나노입자를 함유하고 있으면서, 입자 주위는 silk fibroin으로 코팅되어 있다. Silk fibroin은 이전의 연구를 통해 IgE의 과발현을 억제한다고 보고 되어 있다[21]. 또한 astaxanthin의 탁월한 항산화능 과 항염증 효과로 인하여 Th1 cell이 활성화 되고 Th2 cell의 활성이 감소되면서 IgE의 발현량이 현저히 낮아 진 것으로 보고 있다[19].

3.5. 혈청 Cytokine의 농도

Figure 6은 아토피 피부염 마우스의 최종적인 IL-4의 농도를 측정하였다. 종료 후, 혈청 IL-4의 최종농도는 정상군, 대조군, 정상군의 인산완충용액 처리, NC 처리, BC 처리, FL처리, FC처리 한 군에서 각각 28.50 ± 2.01 , 106.75 ± 0.75 , 66.63 ± 9.77 , 44.75 ± 3.02 , 48.38 ± 1.16 , 42.25 ± 1.59 , 46.38 ± 0.55 pg/mL으로 각 군별로 유의차가 나타났다. Figure 6에서와 같이 정상군에 비해 아토피가 유발된 대조군에서 IL-4

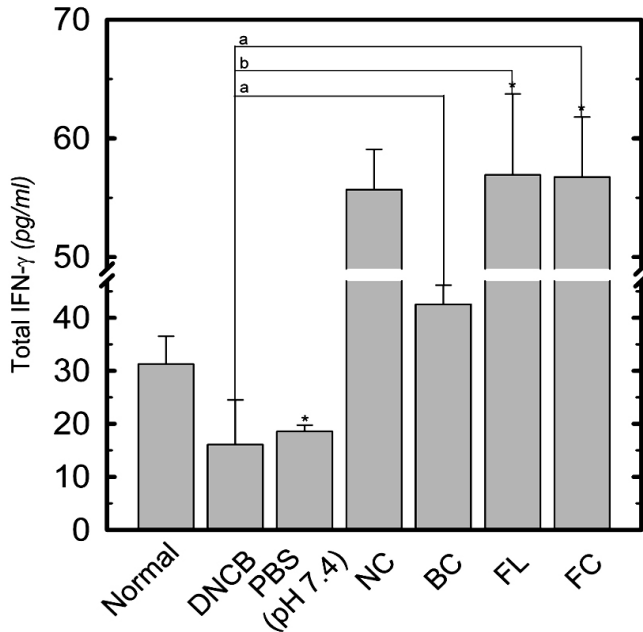


Figure 7. Effect of anti-atopic dermatitis preparations on serum IFN- γ expression in DNCB-applied hairless mice. Normal (n = 4); group without any treatment, DNCB (n = 4); group treated with only DNCB, PBS (pH 7.4) (n = 4); group treated with DNCB plus PBS(pH 7.4), NC (n = 4); group treated with DNCB plus NC, BC (n = 4); group treated with DNCB plus BC, FL (n = 4); group treated with DNCB plus FL, FC (n = 4); group treated with DNCB plus FC. Values are means \pm SEM. * p < 0.05 versus normal group, $^{\#}p$ < 0.05, $^b p$ < 0.01 versus DNCB group.

