

## *Lactobacillus bifementans*로 발효한 울피의 항아토피 효과

김배진<sup>1</sup> · 손우림<sup>1</sup> · 최미옥<sup>1</sup> · 조성경<sup>1</sup> · 정희경<sup>1</sup> · 이진태<sup>2</sup> · 김학윤<sup>3</sup> · 권대준<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터

<sup>2</sup>대구한의대학교 화장품약리학과

<sup>3</sup>계명대학교 환경생물학과

### Anti-atopic Effects of *Castanea crenata* Inner Shell Extracts Fermented by *Lactobacillus bifementans*

Bae Jin Kim<sup>1</sup>, Woo Rim Son<sup>1</sup>, Mi Ok Choi<sup>1</sup>, Seung Kyeong Jo<sup>1</sup>, Hee Kyoung Jung<sup>1</sup>,  
Jin Tae Lee<sup>2</sup>, Hak Yoon Kim<sup>3</sup>, and Dae Jun Kwoen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biohealth Convergence Center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongbuk 712-715, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Global Environment, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

**ABSTRACT** Atopic dermatitis (AD) is a common skin disease characterized by chronic and relapsing inflammatory dermatitis with immunological disturbances. In spite of the continuous increase in the incidence of AD, it is regrettable that till date there is no effective treatment to treat the same. Therefore, the present study was designed to examine the possible anti-atopic effects of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans* (FCS) in 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) induced AD in NC/Nga mice. Based on the results of HPLC analysis, we found that FCS contains anti-inflammatory factors such as gallic acid (10.18 mg/g) and ellagic acid (2.14 mg/g). The groups that we have used in this study included 0.1%, 1%, 5% fermented *Castanea crenata* inner shell extracts (FCS 0.1, FCS 1, FCS 5), 1,3-butylene glycol treated control (AD), and normal mice. After topical FCS treatment, we observed that the clinical severity score for AD was lower in both the FCS 1 and FCS 5 groups than the AD group. We also proved beyond doubt that there was improvement of melanin, erythema and skin moisture indices in the FCS 5 group. Spleen index and gene expression levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were significantly decreased in the FCS 5 group compared to the AD group ( $P < 0.05$ ). Further, we also found that the level of serum immunoglobulin E (IgE) in the FCS-treated group was decreased in a concentration-dependent manner. The results of our study suggest that FCS can be effectively used as a cosmeceutical ingredient for both the prevention and improvement of AD.

**Key words:** fermented *Castanea crenata* inner shell, atopic dermatitis, NC/Nga mice, cosmeceutical ingredient

## 서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 주로 유아와 소아에서 발생하는 만성적 또는 재발성 염증 피부질환으로 멜라닌(melanin) 색소의 과침착, 피부 건조증 그리고 홍반성 피부병변으로 특징지어진다(1). 아토피 피부염이 발병하면 과민 반응으로 인해 피부를 긁게 되고 이는 홍반, 짓무름, 부종과 혈중, 가려움, 그리고 태선화 등을 동반한 염증반응을 심화시킨다(2,3). 아토피 피부염의 발병 원인은 아직까지 명확히 규명되지 않았으나 유전적인 요인, 환경적인 요인, 그리고 면역학적 이상 등 복합적인 요인들이 관여하는 것으로 알려

져 있다(4,5). 특히 많은 아토피 피부염 환자에게서 혈청 내 immunoglobulin E(IgE) 농도가 증상이 심할수록 높게 나타나는데 이로 인해 혈청 내 IgE의 농도는 아토피 피부염의 진단 지표 중 하나로 제시되고 있다(6-8). 또한 아토피 피부염 환자에게는 콜라겐(collagen)이 콜라게나아제(collagenase)에 의해 분해되어 피부장벽의 손상이 일어나는데 이는 염증유발물질의 피부 침투와 염증에 대한 감수성을 높이게 되므로 피부장벽의 손상도 아토피 피부염의 중요한 지표가 될 수 있다(9).

현재까지 알려진 아토피 피부염의 치료 방법은 건조된 피부의 보습을 비롯하여 염증 억제제인 스테로이드제의 외용제나 연고, 항히스타민제의 도포나 복용 그리고 면역반응 억제제가 사용되고 있다. 이러한 치료제는 매우 효과적인 증상 완화 결과를 나타내고 있으나, 장기간 사용할 때 부작용이 있으며 약 복용을 중단하면 병변의 재발 가능성이

Received 6 March 2013; Accepted 21 August 2013

\*Corresponding author.

E-mail: kj8214@tp.org, Phone: 82-53-757-4148

높으므로 안전하고 효과적인 신규 보완 대체 치료법이 요구된다(10,11). 이에 따라 아토피 피부염의 예방 및 개선을 위한 대체 치료법 개발이 활발하게 진행되고 있으며 특히 자연으로부터 획득할 수 있는 천연물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 최근에는 아토피 피부염에 대한 개선 효능이 기대되는 천연물질로 다래 추출물(12), 비파엽 및 삼백초 추출물(13), 편백잎 추출물(14) 등이 보고된 바 있다.

율피는 너도 밤나무과(Buna)의 다년생 초목인 밤나무(*Castanea crenata* Sieb)의 과실인 밤의 속껍질로 피부를 청결하게 하고 피부에 수분을 공급하거나 피부 수분의 손실을 막아주는 보습작용을 한다(15). 또한 율피는 피부의 과다한 멜라닌 색소 형성에 의한 피부의 색소 침착을 억제하며 오래 전부터 피부 미용 재료로 인정받아 왔을 뿐 아니라, 민간에서도 많이 사용되고 있다(16). 하지만 지금까지 율피는 미백효과, 주름 개선 그리고 피부 노화 방지 등의 연구를 위해 많이 사용되어 왔고 아토피 피부염과 같은 피부질환의 개선 효과에 대한 내용은 거의 보고된 바가 없다.

발효 기법은 오래 전부터 행해져온 가공공정의 일환으로 미생물의 작용을 통해 유용성분 및 영양성을 증진하는 장점을 가진다(17). 특히 발효에 많이 이용되는 유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 오래 전부터 발효 식품에서 의약품에 이르기까지 그 특성에 따라 인류생활에 광범위하게 활용되었다. 유산균의 주요 대사물질은 lactic acid이며 이것은 pH를 급격히 강하시킴으로써 부패균의 생장을 억제하고 불용성 무기성분을 가용화하는 작용을 한다(18).

