

Anti-allergic activities of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans*

Mi-Ok Choi¹, Bae-Jin Kim¹, Seung-Kyeong Jo¹, Hee-Kyoung Jung¹, Jin-Tae Lee², Hak-Yoon Kim³, Dae-Jun Kweon^{1*}

¹BioHealth Convergence Center, Daegu Technopark, Daegu 701-020, Korea

²Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Korea

³Department of Global Environment, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

유산균 발효에 의한 울피(*Castanea crenata* inner shell) 열수추출물의 아토피 피부 질환에 관한 효과 연구

최미옥¹ · 김배진¹ · 조성경¹ · 정희경¹ · 이진태² · 김학윤³ · 권대준^{1*}

¹(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터, ²대구한의대학교 화장품약리학과, ³계명대학교 지구환경과학과

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is a common chronic inflammatory disease associated with a cutaneous hypersensitivity reaction to an allergen. Although the incidence of AD is increasing these days, therapeutics has yet to be developed for its treatment. The aim of this study was conducted in order to compare and investigate the characteristic between the *Castanea crenata* inner shell extract (CS) and the *Castanea crenata* inner shell extract fermented by *Lactobacillus bifementans* (FCS) for an anti-atopic medication. The total polyphenol and flavonoid contents were similar to CS and FCS. In the DPPH and superoxide anion radical scavenging, the CS and FCS had the potential for antioxidant activities. Both of them did not exhibit cytotoxicity to HS68 cells. The evaluation of the anti-inflammatory activity in Raw264.7 cells demonstrated that the FCS has inhibited the LPS-induced production of nitric oxide as compared to the CS. The anti-atopic dermatitis test was done through the induction of DNCB in AD hairless mice. The FCS has inhibited the development of the atopic dermatitis-like skin lesion by transdermal water loss, melanin and erythema of the skin as compared to the CS. Moreover, the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α production in hairless mice were inhibited by the FCS treatment. It indicates that the fermentation of the *Castanea crenata* inner shell has the potential for the treatment of atopic dermatitis.

Key words : *Castanea crenata* inner shell, fermentation, atopic dermatitis, antioxidants, anti-inflammatory

서 론

현대 사회의 산업화·도시화에 따라 식생활과 주거생활의 변화 및 환경오염에 의한 유해물질의 노출 증가로 인해 다양한 연령층에서 알레르기 질환 유병율이 크게 증가하고 있다. 알레르기 질환은 인체가 무해한 외부 환경에 대해서도 민감한 반응을 보이는 것으로 천식이나 비염과 같은

호흡기 질환 또는 접촉성 피부염, 아토피 질환 등과 같은 피부 질환 등으로도 나타난다(1). 이들 중에서도 아토피 피부 질환은 음식물, 세균, 진드기, 기후환경인자 등과 같은 외부 항원에 지속적으로 노출됨으로 발생하는 염증 질환으로 다양한 환경 인자들에 대한 알레르기 반응은 유전적인 요소 역시 영향을 미친다(2). 이들 질환을 개선, 치료하기 위해서는 우선 알레르기 유발 요인에 노출 및 접촉을 피하고 피부를 청결하게 유지하면서 적절한 약효성분을 피부염 발병 부위에 도포하거나 전신에 투여하는 방법이 있다. 그러나 합성 아토피 피부질환 억제제는 가격이 고가이고, 의

*Corresponding author. E-mail : kj8214@ttp.org
Phone : 82-53-602-1821, Fax : 82-53-602-1898

약품 및 화장품적인 방법 모두 아직까지는 병변의 재발을 막을 수 없어 외부 항원 노출 시 재발이 빈번하게 일어나며, 부작용이 검증되지 않는 등의 문제점을 지니고 있어 이를 보완하기 위해 천연 소재를 이용한 치료제 개발 필요성이 절실한 실정이다. 최근 천연물로부터 새로운 물질에 대한 탐색 및 연구와 이에 따른 유효성·안전성 평가 기준이 확립되면서 천연물을 이용한 약물개발 연구가 가속화 되고 있다. 아토피 피부질환 개선의 일환으로는 한약재를 이용하거나 황벽나무, 대나무, 다래, 버섯 등 식물이나 수목의 추출물을 단독 또는 혼합하여 이용한 치료제의 개발이 활발하게 진행되고 있다(3-7).

우리나라는 예로부터 김치, 된장, 간장 등과 같은 발효식품을 많이 섭취하고 있으며, 최근 발효식품의 생리활성 작용이 알려지면서 건강 기능성 소재로 응용하기 위한 연구가 이루어지고 있다. 발효는 넓은 뜻으로 미생물에 의한 유용한 물질 생산으로 여길 수 있는데, 미생물은 영양물질을 외부로부터 세포 내로 섭취하고, 이들 영양물질이 효소에 의해 분해되어 생성되는 에너지를 이용하여 생명의 유지와 생장이 가능하도록 해준다. Foolad 등(8)의 연구에 따르면, 프로바이오틱 성분이 포함된 보충제를 복용한 아이들에게 알레르기성 피부 질환을 예방, 억제 효과를 보이는 것으로 나타났으며, 이들 성분 중에서도 *Lactobacillus rhamnosus* GG가 장기적으로 예방 효과가 큰 것으로 나타났다고 보고하였다. 프로바이오틱은 대장에서 항생물질의 작용을 돕는 몸에 유익한 박테리아를 아우르는 단어로 항알레르기성을 지닌 레몬밤(9), 도라지(10), 삼백초 및 비파엽(11), 알로에(12) 등 다양한 식품소재에 식품의 기능성 강화 시키거나 품질을 향상 시키는데 이용되고 있다.

밤나무(*Castanea crenata* Sieb)는 참나무과에 속하는 낙엽 활엽 교목으로 그 열매인 밤(*Castanea crenata*)은 식용, 약용, 가공식품으로 이용되고 있으며, 열매뿐 아니라 생잎, 밤나무껍질, 밤 열매 껍질과 내피 등도 약재로 사용되고 있다(13). 그 중, 율피(*Castanea crenata* inner shell)는 밤의 속껍질로 과도한 염증반응으로 인한 생체의 유해한 작용을 억제하는 항염효과 지니고 있는 것으로 보고되어 있다(14).

