

고욤잎, 감잎 및 뽕잎 복합추출물의 항아토피 효과

조병옥^{1,2} · 윤홍화¹ · 신재영² · 방송주² · 체 데니스 창² · 장선일^{1,2,3}

¹(주)아토큐앤에이 부설연구소

²전주대학교 보건관리학과

³전주대학교 농생명치유산업연구소

Anti-Atopic Effects of Mixed Extracts from Date Plum, Persimmon, and Mulberry Leaves

Byoung Ok Cho^{1,2}, Hong Hua Yin¹, Jae Young Shin², Chong Zhou Fang²,
Che Denis Chang², and Seon Il Jang^{1,2,3}

¹Research Institute, Ato Q&A Corporation

²Department of Health Care & Science and ³Agri-Bio Institute, Jeonju University

ABSTRACT The present study investigated the anti-atopic effects of mixed extracts from date plum, persimmon, and mulberry leaves (DPME) on atopic dermatitis (AD)-like skin lesions in hairless mice. The *in vivo* results demonstrated that DPME treatment significantly reduced the dermatitis clinical score and epidermal thickness in AD-like skin lesions. Histological analyses showed that DPME treatment strongly inhibited dermal infiltration of inflammatory cells and activity of mast cells in AD-like skin lesions. DPME treatment inhibited production of serum IgE and interleukin (IL)-4 in hairless mice with AD. Moreover, DPME treatment significantly suppressed production of tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-6 cytokines in phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187-stimulated HMC-1 human mast cells. In addition, DPME treatment reduced production of pro-inflammatory mediators (nitric oxide, prostaglandin E₂, TNF- α , and IL-6) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Therefore, the results of this study indicate that the anti-atopic and anti-inflammatory effects of DPME may be involved in the regulation of inflammatory responses, suggesting that DPME may be used as an anti-atopic dermatitis material and natural anti-inflammatory ingredient.

Key words: date plum leaves, persimmon leaves, mulberry leaves, atopic dermatitis, inflammation

서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 만성 피부염증과 함께 심한 가려움증을 동반하는 피부질환으로 산업화한 국가에서 발병률이 높으며 유아와 소아에서 흔히 발생하는 염증성 피부질환이다(1-3). 또한 아토피 피부염은 유전, 환경 및 식품 등 다양한 자극원에 의해 복합적으로 발생하고, 일시적인 완화와 재발이 반복적으로 일어나는 만성 피부질환이다(4). 아토피 피부염은 면역학적 이상 반응과 관련되어 있으며, 이러한 면역학적 이상 반응은 면역계 발달 과정 중에 T helper(Th) 세포의 비정상적인 성숙으로 인해 Th1 및 Th2 세포의 균형이 깨어지고 Th2 세포의 과반응과 관련되어 있다고 보고하고 있다(5). Th2 세포의 과반응은 혈청 총 면역글로불린 E(IgE)의 생성을 증가시키고, 피부의 비만세

포에서 히스타민, 류코트리엔 등의 화합물질의 탈과립(de-granulation)을 촉진하여 피부에 붉은 반점 및 부종, 가려움증 등을 유발하여 아토피 피부염을 더욱 악화시킨다(6). IgE 매개성 아토피 피부염은 interleukin(IL)-4, IL-5, IL-13 등을 분비하는 Th2 세포의 국소침윤과 관련되어 있으며, 최근에는 Th17에 의해 생성되는 IL-17 사이토카인과도 연관되어 있다고 보고되었다(7). 현재 아토피 피부염을 치료하기 위해서는 피부에 보습제를 사용하면서 면역반응 억제제인 스테로이드제와 항히스타민제를 함께 사용하고 있다. 이러한 약물 제제는 증상 완화 효과는 뛰어나지만 독성을 비롯한 가려움증이 증가하는 부작용이 발생하고 있어 이를 개선하기 위한 치료법 개발이 필요하며, 안전성이 입증된 천연물에서 활발한 연구가 이루어지고 있다(8).

고욤나무(*Diospyros lotus*, date plum)는 우리나라와 중국을 비롯한 아시아에서 자생하는 낙엽성 식물로서 성숙한 과일을 고욤이라 하여 직접 섭취하거나 잎을 차로 가공하여 먹을 수 있다(9). 고욤은 전통의학에서 진정제(sedative), 수렴제(astringent), 방부제(anti-septic), 항암(anti-tumor),

Received 11 December 2015; Accepted 28 January 2016

Corresponding author: Seon Il Jang, Department of Health Care & Science, Jeonju University, Jeonju, Jeonbuk 55069, Korea
E-mail: sonjjang@jj.ac.kr, Phone: +82-63-220-3124

항당뇨(anti-diabetic), 해열제(febrifuge), 변비완화제(laxative), 설사(diarrhea) 및 고혈압(hypertension) 치료제 등으로 사용됐으며, 최근에는 고염증이 동물모델에서 항염증(anti-inflammatory), 진통제(analgesic) 및 간 기능 보호 활성을 나타내는 보고가 있다(10).

감(persimmon)은 중국, 인도, 일본 및 한국을 비롯하여 널리 재배되는 식용 및 약용 식물로 우리나라에서 재배되는 고종시 감(*Diospyros kaki*)은 주로 꾀감용으로 활용되며, 전라북도 진안군과 완주군 일대는 씨가 없는 고종시로 씨 없는 꾀감이 이 지역의 특산물로 생산되고 있다(11,12). 감잎은 전통의학에서 감기(cough), 토혈(hematemesis), 타액분비(salivation), 갈증(thirst)의 해소뿐만 아니라 건강음료 및 화장품으로 이용되고 있다(11). 최근 연구에 의하면 마우스 모델에 감잎 추출물을 투여한 결과 망막변성(retinal degeneration)을 억제하는 효능이 우수하다고 보고되었다(13).