따라서 본 연구에서는 아토피 피부염의 증상을 개선시킬 수 있는 유효성분 개발을 위해 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)으로 유도된 아토피 피부염 NC/Nga mice에서 *Lactobacillus(L.) bifementans*로 발효한 율피 발효물의 농도별 항아토피 효능을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 율피 발효물 제조

본 실험에 사용된 율피는 (주)푸드웰(대구)에서 제공받아 사용하였다. 율피의 추출은 율피에 시료 중량 대비 10배의 물을 가하여 압력식 추출기(KSNP B1130, KyungSeo Machines, Incheon, Korea)에서 70°C, 3시간씩 3회 반복 추출하고 감압 농축기(rotary vacuum evaporator, N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 다음 동결건조 하여 준비하였다. 율피 발효물 제조에 사용한 균주는 한국미생물보존센터에서 분양받은 *L. amylophilus*(KCCM 40980)와 *L. bifementans*(KCCM 40981)를 대상으로 균주 생육과 각 균주를 이용한 율피 발효물의 피부세포 독성을 조사하여 율피 추출물에서 우수한 생육을 나타내고 발효 후 HS68 피부 세포에 대한 세포독성을 감소시킨 *L. bifementans*를 이용하였다. 율피 발효를 위한 배지는 1/10 MRS와 0.5% 율피

추출물을 혼합한 배지를 이용하였으며, *L. bifementans*의 전배양액은 MRS 배지 5 mL에 백금으로 접종한 뒤 24시간 동안 배양하여 준비하였다. 율피 발효물은 율피발효 배지 500 mL에 *L. bifementans* 전배양액 5 mL를 접종하여 24시간 발효한 후 원심분리기를 사용하여 상층액을 회수하고 동결건조 하여 본 연구에 사용하였다.

### HPLC 분석

율피 발효물에 함유되어 있는 gallic acid와 ellagic acid의 함량은 high performance liquid chromatography (HPLC, e2790/5 HPLC system, Waters Co., Milford, MA, USA) 분석을 통해 측정하였다. 분석을 위한 시료는 율피 발효물 0.1 g에 5 mL의 증류수를 가하여 용해하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 10 mg/mL의 농도로 희석한 다음, 0.45 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다. HPLC 분석 조건은 Table 1과 같으며 UV detector를 사용하여 254 nm 및 280 nm에서 최대 흡수 분광을 측정하고 mg/g으로 나타내었다.

### 실험동물

본 실험에서 사용한 실험동물은 6주령 된 수컷 NC/Nga mice(21~26 g)로, (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 공급받아 실험동물사에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 중 사료와 물은 자유로이 섭취시켰으며 사육실의 온도는 22±2°C, 습도는 55±15% 그리고 명암은 12시간 주기를 유지하였다. 실험군은 DNCB(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 도포한 atopic dermatitis(AD)군, DNCB 및 0.1% 율피 발효물을 도포한 fermented *Castanea crenata* inner shell(FCS) 0.1군, DNCB 및 1% 율피 발효물을 도포한 FCS 1군, DNCB 및 5% 율피 발효물을 도포한 FCS 5군, 그리고 아무것도 도포하지 않은 정상군을 포함하여 총 5개 군으로 나누었으며 각 군에 6마리씩 배정하여 실험하였다. 이 동물실험은 (재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: BHCC-IACUC-2012-02)을 받아 수행되었다.

**Table 1.** HPLC conditions for quantitative analysis of gallic acid and ellagic acid of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans*

Item	Operating condition
HPLC system	Waters e2790/5 HPLC system equipped with 2487 UV detector and autosampler
Column	YMC-Pack Pro C <sub>18</sub> 5 µm, 4.6×250 mm (YMC Inc., Milford, MA, USA)
Solvent	Sol. A: 0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O Sol. B: 100% MeOH A linear gradient elution from A to B for 50 min
Detector	UV 254 & 280 nm
Flow rate	1 mL/min

### DNCB 제조 및 아토피 피부염 유발

안정화 기간이 지난 후, animal clipper(JP-6116, Joas Electronics, Namyangju, Korea)를 이용하여 모든 NC/Nga mice의 등 부위를 깨끗하게 제모하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 그 후 1% DNCB 용액 (acetone : olive oil=3:1) 200  $\mu$ L를 등 부위에 도포하여 피부 감각을 유도하였다. 도포 3일 후 0.4% DNCB 용액 150  $\mu$ L를 다시 도포하였으며, 4일 후부터는 주 3회씩 3주 동안 0.4% DNCB 용액 150  $\mu$ L를 도포하여 아토피 피부염을 유발시켰다(19,20).

### 실험시료의 처치

실험시료는 DNCB 도포가 끝난 후, FCS 0.1, FCS 1, FCS 5군에 매일 정해진 시간에 율피 발효물을 각각 0.1%, 1%, 5%의 농도로 1,3-butylene glycol(Sigma-Aldrich) 200  $\mu$ L에 희석하여 3주간 도포하였으며 동일 기간 동안 AD 군에는 1,3-butylene glycol 200  $\mu$ L를 도포하였다.

### 육안 평가 및 체중 측정

육안 평가는 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 평가방법으로써 아토피 피부염 증상의 심각성 정도를 측정하기 위해 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반(erythema), 가려움과 피부건조(pruritus & dry skin), 부종과 혈종(edema & excoriation), 짓무름(erosion) 그리고 태선화(lichenification)이며 각각의 항목에 대해 증상 없음(0점), 약함(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 채점한 후, 합산하여 최소 0점에서 최고 15점 사이의 점수를 부여하였다(21,22). 시료 도포가 끝난 NC/Nga mice의 체중은 전자저울(CP423S, Sartorius AG, Goettingen, Germany)을 이용하여 측정하였다.

### 피부 측정

피부 측정 기기인 Multiprobe Adapter System(MPA5 580, Courage & Khazaka GmbH, Cologne, Germany)을 이용하여 아토피 피부염 상태에서 변화하는 피부수분지수(Corneometer<sup>®</sup> CM825), 피부멜라닌지수 그리고 피부홍반지수(Mexameter<sup>®</sup> MX18)를 측정 및 비교·분석하였다. 실험시료의 도포가 끝난 NC/Nga mice의 등 부위 피부를 3번 연속 측정하여 평균값을 얻었으며 측정 장소는 실내 온도 21~23°C, 습도 50~60%가 유지되는 조건에서 측정하였다.

### 비장 수치 측정

시료 도포가 끝난 후, NC/Nga mice를 희생시켜 비장을 적출하고 무게를 측정하였다. 비장 수치(spleen index)는 NC/Nga mice의 비장 무게(mg)를 체중(g)으로 나누어 산출하였다(23).