최근 발효를 통하여 생리기능성을 높이하고자 하는 연구가 활발한 바 본 연구에서는 율피 열수추출물과 *L. bifementans*로 발효과정을 거쳐 얻어진 율피 발효추출물을 대상으로 항산화 및 항염증 활성을 조사하여 아토피 피부질환 기능성 소재로서의 활용 가능성을 타진하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

율피 열수추출물의 제조 및 일반 성분 분석

본 실험에 사용한 율피(*Castanea crenata* inner shell)는

대구 소재 (주)푸드웰에서 제공받아 사용하였다. 율피 열수추출물(*Castanea crenata* inner shell extracts, CS)은 율피를 압력식 추출기(KyungSeo Machines Co., Incheon, Korea)에 시료중량 대비 10배의 물을 넣어 70°C에서 3시간씩 3회 반복 열수 추출한 다음 감압 농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 동결시켜 시료를 준비하였다. 율피 열수추출물의 일반 성분은 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의뢰하여 분석하였다. AOAC법(15)에 따라 율피 열수추출물의 수분함량, 조회분함량, 조단백질함량 및 조지방함량을 분석 후 탄수화물 함량은 시료에서 수분, 단백질, 지질 및 회분의 함량을 감하여 계산한 값으로 하였다.

발효 균주 선발 및 율피 발효추출물 제조

율피 발효추출물(fermented *Castanea crenata* inner shell extracts, FCS) 제조에 적합한 균주 선발을 위하여 (재)대구 테크노파크 바이오헬스융합센터에서 보유 중인 *L. amylophilus*와 *L. bifementans*를 대상으로 율피 발효에 따른 균주 생육을 조사하였다. 즉, 0.5 g 율피 열수추출물에 물 100 mL를 첨가하여 제조한 배지에 두 종류의 유산균 전배양액을 1%(v/v) 접종하고 24시간 동안 정치배양한 다음 MRS agar(Difco Laboratoriese, Detroit, MI, USA)에 도말하고 24시간 동안 배양 후 형성된 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다. 율피 발효추출물은 선발된 균주 전배양액을 1%(v/v)로 접종하여 상기와 같이 24시간 동안 정치배양한 다음 원심분리 후 상등액을 회수하고 동결건조하여 준비하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법(16)에 준하여 측정하였다. 시료 1 mL에 10배 희석한 Folin 시약 5 mL 첨가하고, 용액을 잘 혼합한 다음 5분 동안 실온에 방치하였다. 여기에 7.5% Na_2CO_3 4 mL를 첨가하고 이 혼합액을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 대표적인 폴리페놀계 물질인 tannic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을 작성하여 나타내었다.

총 플라보노이드 함량의 측정은 AlCl_3 법(17)을 이용하여 측정하였다. 율피 열수추출물과 율피 발효추출물 1 mL에 5% NaNO_2 150 μL 를 혼합하여 5분 동안 실온에 방치하였다. 여기에 10% AlCl_3 300 μL 를 가하여 실온에서 5분 반응시킨 후, 1 M NaOH 1 mL와 혼합하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 catechin(Sigma)을 사용하였으며, 표준물질의 검량선과 비교하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다. 모든 실험은 3회 반복수행하여 평균값으로 나타내었다.

전자공여능 측정

시료의 전자공여능(electron donating ability)을 통한 항산화 활성 측정을 위해 Blois 법(18)에 의하여 시행하였다. 율피 열수추출물과 율피 발효추출물 0.5 mL에 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH, Wako, Tokyo, Japan) 용액 5 mL를 넣어 잘 혼합한 후 암실에서 15분 간 방치한 다음, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료 첨가 유무에 따른 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Electron donating ability(\%)} = (1 - \text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무 첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Superoxide anion radical 소거능 측정

Superoxide anion radical 소거능은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원법(19)에 의하여 시행하였다. 시료 0.1 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 0.6 mL를 넣어 잘 혼합하였다. 여기에 0.4 mM xanthine(Sigma)용액과 0.24 mM NBT(Sigma)용액을 1:1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하고 xanthine oxidase(0.049 U/mL) 1 mL를 가하여 혼합하였다. 이를 37°C에서 20분 반응시킨 후, 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음 560 nm에서 흡광도 측정하였다. Superoxide anion radical 소거능은 시료용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Superoxide anion radical 소거능(\%)} = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{시료 무 첨가군의 흡광도}) \times 100$$

HS68 human fibroblast에 대한 세포 독성 측정

HS68 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양은 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Welgene Co.)에 10% FBS(Welgene Co., Daegu, Korea)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 배지를 이용하여 37°C온도와 5% CO₂가 공급되는 조건하에서 배양하였다.

율피 열수추출물과 율피 발효추출물에 대한 세포 독성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazole -2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]법(20)을 이용하여 측정하였다. 24 well plate에 세포를 3×10⁴ cells/well 농도로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 율피 열수추출물과 율피 발효추출물을 0.1 mg/mL 농도로 처리하였다. 이를 24시간 배양한 뒤 MTT(Sigma)용액 100 μL를 첨가하고 다시 4시간 동안 추가반응을 시킨 다음 배지를 제거하고 형성된 formazan을 1 mL dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여낸 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 대한 세포 독성은 시료를 첨가 하지 않은 세포의 흡광도 값을 100%로 하여 상대적인 세포 생존율로 나타내었다.

항염증 활성 측정

율피 열수추출물과 율피 발효추출물에 의한 항염증 활성도를 측정하기 위해 마우스의 대식세포인 RAW264.7을 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 이용하였다. 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Welgene Co.)에 10% FBS(Welgene Co.)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco)을 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 incubator에서 배양하였다.