의 발현량이 증가하였다. 인산완충용액과 항 아토피 제품을 처리 하였을 때 대조군 보다 현저히 IL-4의 발현량이 줄어 든 것을 볼 수가 있다. 전반적으로 Figure 5에서와 유사한 경향을 보이고 있다. 앞에서의 언급처럼 면역학적으로 정상적인 상태에서는 Th1 cell의 cytokine인 IFN- γ 와 Th2 cell의 IL-4가 서로를 조절하면서 균형을 이룬다. 하지만 아토피가 유발된 상태에서는 IL-4는 과발현이 일어나 IFN- γ 의 발현을 억제할 함으로써 불균형이 초래된다[15]. IL-4가 많이 생성되고 B cell이 자극을 받아 IgE의 과발현을 유도함으로써 히스타민이 과도하게 배출되는 것이다. IL-4와 IgE는 아토피 증상에 직접적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 유도하기 때문에 면역학적으로 중요한 인자이다 [21]. Figure 6에서 보듯이 아토피 피부염이 유발된 마우스에 항아토피 제품을 처리하였을 때 각 제품별 유의차는 크지 않았다. 하지만, FL로 처리 하였을 때 IL-4의 수치가 가장 낮게 나왔고, 그 유의차는 NC는 0.675, BC는 0.321로 나타났다. 이것으로 FL은 Th1 cell의 cytokine의 과발현을 억제시켜 T cell들 사이의 균형을 유지 하고 하는 작용이 입증 되었다. Figure 7 아토피 피부염이 유발된 마우스의 최종적인 IFN- γ 의 농도를 측정하였다. 실험 종료 후, 혈청 IFN- γ 농도는 정상군, 대조군 그리고 실험군의 인산완충용액 처리, NC 처리, BC 처리, FL처리, FC처리 한 군에서 각각 31.82 \pm 5.25, 16.10 \pm 8.43, 18.60 \pm 1.16, 55.68 \pm 3.40, 42.56 \pm 3.60, 56.91 \pm 6.83, 56.74 \pm 5.05 pg/mL으로 각 군별로 유의차가 있게 나타났다. Figure 7은 Figures 5, 6에서의 경향과는 반대로 나타났다. Figure 7에서 정상군의 IFN- γ 농도는 31.82 \pm 5.25 pg/mL인 반면, 대조군과 인산완충용액으로 처리 하였을 경우에는 정상군에 비해 2배정도 낮은 수치를 보였다. 항 아토피 제품

으로 처리하였을 경우엔 정상군과 대조군 비해 현저히 IFN- γ 의 발현량이 증가 한 것을 볼 수 있다 Figure 6에서의 설명처럼 IL-4의 과 발현으로 인해 IFN- γ 의 발현이 억제 된다. Figure 7에서 보듯이 아토피 피부에서는 IFN- γ 의 발현량이 억제 되었기 때문에 정상군 보다 대조군의 IFN- γ 농도가 낮은 것이다. 항 아토피 제품은 IFN- γ 의 발현량을 증가 시키고 IL-4와 균형을 이루게 함으로써 면역학적으로 아토피 피부염의 증상 완화를 이룰 수 있다[15]. Figure 7에서와 같이 IFN- γ 의 발현량의 수치가 높을수록 항아토피 효과는 우수하다고 볼 수 있다. 아토피 피부염이 유발 된 마우스에 FL 제품으로 처리를 하였을 경우 NC, BC, FL에 비해 0.354, 0.075, 0.565 정도의 유의차를 보여 IFN- γ 의 발현량이 가장 높은 것으로 확인되었다. 다음으로 FC, NC 그리고 BC가 아토피 증상 완화에 효과가 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 ceramide와 astaxanthin을 함유한 고흥 지질 나노입자의 제조와 동시에 입자 주위에 silk fibroin을 코팅 시켰으며, 이를 기반으로 하는 항 아토피 제품인 로션과 크림을 제조하였다. 아토피 피부염 모델인 hairless mice에 항 아토피 제품인 NC, BC, FL, FC을 처리 하여 아토피 피부염의 외형적인 관찰과 동시에 피부 두께를 측정함으로써 아토피 피부염과 피부 사이의 상관관계에 대해 설명하였으며 면역학적인 관점에서 혈청 면역지표(IgE, IL-4, IFN- γ)와 비장의 무게를 측정하였다. ELISA 방법을 통해 IgE와 IL-4, IFN- γ 의 농도를 확인한 결과 IgE와 IL-4에서는 아토피 피부염이 유발된 마우스의 경우 정상군에 비해 상당히 높은 수치를 보였지만 항 아토피 제품 FL과 FC를 처리한 마우스에서는 수치가 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 IgE와 IL-4 경향과 반대로 아토피 피부염이 유발된 마우스의 IFN- γ 수치는 정상군 보다 낮았고, 항 아토피 제품을 처리한 마우스는 상대적으로 높게 나타났다. 이것은 FL과 FC 제품에 있는 항아토피 물질인 ceramide, silk fibroin이 무너진 피부 장벽과 피부세포의 재생에 관여를 하였고, astaxanthin이 Th2 cell의 발현을 억제시키고 T helper cell 간의 balance를 유지시켜 아토피 피부염 치료 개선에 효과가 나타난다. 이와 같은 결과를 통해 화인코(주)에서 생산한 항 아토피 로션과 크림 제품은 아토피 피부의 치료 및 증상 개선에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

