

## 아로니아 및 모링가 종자 복합물의 항아토피 상승효과

기현희<sup>1</sup> · 이지현<sup>1</sup> · 문광현<sup>2</sup> · 이정호<sup>2</sup> · 김대근<sup>2</sup> · 정경옥<sup>2</sup> · 임소연<sup>2</sup> · 이영미<sup>3</sup> · 김대기<sup>1</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 의과대학 및 의과학연구소  
<sup>2</sup>(재)순창건강장수연구소  
<sup>3</sup>원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소

### Synergistic Inhibition of *Aronia melanocarpa* and *Moringa oleifera* Seed Extract on Experimental Atopic Dermatitis

Hyeon-Hui Ki<sup>1</sup>, Ji-Hyun Lee<sup>1</sup>, Kwang-Hyun Moon<sup>2</sup>, Jeong-Ho Lee<sup>2</sup>, Dae-Geun Kim<sup>2</sup>,  
Kyung-Ok Jeong<sup>2</sup>, So-Yeon Im<sup>2</sup>, Young-Mi Lee<sup>3</sup>, and Dae-Ki Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Institute of Medical Science, Chonbuk National University Medical School

<sup>2</sup>Sunchang Research Institute of Health and Longevity

<sup>3</sup>Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University

**ABSTRACT** Atopic dermatitis is a chronic, relapsing inflammatory skin disease. This study aimed to investigate the therapeutic benefits of *Aronia melanocarpa* (AM) and *Moringa oleifera* seed extract (MO) on experimental atopic dermatitis. We examined the effects of AM or MO and their combination on 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced atopic dermatitis in BALB/c mice as well as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$ -stimulated HaCaT keratinocytes. Mice were orally treated with extract during repeated application of DNCB to shaved dorsal skin. Our results show that treatment with AM and MO in combination reduced histological manifestations such as epidermal hyperplasia and inflammatory cell infiltration. Furthermore, it significantly decreased skin thickness and serum immunoglobulin E (IgE) level compared to the AM or MO alone treated group. Combined extract of AM and MO suppressed expression of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced T helper 2 (Th2) chemokines such as thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. To sum up, combination of AM and MO suppressed the inflammatory response and serum IgE as an indicator of several allergic diseases in DNCB-induced experimental atopic dermatitis and Th2 chemokine expression in HaCaT cells. This result suggests that combination of AM and MO could be a valuable strategy to improve atopic dermatitis.

**Key words:** *Aronia melanocarpa*, *Moringa oleifera*, atopic dermatitis, 2,4-dinitrochlorobenzene, keratinocytes

## 서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 아토피성 습진이라고도 불리는 만성 또는 재발성의 염증성 피부 질환이며, 세계적으로 15~20%의 어린이와 1~3%의 성인이 영향을 받고 있다. 건조한 피부에 가려움증, 태선화 증상 등이 흔하게 나타나고, 보통 유아시절에 증상이 시작된 아토피 피부염이 천식이나 알레르기 비염과 같은 다른 알레르기 질환으로 발전하는 아토피 행진(atopic march)으로 이어지기도 한다(1). 아토피 피부염의 원인은 피부장벽의 이상, 유전적, 환경적, 심리적 및 면역학적 요인 등 다양한 원인들이 복합적으로

상호 관계를 이루는 것으로 알려져 있다. 아토피 피부염 환자는 심각한 가려움증으로 인해 불충분한 수면 등으로 일상생활에서 불편함을 겪을 뿐만 아니라 사회적 인간관계에도 어려움을 느끼며, 치료비용으로 인한 경제적인 문제로 고통 받고 있다(2).

현재 아토피 피부염의 치료는 국소 치료제로써 스테로이드나 칼시뉴린(calcineurin) 억제제가 일반적으로 사용되고 있으며, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 같은 박테리아의 2차 감염을 억제하기 위해 표백제 목욕법(bleach baths) 등이 시도되고 있다. 만성적인 아토피 피부염 환자에게는 경구 및 전신 치료가 고려되는데, 전신 면역억제제인 사이클로스포린(cyclosporine)의 투여나 광선치료요법이 사용된다(3,4). 이와 같은 치료제는 효과적이고 유익하지만 코르티코스테로이드는 장기 사용 시 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome)의 위험이 있으며, 사이클로스포린을 이용

Received 23 November 2016; Accepted 17 January 2017

Corresponding author: Dae-Ki Kim, Department of Immunology and Institute of Medical Sciences, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Jeonbuk 54907, Korea  
E-mail: daekim@jbnu.ac.kr, Phone: +82-63-270-3080

한 치료도 신독성, 고지혈증, 고혈압 등의 부작용(5)이 보고되었다. 이에 따라 약물에 의존하기보다 비교적 안전한 천연물 소재를 활용한 기능성 식품을 섭취하거나 화장품 등을 사용하는 일상적인 관리의 필요성이 증가하고 있다.