뽕나무과(Moraceae)에 속하며 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba*, mulberry tree)는 잎, 뿌리껍질 및 열매를 오랫동안 약제로 사용하였고 뽕잎은 수천 년 동안 누에의 먹이로 이용됐으며, 한방의학에서 뽕잎은 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension) 및 고콜레스테롤(hypercholesteremia) 치료에 사용되어 왔다(14,15). 뽕잎에는 각종 무기질과 아미노산뿐만 아니라 기능성 성분인 rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin과 같은 flavonoid 물질이 다량 함유되어 있어 중성지방 분해, 콜레스테롤 저하, 항고혈압, 항당뇨, 항암 효능 및 체지방 축적 억제 등에 효과가 있다고 알려졌다(15). 또한 뽕잎 추출물은 고지방 식이 동물모델에서 고지혈증 개선 효과(16), 항염증 및 항비만 효과(17)를 나타내다고 보고되었다.

식용 및 약용 식물 추출물을 일정한 비율로 혼합하여 사용하거나 동량을 병용 처리 후 사용하여 추출물의 항아토피(18), 면역 활성 증강(19) 및 항당뇨 효과(20) 등 생리활성 효능에 관한 연구가 보고되고 있다. 이전 연구에서 본 연구팀은 고염증의 항알레르기 및 항가려움 효과(21), 감잎의 아토피 개선 효과(22), 뽕잎의 항당뇨 효과(23)에 대해 보고한 바 있다. 비록 고염증, 감잎 및 뽕잎 각각에 대한 생물학적 효능은 다양하게 연구되었으나 세 가지 천연소재를 활용한 복합추출물에 대한 효능은 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 고염증, 감잎 및 뽕잎을 단독으로 사용하기보다 혼합하여 사용할 경우 고염증, 감잎 및 뽕잎 복합추출물이 아토피 피부염 증상을 억제하는지를 밝히고, 항염 효능을 나타내는 기능성 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

고염증, 감잎 및 뽕잎 각각의 추출물 및 이의 복합추출물 제조

본 실험에 사용된 고염증, 감잎 및 뽕잎은 전북 진안군

정천면 및 부귀면에서 2015년 6월에 채취하였다. 채취된 각 잎은 우석대학교 한의과대학 방제학교실의 김홍준 교수에게 의뢰하여 동정하였고, 동정된 고염증(#2015-06-30), 감잎(#2015-06-29), 뽕잎(#2015-06-28) 각 표본은 전주대학교 벤처창업관(주)아토큐엔에이 부설연구소 표본 보관실에 보관하였다. 채취된 각 잎은 증류수로 씻은 후 건조기에서 40°C로 12시간 동안 건조한 다음 분쇄기를 사용하여 분쇄하였다. 건조된 각각의 고염증, 감잎 및 뽕잎(180 g)과 혼합물(고염증 60 g, 감잎 60 g, 뽕잎 60 g씩 총 180 g)에 70% 에탄올 4 L를 넣고 실온에서 5일 동안 추출하였다. 상등액을 Advantec filter paper No. 2(Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과하고 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)에서 농축한 다음 동결건조기(EYELA FDU-2100, EYELA)에서 건조하여 회수한 후 -20°C에 보관하면서 본 실험에 사용하였으며, 고염증 추출물은 DLE(extracts from date plum leaves), 감잎 추출물은 PLE(extracts from persimmon leaves), 뽕잎 추출물은 MLE(extracts from mulberry leaves), 고염증, 감잎 및 뽕잎 복합추출물은 DPME(mixed extracts from date plum, persimmon, and mulberry leaves)로 표기하였다.

실험동물

무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 hairless 마우스는 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하여 전주대학교 동물사육실에서 사료와 물을 충분히 공급하면서 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도 21±2°C와 습도 50±5%의 조건에서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 1주일 적응 후 난피법에 따라 군당 5마리씩 7군[대조군, AD(atopic dermatitis) 유도군, AD+DLE 200 mg/kg 처리군, AD+PLE 200 mg/kg 처리군, AD+MLE 200 mg/kg 처리군, AD+DPME 200 mg/kg 처리군, AD+Prednisolone 5 mg/kg 처리군]으로 나누고 전주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았으며, 전주대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 실험하였다(승인번호 JJU-IACUC-2015-06).

아토피 피부염 유도 및 추출물 투여

실험 디자인 및 일정은 Fig. 1에 나타내었다. 화학 항원 유도 아토피 피부염 모델 동물을 유도하기 위해서 아세톤과 올리브 오일을 3:1로 제조된 용매에 0.15% 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(DNFB; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 제조하여 1일과 4일에 각각 등쪽 피부에 100 µL씩 도포하여 감작(sensitization)하였다. 두 번째 감작일인 4일부터 대조군과 AD 유도군은 생리식염수를 경구 투여하였고, 각각의 추출물 투여군과 복합추출물 투여군은 하루에 한 번 실험 종료일까지 경구 투여하였다. 또한 염증질환 치료 약물인 prednisolone을 표준물질로 사용하여 하루에 한 번 실험 종료일까지 경구 투여하였다. 첫 번째 감작일로부터 7일, 10일, 13일과 16일에 3일 간격으로 0.2% DNFB

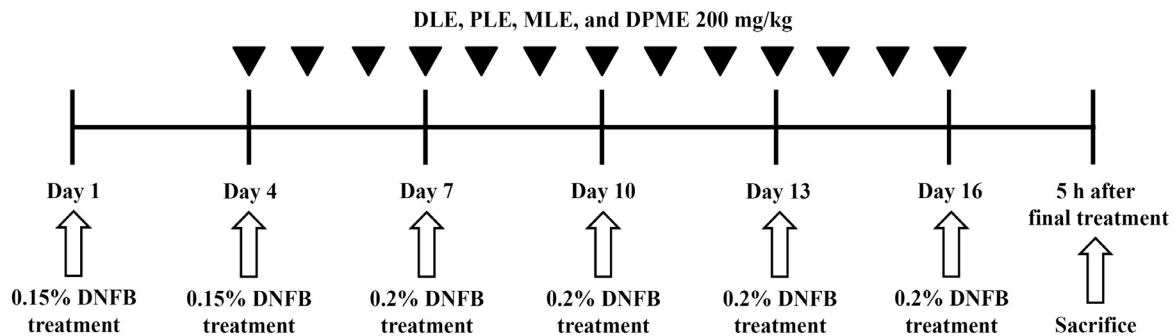


Fig. 1. Experimental design. Atopic dermatitis (AD)-like lesions were evoked by repetitive painting of 0.15% DNFB (acetone : olive oil, 3:1) on dorsal skin of hairless mice once daily on days 1 and 4, then further challenge with 0.2% DNFB on days 7, 10, 13, and 16. On days 4, DLE, PLE, MLE, and DMPE were administered orally every day for 13 days.