감 사

본 연구는 지식경제부 지역연계개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다(70004549).

참 고 문 헌

1. K. D. Cooper, *J. Invest. Dermatol.*, **102**, 128 (1994).
2. N. A. Soter, *Allergy*, **44**, 16 (1989).
3. M. Uehara, R. Izukura, and T. Sawai, *Clin. Exp. Dermatol.*, **15**, 264 (1990).
4. Y. M. Donald and M. Leung, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 860 (2000).
5. X.-F. Qi, D.-H. Kim, Y.-S. Yoon, J.-H. Li, D. Jin, Y.-K. Deung, and K. J. Lee, *J. Ethnopharmacol.*, **123**, 195 (2009).
6. L. K. Poulsen, C. M. Reimert, C. Bindslev-Jensen, M. B. Hansen, and K. Bendtzen, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **106**, 55 (1995).

7. J. Y. Ahn, L. R. Im, J. H. Kim, J. H. Park, D. K. Kim, and Y. M. Lee, *Kor. J. Pharmacogn.*, **40**, 218 (2009).
8. Y. A. Hannun and L. M. Obeid, *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 73 (1995).
9. S. L. Chamlin, J. Kao, I. J. Frieden, M. Y. Sheu, A. J. Fowler, J. W. Fluhr, M. L. Williams, and P. M. Elias, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **47**, 198 (2002).
10. M. A. Linan-Cabello, J. Paniagua-Michel, and P. M. Hopkins, *Aquac. Nutr.*, **8**, 299 (2002).
11. Y. M. A. Naguib, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1150 (2000).
12. S. Sakai, T. Sugawara, K. Matsubara, and T. Hirata, *J. Biol. Chem.*, **284**, 28172 (2009).
13. M. J. Kang, J. Y. Eum, M. S. Jeong, S. E. Choi, S. H. Park, H. I. Cho, C. S. Cho, S. J. Seo, M. W. Lee, and Y. W. Choi, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 10 (2010).
14. S. M. Cho, H. Y. Lee, and J.-C. Kim, *J. Am. Oil. Chem.*, **84**, 859 (2007).
15. K. Matsumoto, K. Mizukoshi, M. Oyobikawa, H. Ohshima, Y. Sakai, and H. Tagami, *Skin Res. Technol.*, **11**, 209 (2005).
16. D. W. Kim, J. Y. Park, G. Y. Na, S. J. Lee, and W. J. Lee, *Int. J. Dermatol.*, **45**, 698 (2006).
17. M. Loden, H. Olsson, T. Axell, and Y. W. Linde, *Br. J. Dermatol.*, **126**, 137 (2006).
18. S. Haug, A. Roll, P. Schmid-Grendelmeier, P. Johansen, B. Wuthrich, T. M. Kundig, and G. Senti, *Curr. Probl. Dermatol.*, **33**, 144 (2006).
19. T. Agner, *Contact Dermatitis*, **25**, 108 (2006).
20. H. Jyonouchi, S. Sun, Y. Tomita, and M. D. Gross, *J. Nutr.*, **125**, 2483 (1995).
21. C. Walker, M. K. Kagi, P. Ingold, P. Braun, K. Blaser, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, and B. Wuthrich, *Exp. Allergy*, **23**, 145 (2006).