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 블랙초크베리(black chokeberry)라고도 불리며, 주스나 잼, 와인 제조뿐 아니라 장식용 식물에도 사용되고 있고 강력한 항산화성을 가진 안토시아닌(anthocyanins), 프로시아니딘(procyanidins)을 함유하고 있어(6) 항산화 활성에 대한 연구가 많이 진행되었다(7-10). 또한, 항염(11), 고지혈증 개선(12), 항돌연변이 효과(13) 등의 다양한 생리활성 연구가 보고되었다.

모링가(*Moringa oleifera*)는 Moringaceae과의 지역적인 인도의 약용 허브의 일종으로 주로 열대 및 아열대 국가에서 재배되는 것으로 알려져 있으며, 비타민, 미네랄, 아미노산, 베타카로틴(beta-carotene) 등의 영양성분이 풍부하게 함유되어 있다(14). 남아시아에서는 식물의 뿌리, 나무껍질, 검(gum), 잎, 포드(pods), 꽃, 종자 등 모든 부분이 염증 및 감염성 질환을 포함한 다양한 질환의 치료에 민간요법으로 사용되고 있다(15). 그중에서 모링가의 종자는 천식환자들을 대상으로 모링가 종자의 파우더를 물과 함께 음용하게 하였을 때 천식의 증상과 폐기능 지표가 개선되었음이 보고되었고(16), 기니피그 동물모델에서도 항천식 효과가 보고되었다(17).

최근 probiotics(18,19)나 천연물 소재인 다래 추출물(20) 등의 아토피 피부염 개선 효능이 연구되었으며, 이러한 연구 결과를 바탕으로 과민면역반응 개선과 피부 건강에 대한 기능성 식품소재 개발 및 관련 시장이 발달되고 있다. 또한, 단일 소재뿐 아니라 다른 소재와 같이 혼합하여 투여할 경우 항아토피 개선 활성이 증대됨이 보고되었다(21). 따라서 본 연구에서는 혼합하여 투여하였을 때 생리활성이 상승할 것으로 예상하는 아로니아 및 모링가 종자 추출물의 아토피 피부염 개선 효능을 평가하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**추출물 제조**

본 실험에 사용된 아로니아 열매는 순창군 순창읍에 소재한 순창 농산물 직판장에서 구입하였고, 모링가의 종자는 (주)신선약초(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 각 재료 300

g에 20배수의 추출 용매 50% 에탄올을 첨가하여 60°C에서 3시간 2회 반복 추출한 후에 동결 건조하여 분말화하였다.

**실험동물 사육**

실험동물은 BALB/c계 암컷 4주령을 Samtako(Osan, Korea)에서 공급받아 일주일 동안 실험동물실 환경에 적응 및 순화를 시켰다. 동물 사육장의 온도는 22±2°C, 습도는 55±10%를 유지하였으며, 조명은 12시간을 주기로 조절하였다. 물과 고형사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

**아토피 피부염 동물모델 및 추출물 투여**

실험동물이 5주령이 되었을 때 총 35마리를 군당 5마리로 난피법에 따라 7군으로 다음과 같이 분류하였다. 정상군(Normal), DNCB 도포군(DNCB), DNCB 도포+아로니아 추출물 투여군(AM), DNCB 도포+모링가 종자 추출물 투여군(MO), DNCB 도포+아로니아 추출물과 모링가 종자 추출물의 1:1 조성비 복합물 투여군(AM-MO), 실험대조군으로써 아토피 유도+dexamethasone 투여군(Dexa)으로 나누어 실험을 진행하였다(Fig. 1). 실험 시작 전에 실험동물의 등 부분을 전자이발기 및 제모크림을 이용해 깨끗하게 제모하고, 미세 상처치유를 위해 24시간 동안 방치하였다. 아토피 피부염의 유도를 위해 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, acetone : olive oil(4:1)의 용매에 1%(w/v) DNCB 용액을 제조하여 실험동물의 등 부분에 실험 시작일로부터 1일 1회씩 3일간 도포하고 그다음 날로부터 2일 간격으로 1회씩 10일간 0.5% DNCB 용액을 도포하였다. 시료는 실험 시작 4일에서 14일까지 10일간 투여하였고, 각 추출물 및 복합물의 농도는 200 mg/kg으로, dexamethasone(Sigma-Aldrich Co.)은 0.5 mg/kg의 농도로 경구투여 하였으며, 15일째 되는 날 실험동물을 희생하여 아토피 피부염의 병리학적 지표를 분석하였다. 또한, 본 연구는 전북대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 윤리규정에 따라서 수행되었다(승인번호 CBNU 2016-0011).