### 염증 cytokine 유전자 발현 측정

피부조직의 RNA는 Fibrous Tissue Mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA의 농도는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정하였으며 cDNA synthesis kit(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 5  $\mu$ g의 mRNA를 cDNA로 합성 한 후 real-time PCR에 사용하였다. Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)은 Corbett Research RG-6000(Corbett Life Science, Sydney, Australia)을 이용하여 수행하였다. 염증 유발 cytokine의 유전자 발현은 QuantiTect SYBR Green PCR kit(Qiagen)를 사용하였고, endogenous control은 GAPDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 10 pM이 되게 반응시켰다. 유전자 발현의 fold change는 delta-delta Ct 방법을 이용하여 산출하였다(24). qRT-PCR에 사용된 염증 cytokine primer와 각각의 염기배열은 다음과 같다. IL-1 $\beta$ (forward, 5'-CCC AAG CAA TAC CCA AAG AA-3'; reverse, 5'-GCT TGT GCT CTG CTT GTG AG-3'), TNF- $\alpha$ (forward, 5'-GAT TAT GGC TCA GGG TCC AA-3'; reverse, 5'-GCT CCA GTG AAT TCG GAA AG-3'), GAPDH(forward, 5'-TGA ATA CGG CTA CAG CAA CA-3'; reverse, 5'-AGG CCC CTC CTG TTA TTA TG-3').

### 혈청 IgE 농도 측정

NC/Nga mice의 심장으로 부터 채취한 혈액을 원심분리 한 후 혈청을 획득하고 혈청 내 IgE 농도는 Mouse Serum IgE ELISA kit(Shibayagi, Gunma, Japan)를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 혈청 5  $\mu$ L와 buffer solution 45  $\mu$ L를 혼합하여 각각의 well에 50  $\mu$ L씩 분주하고 20~25°C에서 2시간 동안 방치한 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 다시 biotin-conjugated anti-IgE antibody 50  $\mu$ L를 넣고 20~25°C에서 2시간 동안 배양한 후에 다시 3회 세척하였다. 이어서 HRP-conjugated avidin 50  $\mu$ L를 넣고 20~25°C에서 1시간 동안 배양한 후 다시 세척하였다. 마지막으로 chromogenic substrate reagent 50  $\mu$ L를 넣고 20~25°C에서 20분간 배양한 후, 50  $\mu$ L의 reaction stopper를 첨가하고 Multi Microplate Reader(infinite M200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 450 nm(reference wavelength, 620 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계분석

실험 결과의 분석은 Statistical Package for Social Science(SPSS, win 12.0 version, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 기술적인 통계치를 산출하였다. 결과는 각 실험군별 평균±표준편차로 표시하였으며, 평균 간의 유의성은 Student's *t*-test와 One way ANOVA

검증을 통한 Duncan's multiple range test로  $P < 0.05$  수준에서 검증하였다.

### 결과 및 고찰

#### 율피 발효물의 성분 분석

피부세포에 대한 세포독성 감소효과를 나타내는 *L. bifementans* 율피 발효물의 gallic acid 및 ellagic acid 함량을 HPLC로 분석한 결과, 율피 발효물 g당 10.18 mg/g, 2.14 mg/g으로 각각 측정되었다(Fig. 1). Gallic acid는 폴리페놀계 화합물(polyphenolic compounds)의 하나로 비만세포에서 발현되는 염증 유발 cytokine과 히스타민의 분비를 억제시킨다(25,26). 그리고 또 다른 폴리페놀계 화합물인 ellagic acid는  $Ca^{2+}$ 의 억제와 NF- $\kappa$ B의 활성 증가를 통해 염증 유발 인자의 분비를 감소시켜 IgE와 관련된 과민성 반응을 억제시킨다(27). 따라서 gallic acid와 ellagic acid가 함유되어 있는 율피 발효물은 아토피 피부염과 같은 염증성 알레르기 질환의 개선에 적합한 새로운 효능물질이 될 수 있을 것으로 판단된다.

율피 열수추출물과 율피 발효물의 폴리페놀계 화합물 함량을 비교하였을 때, 발효를 통한 함량 증가는 나타나지 않았다. 하지만 천연자원을 사용한 기존 연구결과에 의하면 발효를 통해 다양한 효소와 피부세포의 상호작용에 의해 면역역계가 조절되고 소염 작용 및 아토피 피부염의 개선효과가 향상되는 것으로 나타났다(13,28). 이러한 결과들은 천연자원이 가지는 항아토피 효능이 발효를 통해 증대되는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 율피에 함유되어 있는 폴리

페놀계 화합물의 작용뿐만 아니라 발효를 통한 다양한 면역조절 작용에 의해 아토피 피부염의 증상 완화가 나타나는 것으로 사료된다.

율피는 도포에 의한 화장품 소재로서의 이용뿐만 아니라 높은 수분결합력, 섬유소에 의한 수분흡수 시간의 단축력, 그리고 높은 팽화도를 지니고 있어 기호식품의 소재로 활용될 수 있는 가능성을 지니고 있다(29). 또한 율피와 같이 gallic acid와 ellagic acid를 주성분으로 함유하고 있는 가자(fructus chebula) 추출물을 경구투여 하면 면역학적 및 비면역학적 자극에 의한 알레르기 반응이 억제된다고 보고된 바 있다(30). 따라서 유산균 발효를 통해 항아토피 활성이 강화된 율피는 화장품 소재뿐만 아니라 식품소재를 비롯한 다양한 분야의 기능성 소재로서 충분히 활용 가능할 것이다.

