

## 마유(馬油)가 DNCB로 유발된 알레르기성 접촉성피부염에 미치는 영향

이영선<sup>1#</sup>, 윤지현<sup>1</sup>, 김보애<sup>2</sup>, 박찬익<sup>2</sup>, 유왕근<sup>3</sup>, 조재위<sup>4</sup>, 김미려<sup>5,6\*</sup>

1 : 성덕대학교 대한말산업 연구소, 2 : 대구한의대학교 화장품약리학과,  
3 : 대구한의대학교 보건학부, 4 : 계명대학교 의과대학 피부과학교실,  
5 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 6 : (재)대구테크노파크 한방산업지원센터

### Effects of Horse oil on the DNCB-induced Contact Hypersensitivity in Balb/c Mice

Young Sun Lee<sup>1#</sup>, Ji-Hyun Yoon<sup>1</sup>, Bo-Ae Kim<sup>2</sup>, Chan Ik Park<sup>2</sup>,  
Wang Keun Yoo<sup>3</sup>, Jae We Cho<sup>4</sup>, Mi Ryeo Kim<sup>5,6\*</sup>

1 : Research Institute of Korea Horse Industry, Sung Duk University, Youngchun, Korea  
2 : Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyungsan, Korea  
3 : Department of Health Science, Daegu Haany University, Gyungsan, Korea  
4 : Department of Dermatology, College of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea  
5 : Department of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea  
6 : Oriental Medicine Industry Support Center, Daegu Techopark, Daegu, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : Horse oil (HO) has been used long time as the folk medicine of many Asian countries such as Korea, Mongol, China, India and Japan. HO has been used for anti-bacterial, anti-inflammatory, and anti-pruritic purposes in skin. However, it is still largely unknown whether HO modulates the skin condition. In this study, we attempted to evaluate the anti-inflammatory effect of HO on the 1 % of 2, 4-dinitro-1-chlorobenzene (DNCB)-induced contact hypersensitivity in Balb/c mice.

**Methods** : To find the anti-inflammatory effect of HO, contact hypersensitivity, a local inflammatory response of skin, was induced on the back of Balb/c mice by sensitization and repeated application by 1% DNCB and HO treated 2 weeks on the 1% of DNCB-treated Balb/c mice. Excised mice skins were stained with hematoxylin and eosin and serum IgE level was measured by mouse IgE ELISA kit.

**Results** : In this study, we found that HO reduced erythema by 1% of DNCB treated Balb/c mice. Also, HO recovered histopathological features such as the thickening of epidermis, hyperkeratosis and the infiltration of inflammatory cells in 1% of DNCB treated Balb/c mice. In addition, HO reduced IgE level on the serum obtained from blood of 1% of DNCB-treated Balb/c mice.

**Conclusion** : Taken together, these results showed that HO could be used as a pharmaceutical material with anti-inflammatory effects by reducing of erythema, IgE level and recovering of histopathological features skin on DNCB-induced contact hypersensitivity in Balb/c mice model.

**Key words** : Horse oil, DNCB, Contact hypersensitivity, anti-inflammatory, Balb/c mice, IgE

\*교신저자 : 김미려, 대구 수성구 상동 165번지 대구한의대학교 한의과대학 & 한방산업지원센터  
· Tel : +82-53-770-2241 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr  
#제1저자 : 이영선, 경북 영천시 신녕면 대학길 105 성덕대학교 대한말산업연구소  
· Tel : +82-54-330-8716 · E-mail : yslee6784@hanmail.net  
· 접수 : 2013년 6월 24일 · 수정 : 2013년 7월 7일 · 채택 : 2013년 7월 10일

## 서론

인체 피부는 외부 환경에 대한 보호 장벽의 역할을 하여 피부의 건조를 막고 피부가 정상적으로 대사를 할 수 있도록 환경을 조성함으로써 외부 자극에 효율적으로 대처하여 손상 시 빠르게 회복 할 수 있도록 한다. 그러나 최근 산업사회의 발달로 인한 합성물질과 환경오염으로 인해 피부 장벽의 기능이 제대로 역할을 하지 못하여 만성 염증성 피부 질환, 아토피 피부염 및 각종 알레르기성 접촉성 피부염 환자들이 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>.

만성적인 피부질환의 치료제로 주로 부신피질 호르몬제, 항히스타민제, Cyclosporin A, FK506과 같은 면역억제제가 사용되고 있으나 장기간 사용 시 신독성, 골다공증, 고혈압, 심한 소양증 등의 부작용이 나타나고 있어 이들 약물의 사용에 많은 주의가 요구되고 있다<sup>3,4)</sup>.