**조직학적 검사**

실험이 종료된 후 실험동물을 희생시켜 등 조직 피부를 떼어내어 4% 포르말데히드 용액에 고정하였다. 24시간 동안 상온에서 고정한 후 에탄올 용액에서 단계적으로 탈수시

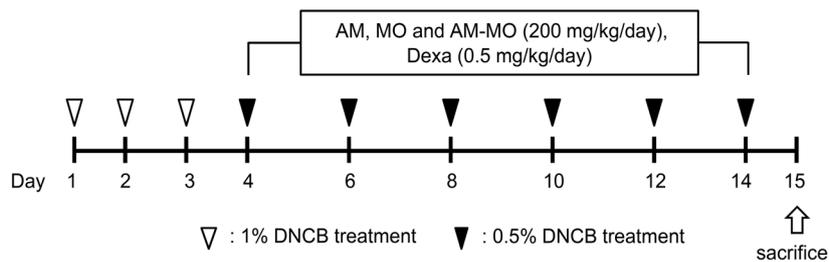


Fig. 1. Experimental protocol. AM, *Aronia melanocarpa* extract; MO, *Moringa oleifera* seed extract.

킨 다음 xylene으로 투명화하였다. 그 후 파라핀 블록을 제작하여 4  $\mu\text{m}$ 의 두께로 박절하여 슬라이드에 조직 절편을 만들었다. 각 조직 절편은 xylene으로 탈파라핀 후 흡수하여 hematoxylin 시액 1분 및 eosin 시액 3분 처리하여 염색하였다. 염색 후 각 조직 절편을 탈수과정을 거친 다음 봉입하여 광학현미경(CX21, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

### 등 피부 두께 측정

실험동물을 희생시킨 후 등 피부 조직을 절개하여 thickness gage(Mitutoyo, Tokyo, Japan)를 이용해 각 실험동물의 등 피부 조직의 두께를 측정하였다.

### 피부 수분 함량 분석

피부 표면의 전기적 정전용량에 기초해 수분 함량(%)으로 측정하는 기기인 aramo TS-skin diagnosis system (Aram Huvis Co., Ltd., Seongnam, Korea)을 사용하여 아토피 피부염 유사 증상이 유발된 실험동물의 등 피부의 수분 함량을 분석하였다.

### 혈청 내 immunoglobulin E(IgE) 농도 측정

실험동물의 복부 대정맥으로부터 23G의 주사기로 혈액을 채취하고 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 Mouse IgE ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 이용하여 sandwich ELISA법으로 혈청 중의 총 IgE를 분석하였다. Coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.5)에 250배 희석한 capture antibody를 4°C에서 overnight 한 후에, 200  $\mu\text{L}$ 의 assay diluent를 각 well에 분주하여 1시간 동안 실온에서 blocking 하였다. 희석한 농도별 표준액과 혈청을 100  $\mu\text{L}$ 씩 well에 분주하고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 희석한 detection antibody+ streptavidin-HRP를 각 well에 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 각 단계 사이에 well은 0.05% PBS-Tween 20으로 세척하였고, 마지막 세척 이후 100  $\mu\text{L}$ 의 substrate solution을 분주하고 빛을 차단한 상태로 30분 동안 반응시켰다. 반응을 정지하기 위해 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 microplate reader(zeniyth 200rt, Anthos, Salzburg, Austria)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### HaCaT 세포주 배양

HaCaT 인간 유래 피부각질세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 10%의 fetal bovine serum (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)과 1%의 penicillin(100 units/mL)-streptomycin(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이 포함된 DMEM(HyClone Laboratories) 배지에 배양하였다. 배양기는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하였다.

### 세포독성 시험

AM, MO 및 AM-MO의 처리에 따른 HaCaT 세포주의 세포독성을 분석하기 위하여 Cell counting kit(CCK)-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)을 사용하였다. 세포를 2.5  $\times 10^5$  cells/mL로 48-well plate에 분주하고 안정화한 후, 시료를 농도별(25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 CCK-8 시약을 각 well에 20  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고, 다시 1시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양한 다음, 배양액을 수집하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### RNA 추출 및 real time RT-PCR

피부각질세포주인 HaCaT 세포주를 6-well plate에 1  $\times 10^5$  cells/mL로 분주하고, 각 추출물을 1시간 전처리하였다. TNF- $\alpha$ (10 ng/mL) 및 IFN- $\gamma$ (10 ng/mL)를 각 well에 분주하여 세포를 자극하였으며, 6시간 배양 후 각 well당 1 mL의 Trizol 용액(Ambion, Austin, TX, USA)을 넣어 세포막을 파괴하고 total RNA를 수집하였다. 수집한 RNA를 0.2 mL의 chloroform과 혼합하여 4°C 조건에서 12,000 rpm에서 원심분리 하고, 상층액을 취하여 0.5 mL의 2-propanol과 혼합한 후 다시 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 하고 용액을 제거한 다음 RNA 펠릿을 건조하였다. 건조된 RNA 펠릿을 RNase free water에 용해하고 분광광도계를 이용해 총 RNA를 정량하였다. 2  $\mu\text{g}$ 의 RNA를 Prime Script<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA Synthesis kit(Takara Bio Inc., Otsu, Japan)을 사용하여 cDNA를 합성하였으며, SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)와 StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR system(Applied Biosystem)을 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. PCR은 95°C에서 10분 동안 초기 변성 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 40 cycles의 조건으로 수행하였고, house-keeping 유전자인 GAPDH를 동시에 측정하여 RNA량을 보

