

약용식물추출물의 아토피성피부염에 대한 항염증 및 항알레르기효과(제 1보)

랑문정[†]

배재대학교 분자과학부
302-735, 대전광역시 서구 연자1길 14
(2011년 2월 17일 접수 ; 2011년 3월 9일 채택)

Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Herbal Extracts on Atopic Dermatitis(Part I)

Moon-Jeong Rang[†]

*Division of Molecular Science, Pai Chai University,
14, Yeonja-1-Gil, Seo-Gu, Daejeon, 302-735, Korea
(Received February 17, 2011 ; Accepted March 9, 2011)*

Abstract ; Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disease associated with cutaneous hyper-reactivity to environmental triggers. In order to develop effective therapeutic herbal extracts for atopic dermatitis, cytotoxicity, antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities were investigated for various herbal extracts. Among candidate extracts, we selected *Aloe vera L.* (AV), *Viola mandshurica W. Becker* (VM), *Punica granatum L.* (PG), *Dendrobium nobile L.* (DN) and mixture of the above extracts (MX) for further investigations. All of them did not show cytotoxic activities to macrophage RAW264.7 cells below the concentration of 100 ppm. All showed antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic effects, although to various extents. In antioxidant effects, AV showed the highest effect, followed by PG and VM, while DN did the lowest. In evaluation for anti-inflammatory activities in macrophage RAW264.7 cells, AV and DN inhibited almost completely the LPS-induced production of nitric oxide, while AV, DN and VM showed strong inhibitory activities on the LPS-induced production of TNF- α . In anti-allergy effect in mast cell HMC-1, DN showed the highest effect, followed by AV and PG, while VM did the lowest. In the topical allergy reaction induced by compound 48/80 in Sprague-Dawley rat, DN exhibited significant anti-allergic effect, while PG, VM and AV did slight effect. These results suggest that AV, VM, PG and DN have antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities, and thus have the potential to reduce and alleviate the symptoms of atopic dermatitis

Keywords : atopic dermatitis, *Aloe vera L.*, *Viola mandshurica W. Becker*, *Punica granatum L.*, *Dendrobium nobile L.*

[†]주저자 (E-mail : mjrang@pcu.ac.kr)

1. 서론

아토피(Atopy)는 “이상한”, “뜻을 알 수 없는” 또는 “부적절함”이란 의미로 아토피성피부염, 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염 등과 같이 원인을 알 수 없는 질환을 아토피질환(Atopic Diseases) 이라고 한다. 아토피성 피부염(Atopic Dermatitis, Atopic Eczema)을 일반적으로 유아 및 소아에게 발생하는 만성 및 재발성 피부질환으로 심한 가려움(소양증)과 피부습진 등 증상이 여러 가지 원인에 의해 악화, 완화, 재발 등의 악순환이 계속된다 [1,2]. 심한 가려움을 동반하는 습진의 일종인 아토피 피부염의 근본적인 원인은 알레르기 유발 물질에 대한 ① 피부방어 및 보호기능이 약화되거나 ② 피부면역반응이 과민하게 발생하기 때문이다. 이러한 직접적인 원인에 대한 근본원인은 크게 유전적 원인과 환경적 원인으로 구분할 수 있다. 아토피 피부염이 발병한 사람의 80~90%가 아토피질환의 가족력이 있다. 부모 중 한쪽이 아토피 피부염이 있는 경우 자녀에서 아토피 피부염이 나타날 확률이 높으며 부모 모두 아토피 피부염이 있는 경우 확률이 더욱 높아 자녀의 80 %에서 발생한다는 보고도 있다 [2]. 식생활, 주거환경 등의 환경적 원인은 피부를 건조하게 하여 피부를 외부 알레르기유발 물질이 공기, 음식, 접촉 등에 의해 피부에 과민한 면역반응을 발생시킨다. 아토피 피부염의 원인 및 악화인자는 음식물, 땀, 세균, 진드기, 접촉항원, 기후환경인자, 스트레스 등 여러 가지가 있으며 개개의 유전적인 특성 때문에 다양한 환경인자들에 대한 알레르기 반응의 발생 정도가 개개인이 다르다.