마유(馬油)는 한국, 몽골, 중국 및 일본 등 많은 아시아 국가에서 민간요법으로 오랫동안 이용되어 오고 있다. 마유(馬油)에 관한 효능은 황제내경 영추(黃帝內經靈樞)편에 마고(馬膏) 또는 마기고(馬鬣膏)로 상처와 화상에 관한 효능이 처음 소개되어 있으며, 본초경집주(本草經集注)에는 마두고(馬頭膏)가 모발을 자라게 한다는 내용과 본초강목(本草綱目)에는 분장을 많이 해서 피부가 거칠어진 기생이나 광대 등이 피부재생제로 마유를 사용하였음이 언급되어 있다<sup>5,6,7)</sup>.

최근 들어 우리나라 말(馬) 보유 두수는 해마다 증가하고 있다. 이에 따라 말(馬) 부산물 즉 말기름이나 말똥 또한 공급이 증가하고 있다. 그러나 이러한 말(馬) 부산물의 효능에 관한 과학적 연구 결과는 아직 잘 알려져 있지 않다. 마유(馬油)에는 특히 불포화 지방산이 60~65%로 다량 함유되어 있으므로 동물성 지방과 식물성 지방의 중간 형태로서, 인간의 지방과 매우 유사하여 인체 피부내로 쉽게 흡수되는 장점을 가지고 있다.

본 연구는 말(馬) 부산물 중 특히 피부개선 효과가 알려져 있는 마유(馬油)를 항아토피 제품 개발을 위한 소재로 활용하고자 Balb/c 마우스에 알레르기성 접촉 피부염 유발 물질인 2,4-dinitro-1-chlorobenzene (DNCB)로 접촉성 피부염을 유발하고 마유를 처치하여 피부 조직 변화, 피부 병리 조직 및 혈청 IgE 농도에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물의 사육

실험동물은 male Balb/c mice 7주령을 중앙실험동물(SLC, Japan)로부터 공급받았으며, 실험군은 2,4-dinitro-1-chlorobenzene (DNCB: Aldrich, USA)를 도포하지 않은 정상대조군 (Normal군), DNCB 단독 도포군 (only DNCB군), 마유를 도포한 군(HO+DNCB군)으로 나누었다. 각 군에 7마리씩 배당하여 polycarbonate cage에 수용하고, 고행사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 자유롭게 섭취시키면서 1주 동안 적응시킨 후 사용하였다. 이때 사육실의 조건은 온도가  $21.4 \pm 0.05^\circ\text{C}$ , 습도는  $61 \pm 1\%$ ,

12시간 명암 조건을 유지하였다.

### 2. 시료의 제조

실험에 사용한 마유(馬油)는 제주도, (주)산새미로부터 구입하여 사용하였다. 접촉피부염이 유발된 Balb/c mice의 귀 뒤 쪽과 등 부위에 100  $\mu\text{l}$  씩 2주 동안 마이크로 피펫 팁의 뒤쪽을 이용하여 골고루 도포하였다.

### 3. 피부염 유도 및 시료 처리

접촉피부염을 유발하기 위해 8주령이 된 Balb/c mice의 등 부위를 깨끗하게 제모 하였다. 제모 후 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였으며 DNCB의 침투력을 높이기 위해 4% SDS (sodium dodecyl sulfate) 수용액을 마이크로 피펫 뒤쪽을 이용하여 등 부위, 귀 뒤쪽 부분에 균일하게 도포하고 2~3시간 자연건조 시켰다. 본 실험에 사용된 DNCB는 아세톤과 올리브오일이 3 : 1로 혼합된 용액을 1%로 희석한 다음 사용하였다. 제조된 DNCB 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 등 부위에 도포하였고 4일 동안 면역반응을 유발한 후, 다시 1% DNCB 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 등 부위에 도포하여 접촉피부염을 유발하였다(Fig. 1). DNCB군에서의 접촉피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인 할 수 있었다.