항염증 활성은 RAW264.7 세포로부터 생산된 nitric oxide(NO) 생성량을 Griess reagent system(21)법을 이용하여 조사하였다. 24 well plate에 RAW264.7 세포를 5×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여, 24시간동안 배양하고 율피 열수추출물 및 율피 발효추출물을 농도별로 처리하고 2시간 동안 반응시킨 다음 lipopolysaccharide(LPS) 1 μg/mL를 첨가한 후 18시간 동안 추가 배양하였다. 세포로부터 생산된 NO의 양은 세포 배양액과 Griess 시약(Sigma)을 동일한 비율로 혼합하여 상온에서 15분 동안 방치시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 NaNO₂로부터 작성된 표준 곡선을 이용하여 NO 함량을 산출하였다.

실험동물

실험동물인 6주령의 수컷 NC/Nga mice(21~26 g)는 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 공급 받아 실험 당일까지 사료와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12시간 주기의 명암을 유지한 실험동물사에서 1주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험 수행에 관련된 모든 과정은 동물보호법의 3R 및 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 원칙을 준수하고 윤리적인 측면을 고려하면서 수행하였다.

피부염 유발 및 시료 처리

안정화 기간이 지난 후 NC/Nga mice의 등 부위를 깨끗하게 제모하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)용액(Acetone: Olive oil=3:1) 200 μL를 NC/Nga mice 등 부위에 도포하고, 3일 후 0.4% DNCB 용액 150 μL를 다시 도포하였으며, 4일 후부터는 1주일에 3번씩 0.4% DNCB 용액 150 μL를 3주간 도포하였다. 실험동물은 총 12마리를 4개의 군으로 나누었으며 정상군, 대조군에는 증류수를 도포하고, 나머지 두 개의 군에는 각각 5% 율피 열수추출물, 5% 율피 발효추출물을 1주일에 5번씩 3주간 도포하였다. 아토피 피부염 유발 후 율피 열수추출물 및 율피 발효추출물을 도포한 실험을 통해 피부조직의 형태학적 변화인 홍반, 건조피부, 깃무름, 부종과 혈종 등을 육안으로 관찰하였다.

피부 분석

피부 측정 기기인 MPA5 580(Courage & Khazaka GmbH,

Cologne, Germany)을 이용하여 아토피 피부염 상태에서 변화하는 피부수분지수, 피부멜라닌지수, 피부홍반지수를 측정 및 비교분석하였다. 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mice에 시료를 3주간 도포하고 마지막 도포 24시간 후, NC/Nga mice의 등 부위 피부를 3번 연속 측정하여 평균값을 얻었으며 측정 장소는 실내온도 21~23°C, 습도 50~60%가 유지되는 조건에서 측정하였다.

염증 사이토카인의 유전자 발현 측정

피부조직의 RNA는 Fibrous Tissue Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA의 농도는 NanoDrop ND-1000(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 측정하였으며, cDNA Synthesis Kit(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 5 µg의 RNA를 cDNA로 합성한 후, real-time PCR에 사용하였다. Real-time PCR은 Corbett research RG-6000(Corbett Life Science, Sydney, Australia)을 이용하여 수행하였다. 염증 사이토카인 유전자 발현은 QuantiTect SYBR Green PCR(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하였고, endogenous control은 GAPDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 10 pM이 되게 반응시켜 측정하였다. 실험에 사용된 염증성 사이토카인의 염기서열은 다음과 같으며, 유전자 발현의 fold change는 delta-delta Ct 방법(22)을 이용하여 산출하였다.

IL-1β : 5' CCC AAG CAA TAC CCA AAG AA 3'(Forward)
 5' GCT TGT GCT CTG CTT GTG AG 3'(Reverse)
 TNF-α : 5' GAT TAT GGC TCA GGG TCC AA 3'(Forward)
 5' GCT CCA GTG AAT TCG GAA AG 3'(Reverse)
 GAPDH : 5' TGA ATA CGG CTA CAG CAA CA 3'(Forward)
 5' AGG CCC CTC CTG TTA TTA TG 3'(Reverse)

통계처리

실험 결과의 통계처리는 평균±표준편차로 표시하였으며, 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (statistical package for social sciences, 10.0, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결과 및 고찰

울피 열수추출물의 일반 성분 분석 및 울피 발효추출물 제조를 위한 발효 균주 선발

본 연구에서 분석된 울피 열수추출물의 일반성분 함량은 Table 1과 같다. 추출물 100 g 중에는 수분 0.83 g, 조회분 2.49 g, 조단백 7.00 g, 탄수화물 90.00 g이 함유된 것으로 분석되어 울피 열수추출물의 주된 성분은 탄수화물과 조회

분으로 구성되어 있으며, 조지방 함량은 거의 함유되어 있지 않은 것으로 나타났다. 울피 발효추출물 제조를 위한 미생물 선발을 위하여 각 균주의 발효액으로부터 *L. amylophilus*와 *L. bifementans* 두 균주의 생균수를 측정할 결과, *L. amylophilus*와 *L. bifementans*의 생균수는 각각 1.40 log CFU/mL, 5.52 log CFU/mL로 나타났다(data not shown). *L. bifementans*가 *L. amylophilus*와 비해 균주의 생육이 우수하여 *L. bifementans* 균주를 울피 발효추출물 제조 균주로 선발하였다.

Table 1. The proximate composition of in *Castanea crenata* inner shell extracts (CS)

Component	Contents (g/100 g)
Moisture	0.83
Crude ash	2.49
Crude protein	7.00
Crude fat	0
Carbohydrate	90.00

울피 열수추출물 및 울피 발효추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

일반적으로 식물은 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물과 같은 2차 대사산물을 함유하고 있는데 이들은 방향성 화합물로 고리구조상 -OH기로부터 전자를 공여하여 페놀 고리 구조 공명에 의해 구조적 안정화되면서 항산화 활성을 나타내게 된다(23). 이러한 폴리페놀과 플라보노이드는 항산화, 항염증, 항암 등 생리활성에 관여하는 것으로 최근 많은 연구에서 밝혀지고 있다.