아토피 피부염의 직접적인 원인은 알레르기 유발 물질에 대한 피부방어 및 보호기능이 약화되거나 피부면역반응이 과민하게 발생하기 때문이다 [2,3]. 첫째 원인은 각질형성세포의 기능의 이상으로, 피부의 각질층의 구조적 결함에 의해 수분유지기능과 피부장벽기능이 저하되고 따라서 정상피부에서는 침투가 어려운 세균 및 이물질이 피부에 침투하여 자극 및 알레르기 반응이 쉽게 일어나는 것이다. 둘째 원인은 피부면역학적 과민반응으로, 아토피 피부염이 발생한 경우에 나타나는 여러 가지 면역학적 이상 현상은 면역글로브린(IgE)의 합성 증가, 다양한 항원들에 대한 특이성 면역글로브린

의 증가, B림프구와 단핵구의 IgE 수용체의 발현 증가, 비만세포/호염구에 의한 히스타민 분비 증가, 지연형 과민반응 증가, 호산구(Eosinophil)의 증가, 제2형 보조 T림프구(Th2 Lymphocyte)에 의한 Interleukine IL-4, IL-5, IL-13의 분비 증가, 제1형 보조 T림프구(Th1 Lymphocyte)에 의한 Inteferon INF- γ 의 분비 감소 등 다양하고 복잡한 양상을 보이고 있다 [2,3,4,5].

아토피 피부염을 예방, 개선, 치료하기 위해서는 우선 알레르기 유발 요인으로부터 노출 및 접촉을 피하고 피부를 청결하게 건강하게 유지하면서 적절한 약효성분을 아토피 피부염 발병 국소부위에 도포하거나 또는 전신에 투여하는 것이다. 피부의 보습 및 장벽기능 유지 또는 회복 그리고 면역기능 억제 및 조절 등을 목적으로 개개인 특성과 증상의 정도에 따라 선택적으로 다양한 방법과 성분이 사용되어 왔다. 치료의미의 의약품적 방법은 항염제(Glucocorticoid ; 부신피질호르몬제), 항생제 및 항진균제, 항히스타민제, 면역억제제 등이 중증의 아토피 피부염 증상의 치료에 사용되나 부작용 등으로 장기간사용이 불가하다 [1,6]. 따라서 예방 또는 경미한 아토피 피부염 증상의 개선의 목적으로 화장품적 방법으로 보습제(Moisturizer, Humectant), 유사세라마이드(Pseudoceramide) [7,8], 감마리놀렌산을 다량 함유하고 있는 식물성오일(보라지오일, 월견초유 등), 그리고 항알레르기/항염/염증완화/항히스타민/항균효과가 있는 식물추출물을 경피도포하는 것이다 [9,10]. 하지만 의약품적 및 화장품적인 방법 모두 아직까지는 병변의 재발이 빈번한 실정이다

아토피 피부염 증상완화에 효과적인 약용식물추출물을 발굴하기 위한 본 연구에서는 많은 의학서에 기록된 한약재에 관련된 문헌조사를 통해 선정된 한약재 120종을 선정해 1, 2차 스크리닝 실험을 통해 노회, 자화지정, 석류, 석곡 등 4종의 약재를 선정하였다.