를 도포하여 공격(challenge)하였다.

혈청 및 피부조직의 두께 측정

마지막 공격 5시간 후에 마우스의 간문맥으로부터 혈액을 채취하여 실온에 30분간 방치한 후 2,000 rpm에서 원심분리 하여 혈청을 얻었고, 등 피부조직의 두께는 디지털 캘리퍼(Mitutoyo, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

피부병변 평가

피부 상태는 실험 종료 후 사진을 찍어 이중맹검법으로 조사하였다. 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 방법(8)인 피부의 건조 상태(dryness), 스케일링(scaling), 미란(erosion), 찰과상(excoriation) 및 홍반(erythema) 등의 항목을 측정하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한 상태를 3점(severe)을 주어 단계별로 총점수를 부여하여 평가하였다.

피부조직 염색

조직 염색은 H&E stain(Hematoxylin & Eosin, Sigma-Aldrich Co.) 및 toluidine blue(Sigma-Aldrich Co.)로 실시하였다. 피부조직 약 5×5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde(pH 7.4, Sigma-Aldrich Co.)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후 5 μm 두께로 사정하였다. 사정한 조직 절편은 탈파라핀과 합수 과정을 거쳐 H&E 또는 toluidine blue로 염색하여 현미경(×100, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

혈청의 IgE와 IL-4 사이토카인 측정

아토피 피부염 모델 마우스의 IgE 및 IL-4 사이토카인 측정은 추출물 투여 종료 후 5시간에 혈액을 취하고 혈청을 분리하여 IgE와 IL-4를 측정하였다. 혈청 IgE 사이토카인의 측정은 Shibayagi사(Hyogo, Japan)에서 구입한 ELISA kit을 사용하여 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라 측정하였으며, IL-4 사이토카인은 R&D systems사(Minneapolis,

MN, USA)가 제공하는 방법에 따라서 측정하고 정량하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 세포는 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포로 American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 10% FBS(fetal bovine serum, Life Technology, Carlsbad, CA, USA)와 100 units/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technology) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, human mast cell lines(HMC-1) 세포는 10% FBS와 glutamax가 첨가된 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium, Life Technology) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

세포독성 측정

세포독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit(DaeilLab, Seoul, Korea)을 사용하여 제조사가 권장하는 방법에 따라 측정하였다. 먼저 96 well plate에 RAW 264.7 세포는 최종 농도가 2×10⁵ cells/mL가 되도록 분주하고, HMC-1 세포는 5×10⁵ cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양한 후 고욤잎, 감잎, 뽕잎 각각의 추출물 및 복합추출물을 여러 가지 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 EZ-Cytox 시약 10 μL를 넣고 3시간 동안 배양한 다음 microplate reader(Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

HMC-1 세포주 대상 염증성 사이토카인 측정

HMC-1 세포를 6 well plate에 최종농도가 5×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 50 μg/mL의 고욤잎, 감잎, 뽕잎 각각의 추출물 및 복합추출물을 처리하고 30 nM의 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, Sigma-Aldrich Co.)와 1 μM의

calcium ionophore A23187(Sigma-Aldrich Co.)로 동시에 자극한 다음 16시간 후에 세포 상층액을 회수하여 TNF- α 와 IL-6에 대한 ELISA kit을 사용하여 R&D systems사가 제공하는 방법에 따라서 측정하고 정량하였다.

RAW 264.7 세포주 대상 NO, PGE₂ 및 사이토카인 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가 2×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 100 μ g/mL의 고염일, 감일, 뽕일 각각의 추출물 및 복합추출물을 1시간 전처리하고 1 μ g/mL의 LPS(Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 16시간 후에 세포 상층액을 회수하였다. NO 측정은 세포배양액 100 μ L와 Griess reagent(Sigma-Aldrich Co.) 100 μ L를 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Tecan Group Ltd.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO 생성량을 정량하였다. 또한 prostaglandin E₂(PGE₂) 및 TNF- α 와 IL-6 사이토카인에 대한 ELISA kit을 사용하여 R&D systems사가 제공하는 방법에 따라서 측정하고 정량하였다.

결과분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Microsoft Excel program의 Student's *t*-test를 사용하여 실시하였으며, 조사 항목 간의 유의성 검정은 $P < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

아토피 피부염 완화 육안 평가 및 피부 두께 측정

아토피 피부염이 발병하면 과민반응으로 인해 홍반, 종창, 발진 및 미란 등을 동반한 염증반응이 반복적으로 일어나면서 피부장벽이 손상되고 염증성 매개물질과 산화적 스트레스 물질이 피부조직 손상을 가중할 뿐만 아니라 가려움증이 더욱 심해진다(24,25). 각 실험군별 hairless mice의 등 부위를 관찰한 후 아토피 피부염 병변의 형태학적 변화를 확인하여 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 정상군에서는 피부의 형태학적 변화가 나타나지 않았지만, DNFB 처리된 AD 유발군에서는 피부의 건조 상태, 스케일링, 미란, 찰과상 및 홍반 같은 아토피성 피부변화가 심하게 나타났다. 고염일, 감일 및 뽕일 각각의 추출물과 복합추출물 또는 표준물질인 prednisolone을 투여한 군에서는 이러한 변화들이 개선되는 효과를 나타내었고, 복합추출물 투여군이 고염일, 감일 및 뽕일 각각의 추출물과 prednisolone보다 더 낮은 점수를 나타내어 아토피 피부염을 완화하는 데 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2A, B). 또한 아토피 피부염 유발 부위의 피부 두께를 측정한 결과, AD 유발군에 비해 복합추출물 처리 시 고염일, 감일 및 뽕일 각각의 추출물과 prednisolone보

다 더 낮은 두께를 나타내어 병변 상태가 더 양호함을 확인하였다(Fig. 2C). 따라서 본 연구 결과는 고염일, 감일 및 뽕일을 혼합한 복합추출물 투여가 아토피 피부염 증상을 효과적으로 완화할 수 있음을 나타낸다.