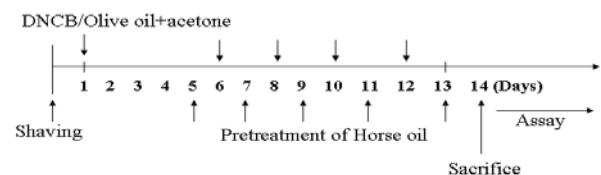


Figure 1. Experimental Design

### 4. 시료의 채취

채혈은 Balb/c mice를 12시간 절식 시킨 다음 에테르로 마취시킨 후 복부를 개복하여 헤파린이 도포된 주사기를 이용해 심장으로부터 혈액을 채취한 후 원심분리 (2000 rpm, 20 분,  $4^\circ\text{C}$ )하여 혈청을 분리하고, 분석 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 혈액을 채취한 후 즉시 피부조직은 등 주변의 환부를 중심으로  $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$  넓이로 생검하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후 염색 전 까지  $4^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

### 5. 피부조직 병리 검사

실험 종료 후에, 등 쪽 목부위의 피부를 적출하여 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정한 다음 그 조직을 파라핀으로 포매하였고 5  $\mu\text{m}$  두께로 block을 만들었다. 그 조직은 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils, eosinophil과 그 외 다른 세포와 부종을 식별할 수 있는 haematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 조직염색을 했고, 광학현미경 상에서 100배의 배율로 피부의 전반적인 상태를 관찰하였다.

## 6. Serum IgE 수준 측정

혈중 IgE 수준은 Mouse IgE ELISA kit (Shibayagi Co, Shibukawa, Japan)를 사용하여 종합면역분석기 (Wallac OY, Turku, Finland) 450 nm에서 측정하였다.

## 결 과

### 1. 마유(馬油)가 피부 조직 변화에 미치는 영향

DNCB를 단독으로 처리한 군의 귀 등쪽 목 부위에 skin lesions, erythema, erosion, skin dryness가 심화된 것을 관찰할 수 있었으며 DNCB 처리 후 마유(馬油)를 도포한 군에서는 시간이 경과함에 따라 피부조직 손상이 감소되는 것이 관찰되었다(Figure 2).



Figure 2. Clinical skin features of back skin in BALB/c mice. Normal group (a), DNCB + Horse oil group (b) and only DNCB group (c).

### 2. 마유(馬油)가 피부 조직 병리 검사에 미치는 영향

실험 종료 후 등 쪽 목 부위 피부를 박리한 후 H&E 염색법을 이용하여 피부 조직을 분석한 결과, Normal군은 epidermis, dermis, baseline이 ×100에서 관찰되었고, DNCB로 피부염을 유발한 군에서는 epidermis가 dermis쪽으로 두껍게 내려갔으며, 현저하게 확장된 피부손상을 나타내는 것으로 보아 발진이 많이 진행된 것을 확인할 수 있었으며 백혈구의 침윤도 관찰되었다. DNCB로 접촉피부염 유발과 동시에 마유(馬油)를 처리한 군은 DNCB만 처리한 군에 비해 epidermis의 두께도 현저히 줄었고, 부종이 많이 사라진 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3).

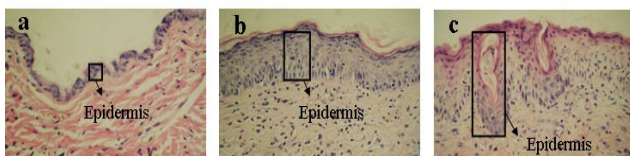


Figure 3. Histologic features of skin lesion in Balb/c mice. Normal group (a), DNCB + Horse oil group (b) and only DNCB group (c). Mice skin biopsy were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Bright microscope (Nikon, Japan, Magnification, ×100).

### 3. 마유(馬油)가 혈청 IgE 농도에 미치는 영향

실험 종료 후 심방으로부터 채취한 혈액에서 혈청을 분리하여 혈청 IgE 수준을 ELISA reader에서 450nm로 측정하였다. Normal군에 비해 DNCB만 처리한 군에서 IgE 수준이 유의하게 증가하였으며, 마유(馬油)를 처리한 군에서는 DNCB

만 처리한 군에 비해 IgE 수준이 감소됨이 관찰 되었다(Figure 4).

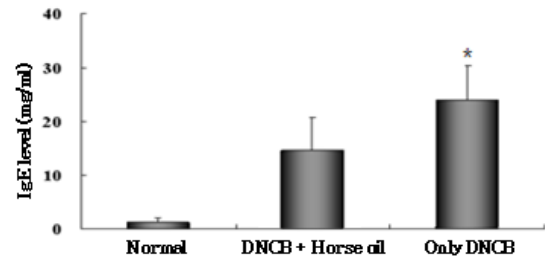


Figure 4. The effects of HO on serum levels of IgE in Balb/c mice. Statistically significant value compared with Normal group data by T-test (\* : p < 0.05).