울피 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 0.25 mg/mL에서 14.37±1.14 µg/mL의 함량을 보였고 0.5, 0.75, 1 mg/mL에서는 각각 38.83±0.27, 59.82±0.57, 73.85±1.78 µg/mL의 폴리페놀 함량을 나타내었다. 울피 발효추출물은 동일한 농도에서 각각 19.98±0.32, 42.48±0.46, 58.19±3.42와 81.32±1.73 µg/mL로 울피 열수추출물에 비해 약간 증가하였으나 큰 차이를 보이지 않았다(data not shown). Jo 등(24)은 대추 혼합물의 발효에 따른 폴리페놀 함량의 변화는 크지 않았다고 보고하였는데, 본 연구에서도 역시 울피의 발효에 따른 폴리페놀 함량의 변화는 거의 보이지 않았다. 총 플라보노이드 함량은 울피 열수추출물이 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL의 농도에서 각각 3.55±0.23, 7.75±0.05, 11.66±0.28, 18.72±0.20 µg/mL의 함량을 보였으며, 울피 발효추출물은 동일한 농도에서 3.39±0.09, 6.95±0.01, 11.22±0.29, 14.70±0.21 mg/mL로 울피 열수추출물과 비교해 약간 감소하는 경향을 보였다(data not shown). Chien 등(25)은 두유 젖산균 발효 시 glucoside isoflavone이 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다. 이는 울피 역시 젖산 발효에 의한 플라보노이드 계열의 물질이 감소로 여겨진다.

올피 열수추출물 및 올피 발효추출물의 항산화 활성

전자공여능은 활성라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화를 억제하는 목적으로 사용되며, 인체 내 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다. 전자공여능 측정은 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH는 아스코르빈산 및 토코페롤, flavonoid 화합물, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 짙은 자색을 띠는 안정한 자유 라디칼로 다양한 천연소재로부터 생리활성 물질을 검색하는데 널리 이용되고 있다(26). 올피 열수추출물과 올피 발효추출물을 동일한 농도로 용해하고 DPPH 시약을 이용하여 전자공여능을 조사한 결과, 두 시료 모두 농도가 증가할수록 항산화 효과가 조금씩 증가하는 결과를 보였으나, 오차 범위에서 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 최대 농도인 1 mg/mL 올피 열수추출물과 올피 발효추출물의 전자공여능은 각각 73.74 ± 1.18 , 67.17 ± 1.87 로 70% 내외로 측정되었다(Table 2).

Superoxide radical은 호기적 대사기관에서 생성되고 주로 세포막 지질과 반응하여 과산화물을 생성하므로 세포 손상을 초래한다고 알려져 있으며, 생체는 이러한 과산화물에 대한 반응 체계로 SOD(superoxide dismutase)에 의하여 superoxide radical을 H_2O_2 로 바꾸어 다시 H_2O_2 는 catalase와 glutathion peroxidase의 작용에 의해 H_2O 로 환원되어 생체를 보호할 수 있도록 해준다(27). 올피 열수추출물의 농도가 0.25 mg/mL에서 $61.93 \pm 1.20\%$ 로 나타났으며, 농도를 높일수록 소거능이 계속 증가하여 1 mg/mL에서는 $91.58 \pm 2.51\%$ 의 소거능을 보였다. 올피 발효추출물 역시 저농도에서 $75.18 \pm 7.14\%$ 의 소거능을 보였으며, 농도의존적으로 소거능이 향상되어 1 mg/mL에서 $100.15 \pm 4.30\%$ 를 나타내었다(Table 2).

Table 2. DPPH and superoxide anion radical scavenging activity of *Castanea crenata* inner shell extracts (CS) and fermented *Castanea crenata* inner shell extracts (FCS)

Group	Concentration (mg/mL)	DPPH (%)	Superoxide anion radical scavenging (%)
CS	0.25	$20.31 \pm 0.29^{1)}$	61.93 ± 1.20
	0.50	41.70 ± 0.63	79.30 ± 1.46
	0.75	58.88 ± 1.02	87.89 ± 1.92
	1.00	73.74 ± 1.18	91.58 ± 2.51
FCS	0.25	20.55 ± 1.08	75.18 ± 7.14
	0.50	38.49 ± 0.75	$95.07 \pm 2.82^*$
	0.75	55.10 ± 1.88	$96.13 \pm 2.91^*$
	1.00	67.17 ± 1.87	100.15 ± 4.30

¹⁾The results are expressed as mean±standard deviation of triplicate experiments.
*p<0.05 vs. *Castanea crenata* inner shell extracts.

올피의 발효에 따른 항산화 활성은 다소 증가하는 경향을 보였으나 큰 차이를 나타내지 않았다. Kim 등(28)은 다양

한 약용식물의 폴리페놀 함량과 항산화 활성, superoxide radical 소거능 사이의 상관관계가 있다고 보고하였으며, Yoo 등(29) 역시 감잎 추출물에서 폴리페놀 화합물이 증가할수록 전자공여능이 비례적으로 증가한다고 나타내었다. 올피 발효추출물 역시 올피 열수추출물에 비해 높은 총 폴리페놀 함량을 보였으나, 두 그룹 사이에서 큰 차이를 보이지 않았으며 이에 따른 항산화 활성 역시 큰 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다.

올피 열수추출물 및 올피 발효추출물의 HS68 세포에 대한 독성

올피 열수추출물 및 올피 발효추출물의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 HS68 세포에 각 시료를 처리하여 24시간 후 MTT assay로 세포 생존율을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 올피 열수추출물에서는 0.1 mg/mL에서 $77.80 \pm 8.16\%$ 의 생존율을 보였으나, 올피 발효추출물에서는 $104.04 \pm 3.04\%$ 로 올피 열수추출물과 비교해 유의적으로 높은 생존율을 보였으며, 현미경 상에서 morphology 변화도 관찰되지 않았다. Ryu 등(30)은 발효기간에 따른 김치 추출물을 피부세포에 처리하였을 때, 세포의 산화적 스트레스에 대한 세포 독성 완화효과를 보였다고 보고하였다. Choi 등(31)은 발효 한약 혼합물을 세포에 처리 시 유의성 있게 세포 증식 효과를 보임에 따라, 노화된 피부세포의 활성화를 가져와 노화 방지에 우수한 효능을 지니고 있으며 세포 활성능을 완화하여 피부 세포가 암화 될 가능성도 적어 피부에 독성이 적고 친화적인 물질이라 나타내었다. 발효에 의한 올피 역시 세포 독성을 보이지 않아 새로운 향장 소재로서의 적용 가능성을 지닌 것으로 보인다.