**Table 1.** Sequences and product size of primers for real-time RT-PCR

Gene		Sequences	Size (bp)
TARC/CCL17	Sense	CCATCCCCTTAGAAAGCTG	157
	Anti-sense	CTCTCAAGGCTTTGCAGGTA	
MDC/CCL22	Sense	TGCCGTGATTACGTCGGTTAC	201
	Anti-sense	AAGCCACGGTCATCAGAGTAG	
GAPDH	Sense	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	226
	Anti-sense	GAAGATGGTGATGGGATTC	

정하였다. 검출하고자 하는 유전자 특이적인 primer를 제작하여 사용하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

### 통계분석

모든 실험의 결과는 평균치(mean)와 표준오차(standard error, SE)로 표시하였고, SPSS(version 24.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 하였으며, 사후검정방법으로 Duncan's multiple range test를 수행하여  $P < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 피부조직의 형태학적 변화에 미치는 영향

DNCB로 유도한 아토피 피부염 동물모델에서 아로니아, 모링가 종자 추출물 및 각 추출물의 복합물이 피부의 형태학적 변화에 미치는 영향을 확인하고자 조직 검사를 수행하였다(Fig. 2). DNCB를 도포하여 아토피 피부염 유사 병변을 유도한 각 실험동물의 등 피부조직 절편을 hematoxylin과 eosin 시액으로 염색한 결과, DNCB 도포군(DNCB)은 정상군(Normal)과 비교하여 표피의 과증식이 나타나고 염증이 악화된 상태를 나타내어 아토피 피부염과 유사한 피부 손상이 나타났다. 아로니아 추출물(AM) 투여군은 DNCB군과 비슷한 조직병리학적 형태를 보여 개선 효과가 미약하였지만, 모링가 종자 추출물(MO) 투여군에서는 표피의 과증식 및 염증 상태가 감소함을 확인하였다. 한편 아로니아와 모링가 종자 추출물의 복합물(AM-MO) 투여군에서는 AM 및 MO 각각의 단독 투여군보다 표피의 과증식과 염증세포의 침윤 정도가 더 현저하게 감소한 것으로 확인하였다.

### 피부조직 두께에 미치는 영향

피부 손상 및 염증으로 인한 피부 두께의 증가에 대하여 AM, MO 및 AM-MO의 영향을 조사하였다(Table 2). 실험 동물로부터 등 피부 조직을 채취하여 thickness gage를 이용하여 두께를 측정된 결과, DNCB군의 등 피부 조직 두께는  $1.56 \pm 0.04$  mm로 Normal군의  $0.60 \pm 0.03$  mm보다 현

**Table 2.** Thickness of dorsal skins in the experimental groups

Groups <sup>1)</sup>	Dorsal skin thickness (mm)
Normal	$0.60 \pm 0.03^{a2)}$
DNCB	$1.56 \pm 0.04^d$
AM	$1.50 \pm 0.07^{cd}$
MO	$1.38 \pm 0.09^{cd}$
AM-MO	$1.28 \pm 0.05^c$
Dexa	$0.96 \pm 0.10^b$

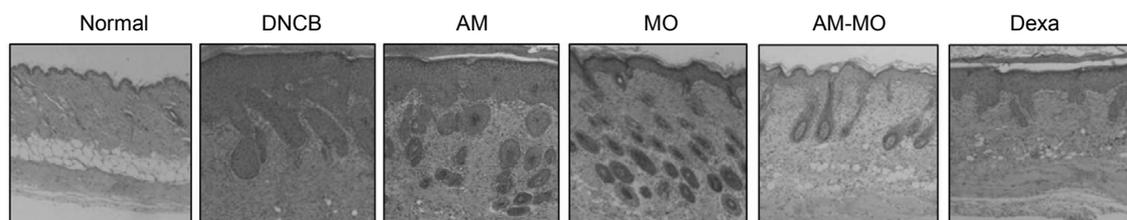
<sup>1)</sup>Groups are the same as in Fig. 2.

<sup>2)</sup>Values are shown as mean $\pm$ SE (n=5). Values with different letters in a column are significantly different at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

저하게 피부가 두꺼워진 상태임을 보여주었다. AM 투여군에서는  $1.50 \pm 0.07$  mm, MO 투여군에서는  $1.38 \pm 0.09$  mm로 DNCB 도포군보다 약간 감소하였으나 통계적으로 유의하지 않았다. 반면 AM-MO 투여군에서는  $1.28 \pm 0.05$  mm로 각 추출물을 단독으로 투여하였을 때보다 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. Minaiyan 등(22)은 모링가의 종자 추출물이 대장염 동물모델에서 궤양 심각도 및 점막 염증을 개선하는 항염 효과를 보고한 바 있고, Borissova 등(23)은 히스타민 또는 세로토닌으로 유도한 염증 모델에서 아로니아로부터 분리한 안토시아닌이 효과적으로 부종을 억제하였음이 보고되었다. 본 실험 결과와 같이 단독 추출물보다 복합물에 의해서 더 현저히 염증이 개선된 것은 복합적으로 사용하였을 때 각 소재의 항염 생리활성 작용이 상승하였기 때문으로 보인다.