## 고 찰

알레르기성 접촉성 피부염은 피부의 수분 증발이 증가됨으로 항원의 침투가 용이해져 피부 과민 반응이 심화되어 감염과 염증에 대한 감수성이 높아지게 된다. 알레르기성 접촉성 피부염의 주요 초기 증상으로 호산구증과 혈액내 IgE 농도 증가가 관찰되며 원인 물질에 따라 특정부위에서 피부질환, 발진, 홍반, 종창, 미란, 작열감, 통증, 소양감, 습진상 변화 등의 병증을 동반하는 제IV형 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity)에 속하는 면역질환으로 전신적 면역 반응의 불균형으로 발생된다<sup>8,9,10,11</sup>.

최근 급속한 산업화로 인한 환경오염과 합성물질의 증가로 알레르기성 접촉성 피부염, 아토피 피부염 등 각종 피부 질환이 증가하고 있다. 이러한 피부 질환 치료제로 항히스타민제, 면역억제제 및 부신피질 호르몬제 등이 이용되고 있으나 어지럼증, 신독성, 골다공증, 표피위축, 고혈압 유발 등 많은 부작용을 보이고 있으며 피부가 건강한 장벽의 기능을 회복하는데 별다른 효과가 없는 것으로 알려져 있다<sup>3,4,12</sup>.

알레르기성 접촉 피부염 유발에 사용되는 DNCB는 벤젠 고리를 가진 화합물로 국소 면역반응 유발과 Langerhans cell의 수와 기능에 강력한 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있어 실험동물에 접촉성 피부염을 유발하기 위해 대표적으로 사용되는 화합물로 알려져 있다<sup>13,14,15,16,17</sup>. DNCB 처리는 상부 진피층에 심한 염증 세포 침윤을 유발하며 피부상피에서 각질형성세포의 과형성으로 피부 상피층수의 급격한 증가, 세포사이 공간의 확장, 기저세포와 기저판의 결합 파괴로 림프구의 침윤등에 관한 연구 결과들이 보고되었다<sup>15,16,17</sup>. 실험실적으로 DNCB에 의해 유발된 염증에서는 피부 홍반, 귀 부종, 피부조직, 혈청 IgE 수준 변화 등이 관찰된다. 이 중 피부 홍반 반응은 여러 가지 내·외적 자극에 의해 발생하는 가장 흔한 피부반응으로 피부 표층부 및 심층부 피부 혈관의 혈액량이 38%이상 증가하게 되면 육안으로도 관찰이 된다<sup>18</sup>.

본 연구에서는 마유(馬油)의 접촉성 피부염에 대한 효능을 조사하기 위하여 DNCB로 Balb/c 마우스에 접촉성 피부염을 유발하여 피부조직 변화, 피부조직의 병리학적 변화를 관찰하였다. 마유(馬油)의 처리에 의한 피부조직의 변화를 살펴본 결과, DNCB의 처리 후 마우스 귀 부근의 등 쪽 피부에 심각한 부종, 침식 및 피부 건조 상태가 관찰되었으나 마유(馬油)

처리군에서는 이러한 상태가 현저하게 개선됨이 관찰되었다. H&E 염색으로 피부조직 세포의 변화를 관찰한 결과 DNCB 처리에 의해 마우스 피부 조직세포의 epidermis가 dermis쪽으로 두껍게 내려가 현저하게 확장된 피부손상 및 백혈구의 침윤도 관찰되었다. 마유를 처리한 군에서는 DNCB만 처리한 군에 비해 epidermis의 두께도 현저히 줄었고, 부종이 많이 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

IgE는 혈장세포에서 분비되어 조직 내 FcεR I이라 불리는 고친화성 표면수용체를 매개로 비만세포에 강하게 결합하여 비만세포의 과립으로부터 화학적 매개 물질인 histamine, chymase, tryptase, serine esterase 등의 효소를 분비 조직 파괴를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>.

본 연구에서의 혈청 IgE 수준은 Normal군에 비해 DNCB만 처리한 군에서 IgE 수준이 유의하게 증가됨이 관찰되었다. 그러나 마유(馬油) 처리 시 DNCB만 처리한 군에 비해 현저하게 IgE가 감소됨이 관찰 되었다.