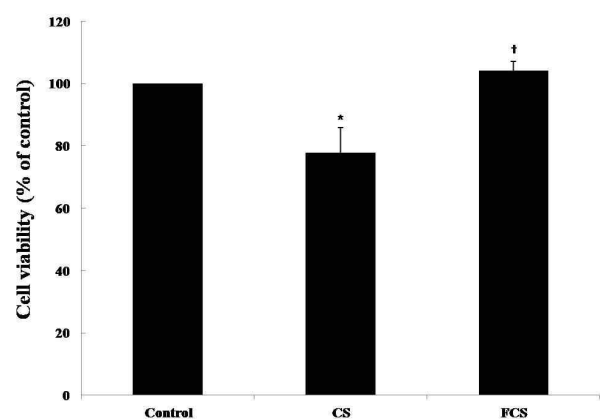


Fig. 1. Effect of *Castanea crenata* inner shell extracts (CS) and fermented *Castanea crenata* inner shell extracts (FCS) cytotoxicity in HS68 cells.

HS68 cells were treated with CS (0.1 mg/mL) and FCS (0.1 mg/mL) for 18 hr. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and methods. Data represent mean±SEM. Student's t-test, *p<0.05 vs. control group; † p<0.05 vs. CS treated group.

올피 열수추출물 및 올피 발효추출물이 NO 생성에 미치는 영향

그람 음성 박테리아의 외벽에 존재하는 LPS(lipopolysaccharide)로 활성화된 대식세포(macrophage)는 TNF- α , IL-6, COX-2 등과 같은 염증을 유발하는 사이토카인(proinflammatory cytokine)과 NO를 생성하여 여러 염증성 질환에 중요한 역할을 한다(32). NO는 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 부산물로 생성되며, 신경 전달 체제, 항균 물질, 면역조절 등 생체 내에서 항상성 유지에 중요한 역할을 하나, 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, 혈관 확장, 염증 반응 유발에 의한 조직손상을 초래한다고 알려져 있다(32). 이와 같은 관찰 결과로부터 올피 열수추출물과 올피 발효추출물의 생체 내 약리 작용을 알아보기 위하여 LPS로 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 NO 발생을 유도한 후, 시료를 처리하여 NO 발생 정도의 변화유무를 관찰하였다.

RAW264.7 대식세포에 올피 열수추출물과 올피 발효추출물 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/mL를 처리하고 2시간 배양시킨 다음 LPS 1 μ g/mL를 처리하고 18시간 동안 추가반응을 시킨 다음 NO를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 올피 열수추출물과 올피 발효추출물은 각각 대조군 9.07 \pm 3.79, 8.49 \pm 2.56 μ M에 비하여 LPS 단독 처리군에서는 37.56 \pm 4.32, 38.12 \pm 3.36 μ M로 유의적으로 증가하였다. 0.05 mg/mL에서 올피 열수추출물과 올피 발효추출물의 NO 생산량은 각각 36.27 \pm 4.52, 29.56 \pm 4.91 μ M로 올피 열수추출물과 비교해 올피 발효추출물이 약 18.54%로 유의적인 감소를 나타냈으며, 전체적으로 농도의존적인 NO 생성 억제력을 보였다. Yang 등(33)은 황련해독탕과 비교해 발효황련해독탕에서 NO 생성이 유의적으로 억제되었으며, 두 시료 모두 염증성 질환의 치료에 응용 가능할 것이라 보고하였다. 이

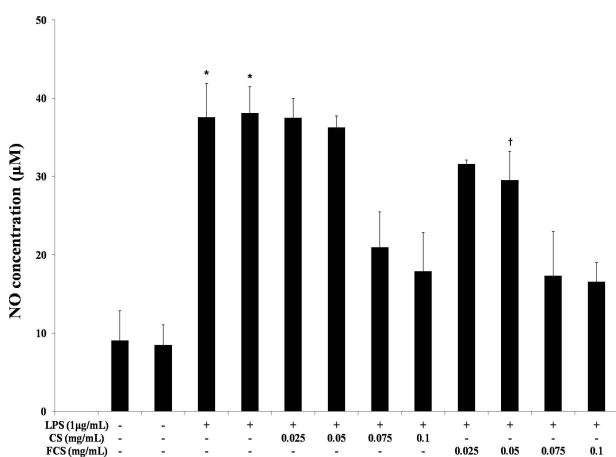


Fig. 2. The inhibitory effects of *Castanea crenata* inner shell extracts (CS) and fermented *Castanea crenata* inner shell extracts (FCS) on LPS-induced NO production.

The Raw 264.7 cells were treated with CS and FCS as indicated concentration for 2 hr, and then with or without LPS 1 μ g/mL for 18 hr. NO production was measured by Griess method. Data represent mean \pm SEM. Student's t-test, *p<0.05 vs. control, †p<0.05 vs. CS treated group.

에 따라 올피 열수추출물 및 올피 발효추출물 역시 알레르기성 질환 치료제에 적용이 가능할 것이라 사료된다.

NC/Nga mice에서 피부 형태 및 피부지수 변화

DNCB 도포를 통해 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mice에 올피 열수추출물 및 올피 발효추출물을 3주간 도포한 후, 형태학적 변화를 육안상 관찰하였다. 그 결과, 정상군에서는 피부의 형태학적 변화가 나타나지 않았으나, DNCB를 처리한 대조에서는 홍반, 건조피부, 짓무름, 부종과 혈종 등의 아토피성 피부 변화가 확인되었다. 올피 열수추출물 군에서는 DNCB 도포에 의한 피부의 형태학적 변화가 일부 호전되었지만 큰 차이는 없었으나, 올피 발효추출물 군에서는 뚜렷한 개선 효과를 보였고 정상군과 유사한 피부 형태를 나타내었다.