### 피부 수분 함량 분석

피부 각질층은 세라마이드(ceramides), 콜레스테롤(cholesterol), 자유지방산이 풍부한 평면으로 된 판상의 이중층이 여러 겹으로 이루어진 구조로 수분이 체외로 빠져나가는 것을 방지할 뿐만 아니라, 유해한 알레르겐 및 병원체가 체내로 침입하는 것을 막는다(24). 아토피 피부염이 발병하면 피부장벽이 손상됨에 따라 피부의 수분이 손실되어 건조해지는 특징을 나타내게 된다. 따라서 피부의 수분 손실에 대한 AM, MO 및 AM-MO의 영향을 평가하고자 각 실험동물의 피부 수분 함량을 측정하였다(Table 3). DNCB군에서는 수분 함량이  $16.6 \pm 2.4\%$ 로 Normal군의  $40.7 \pm 1.3\%$ 와 비



**Fig. 2.** Histological status of dorsal skins in experimental groups. Dorsal skins were stained with hematoxylin and eosin reagent and observed by optical microscope. Original magnification:  $\times 400$ . Normal, normal group; DNCB, DNCB+distilled water group; AM, DNCB+Aronia melanocarpa extract group; MO, DNCB+Moringa oleifera seed extract group; AM-MO, DNCB+Aronia melanocarpa extract with Moringa oleifera seed extract; Dexa, DNCB+dexamethasone group.

**Table 3.** Moisture contents of dorsal skins in the experimental groups

Groups <sup>1)</sup>	Skin moisture content (%)
Normal	40.7±1.3 <sup>b2)</sup>
DNCB	16.6±2.4 <sup>a</sup>
AM	20.4±1.5 <sup>a</sup>
MO	18.0±2.2 <sup>a</sup>
AM-MO	19.0±0.6 <sup>a</sup>
Dexa	17.5±0.5 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Groups are the same as in Table 2.

<sup>2)</sup>Values are shown as mean±SE (n=5). Values with different letters in a column are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

교하여 현저하게 피부의 수분 함량이 감소하여 아토피 피부염과 유사한 건조 상태를 나타내었다. AM 투여군에서는 20.4±1.5%로 DNCB군보다 약간 증가하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다. 마찬가지로 MO 및 AM-MO 투여군은 각각 18.0±2.2, 19.0±0.6%로 DNCB 도포군과 유사한 수준을 나타내어 개선 효과를 나타내지 않았다. Dexa군의 피부 수분 함량도 17.5±0.5%로 DNCB군과 유사하였다. 이러한 결과는 아로니아, 모링가 종자 추출물 및 복합물이 아토피 피부염 유사 증상인 피부 건조에 대해서는 유의한 개선 효과를 나타내지 않음을 시사한다.

### 혈청 내 IgE 분석

아토피 피부염 발병의 면역학적 특징으로는 말초혈액 내의 Th2 세포 활성화로 인한 혈청 IgE 및 호산구 증가가 있다. 아토피 환자의 70~80%가 IgE 매개의 감작과 관련되어 있다고 보고되었다(25). AM, MO 및 AM-MO의 IgE 생성 억제 효과를 확인하기 위해 실험 종료 후 실험동물의 혈액에서 혈청을 분리하여 총 IgE 수준을 분석하였다(Table 4). DNCB군의 혈청 내 총 IgE는 1,054.1±30.9 ng/mL로 Normal군의 427.9±21.4 ng/mL와 비교해 약 2.5배 유의하게 증가하였다. AM 투여군은 971.9±40.5 ng/mL, MO 투여군은 962.9±19.7 ng/mL로 DNCB 도포군과 비교하여 감소하였으나 유의성은 없었다. 반면 AM-MO 투여군에서는 878.2±40.4 ng/mL로 현저하게 감소하였으며, 이는 Dexa군의 865.4±40.2 ng/mL와 유사한 수준을 보여주어 각 추출물을

**Table 4.** Serum levels of immunoglobulin E (IgE) in the experimental groups

Groups <sup>1)</sup>	Total-IgE (ng/mL)
Normal	427.9±21.4 <sup>a2)</sup>
DNCB	1,054.1±30.9 <sup>c</sup>
AM	971.9±40.5 <sup>bc</sup>
MO	962.9±19.7 <sup>bc</sup>
AM-MO	878.2±40.4 <sup>b</sup>
Dexa	865.4±40.2 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Groups are the same as in Fig. 2.