두 차례의 스크리닝 실험을 통해 선정된 한약재의 특징을 살펴보면, 노회(蘆薈, Aloe vera L., AV)는 약리작용으로 세포성장촉진작용, 상처치유촉진작용, 화상치료작용, 면역조절작용 및 피부질병치료작용 등이 알려져 있고, 주요성분으로는 aloin, aloe-emodin, polysaccharide, chromone 등이 보고되어 있다 [11,12]. 석곡

(石斛, *Dendrobium nobile* L., DN)은 약리작용으로 해열작용, 호흡 억제 작용, 심장흥분 억제 작용 알려져 있고, 주요성분으로는 dendrobine, dendramine, nobilonine, dendrine 등이 보고되어 있다 [13,14]. 석류(石榴, *Punica granatum* L., PG)는 약리작용으로 estrogen 유사작용이 알려져 있고, 주요성분으로는 puniceic acid, trichosanic acid, estrogen, estradiol 등이 보고되어 있다 [15,16]. 자화지정(紫花地丁, *Viola mandshurica* W. Becker, VM)은 약리작용으로 소염작용, 항균작용 등이 알려져 있고 주요성분으로는 cerotic acid와 flavon 등이 보고되어 있다 [17,18].

본 연구에서는 위의 네 가지 약용식물 추출물에 대하여, 세포독성과 항산화, 항염증, 항알레르기 등의 효능을 *in vitro* 및 *in vivo* test 방법으로 평가하여 아토피 피부염의 증상을 개선 완화할 수 있는 식물추출물 소재를 개발하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

본 실험에 사용된 약용식물인 노회, 자화지정, 석류, 석곡은 국내 약초시장인 경동시장에서 구입하였다. 시약으로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)는 Sigma(USA)사 제품을 사용하였고, DMSO(dimethylsulfoxide), PBS(phosphate-buffered saline), 에탄올 등은 분석시약급을 사용하였다

2.2. 기기

본 시험에 사용된 기기는 감압농축기 (EYELA, Japan), Microplate Reader (Molecular Devices Corp., USA), UV spectrophotometer (Shimadazu, Japan), CO₂Incubator(Jeotech, Korea)이었다.

2.3. 약용식물추출

약용식물 각각 100 g을 파쇄한 다음 99.5 %의 에탄올과 1:5(W/V)로 섞어 상온에서 72시간 동안 냉침한 후에 추출물을 여과지(Whatmann No. 2)로 여과한 다음 감압농축기로 45 °C에서

농축하여 용매를 완전히 제거한 추출물시료를 얻었다.

2.4. Cell Culture

Macrophage RAW264.7 cell(ATCC, USA)은 배양액에서 37 °C로 5 % CO₂Incubator에서 배양하였다. 배양액으로는 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA)배지에 10 % fetal bovine serum (Gibco), 100-units/mL penicillin (Gibco), 100 ng/mL streptomycin (Gibco), 0.25 g/mL amphotericin B (Gibco), 1X Non-essential amino acids solution (Gibco) 를 첨가하였다.

Mast cell HMC-1 cell(한국세포주은행)은 배양액에서 37 °C로 5 % CO₂ Incubator에서 배양하였다. 배양액으로는 2 mM L-glutamine (Gibco), 200u penicillin/ml(Gibco), 200 mg streptomycin/ml(Gibco), 그리고 10 % fetal bovine serum (Gibco)이 함유된 Iscoves Modified Dulbeccos Media (IMDM, Gibco)를 이용하였다

2.5. 세포독성 실험

약용식물추출물이 세포에 독성을 미치는지 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw264.7 세포를 96-well plate에 1 X 10⁴개가 되도록 seeding하여 5 % CO₂ Incubator에서 37 °C로 하루동안 배양하고, 한약추출물을 농도별로 첨가하여 하루 동안 더 배양하였다. 세포의 생존을 평가를 위해 MTT시약을 1 mg/mL로 처리한 후 4시간 더 배양하고, 배양액을 제거한 후 DMSO를 처리하여 insoluble 상태의 MTT를 용출 시켰다. 이를 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 한약추출물을 첨가하지 않은 배양액으로 동일처리 후 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(cell viability)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

Cell viability (%)

= 시료첨가군의 흡광도/대조군의 흡광도X 100

2.6. 항산화능 실험

약용식물추출물의 항산화능 평가는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다 [19]. 한약추출물을 0.1 %와 0.01 %로 희석한 시료 1 mL에 0.1 mM DPPH 용액 1 mL를 가하여 혼합하고, 37 °C incubator에서