아토피가 유발된 피부는 염증을 동반하여 붉게 부어오르고, 염증을 완화시키기 위하여 염증 유발 부위에 멜라닌 침착이 증가하는 현상을 보이게 된다(34). NC/Nga mice의 피부멜라닌지수를 측정된 결과, 정상군 44.50 \pm 0.17, 대조군 211.33 \pm 12.33, 올피 열수추출물군 158.67 \pm 23.11, 올피 발효추출물군 99.56 \pm 5.20로 나타나 아토피 피부염 유발로 인해 증가된 멜라닌 함량이 올피 발효추출물 도포에 의해 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 피부홍반지수를 측정된 결과에서도 정상군 156.50 \pm 3.83, 대조군 276.33 \pm 10.33, 올피 열수추출물군 258.44 \pm 26.12, 올피 발효추출물군 223.22 \pm 4.64로 나타나 올피 발효추출물의 도포에 의한 피부 홍반의 감소 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 멜라닌 함량과 홍반의 감소 효과는 올피 열수추출물을 도포하였을 때도 확인할 수 있었지만 상대적으로 올피 발효추출물에 의한 멜라닌의 경우 유의적인 감소를 보였다. 이와 마찬가지로 피부수분지수 측정값의 변화에서도 정상군 54.60 \pm 4.72, 대조군 15.50 \pm 2.23, 올피 열수추출물군 11.50 \pm 1.04, 올피 발효추출물군 29.20 \pm 2.18로 나타나 DNCB 도포에 의해 감소된 피부의 수분 함량이 올피 열수추출물의 도포에 의해 유의적으로 증가되었다(Fig. 3C). Chang 등(6)은 아토피 유발 마우스에 대나무 추출물을 도포하게 되면 경피수분손실, 멜라닌과 홍반의 증가가 억제되어 아토피 피부염을 억제시키는 것으로 나타났다고 보고하였으며, 이러한 실험 결과를 바탕으로 올피 발효추출물 역시 아토피 피부질환에서 나타나는 피부 병변의 변화를 호전시킬 수 있음을 시사한다.

NC/Nga mice에서 염증 사이토카인 유전자의 발현의 변화

앞선 실험을 통해 확인된 올피 발효추출물의 항아토피 효능이 피부에 존재하는 염증 사이토카인 유전자의 변화와 관련 있는지 확인하기 위해 IL-1 β 와 TNF- α 에 대한 quantitative real-time PCR을 수행하였다. TNF- α 와 IL-1 β 는 LPS에 의해 유도되는 전염증성 사이토카인으로 면역세포를 활성화시

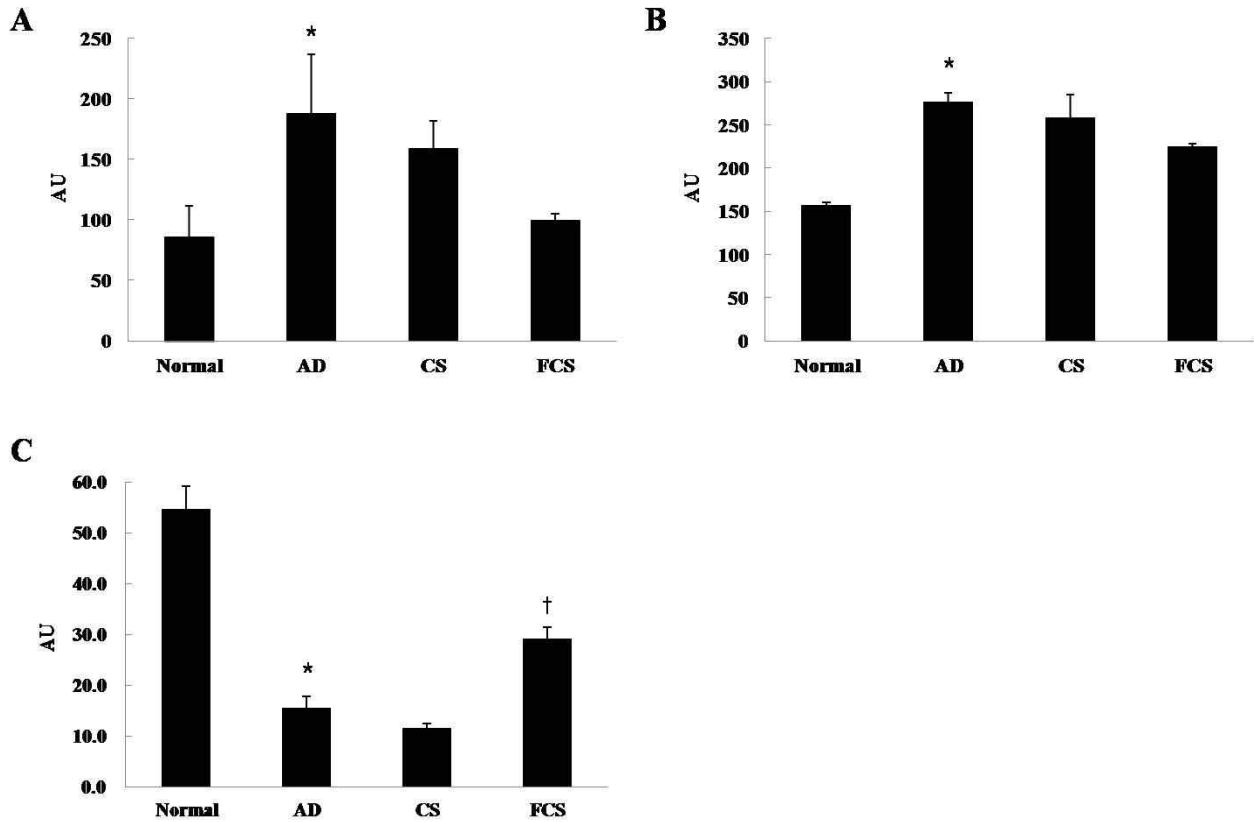


Fig. 3. Skin measurement results of DNCB-induced NC/Nga atopic mice.

Skin melanin, erythema and moisture indices of NC/Nga mice were measured by MPA5 580 on three weeks with CS or FCS treatment. Melanin (A), erythema (B) and skin moisture index (C) occurred in CS or FCS treated NC/Nga atopic mice group (n=3 per group). Data represent mean±SEM. Student's t-test, *p<0.05 vs. normal mice group; † p<0.05 vs. AD mice group.