<sup>2)</sup>Values are shown as mean±SE (n=5). Values with different letters in a column are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

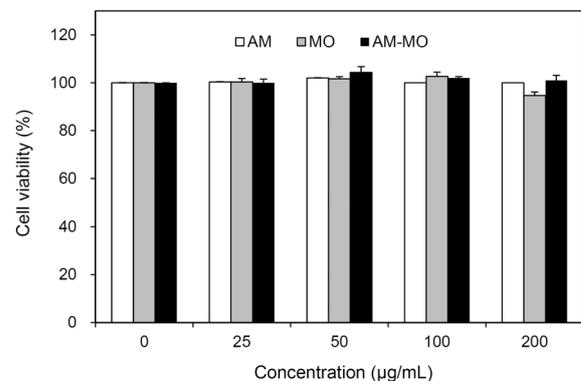
단독으로 투여하였을 때보다 효과적으로 IgE 생성을 억제하는 것을 확인하였다. Mahajan과 Mehta(26)는 모링가 종자의 에탄올 추출물이 양적혈구(sheep red blood cell)를 감작시킨 마우스에서 항원에 의한 지연형 과민반응 및 체액성 항체 농도를 현저하게 감소시켜 면역 억제 효과를 나타냄을 보고한 바 있다. 또한, Kim과 Choung(27)은 *Vaccinium uliginosum* L.로부터 분리한 폴리페놀과 안토시아닌 성분을 DNCB로 유도한 아토피 피부염 NC/Nga 마우스에 경구 투여 하였을 때 혈청 내 IgE 수준이 감소함을 보여주었으며, 천연물로부터 분리한 많은 폴리페놀 성분들이 알레르기 질환의 예방 및 치료에 대한 가능성을 보여주고 있다(28). 아로니아가 체액성 면역에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미비하지만, 아로니아가 함유한 폴리페놀 성분이 모링가 종자 추출물의 효능에 더하여 상승적으로 IgE 생성 감소에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

### 세포독성평가

AM, MO 및 AM-MO의 세포독성 범위를 확인하고자 다양한 농도로 인간 각질세포주인 HaCaT 세포에 처리하고 CCK-8을 이용하여 세포 생존율을 분석하였다(Fig. 3). AM, MO 및 AM-MO를 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 세포에 처리했을 때 모든 처리군에서 200 µg/mL까지 세포 독성이 나타나지 않았다. 따라서 모든 추출물을 세포 생존율에 영향을 주지 않는 200 µg/mL 이하의 범위로 피부각질세포주에서의 케모카인 발현 분석에 이용하였다.

### 피부각질세포주의 케모카인 발현에 미치는 영향

아토피 피부염의 특징적인 증상인 가려움증은 피부를 긁는 행위를 유발하고 그로 인해 기계적인 손상이 야기되며, 전염증성 사이토카인 및 케모카인이 생성되어 다양한 부착분자들의 발현과 함께 백혈구들을 염증 부위로 유주시킨다(29). 그중에서 thymus and activation-regulated che-



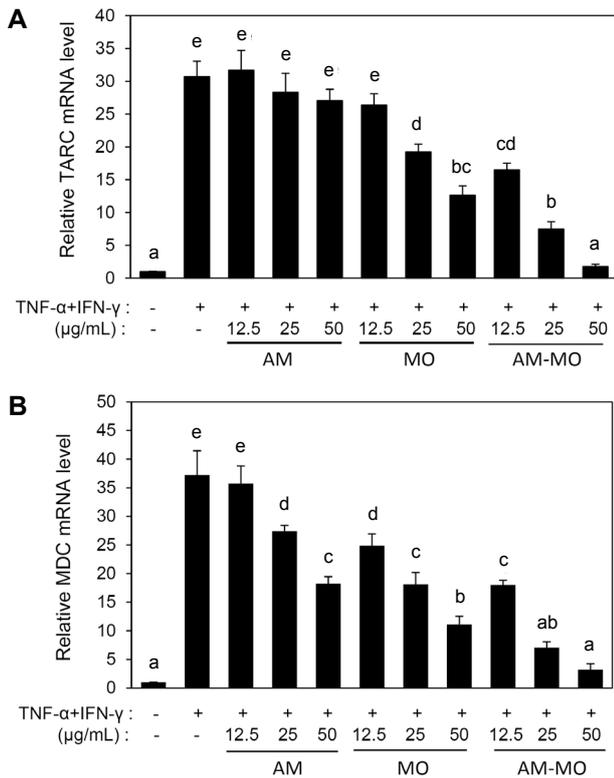
**Fig. 3.** Cytotoxicity of AM and MO treated alone or in combination (AM-MO) in HaCaT keratinocytes. Cells were treated with various concentration of AM and MO alone or in combination (25, 50, 100, 200 µg/mL) and incubated for 24 h. Cell viability was analyzed by using CCK-8. Values are shown as mean±SE of independent three experiments.