본 연구 결과에서 마유(馬油)는 접촉성 피부염 개선에 효과가 있으며 특히 피부 조직세포와 IgE level 조절을 통해 피부 조직의 변화를 유도함으로써 피부 상태를 개선시키는 효능이 있음을 제시하였다. 마유의 이러한 피부 개선 효과에 관해 좀 더 체계적인 연구가 이루어진다면 알레르기성 피부염의 부작용을 최소화하면서 피부 장벽의 역할을 증대시켜줄 수 있는 피부질환 개선 제품을 개발하는데 유용한 소재로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

마유(馬油)가 알레르기성 접촉성피부염에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 Balb/c 마우스에 DNCB로 접촉성 피부염을 유발한 후 마유를 처리하여 DNCB로 유발된 접촉성피부염에 대한 피부 조직 변화, H&E 염색법을 이용한 피부 조직 분석 및 혈청 IgE 수준 변화를 관찰 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DNCB로 유발된 접촉성피부염의 피부 조직 변화를 살펴본 결과, DNCB에 마유(馬油)를 처리한 군이 DNCB를 단독으로 처리한 군에 비해 skin lesions, erythema, erosion, skin dryness가 호전됨이 관찰되었다.
2. DNCB로 유발된 접촉성피부염에 마유를 처리한 실험군과 DNCB를 단독 처리한 군에서 H&E 염색법을 이용하여 피부 조직을 분석한 결과, 마유를 처리한 실험군에서 epidermis의 두께가 줄어드는 것이 관찰되었으며 피부 표피각화증의 완화도 관찰되었다.
3. DNCB로 유발된 접촉성피부염에 마유를 처리한 실험군과 DNCB를 단독 처리한 군에서 혈청 IgE 수준 변화를 관찰 한 결과, DNCB만 처리한 군에서 IgE 수준의 유의한 증가가 관찰되었으나, 마유를 처리한 군에서는 DNCB만 처리한 군에 비해 IgE 수준이 감소하는 것으로 관찰되었다.

## Reference

1. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004 ; 113 : 651-7.
2. Park CI. Study on the development of cosmetic emulsion cream for patients with atopic dermatitis using *Scutellaria Baicalensis*. *Kor J Herbology.* 2006 ; 21 : 47-53.
3. Tasaka K. Epinastine: An update of its pharmacology, metabolism, clinical efficacy and tolerability in the treatment of allergic diseases. *Drugs Today (Barc).* 2000 ; 36 : 735-57.
4. Pacor ML, Di Lorenzo G, Martinelli N, Mansueto P, Rini GB, Corrocher R. Comparing tacrolimus ointment and oral cyclosporine in adults patients affected by atopic dermatitis: a randomized study. *Clin Exp Allergy.* 2004 ; 43 : 639-45.
5. Wang B (zhu). *Huangdineijing Lingshu*. Chung Hwa Book Company, Taipei. 1972 : 90-1.
6. Tao HJ. *Bencaojingjizhu*. Beijing : People's Medical Publishing House. 1994 : 416.
7. Li SZ. *Bencaogangmu*. Beijing : People's Medical Publishing House. 1982 : 2769.
8. Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2003 ; 48 : 352-8.
9. Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol.* 2002 ; 2 : 201-11.
10. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Ng mice. *Int Immunol.* 1997 ; 9 : 461-6.
11. Eun JS, Lee DH, Jeon YK, Kwon YA, Kwon J. Effect of *Kamichungdieum* on immune reaction. *Kor J Orient Physiol Pathology.* 2003 ; 18 : 1391-6.
12. Paller A, Eichenfield LF, Leung DY, Stewart D, Appell M. A 12-week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients. *J Am Acad Dermatol.* 2001 ; 44 : S47-57.
13. Park SJ, Kim YS, Kim TJ. Inhibitory effect of PG-platycodin D on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in ICR mice. *J Life Sci.* 2012 ; 22 : 1339-43.
14. Kim CH, Kim KJ. The Effects of *Yanghyulsamultanggamibang* to allergic contact dermatitis. *J Kor Orient Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2005 ; 1 : 13-26.
15. Park SO, Park BS, Ryu CM, Ahn YS. Effect of herb extracts mixed with *Houttuynia Cordata* on

- antiatopic dermatitis in DNCB-induced BALB/c mouse, *J Kor Oil Chemists Soc.* 2012 ; 2 : 175-83.
16. Kim CJ, Kim YB, Ku YH, Nam HJ. The effects of Sophorae Radix and Coptidis Rhizoma-iontophoresis in allergic contact dermatitis, *J Kor Orient Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2005 ; 18 : 199-20.
  17. Kim BA, Yang JC, Park CI. Effect of Hwangryunhaedok-tang extracts on DNCB-induced allergic contact dermatitis. *Kor J Herbology.* 2009 ; 24 : 1-5.
  18. Leung DY, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001 ; 44 : S1-S12.
  19. Mayr SI, Zuberi RI, Liu FT. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma, *Braz J Med Biol Res.* 2003 ; 36 : 821-7.