#### 체중변화 관찰

DNCB 도포를 통해 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mice에 농도를 달리한 율피 발효물을 3주간 도포한 후, 각 실험군별 NC/Nga mice의 체중 변화를 측정한 결과, 정상군은  $31.15 \pm 1.1$  g, DNCB를 도포한 AD군은  $29.18 \pm 0.4$  g, 그리고 DNCB 도포 후 율피 발효물을 처리한 FCS 0.1, FCS 1, FCS 5군은 각각  $29.04 \pm 0.3$  g,  $28.69 \pm 0.84$  g,  $29.14 \pm 0.51$  g으로 나타났다(Fig. 2). 정상군을 제외한 나머지 실험군에서 조금 감소하는 경향이 나타났으나 유의적 차이는 관찰되지 않았다( $P < 0.05$ ). 이러한 결과로 미루어 볼 때, 실험기간 동안 환경적 요인 및 스트레스 요인에 의한 체중 변화가 발생하지 않았으며 실험시료가 생체 내 안전성에도 큰 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

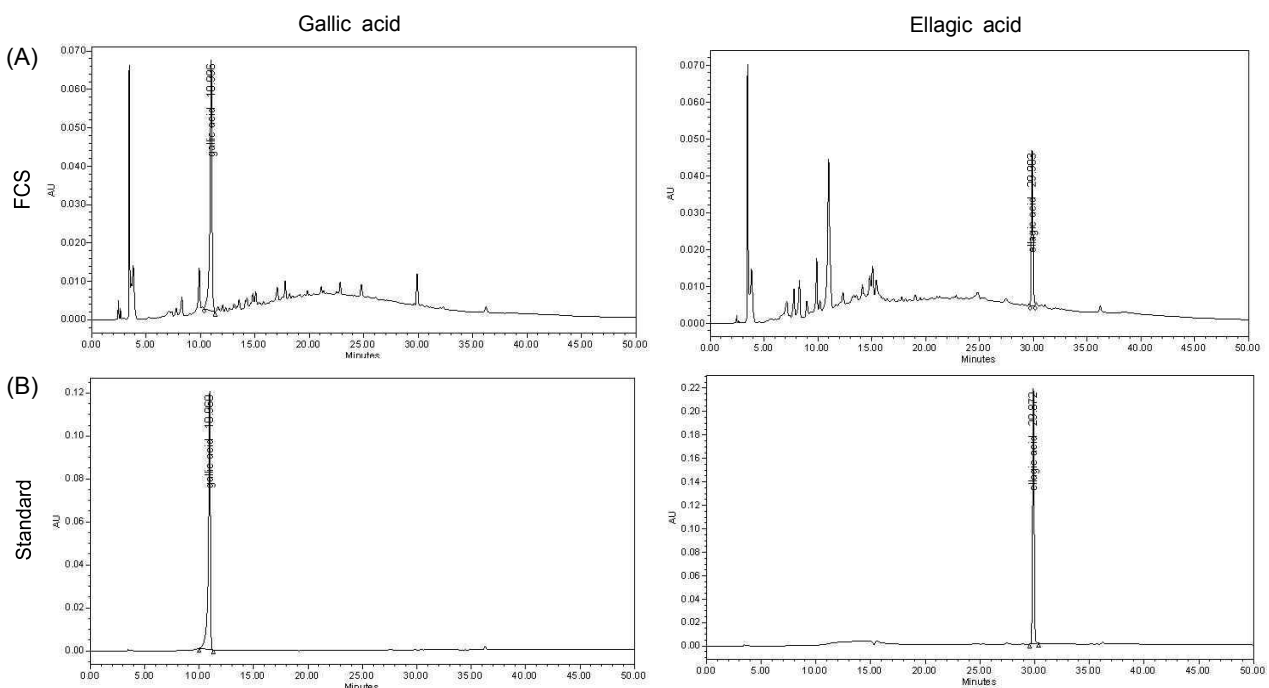
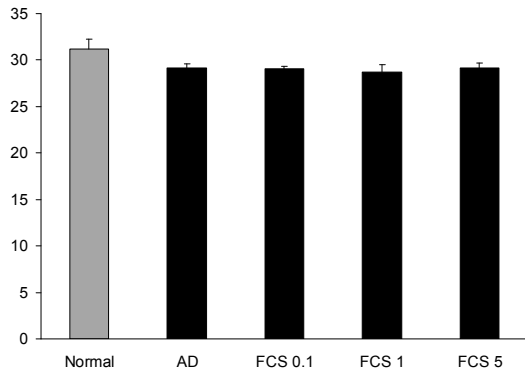


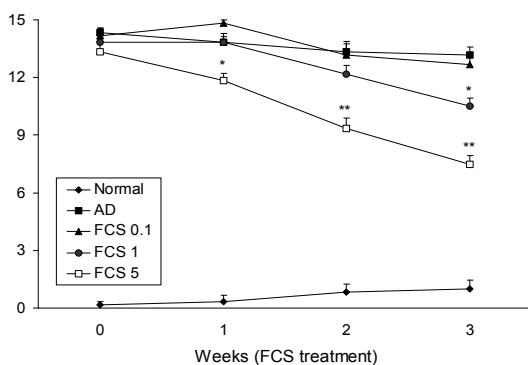
Fig. 1. HPLC chromatogram of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans* (FCS) (A) and standard solutions (B). The HPLC chromatogram revealed that FCS contains gallic acid and ellagic acid.



**Fig. 2.** Body weight of the experimental groups. The groups that we have used in this study included 0.1%, 1%, 5% fermented *Castanea crenata* inner shell extracts (FCS 0.1, FCS 1, FCS 5), 1,3-butylene glycol treated control (AD), and normal mice. All experimental groups were no significant differences in body weight (n=6 per group). Data represent mean±SD. One-way ANOVA.

### 외형 관찰 및 육안 평가

각 실험군별 NC/Nga mice의 등 부위를 관찰하여 아토피 피부염 병변의 형태학적 변화를 확인하였다. 정상군에서는 피부의 형태학적 변화가 나타나지 않았으나, DNCB를 처리한 AD군에서는 홍반, 가려움과 피부건조, 짓무름, 부종과 혈종 등의 아토피성 피부 변화가 확인되었다. 1%와 5% 율피 발효물을 도포한 FCS 1군, FCS 5군에서는 이러한 아토피성 증상들이 개선되는 효과를 나타내었고, 특히 FCS 5군에서는 정상군과 유사한 피부 형태를 나타내었다. 실험시료 도포 3주 후, 아토피 피부염의 여러 증상들을 종합하여 점수화 하는 육안 평가 시험 결과, 정상군  $1.00 \pm 0.45$ , AD군  $13.17 \pm 0.40$ , FCS 0.1군  $12.67 \pm 0.61$ , FCS 1군  $10.50 \pm 0.43$ , FCS 5군  $7.50 \pm 0.43$ 으로 나타나 아토피 피부염 증상들이 FCS 5군에서 빠르게 호전되는 것을 확인하였으며 FCS 1군 역시 대조군에 비해 점수가 유의적으로 감소되었



**Fig. 3.** Clinical severity score in DNCB-induced atopic dermatitis NC/Nga mice. The clinical severity score for atopic dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe) for each of signs and symptoms, such as erythema, pruritus & dry skin, edema & excoriation, erosion and lichenification (n=6 per group). Data represent mean±SD. Student's *t*-test, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. AD group.