mokine(TARC/CCL17)과 macrophage-derived chemokine(MDC/CCL22)은 Th2 세포가 발현하는 CC chemokine receptor 4(CCR4)와 결합하여 Th2 세포를 염증 부위로 이동시키는 대표적인 케모카인으로 알려져 있다. 아토피 피부염 환자의 혈청에서 TARC와 MDC의 수준이 현저하게 증가하며, 질환의 심각도와 연관성이 있다는 것이 보고된 바 있다(30,31). 피부각질세포주에서 AM, MO 및 AM-MO가 TARC 및 MDC의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보고자 real time RT-PCR로 mRNA 발현을 분석하였다(Fig. 4). TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  사이토카인을 HaCaT 세포주에 처리하였을 때 TARC의 mRNA 발현량은 무처리군과 비교해 약 30.7배 현저하게 증가하였다. 각 추출물 50  $\mu$ g/mL 처리군에서는 사이토카인 처리군에 비하여 TARC mRNA 발현이 AM 처리군이 12%, MO 처리군이 59%, AM-MO 처리군이 94% 억제되었다. MDC의 발현은 사이토카인 처리 시 무처리군에 비해 37.2배 증가하였으며, AM 처리군이 51%, MO 처리군이 70%, AM-MO 처리군이 91% 억제되어 TARC와 마찬가지로 AM-MO 처리 시에는 단독으로 처리했을 때보다 더 현저하게 농도 의존적으로 감소하였다. Fig. 2 및

Table 2에 나타난 것과 같이 피부에서 백혈구의 침윤 및 염증 반응이 감소한 결과와 유사하게 AM과 MO 각 추출물을 단독으로 처리했을 때보다 복합물 처리 시 피부각질세포의 케모카인 발현을 현저하게 억제한 것으로 확인하였다. Lee와 Chang(32)의 연구에서는 모링가의 종자 추출물이 HaCaT 세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 prostaglandins의 합성에 관여하는 COX-2 단백질의 생성을 유의적으로 억제함을 나타내어 본 실험 결과와 같이 피부각질세포의 염증반응을 억제하는 데 있어 유사한 결과를 보여주었다. 또한, Goh 등(33)은 아로니아의 농축물이 keratinocyte 세포주에서 ICAM-1의 발현과 단핵구 부착을 저해하였으며, 이의 구성 성분인 cyanidin 3-glucoside가 TNF- $\alpha$ 로 유도된 NF- $\kappa$ B 신호전달을 저해하여 전염증성 반응을 억제하는 것을 보여주었다. 비록 본 실험에서는 아로니아 단독으로는 개선 효과가 미약하였지만 아로니아 및 모링가 종자 복합물의 효과적인 케모카인 억제 활성에는 아로니아에 함유된 cyanidin 3-glucoside가 관여할 것이라고 생각한다. 결과적으로 모링가 종자 및 아로니아 복합물은 상승 작용에 의해 피부각질세포에서의 TARC 및 MDC를 효과적으로 억제함으로써 피부의 염증 부위로의 백혈구의 이동을 방해하여 *in vivo*에서의 염증 반응을 개선했을 것으로 생각한다.

요 약

본 연구는 DNCB로 유도한 아토피 피부염 유사 병변 실험동물 모델을 활용한 *in vivo*와 피부 각질세포주를 이용한 *in vitro* 연구를 통하여 아로니아와 모링가 종자 추출물의 아토피 피부염 개선 효능을 분석하였다. 조직학적 검사 결과 아로니아 추출물(AM) 또는 모링가 종자 추출물(MO) 단독 투여 시보다 1:1로 혼합한 복합물(AM-MO)을 투여했을 때 표피 부분의 과증식과 염증세포의 침윤이 감소하였으며, 염증 및 부종을 나타내는 피부 두께를 측정한 결과에서도 추출물 단독으로 투여하였을 때보다 AM-MO 투여 시 DNCB 도포군과 비교하여 유의하게 감소함을 보여주었다. 피부장벽 손상으로 인한 수분 손실에 대해서는 유의한 효과를 나타내지 않았으며, 혈청 IgE 수준은 AM과 MO 각각 단독으로 투여했을 때보다 혼합 투여하였을 때 현저하게 억제되었다. *In vitro*에서는 피부각질세포주인 HaCaT 세포를 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 로 자극하면 발현이 증가하는 Th2 케모카인 TARC 및 MDC에 대하여 mRNA 수준을 분석하였을 때, 이 역시 단독 추출물 처리 시보다 복합물 처리 시 억제 효과가 더 뛰어남을 확인하였다. 종합적으로 DNCB로 유도된 아토피 피부염 *in vivo* 모델에서 아로니아 및 모링가 종자 추출물은 단독으로 투여하는 것보다 복합물로 투여하였을 때 현저하게 피부 염증 및 혈청 내 IgE 생성을 억제하였으며, 피부각질세포주를 이용한 *in vitro* 연구에서도 추출물 단독 처리보다 혼합하여 처리하였을 때 더 유의한 Th2 케모카인 억제 활성을 나타내었다. 이로 인해 아로니아 및 모링가 종자 추출물