조직학적인 변화에 고염, 감일 및 뽕일 복합추출물이 미치는 영향

아토피 피부염이 유발된 피부조직에서는 백혈구의 침윤과 각질층의 두께 증가가 발생할 뿐만 아니라 비만세포의 활성화를 통해 염증 반응이 일어난다(26,27). 따라서 실험군별 hairless mice의 아토피 피부염의 조직학적 변화를 확인하기 위하여 등 부위 피부조직을 H&E와 toluidine blue로 염색한 후 확인하여 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 DNFB로 공격한 AD 유발군에서는 피부 두께 및 염증세포의 침윤과 더불어 비만세포의 활성 및 탈과립 현상이 뚜렷하게 증가하였으나, 고염일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 복합추출물 또는 표준물질인 prednisolone을 투여한 군에서는 피부 두께 및 염증세포의 침윤과 비만세포의 활성이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 복합추출물 투여군이 고염일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 prednisolone보다 더 뛰어난 억제 효과를 나타내었다. 따라서 본 연구 결과는 고염일, 감일 및 뽕일을 혼합한 복합추출물 투여가 피부 두께 및 백혈구 침윤과 비만세포의 활성과 같은 아토피 피부염의 조직학적인 증상들을 효과적으로 완화할 수 있음을 나타낸다.

혈청 내 IgE와 IL-4의 함량 변화에 고염, 감일 및 뽕일 복합추출물이 미치는 영향

아토피 피부염은 항원-항체 반응에 의존하는 전형적인 알레르기 질환으로, 아토피 피부염이 있는 환자는 Th 세포의 균형이 깨져 Th2 세포에 치중된 경향을 보이고, 과도한 IgE가 생성되는 특징이 있다. 이러한 IgE는 비만세포의 탈과립을 유도하고 히스타민을 방출하여 가려움과 긁고 싶은 행동을 일으켜 피부 장벽 기능 손실과 염증을 유발한다(28). 아토피 마커인 IgE와 IL-4를 비롯하여 IL-5, IL-13 같은 Th2 사이토카인을 억제하는 효능에 관한 많은 연구들이 천연물 및 천연물 유래 화합물에서 보고되고 있다(29-31). 그리하여 고염일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 복합추출물의 항아토피 효과 유효성을 평가하기 위해 아토피 피부염의 면역학적 지표라 알려진 IgE와 염증 유발 사이토카인 IL-4의 함량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 혈청을 대상으로 아토피 바이오 마커인 IgE와 IL-4의 생성량을 측정한 결과 DNFB를 처리한 AD 유발군은 정상군보다 IgE와 IL-4의 함량이 뚜렷하게 증가하였으나, 고염일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 복합추출물을 처리한 군의 경우 AD 유발군에 비해 혈청 내 IgE와 IL-4의 함량이 감소하였으며, 복합추출물 투여군이 고염일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 prednisolone 투여군보다 더 우수하게 감소하는 결과를 보였다. 따라서 본 연구 결과는 아토피 피부염이 유발된 hairless mice에서

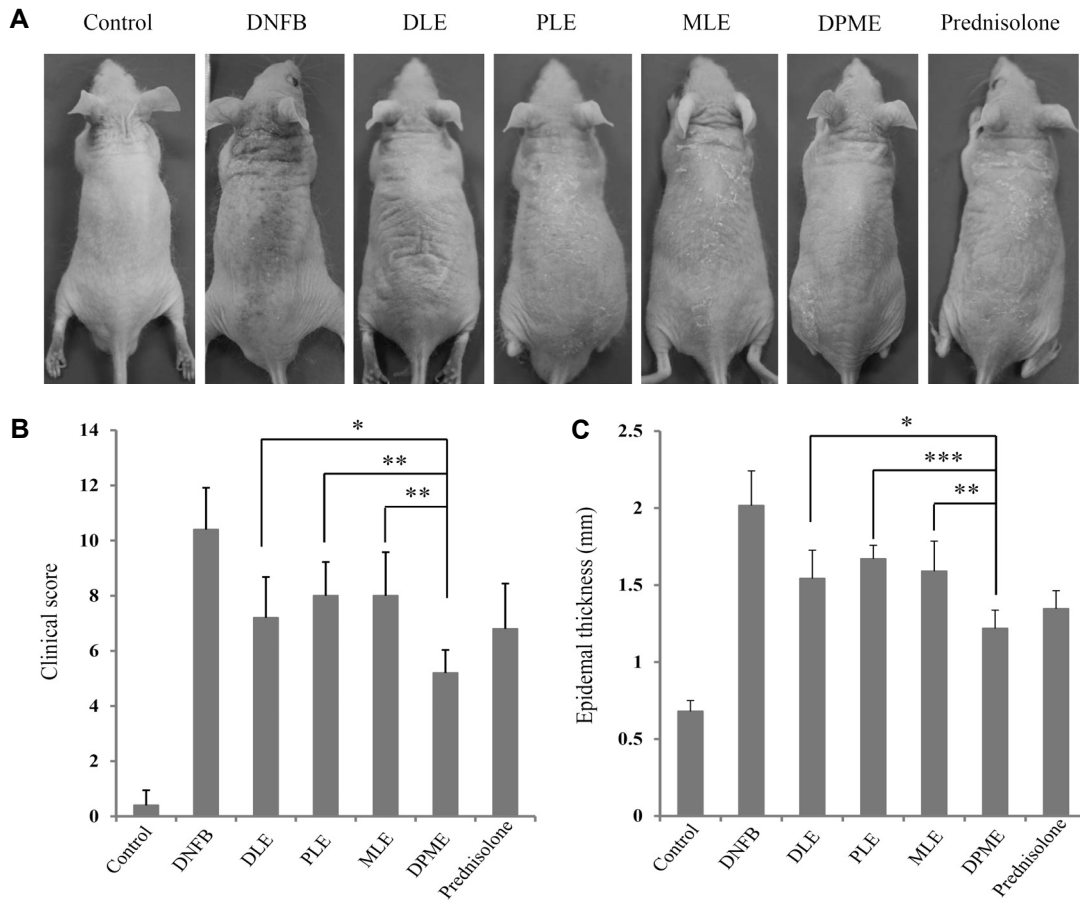


Fig. 2. Effect of DMPE on DNFB-induced AD-like skin lesions. (A) Representative dorsal skin photographs captured at the end of experiments showing comparison of AD-like skin lesions. Clinical score (B) and epidermal thickness (C) of AD-like skin lesions in hairless mice. Data are presented as the mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of **P*<0.05, ***P*<0.01, and ****P*<0.001.