켜 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와주며, 염증성 질환이 일어났을 때, 신체 내에서 고농도로 발현이 되는데, 이들이 장기로 유입되면 장기 손상과 부전을 야기하는 문제점이 있다고 보고되어 있다(35).

피부에서 IL-1 β mRNA 유전자 발현은 정상군의 relative quantification(RQ) 값이 1일 때, 대조군은 1.34로 아토피 유발로 인해 IL-1 β mRNA 발현이 증가되었고 율피 열수추출물군은 0.95, 율피 발효추출물군은 0.82로 나타나 대조군에 비하여 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 4A).

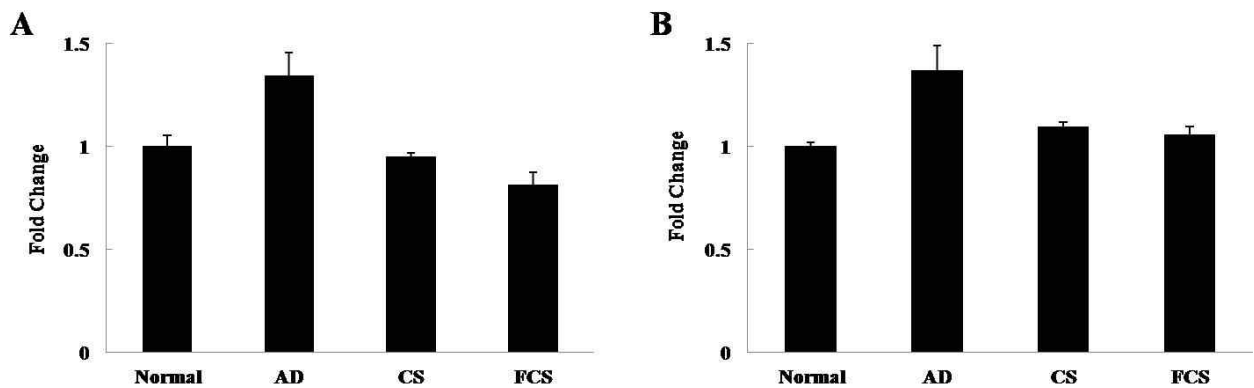


Fig. 4. Expression levels of pro-inflammatory cytokines in the dorsal skin of DNCB-induced atopic dermatitis NC/Nga mice.

The mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines in the dorsal skin of NC/Nga mice were measured by quantitative real-time PCR. On three weeks after CS or FCS treatment, improvement of mRNA expression levels of IL-1 β (A) and TNF- α (B) observed in CS or FCS treated NC/Nga atopic mice group(n=3 per group). Data represent mean±SEM. Student's t-test, *p<0.05 vs. normal mice group; † p<0.05 vs. AD mice group.

TNF- α mRNA 유전자 발현은 정상군의 RQ값이 1일 때, 대조군 1.37, 율피 열수추출물군 1.1, 율피 발효추출물군 1.06으로 나타나 대조군에서 증가된 TNF- α mRNA의 발현이 율피 열수추출물 및 율피 발효추출물 도포에 의해 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 4B). 이 결과들은 율피 열수추출물 및 율피 발효추출물이 IL-1 β , TNF- α 와 같은 염증 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써 아토피 피부염에 치료 효과를 나타내고 있다는 것을 의미한다.

요 약

본 연구에서는 밤나무 과실의 속껍질인 율피를 이용하여 알레르기성 피부질환 기능성 원료로 사용 가능성을 조사하였다. 율피 열수추출물과 율피 발효추출물의 총 폴리페놀 함량은 1 mg/mL에서 각각 73.85 \pm 1.78, 81.32 \pm 1.73 μ g/mL였으며, 동일한 농도에서 총 플라보노이드 함량은 18.72 \pm 0.20, 14.70 \pm 0.21 μ g/mL로 나타났다. 항산화 활성으로 율피 열수추출물과 율피 발효추출물의 전자공여능은 1 mg/mL에서 각각 73.74 \pm 1.18, 67.17 \pm 1.87%로 나타났으며, superoxide anion radical 소거능은 동일한 농도에서 각각 91.58 \pm 2.51, 100.15 \pm 4.30%로 두 그룹 간 항산화 활성은 큰 차이를 보이지 않았다. HS68 세포를 대상으로 율피 열수추출물과 율피 발효추출물에 대한 세포 독성을 조사한 결과, 율피 발효추출물에서 율피 추출물과 비교 시 세포 생존율이 1.33배 증가하였다. 또한 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 0.05 mg/mL 율피 열수추출물과 율피 발효추출물 처리에 의한 NO생산량은 각각 36.27 \pm 4.52, 29.56 \pm 4.91 μ M로 율피 발효추출물 처리군에서 항염증 활성이 유의적으로 높았다. 아토피 유발 NC/Nga 마우스 모델에서 율피 열수추출물 및 율피 발효추출물을 도포하여 육안 상 관찰한 피부 병변은 율피 열수추출물 처리군에서 대조군과 비교해 피부 형태학적으로 일부 호전되는 경향을 보였으나, 율피 발효추출물 처리군은 멜라닌 함량과 피부 홍반의 감소 등 뚜렷한 개선 효과를 보였으며 정상군과 유사한 피부 형태를 나타내었다. 또한 피부에 존재하는 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 율피 열수추출물과 비교 시 율피 발효추출물에서는 각각 13.68, 3.63% 억제되었다. 이는 *in vitro* 실험과 유사하게 염증과 관련된 유전자의 발현을 저해함으로써 율피 발효추출물이 염증억제 효과는 물론 항아토피 효능을 나타내는 것으로 여겨진다. 따라서 율피 열수추출물 뿐만 아니라 율피 발효추출물 역시 아토피 피부질환을 개선하는데 유용한 물질로 활용될 수 있는 효과적인 조성물이라 사료된다.