다(Fig. 3). 그에 반해 저 농도의 율피 발효물을 도포한 FCS 0.1군에서는 변화가 거의 나타나지 않았다.

아토피 피부염이 발병하면 과민 반응으로 인해 여러 증상과 더불어 피부장벽이 손상되는데, 이를 통해 여러 자극물질들이 피부 내로 침투하여 심한 소양증 및 염증반응이 가중된다(31). 본 실험에서는 일정 농도 이상의 율피 발효물 도포가 육안 상 아토피 피부염 증상을 완화시킬 수 있음을 확인할 수 있으며, 이는 율피 발효물이 항염증 및 면역억제 효능에 영향을 미칠 수 있음을 제시한다.

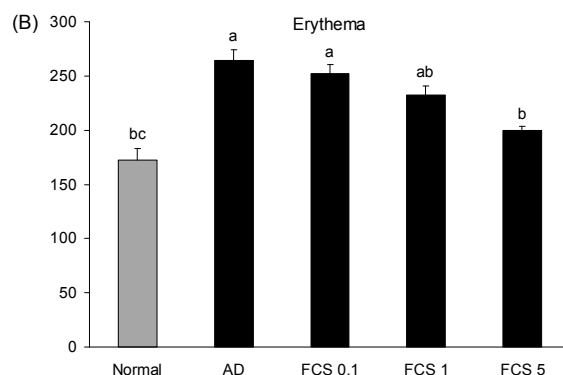
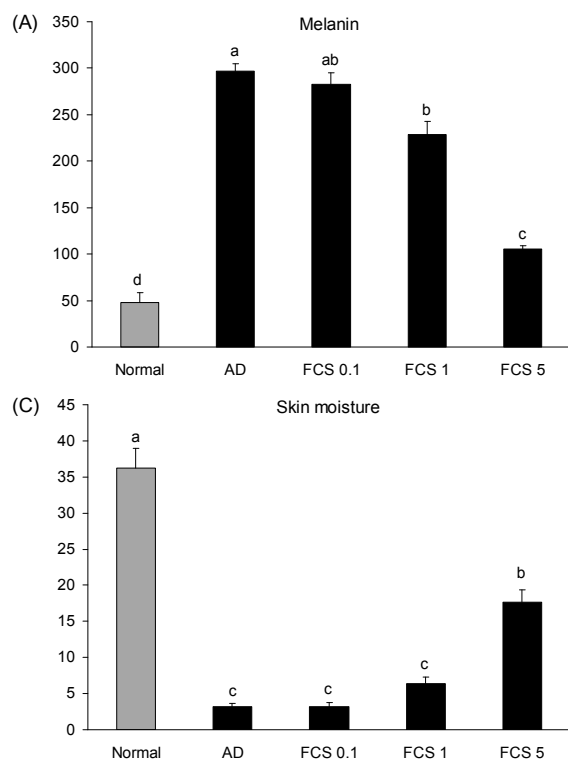
### 피부 지수의 변화

각 실험군별 NC/Nga mice의 피부멜라닌지수를 측정할 결과, 정상군  $48.19 \pm 10.34$ , AD군  $296.61 \pm 8.11$ , FCS 0.1군  $282.61 \pm 12.32$ , FCS 1군  $228.72 \pm 14.26$ , FCS 5군  $105.86 \pm 2.92$ 로 나타나 아토피 피부염 유발로 인해 증가된 멜라닌 함량이 1%와 5% 율피 발효물 도포에 의해 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 피부홍반지수를 측정할 결과에서는 정상군  $172.56 \pm 10.11$ , AD군  $264.33 \pm 10.15$ , FCS 0.1군  $252.45 \pm 7.89$ , FCS 1군  $232.22 \pm 8.52$ , FCS 5군  $199.56 \pm 4.22$ 로 나타나 5% 율피 발효물의 도포에 의한 피부 홍반의 유의적 감소 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이와 마찬가지로 피부수분지수 측정값의 변화에서도 정상군  $36.24 \pm 2.74$ , AD군  $3.15 \pm 0.54$ , FCS 0.1군  $3.21 \pm 0.59$ , FCS 1군  $6.35 \pm 0.97$ , FCS 5군  $17.62 \pm 1.75$ 로 나타나 DNCB 도포에 의해 감소된 피부의 수분 함량이 5% 율피 발효물의 도포에 의해 유의적으로 증가되었다(Fig. 4C).

알레르기를 유발하는 항원의 피부 침투로 인해 아토피 피부염이 발병하면 피부 건조 증상이 나타나게 되고 이는 소양감을 유발시켜 피부 염증 반응 및 발적과 충혈로 인한 홍반을 야기한다. 이러한 피부 자극이나 염증 반응은 멜라닌 세포를 자극하여 멜라닌 색소의 형성을 촉진하게 된다(1, 2, 32). 따라서 고농도의 율피 발효물은 피부의 보습력 개선에 관여하여 손상된 피부장벽의 기능을 회복시키고 항원의 침투를 억제하여 홍반 및 멜라닌 색소의 침착을 감소시키는 것으로 사료된다.

### 비장 수치의 변화

아토피 피부염 유발 및 율피 발효물 도포에 의한 NC/Nga mice의 면역반응을 확인하기 위해 비장 수치를 비교·분석하였다(Fig. 5). 정상군은  $3.35 \pm 0.23$ 의 수치가 나왔지만 AD군은  $5.55 \pm 0.31$ 로 정상군에 비해 약 1.7배 증가된 수치를 보였다. 그에 반해 FCS 0.1군, FCS 1군, FCS 5군은 각각  $4.53 \pm 0.24$ ,  $3.80 \pm 0.40$ ,  $3.32 \pm 0.24$ 로 비장 수치가 율피 발효물의 도포 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 5% 율피 발효물을 도포한 군에서는 유의적 감소를 나타내었다. 이는 아토피 피부염 유발로 인해 증가된 비장 내의 T-림프구를 고농도의 율피 발효물이 효과적으로



**Fig. 4.** Skin measurement results of DNCB-induced NC/Nga atopic mice. Skin melanin, erythema and moisture index of NC/Nga mice were measured by MPA5 580. After topical FCS treatment for 3 weeks, improvement of melanin (A), erythema (B) and skin moisture (C) occurred in 5% FCS treated NC/Nga atopic mice group (n=6 per group). Data represent mean±SD. One-way ANOVA, different superscripts on the bars indicate significant differences at  $P<0.05$ .