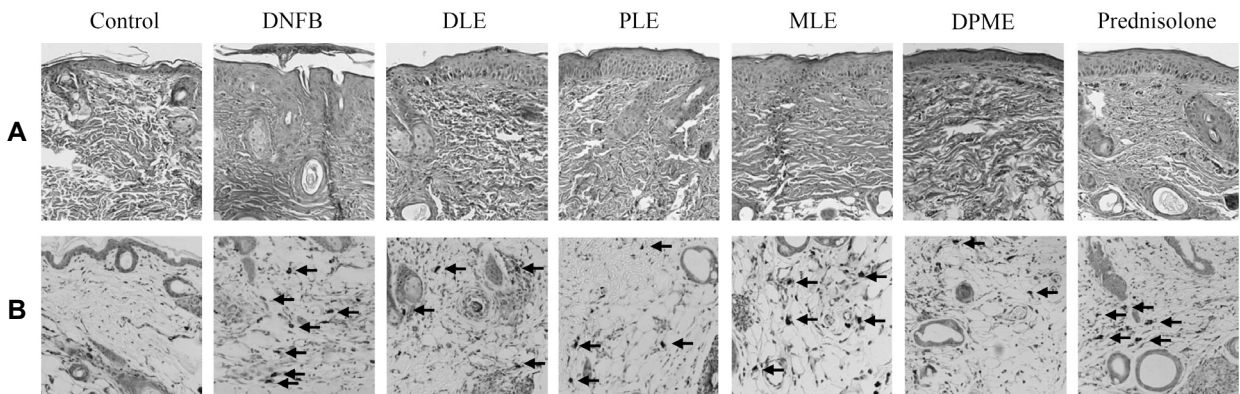


Fig. 3. Histological changes of AD-like skin lesions in hairless mice. DPME inhibits infiltration of leukocyte and mast cells. (A) The skin sections were stained with hematoxylin and eosin. (B) Mast cells were stained with toluidine blue. Sections were evaluated using microscope at a magnification of ×100. Arrows indicate mast cells.

혈청 내 IgE 함량과 IL-4 사이토카인의 감소 효과는 고유일, 감잎 및 뽕잎을 혼합한 복합추출물 투여가 아토피 피부염 증상을 효과적으로 개선하는 것으로 생각한다.

고유, 감잎 및 뽕잎 복합추출물이 염증성 사이토카인 생성

에 미치는 영향

염증은 외상, 감염, 조직손상 및 유해물질을 비롯한 외부 자극에 대한 방어 보호 반응으로, reactive oxygen species 및 전염증성 사이토카인 같은 염증 매개 인자들이 관여하는 방어 기작이다(32,33). Uddin 등(34)과 Jeon 등(3)에 따라

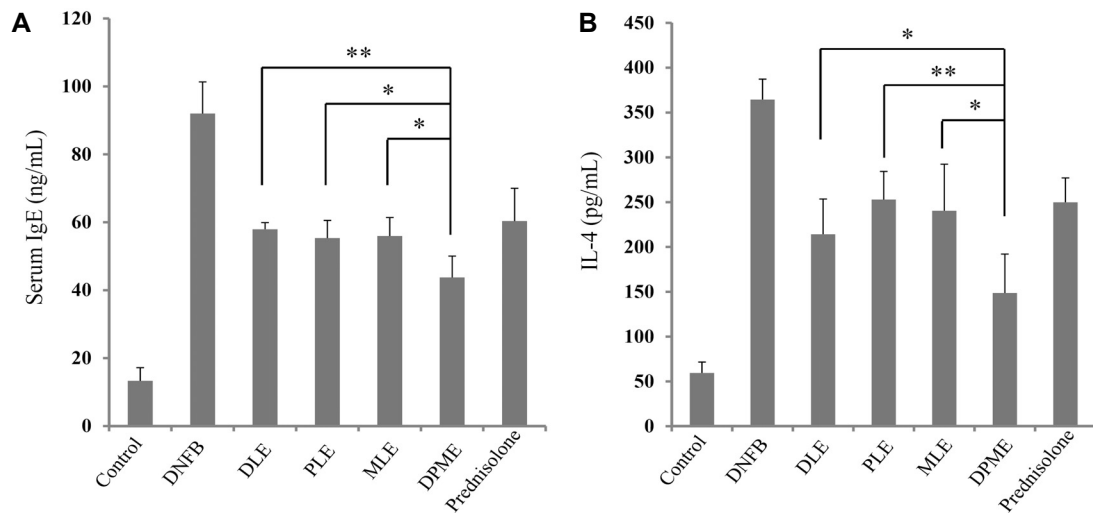


Fig. 4. Effect of DPME on serum IgE (A) and IL-4 (B) production in hairless mice with AD-like skin lesions. Serum levels of IgE and IL-4 were measured using ELISA kit. Data are presented as the mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

면 고염은 항염증 및 항산화 효능이 뛰어나다고 보고되었다. Kim 등(35)의 보고에 의하면 감은 전사인자인 nuclear factor- κ B의 활성을 조절함으로써 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 억제하여 항염증 효능을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Lim 등(36)의 보고에 의하면 뽕잎은 고식이에 의해 유발된 비만 쥐에서 TNF- α 와 IL-1 β , iNOS 같은 염증성 매개 인자들을 억제하고 산화적 스트레스를 경감시켜 항비만 효능을 나타낸다고 발표하였다. 그리하여 고염, 감잎 및 뽕잎을 혼합하여 추출한 복합추출물이 염증성 사이토카인의 생성을 단독추출물보다 효과적으로 억제하는지 알아보기 위하여, HMC-1 세포에 고염, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리한 다음 PMA와 A23187을 동시에 처리하여 자극한 후 사이토카인 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다(Fig. 5). 그 결과 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6