**Fig. 4.** Effect of AM and MO treated alone or in combination (AM-MO) on chemokines expression in HaCaT keratinocytes. Cells were treated with indicated concentrations of AM and MO alone or in combination in the presence of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 6 h. mRNA expression of (A) TARC and (B) MDC was assayed by real-time RT-PCR. GAPDH is used as an internal control. Values are shown as mean $\pm$ SE of independent three experiments. Different letters (a-e) above the bars are significantly different at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

은 복합적으로 사용하였을 때 상호작용에 의해서 더 효과적인 아토피 피부염 개선 식품 소재로써 활용될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 전라북도동부권식품클러스터육성사업 중 순창건강장수식품클러스터육성사업을 추진하고 있는 (재)순창건강장수연구소의 연구과제의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

### REFERENCES

- Nutten S. 2015. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab* 66: 8-16.
- Leung DY. 2000. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 105: 860-876.
- Mohan GC, Lio PA. 2015. Comparison of dermatology and allergy guidelines for atopic dermatitis management. *JAMA Dermatol* 151: 1009-1013.
- Lyons JJ, Milner JD, Stone KD. 2015. Atopic dermatitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Immunol Allergy Clin North Am* 35: 161-183.
- Akhavan A, Rudikoff D. 2008. Atopic dermatitis: systemic immunosuppressive therapy. *Semin Cutan Med Surg* 27: 151-155.
- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. 2010. Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food* 13: 255-269.
- Hwang SJ, Yoon WB, Lee OH, Cha SJ, Kim JD. 2014. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem* 146: 71-77.
- Kim B, Ku CS, Pham TX, Park Y, Martin DA, Xie L, Taheri R, Lee J, Bolling BW. 2013. *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutr Res* 33: 406-413.
- Olas B, Wachowicz B, Nowak P, Kedzierska M, Tomczak A, Stochmal A, Oleszek W, Jeziorski A, Piekarski J. 2008. Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* in blood platelets. *J Physiol Pharmacol* 59: 823-835.
- Valcheva-Kuzmanova S, Blagovic B, Valic S. 2012. Electron spin resonance measurement of radical scavenging activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice. *Pharmacogn Mag* 8: 171-174.
- Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin XH, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S. 2005. Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 275-281.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliyev I, Borisova P, Belcheva A. 2007. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Hum Nutr* 62: 19-24.
- Gasiorowski K, Szyba K, Brokos B, Kołaczyńska B, Jankowiak-Włodarczyk M, Oszmiański J. 1997. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Lett* 119: 37-46.
- Abdull Razis AF, Ibrahim MD, Kntayya SB. 2014. Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 8571-8576.
- Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res* 21: 17-25.
- Agrawal B, Mehta A. 2008. Antiasthmatic activity of *Moringa oleifera* Lam: A clinical study. *Indian J Pharmacol* 40: 28-31.
- Goyal BR, Goyal RK, Mehta AA. 2009. Investigation into the mechanism of anti-asthmatic action of *Moringa oleifera*. *J Diet Suppl* 6: 313-327.
- Kim SO, Ah YM, Yu YM, Choi KH, Shin WG, Lee JY. 2014. Effects of probiotics for the treatment of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Allergy Asthma Immunol* 113: 217-226.
- Yeşilova Y, Çalka Ö, Akdeniz N, Berktaş M. 2012. Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 24: 189-193.
- 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.
- 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-dinitrochlorobenzene-induced BALB/c mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1611-1618.
- Minaiyan M, Asghari G, Taheri D, Saeidi M, Nasr-Esfahani S. 2014. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. *Avicenna J Phytomed* 4: 127-136.
- Borissova P, Valcheva S, Belcheva A. 1994. Antiinflammatory effect of flavonoids in the natural juice from *Aronia melanocarpa*, rutin and rutin-magnesium complex on an experimental model of inflammation induced by histamine and serotonin. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 20: 25-30.
- Elias PM, Wakefield JS. 2014. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134: 781-791.
- Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113: 651-657.
- Mahajan SG, Mehta AA. 2010. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. in experimental immune inflammation. *J Ethnopharmacol* 130: 183-186.
- Kim MJ, Choung SY. 2012. Mixture of polyphenols and anthocyanins from *Vaccinium uliginosum* L. alleviates DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 461989.
- Singh A, Holvoet S, Mercenier A. 2011. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 41: 1346-1359.
- Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. 2006. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 118: 178-189.
- Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Asahina A, Onai N, Matsushima K, Tamaki K. 2001. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 107: 535-541.

31. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. 2002. Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 127: 270-273.
32. Lee HJ, Chang YC. 2012. Suppression of TNF- $\alpha$ -induced inflammation by extract from different parts of moringa in HaCaT cells. *J Life Sci* 22: 1254-1260.
33. Goh AR, Youn GS, Yoo KY, Won MH, Han SZ, Lim SS, Lee KW, Choi SY, Park J. 2016. *Aronia melanocarpa* concentrate ameliorates pro-inflammatory responses in HaCaT keratinocytes and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ear edema in mice. *J Med Food* 19: 654-662.