**Fig. 5.** Spleen index of DNCB-induced NC/Nga atopic mice. The spleen index was calculated according to the following formulas, namely, spleen index=spleen weight (mg)/ body weight (g). After topical FCS treatment for 3 weeks, improvement of spleen index observed in 5% FCS treated NC/Nga atopic mice group (n=6 per group). Data represent mean±SD. One-way ANOVA, different superscripts on the bars indicate significant differences at  $P<0.05$ .

억제할 수 있음을 나타낸다.

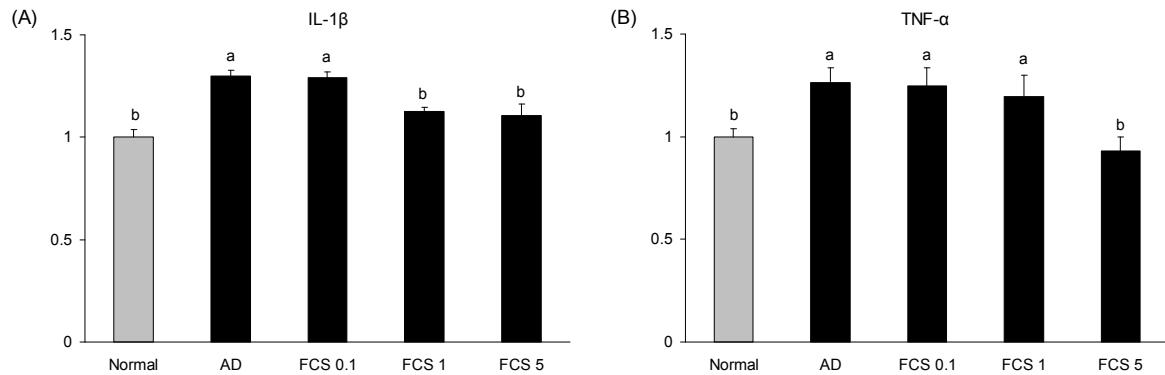
아토피 피부염의 발생에는 비장 내 helper T(Th) cell의 분화가 관여한다. Th1 cell과 Th2 cell의 불균형이 알레르기성 질환의 발생과 연관되어 있는데, 아토피 피부염의 경우 유전적 요인에 의해 Th2 cell로의 분화가 많이 이루어지며 이에 따라 T-림프구가 증가하여 비장이 커지고 아토피 피부염 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다(33). 이와 반대로 비장 내 Th1 cell과 Th2 cell의 균형이 이루어지면 증가된 T-림프구가 감소되고 히스타민의 생성을 억제시켜 아토피

피부염의 증상 완화를 나타낼 수 있다(34,35). 따라서 울피 발효물에 의한 비장 수치의 감소는 아토피 피부염 유발로 인한 비장 내 T-림프구의 불균형을 고농도의 울피 발효물이 효과적으로 조절할 수 있음을 보여주며, 이러한 T-림프구의 조절을 통해 최종적으로 아토피 피부염을 개선하는 것으로 사료된다.

#### 염증 유전자 발현의 변화

울피 발효물의 항아토피 효능이 염증 유발 cytokine의 발현 변화와 관련 있는지 알아보기 위해 피부 조직으로부터 mRNA를 추출하여 qRT-PCR을 수행하였다. 피부 조직에서 IL-1 $\beta$  mRNA 유전자 발현은 정상군의 relative quantification(RQ) 값이 1일 때, AD군 1.30, FCS 0.1군 1.29, FCS 1군 1.12, FCS 5군 1.11로 나타나 아토피 피부염 유발로 인해 증가된 IL-1 $\beta$  mRNA 발현이 1%와 5% 울피 발효물 도포에 의해 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 6A). TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현 역시 정상군의 RQ 값이 1일 때, AD군 1.26, FCS 0.1군 1.24, FCS 1군 1.19, FCS 5군 0.93으로 나타나 5% 울피 발효물의 도포에 의한 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현 감소 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 6B). 0.1%의 울피 발효물을 도포한 FCS 0.1군에서는 염증 유전자의 발현 변화가 나타나지 않았으며 이는 육안 평가, 피부 측정 그리고 비장 수치에서 유의적 효과가 없는 결과와 일치하여 FCS 0.1군에는 항아토피 효능이 없음을 확인하였다.

아토피 피부염의 염증을 손상 부위에 대한 국소적인 반응으로, 여러 종류의 염증 세포들과 염증 유발 cytokine 및



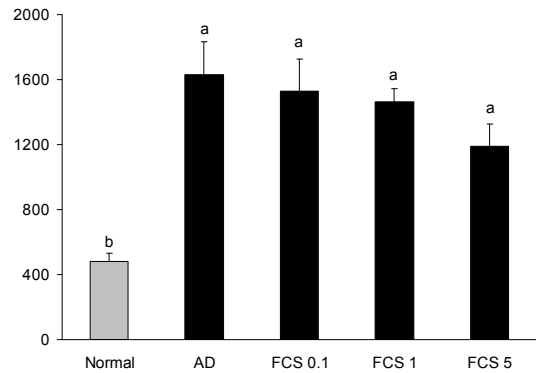
**Fig. 6.** Expression levels of pro-inflammatory cytokines in the dorsal skin of DNCB-induced atopic dermatitis NC/Nga mice. The mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines in the dorsal skin of NC/Nga mice were measured by quantitative real-time PCR. (A) After topical FCS treatment for 3 weeks, significant improvement of mRNA expression level of IL-1 $\beta$  observed in 1% and 5% FCS treated NC/Nga atopic mice group (n=6 per group). (B) Significant improvement of mRNA expression level of TNF- $\alpha$  observed in only 5% FCS treated NC/Nga atopic mice group (n=6 per group). Data represent mean $\pm$ SD. One-way ANOVA, different superscripts on the bars indicate significant differences at  $P<0.05$ .

mediator들이 관여한다. 특히 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 는 급성 염증 단백질의 생성을 유도하는 cytokine이며 염증반응의 정도를 나타내는 지표로 이용되고 있다(36,37). 따라서 상기의 유의적인 결과는 일정농도 이상의 율피 발효물이 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증 유발 cytokine의 발현을 조절하여 아토피 피부염에 대한 개선 효과를 나타내고 있음을 보여준다.