References

1. Kim JS, Park YM, Jeong JB, Lim JH, Jeong HJ, Seo

- EW (2011) Effect of LES on recovery capability of DNCB-induced allergic contact dermatitis in rat. *Korean J Life Sci*, 21, 713-719
2. Kwon HJ (2012) Atopic dermatitis an environmental disease?, *J Skin Barrier Res*, 14, 28-37
3. Cho HC, Sul HC, Kim SR, Choi HS, Shin YC, Ko SG (2011) Topical application of Herbal-mixed extract on back skin suppresses inflammation in Ovalbumin-induced atopic dermatitis. *Kor J Oriental Preventive Medical Society*, 15, 163-178
4. Kim GE, Kim JH, Hong SK, Kim TG, Kim DU (2010), Anti-acne and anti-atopic dermatitis effect of plant extracts including *Eucommia ulmoides Oliv* and *Phellodendron amurense*. *Korean Chem Eng Res*, 48, 700-703
5. Jung HJ, Hwang-Bo M, Do EJ, Suk JM, Kim MR, Kim YH, Do KB, Lee CE, Jee SY (2010) A clinical research about herbal cosmetic containing *Phellinus linteus* extracts in atopic dermatitis patients. *J Korean Oriental Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 23, 154-164
6. Chang BS, Lee GY, Choi EY, Lee JC, Ham JH, Jung HS, Lee KJ, Kim DH (2009) The effects of bamboo extract on atopic dermatitis by induced hairless mice skin. *J Beauty Trichol*, 5, 1-5
7. Joo YH, Won JH, Kim JY, Cho KH, Min KY, Kim KH (2009) Developing an atopic dermatitis model and the effects of *Actinidia* extract on dermatitis in NC.Nga mice. *Korean J Dermatol*, 47, 1105-1112
8. Foolad N, Brezinski EA, Chase EP, Armstrong AW (2012) Effect of nutrient supplementation on atopic dermatitis in children. *Arch Dermatol*, 17, E1-E6
9. Yang HJ, Kim EH, Park JO, Kim JE, Park SN (2009) Antioxidative activity and component analysis of fermented *Melissa officinal* extracts. *J Soc Cosme Scientists Korea*, 35, 47-55
10. Kim MS, Kim WG, Chung HS, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae HS (2012) Improvement of atopic dermatitis-like skin lesions by *Platycodon gtrandiflorum* fermented by *Lactobacillus plantarum* in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull*, 35, 1222-1229
11. Choi MJ, Jung HG, Jeong YS, Park SC, Hong JH (2010) Anti-allergic activities of fermented *Eriobotrya japonica* and *Saurus chinensis* extracts in 2,4-dinitrochlorobenzene-induced BALB/c mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 1611-1618
12. Yun SH, Lee SS, Jang JE, No GW (2004) Sensory evaluation of *Chungkukjangs* with Herbal extracts and clinical evaluation in atopy dermatitis patients. *Korean*

- Nutr Soc, 37, 669-674
13. Oh SH, Kim YW, Kim MA (2004) The antioxidant activities of acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop. Korean J Food Culture, 19, 399-406
 14. Jung SH, Jo WA, Son JH, Park CI, Lee IC, An BJ, Son AR, Kim SK, Kim YS, Jung YS, Kang BY, Choi EY, Lee JT (2005) A study on the application of new cosmetic materials of whitening effect and the physiological activities of chestnut inner shell. Kor J Herbology, 20, 27-33
 15. AOAC (1990) Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed, Association of Official Analytical Chemists international, Gaithersburg, MD, USA
 16. Anesini C, Ferraro GE, Filip R (2008) Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in aegentina. J Agric Food Chem, 56, 9225-9229
 17. Eghdami A, Sadeghi F (2010) Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea millefolium*. Org Chem J, 2, 81-84
 18. Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. J Sci Techol, 26, 211-219
 19. Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Saavedra G, Muricia MA, Jimenez AM, Colina C (2003) Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. Life Sci, 73, 1667-1681
 20. Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. J Immunol Methods, 89, 271-277
 21. Brandenburg LO, Kipp M, Lucius R, Pufe T, Wruck CJ (2010) Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia. Inflamm Res, 59, 443-450
 22. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc, 3, 1101-1108
 23. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (2009) Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci, 32, 67-103
 24. Jo HE, Chong MS, Choi YH (2010) Evaluation of composition and antioxidant activity from *Zizyphus jujuba* fruits and leaves extracts for development medicinal food. Kor J Ori Med Physiol Pathol, 24, 859-865
 25. Chien HL, Huang HY, Chou CC (2006) Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol, 23, 772-778
 26. Yu MH, Lim HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS (2006) Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. inermis rehder. Korean J Food Sci Technol, 38, 128-134
 27. Kim SW, Lee SO, Lee TH (1991) Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*. Agric Biol Chem, 55, 101-108
 28. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant of some medicinal plants. Korean J Food Sci Technol, 36, 333-338
 29. Yoo KH, Jeong JM (2009) antioxidative and antiallergic effect of persimmon leaf extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 1691-1698
 30. Ryu SH, Jeon YS, Kown MJ, Moon JW, Lee YS, Moon GS (1997) Effect of Kimchi extracts to reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. J. Korean Soc Food Sci Nutr, 26, 814-821
 31. Choi JH, Hwang SJ, Jeong SN, Lee YK, Jin MH, Park SG, Lee CK (2009) Anti-aging effect on skin with 9 repetitive streaming and fermenting process herbal composition extract. J Herbology, 24, 101-106
 32. Lee DH, Sohn DS, Jo DY, Kim BJ, Lim YY, Kim YH (2010) Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of Sophora flavescens root extraction in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. Korean J Med Mycol, 15, 39-50
 33. Yang HJ, Joo HA, Baek SC, Park JJ, Hong SH (2011) Anti-inflammatory effects of Hwangyeonhaedok-tang and fermented Hwangyeonhaedok-tang. J Korean Oriental Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 24, 1-15
 34. Spergel JM, Paller AS (2003), Atopic dermatitis and the atopic march. J Allergy Clin Immunol, 112, S118-S127
 35. Park SJ, Kim SK (2010) Anti-inflammatory effects of Belamcanda chinensis water extract. Kor J Ori Med Physiol Pathol, 23, 410-415