생성량은 고염, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리하였을 경우 감소하는 것을 확인하였고, 고염, 감잎 및 뽕잎 단독추출물을 처리하였을 때보다 복합추출물을 처리하였을 때 억제 효능이 더욱 우수하였다. 또한 RAW 264.7 세포에 고염, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리한 다음 LPS를 처리하여 자극하고 사이토카인 생성량을 측정할 결과, TNF- α 의 경우 고염, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리하였을 때 감소하는 것을 확인하였고, 복합추출물을 처리하였을 때 단독추출물 처리 시보다 억제 효능이 더욱 우수하였다(Fig. 6A). IL-6의 경우 고염, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리하였을 때 감소하는 것을 확인하였고, 단독추출물과 복합추출물 간의 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 복합추출물 투여 시 약간 더 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6B). 따라서 본 연구

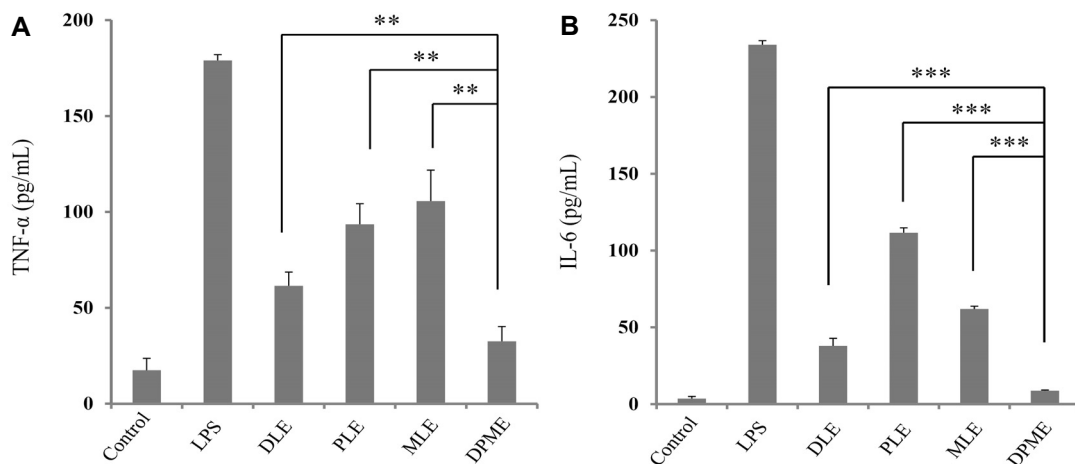


Fig. 5. Effect of DPME on TNF- α (A) and IL-6 (B) production in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells. DLE, PLE, MLE, and DPME were treated at the concentration of 50 μ g/mL in HMC-1 cells. Data are presented as the mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$.

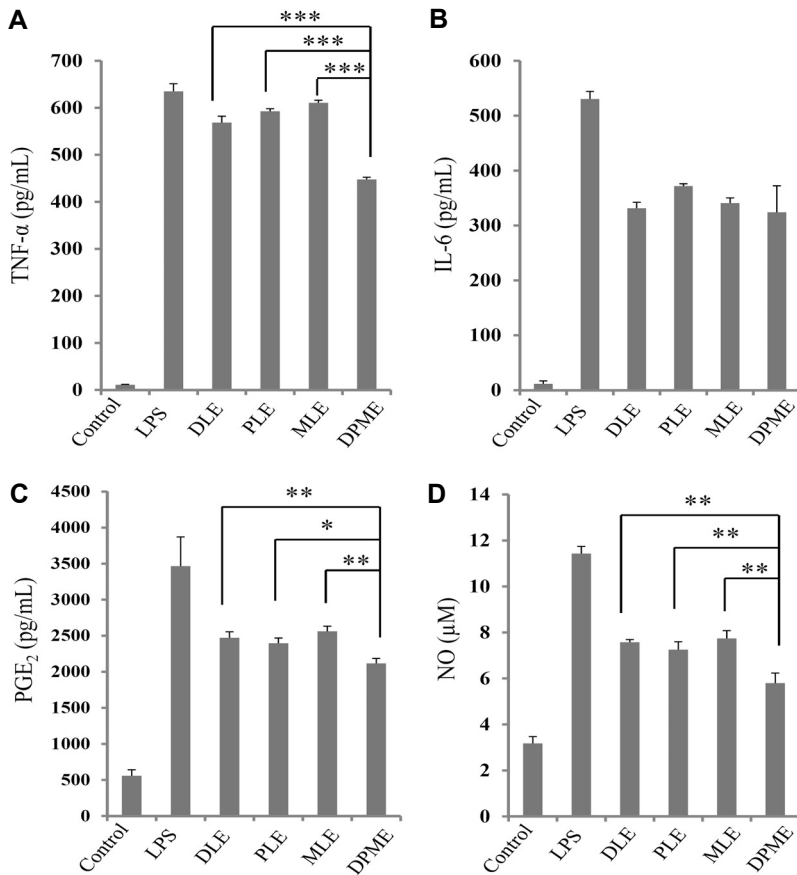


Fig. 6. Effect of DPME on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE₂ (C), and NO (D) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. DLE, PLE, MLE, and DPME were treated at the concentration of 100 μ g/mL in HMC-1 cells. Data are presented as the mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of **P*<0.05, ***P*<0.01, and ****P*<0.001.

결과는 고욤잎, 감잎 및 뽕잎을 혼합한 복합추출물을 사용하는 것이 염증성 사이토카인 생성 억제에 더 효과적일 것으로 생각한다.