피부에서의 염증 유발 cytokine 발현뿐만 아니라 비장세포에서의 cytokine 발현 역시 아토피 피부염의 개선과 밀접한 관계가 있다. 기존에 연구된 바에 의하면 아토피 피부염은 면역학적으로 T-림프구, 호산구, 비만세포 등 다양한 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 Th2 세포가 발현하는 IL-4, IL-5, IL-13 cytokine들이 발병 과정에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고된 바 있다(4). 특히 과도한 IL-4의 분비는 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 발현을 억제시킴으로써 Th1과 Th2의 불균형을 초래하여 아토피 피부염 증상을 악화시키는 것으로 알려져 있다(38,39). 따라서 율피 발효물은 피부에서의 면역인자 조절 작용 외에 비장 내에서 IL-4와 같은 Th2 cytokine의 발현을 감소시키고 IFN- $\gamma$ 와 같은 Th1 cytokine의 발현을 증가시켜 두 세포 간의 균형을 이루게 함으로써 결과적으로 아토피 피부염의 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

#### 혈청 내 IgE의 함량 변화

율피 발효물의 항아토피 효과 유효성을 평가하기 위해 아토피 피부염의 면역학적 지표로 알려진 혈청 내 IgE 함량을 측정하였다. 그 결과 정상군(479.38 $\pm$ 53.22 ng/mL)과 비교 시 AD군은 1,628.71 $\pm$ 202.59 ng/mL로 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다. 아토피 피부염 유발 후, 율피 발효물을 도포한 FCS 0.1군, FCS 1군, FCS 5군에서는 혈청 내 IgE 함량이 각각 1,530.15 $\pm$ 198.70 ng/mL, 1,462.15 $\pm$ 83.79 ng/mL, 1,187.47 $\pm$ 140.09 ng/mL로 율피 발효물의 도포 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 보였지만 유의적



**Fig. 7.** Total serum IgE levels in DNCB-induced atopic dermatitis NC/Nga mice at sacrifice day. After topical FCS treatment for 3 weeks, serum were obtained from each experimental group, and the level of IgE was measured by ELISA. Dose-dependent decrease in serum IgE levels was observed in the FCS treated NC/Nga atopic mice groups (n=6 per group). Data represent mean $\pm$ SD. One-way ANOVA, different superscripts on the bars indicate significant differences at  $P<0.05$ .

인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 7).

아토피 피부염 발생 시 알레르기 유발 물질을 가장 먼저 인지하는 것은 피부에 존재하는 IgE이다(40). 혈청 내 IgE의 함량은 임상적 중증도에 비례하여 증가되는 것으로 알려져 있다(41). 알레르기 반응을 통해 혈청에서 증가된 IgE는 비만 세포의 탈과립화(degranulation)를 유도하여 염증성 매개물을 방출하며 이로 인해 아토피 피부염의 증상이 심화된다(42). 그러므로 아토피 피부염을 효과적으로 억제하기 위해서는 혈청 내 IgE의 함량을 조절할 수 있어야 한다. 따라서 비록 유의적인 차이는 관찰되지 않았지만 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mice에서 율피 발효물의 도포가 혈청 내 IgE의 함량을 줄이는 것으로 보아 아토피 피부염 개선에 긍정적인 효과를 가질 것으로 판단되어진다.

**요 약**

본 연구에서는 DNCB 도포를 통해 아토피 피부염을 유발시킨 NC/Nga mice에 율피 발효물을 각각 0.1%, 1%, 5%로 도포하고 항아토피 효능을 평가하였다. 율피 발효물의 유효 성분은 HPLC 분석 결과, gallic acid와 ellagic acid가 각각 10.18 mg/g, 2.14 mg/g 함량을 나타내었다. 실험군 간의 유의적 체중 변화는 관찰되지 않았으며, 육안 평가를 통해 흥반, 가려움과 피부건조, 부종과 혈종, 짓무름 그리고 태선화와 같은 일반적인 아토피 피부염 증상의 심각도를 측정 한 점수 결과에서는 DNCB 도포를 통해 아토피 피부염을 유발 한 atopic dermatitis(AD)군(13.17±0.40)과 비교 시, 아토피 피부염 유발 후 5% 율피 발효물을 도포한 fermented *Castanea crenata* inner shell(FCS) 5군에서 7.50±0.43으로 나타나 아토피 피부염 증상이 빠르게 개선되는 것을 확인하였다( $P<0.01$ ). 피부 측정 기기인 MPA5 580을 이용하여 피부멜라닌지수, 피부흥반지수, 피부수분지수를 측정 한 결과, AD군은 각각 296.61±8.11, 264.33±10.15, 3.15±0.54를 나타내었으며 FCS 5군은 각각 105.86±2.92, 199.56±4.22, 17.62±1.75로 개선효과가 유의적으로 나타났다( $P<0.05$ ). 각 실험군 mice의 면역반응을 확인 하기 위해 비장 무게(mg)를 체중(g)으로 나누어 산출한 비장 수치(5.55±0.31)가 FCS 0.1군, FCS 1군, FCS 5군에서는 각각 4.53±0.24, 3.80±0.40, 3.32±0.24로 나타나 율피 발효물의 도포 농도에 의존적으로 감소되는 경향을 나타냈으며 특히 FCS 5군에서는 유의적으로 낮게 나타났다( $P<0.05$ ). 이는 율피 발효물이 아토피 피부염 상태에서 증가된 비장 내 T-림프구를 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다. Quantitative real-time PCR을 통해 피부조직에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 염증 유전자의 발현 변화를 분석한 결과, 두 유전자 모두 정상군의 relative quantification값이 1일 때 AD군은 각각 1.30, 1.26으로 증가되었으며 FCS 5군에서는 1.11, 0.93으로 나타나 율피 발효물 도포에 의한 유의적인 감소( $P<0.05$ )를 확인할 수 있었다. 아토피 피부염의 면역학적 지표인 혈청 내 IgE 함량을 분석한 결과에서는 각 실험군 간의 유의적 차이는 보이지 않았으나 AD군(1,628.71±202.59 ng/mL)과 비교 시, 율피 발효물을 도포한 FCS 0.1군, FCS 1군, FCS 5군에서 각각 1,530.15±198.70 ng/mL, 1,462.15±83.79 ng/mL, 1,187.47±140.09 ng/mL로 나타나 율피 발효물 도포에 의해 감소되는 경향을 확인할 수 있었다. 따라서 율피 발효물은 아토피 피부염 증상 개선을 위한 기능성 천연물의 소재로 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

**감사의 글**

본 연구는 산림청에서 시행한 ‘산림과학기술개발사업(과제

번호: S121011L060110)’의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

1. Spergel JM, Paller AS. 2003. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 112: S118-S127.
2. Abramovits W. 2005. Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53: S86-S93.
3. Yamashita H, Makino T, Mizukami H, Nose M. 2007. Pharmacological characterization of a chronic pruritus model induced by multiple application of 2,4,6-trinitrochlorobenzene in NC mice. *Eur J Pharmacol* 563: 233-239.
4. Leung DY, Soter NA. 2001. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 44: S1-S12.
5. McGrath JA. 2008. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *Australas J Dermatol* 49: 67-73.
6. Kang DG, Park CW, Lee CH. 1992. A study of peripheral blood eosinophil and serum IgE level in patients with atopic dermatitis. *Korean J Dermatol* 30: 51-56.
7. Lee YH. 2007. Effect of *Phellinus luteus* grown in germinated brown rice on atopic dermatitis. *J Kor Soc Cosm* 13: 514-519.
8. Vercelli D. 2001. Immunoglobulin E and its regulators. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 61-65.
9. Sator PG, Schmidt JB, Honigsman H. 2003. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 48: 352-358.
10. Sidbury R, Hanifin JM. 2000. Old, new, and emerging therapies for atopic dermatitis. *Dermatol Clin* 18: 1-11.
11. Schreiber SL, Crabtree GR. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13: 136-142.
12. Joo YH, Won CH, Kim JY, Cho KH, Min KU, 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.
13. Choi MJ, Jung HK, Jeong YS, Park SC, Hong JH. 2010. Anti-allergic activities of fermented *Eriobotrya japonica* and *Saurus chinensis* extracts in 2,4-dinitrochlorobezene-induced BALB/c mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1611-1618.
14. Cho SE. 2012. A study on the immunomodulatory effects of *Chamaecyparis Obtusa* leaves on NC/Nga mice as models for atopic dermatitis. *J Kor Soc Cosm* 18: 78-89.
15. Yoon WJ. 1997. The study on the humidity preserving effect with several natural packs. *MS Thesis*. Dongduk Women's University, Seoul, Korea.
16. Yang MJ, Lim SJ, Ahn HS, Kim MA, Ahn RM. 1999. Inhibitory effects of chestnut bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Kor J Env Hlth Soc* 25: 37-43.
17. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Dayd J. 2008. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem* 109: 709-721.
18. Han SK. 2005. Quality improvement of effective microorganisms (EM) pork produced by using EM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 734-737.
19. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, Ra C. 1999. NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 120: 70-75.
20. Kim BA, Kim MS, Kang BM, Byeon SH, Park IH, Park



- JH, Jung JW, Ahn EM, Jung HA, Jang JH, Bae W, Lee HY, Choi PN, Park CI. 2008. Inhibitory studies of Hwangryunhaedok-tang on development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Kor J Herbology* 23: 59-65.
21. Yamaguchi T, Maekawa T, Nishikawa Y, Nojima H, Kaneko M, Kawakita T, Miyamoto T, Kuraishi Y. 2001. Characterization of itch-associated responses of NC mice with mite-induced chronic dermatitis. *J Dermatol Sci* 25: 20-28.
  22. Leung DY, Hirsch RL, Schneider L, Moody C, Takaoka R, Li SH, Meyerson LA, Mariam SG, Goldstein G, Hanifin JM. 1990. Thymopentin therapy reduces the clinical severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 85: 927-933.
  23. Kwon TK, Lim KB, Kim JC. 2011. The effect of anti-atopic cosmetic in hairless mice. *Appl Chem Eng* 22: 91-97.
  24. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.
  25. Kwon KH, Murakami A, Ohigashi H. 2004. Suppressive effects of natural and synthetic agents on dextran sulfate sodium-induced interleukin- $1\beta$  release from murine peritoneal macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 436-439.
  26. Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M. 1997. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 52: 58-64.
  27. Choi YH, Yan GH. 2009. Ellagic acid attenuates immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells. *Biol Pharm Bull* 32: 1118-1121.
  28. Kim SB, Kang BH, Kwon HS, Kang JH. 2011. Antiinflammatory and antiallergic activity of fermented turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 266-273.
  29. Jeon BG, Park CK. 2000. A study on the production of chestnut powder in the inner shell (*endo carp*) of a chestnut from its treatment plant—Study on the utilities of separated powder from chestnut inner shell). *J Kowrec* 8: 111-120.
  30. Aeom YD, Shin MK, Lee YM, Kim HM, Shin TY, Jeong JG, Song HJ. 2000. Anaphylactic reaction inhibitory effect of *Fructus Chebula*. *Kor J Herbology* 15: 123-128.
  31. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7: 52-63.
  32. Kim YB, Yoon HS, Park OS, Kim HJ, Kim KS. 2005. Effects of Chogam-Tang on rat skin induced the allergic contact dermatitis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 18: 44-54.
  33. Renz H, Mutius E, Illi S, Wolkers F, Hirsch T, Weiland SK. 2002. T(H)1/T(H)2 immune response profiles differ between atopic children in eastern and western Germany. *J Allergy Clin Immunol* 109: 338-342.
  34. Heo Y, Lee WT, Lawrence DA. 1998. Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes. *Toxicolo Sci* 43: 172-185.
  35. Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y, Gross MD. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr* 125: 2483-2492.
  36. He J, Wang T, Yao L, Chen A, Zhou B, Yu H, Jia R, Cheng C, Huan L, Zhang Z. 2006. Construction and delivery of gene therapy vector containing soluble TNF $\alpha$  receptor-IgGfc fusion gene for the treatment of allergic rhinitis. *Cytokine* 36: 296-304.
  37. Baeuerle PA. 1991. The inducible transcription activator NF- $\kappa$ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1072: 63-80.
  38. Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, Geha RS. 1999. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest* 103: 1103-1111.
  39. Chen L, Martinez O, Overbergh L, Mathieu C, Prabhakar BS, Chan LS. 2004. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin Exp Immunol* 138: 375-387.
  40. Jang SN, Kim KR, Yun MY, Kang SM. 2009. The effect of  $\gamma$ -PGA on NC/Nga mice, a mouse model for mite antigen-induced atopic dermatitis. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37: 53-63.
  41. Ju JH, Cho HH, Lee YS. 2010. Progress on phytochemical and atopic dermatitis-related study of the root of *Lithospermum erythrorhizon*. *Kor J Pharmacogn* 41: 73-88.
  42. Song EJ, Lee CJ, Kim KBWR, Jung JY, Kwak JH, Choi MK, Kim MJ, Ahn DH. 2010. Effect of *Ecklonia cava* water extracts on inhibition of IgE in food allergy mouse model. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1776-1782.