고욤, 감잎 및 뽕잎 복합추출물이 NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향

그람 음성 세균의 외막 구성 성분인 LPS를 RAW 264.7 세포에 처리하여 자극하면 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 같은 염증성 사이토카인뿐만 아니라 NO, PGE₂를 포함한 염증 매개 물질을 분비하여 염증반응을 촉진한다(37). RAW 264.7 세포에 고욤잎, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리할 경우 PGE₂ 및 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100 μ g/mL의 고욤잎, 감잎, 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리하고 1시간 후에 LPS로 자극하여 16시간 배양한 다음 PGE₂ 및 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과 LPS를 처리한 군에서는 PGE₂ 및 NO 생성량이 무처리군과 비교하여 많이 증가하였지만, 고욤잎, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물을 처리하였을 경우 LPS 처리군과 비교하여 PGE₂ 및 NO 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 복합추출물을 처리하였을 때 단독추출물 처리 시보다 억제효능이 더욱 우수하였다(Fig. 6C, D). 또한 HMC-1 세포와 RAW 264.7 세포에서 세포독성을 측정된 결과, 고욤잎, 감잎 및 뽕잎 단독추출물과 복합추출물 모두 100 μ g/mL의

농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(data not shown).

기존 연구에 의하면 감잎 추출물은 prostaglandin E metabolite를 포함한 염증 매개 물질을 억제하여 아토피 피부염 개선 효과를 나타낸다고 보고되었다(38). Kim 등(21)의 연구에 의하면 고욤잎 열수 추출물은 아토피 피부염 개선 및 가려움증을 억제하는 효과가 뛰어나다고 보고하였다. 또한 뽕잎 에탄올 추출물은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 증가한 NO와 PGE₂를 억제하여 항염증 효능을 나타내는 것으로 보고되었으며(39), 본 연구 결과는 비슷한 양상을 나타내었고 복합추출물이 더 우수한 항염증 효능을 보였다. 이전 연구들에 의하면 한약을 비롯한 생약복합추출물들이 시너지 효과를 나타내어 항산화 및 항염증 효능을 비롯한 생리활성 기능을 상승시킬 수 있다고 보고되었다(40-43). 따라서 고욤잎, 감잎 및 뽕잎 복합추출물에 의한 항아토피 및 항염증 효능은 단독추출물을 사용하는 것보다 더 효율적인 방법이라 생각하고 소재 간의 혼합 비율을 비롯한 더 다양한 후속 연구가 필요할 것으로 생각되며, 기능성 천연 소재로서 염증성 질환 예방 및 치료제 개발을 비롯한 다양한 산업적 활용이 기대된다.

요 약

본 연구는 고욤잎, 감잎 및 뽕잎을 단독으로 사용하기보다

혼합하여 사용할 경우 고요일, 감일 및 뽕일 복합추출물이 아토피 피부염(AD) 증상을 억제하는지 효과를 밝히고, 항염 효능을 나타내는 기능성 소재로서의 이용 가능성을 알아보 고자 하였다. 그 결과 육안 평가를 통해 피부의 건조 상태, 스케일링, 미란, 찰과상 및 홍반 같은 아토피 피부염 증상이 AD 모델에서 증가하였지만, 고요일, 감일 및 뽕일 각각의 추출물과 복합추출물을 투여하였을 경우 완화되는 것을 확인할 수 있었으며, 복합추출물이 고요일, 감일 및 뽕일 각각의 추출물보다 더 뛰어난 효과를 나타내었다. 피부 두께와 염증세포 및 비만세포의 침윤은 AD 모델에서 크게 증가하였지만, 고요일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 복합추출물을 투여하였을 경우 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 복합추출물이 단독추출물보다 더 뛰어난 효과를 나타내었다. 혈청 중의 IgE와 IL-4의 수치를 측정된 결과 AD 모델에서 많이 증가하였으나, 고요일, 감일 및 뽕일 단독추출물과 복합추출물을 투여하였을 경우 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 복합추출물이 단독추출물보다 더 뛰어나게 억제하는 효과를 나타내었다. HMC-1 세포에 복합추출물을 처리하였을 경우 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 생성량이 유의적으로 감소하였으며, 또한 RAW 264.7 세포에 복합추출물을 처리하였을 경우 염증 매개 인자인 TNF- α , IL-6, PGE₂ 및 NO 생성량이 감소하였고, 이러한 염증 매개 인자 억제 효능은 복합추출물이 단독추출물보다 더 뛰어나게 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어볼 때 고요일, 감일 및 뽕일을 혼합한 복합추출물을 사용할 때 효능이 더 우수한 것을 확인하였고, 아토피 피부염 증상 개선 및 염증관련 질환 치료를 위한 기능성 천연물 소재 및 제품 개발에 응용이 가능할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 기술혁신개발사업의 일환으로 수행하였음(S2245418, 식물 유래 암갈색 색소 제거기술을 활용한 기능성 물질 고 함유 화장품 개발).

REFERENCES

- Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. 2011. Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J Invest Dermatol* 131: 67-73.
- Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. 2011. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-part I: clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 127: 1110-1118.
- Jeon IH, Kang HJ, Kim SJ, Jeong SI, Lee HS, Jang SI. 2014. Antioxidant and antipruritic activities of ethyl acetate fraction from *Diospyros lotus* leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1635-1641.
- Boguniewicz M, Leung DY. 2010. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol* 125: 4-13.
- Park KS, Kim KJ. 2010. Effects of atopic dermatitis induced materials on the expression of cytokine genes in human monocytes and mast cells. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 23: 41-56.
- Leung DY. 1999. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 104: S99-S108.
- Kim HS, Jung JI, Suh SB, Jung JA. 2013. Characteristics between IgE mediated and non-IgE mediated atopic dermatitis in children. *Allergy Asthma Respir Dis* 1: 339-343.
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Park WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Bae NY, Park JH, Ahn DH. 2015. Anti-atopic activity of tuna heart ethanol extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1-6.
- Kim SJ, Kim JA, Kim DH, Kwak SH, Yu KY, Jang SI, Kim SY, Jeong SI. 2015. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Diospyros lotus*. *Kor J Pharmacogn* 46: 105-108.
- Said A, Hawas UW, Nofal SM, Rashed K, Huefner A. 2009. Pharmacological studies on the aqueous methanolic extract of *Diospyros lotus* leaves. *Res J Phytochem* 3: 1-12.
- Xie C, Xie Z, Xu X, Yang D. 2015. Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *J Ethnopharmacol* 163: 229-240.
- Jeong SI, Cho JK, Mok JY, Kim SJ, Park JM, Jeon IH, Kim HS, Jang SI. 2010. Antioxidant activity of persimmon leaves during growth. *Kor J Pharmacogn* 41: 255-263.
- Kim KA, Kang SW, Ahn HR, Song Y, Yang SJ, Jung SH. 2015. Leaves of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) ameliorate N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced retinal degeneration in mice. *J Agric Food Chem* 63: 7750-7759.
- El-Sayyad HIH, El-Sherbiny MA, Sobh MA, Abou-El-Naga AM, Ibrahim MAN, Mousa SA. 2011. Protective effects of *Morus alba* leaves extract on ocular functions of pups from diabetic and hypercholesterolemic mother rats. *Int J Biol Sci* 7: 715-728.
- Kim EJ, Kim GY, Kim YM, Choi KH, Jang SJ. 2009. Anti-obesity effect of mulberry leaves extraction in obese rats high-fat diet. *Korean J Orient Physiol Pathol* 23: 831-836.
- Kobayashi Y, Miyazawa M, Kamei A, Abe K, Kojima T. 2010. Ameliorative effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis, and suppression of oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 2385-2395.
- Lim HH, Lee SO, Kim SY, Yang SJ, Lim Y. 2013. Anti-inflammatory and antiobesity effects of mulberry leaf and fruit extract on high fat diet-induced obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 238: 1160-1169.
- Yang HJ, Park KW, Kim HS, Cho SM, Park KM. 2010. Effect of anti-atopic allergic reaction in response to oriental herb extracts. *Korean J Food Sci Technol* 42: 109-114.
- Byun MW, Byun EH. 2015. Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (Hemo-HIM) and red ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 182-190.
- Kim DJ, Kim JM, Kim TH, Baek JM, Kim HS, Choe M. 2010. Effects of mixed extract from *Lycium chinense*, *Cordyceps militaris*, and *Acanthopanax senticosus* on glucose-regulating enzymes of HepG2 in hyperglycemic conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1257-1262.
- Kim HS, Jeon IH, Mok JY, Kang HJ, Shin JH, Park YK, Jeong SI, Jang SI. 2013. Anti-allergy and anti-pruritic effects of *Diospyros lotus* L. leaf extract. *Kor J Pharmacogn*

- 44: 60-69.
22. Cho JK, Jeon IH, Park JM, Kim HS, Jang SI. 2011. Inhibitory effect of persimmon leaf extract on development of atopic dermatitis-like skin lesions. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54: 653-657.
 23. Kwon TO, Choi J, Lee HS, Cho BO, Yin HH, Jang SI. 2015. Anti-diabetic effects of Mori Folium extract on high-fat diet and streptozotocin-induced type II diabetes mellitus in mice. *Kor J Herbol* 30: 1-9.
 24. Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. 2001. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69: 223-228.
 25. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7: 52-63.
 26. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. 2012. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1822: 21-33.
 27. Kim GD, Lee SE, Park YS, Shin DH, Park GG, Park CS. 2014. Immunosuppressive effects of fisetin against dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. *Food Chem Toxicol* 66: 341-349.
 28. Tsuduki T, Kuriyama K, Nakagawa K, Miyazawa T. 2013. Tocotrienol (unsaturated vitamin E) suppresses degranulation of mast cells and reduces allergic dermatitis in mice. *J Oleo Sci* 62: 825-834.
 29. Kim H, Kim JR, Kang H, Choi J, Yang H, Lee P, Kim J, Lee KW. 2014. 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. *PLoS One* 9: e104938.
 30. Park BK, Park YC, Jung IC, Kim SH, Choi JJ, Do M, Kim SY, Jin M. 2015. Gamisangja-tang suppresses pruritus and atopic skin inflammation in the NC/Nga murine model of atopic dermatitis. *J Ethnopharmacol* 165: 54-60.
 31. Yang G, An D, Lee MH, Lee K, Kim B, Khanita Suman C, Ham I, Choi HY. 2016. Effect of *Acer tegmentosum* bark on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol* 177: 53-60.
 32. Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. 2012. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol* 280: 164-170.
 33. Wu Q, Li H, Qiu J, Feng H. 2014. Betulin protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *Microb Pathog* 75: 21-28.
 34. Uddin G, Rauf A, Siddiqui BS, Muhammad N, Khan A, Shah SU. 2014. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L.. *Phytomedicine* 21: 954-959.
 35. Kim HH, Kim DS, Kim SW, Lim SH, Kim DK, Shin TY, Kim SH. 2013. Inhibitory effects of *Diospyros kaki* in a model of allergic inflammation: role of cAMP, calcium and nuclear factor- κ B. *Int J Mol Med* 32: 945-951.
 36. Lim HH, Yang SJ, Kim Y, Lee M, Lim Y. 2013. Combined treatment of mulberry leaf and fruit extract ameliorates obesity-related inflammation and oxidative stress in high fat diet-induced obese mice. *J Med Food* 16: 673-680.
 37. Tan WS, Arulsevan P, Karthivashan G, Fakurazi S. 2015. *Moringa oleifera* flower extract suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via NF- κ B pathway. *Mediators Inflammation* 2015: 720171.
 38. Jung WY, Jeong JM. 2012. Change of antioxidative activity at different harvest time and improvement of atopic dermatitis effects for persimmon leaf extract. *Kor J Herbol* 27: 41-49.
 39. Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Kim SC. 2012. Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol* 27: 31-38.
 40. Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Kim JB, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Korean J Food Sci Technol* 43: 200-205.
 41. Kang CH, Kwak DY, So JS. 2013. Inhibition of nitric oxide production and hyaluronidase activities from the combined extracts of *Platycodon grandiflorum*, *Astragalus membranaceus*, and *Schisandra chinensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 844-850.
 42. Kim DH, An BJ, Kim SG, Park TS, Park GH, Son JH. 2011. Anti-inflammatory effect of *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurea* and *Aruncus dioicus* complex extracts in Raw 264.7 cells. *J Life Sci* 21: 678-683.
 43. Jang YA, Lee JT. 2014. Effects of mixture extract on allergic contact dermatitis and anti-inflammatory. *Kor J Herbol* 29: 55-60.