30분간 반응 시킨 후, 516 nm에서 흡광도를 측정하였다. Free radical 소거능을 나타내는 radical scavenging activity (%)는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Radical Scavenging Activity (\%)} = [1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}] \times 100$$

2.7. 항염증효과 실험

대식세포 (macrophage)인 Raw 264.7 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양한다. 대식세포 활성을 위해서는 LPS (lipopolysaccharide; E. coli B0111:B4; Sigma, USA)를 이용한다. 대식세포는 알레르기성 염증 반응을 매개하는 중요한 면역세포로서 LPS와 같은 외부항원 자극 시 nitric oxide(NO) 및 TNF- α 를 분비함으로써 이후의 염증반응을 매개함이 잘 알려져 있다.

2.7.1 Nitric Oxide 생성억제 실험

RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO양을 세포배양액 중 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. 즉 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약용식물추출물을 30분간 전처리한 다음, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 100 μL 에 동일한 양의 Griess 시약(0.1 NED/1% sulfanilamide in 5 % H₃PO₄)을 넣은 후 15분간 암반응하였다. 발색 정도를 microplate reader의 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포배양액 내 NO의 농도(μM)는 NaNO₂표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다 [20].

2.7.2 TNF- α 생성억제 실험

RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약용식물추출물을 전처리한 후 30분간 배양하고 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 약용식물추출물의 항염증 효과는 TNF- α ELISA kit (R&D Systems, USA)를 이용하여 TNF- α 분비를 얼마나 억제 하였는지 살펴봄으로써 검증한다 [20].

2.8. 항알레르기효과 실험

약용식물추출물의 항알레르기 효과를 in vitro 실험방법으로 조사해 보기 위하여, 비만세포주인 HMC-1세포를 이용한다. HMC-1 세포

는 Iscove's modified Dulbecco's media (Gibco, USA)로 배양하며 비만세포 활성화 물질로는 25 μM A23187 (Calcium Ionophore, Sigma, USA)과 5 μM PMA(Phorbol-12-Myristate-13-Acetate, Sigma, USA)를 이용한다. 약용식물추출물을 농도별로 처리한 후 30분간 배양하고, A23187 및 PMA를 첨가하여 비만세포 활성을 유도한다. 약용식물추출물에 의한 비만세포 활성화 억제 효과는 비만세포내에서 합성된 염증매개 cytokine인 TNF- α 를 ELISA kit (R&D Systems, USA)를 이용하여 측정함으로써 검증한다 [21].

2.9. 국소알레르기반응 실험

수컷 Sprague-Dawley Rat을 대상으로 compound 48/80-induced skin reaction을 유도한다. 약용식물을 3일간 경구투여한 후, 0.1 % compound 48/80 (Sigma, USA) 용액을 등쪽 피부에 경피주사한다. 약 30분 후 1 % Evans blue(Sigma, USA) 용액을 꼬리 정맥에 주사하고 1시간 후 흰쥐를 도살하여 피부를 적출한다. 약용식물추출물의 항알레르기 효능은 피부조직의 색상을 육안 판정한다. 청색색상의 침윤이 적은 피부조직이 항알레르기 효능이 높은 것이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성 실험결과

약용식물추출물이 세포에 미치는 독성을 확인하고 세포실험에 대한 시료의 적정 처리농도를 확인하기 위하여 대식세포주인 RAW234.7 cell에 대하여 MTT assay를 실시하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; 황색 수용성)는 살아 있는 세포내의 mitochondria reductase에 의해 물 불용성 보라색 formazan으로 환원된다. 생성된formazan의 양은 살아 있는 세포의 수에 비례한다 [22]. 약용식물추출물들에 대한 세포독성실험결과 노회, 석류, 석곡, 자화지정, 혼합(노회:석류:석곡:자화지정=1:1:1:1) 등 모든 한약추출물들이 처리 농도가 100 ppm 까지 세포 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

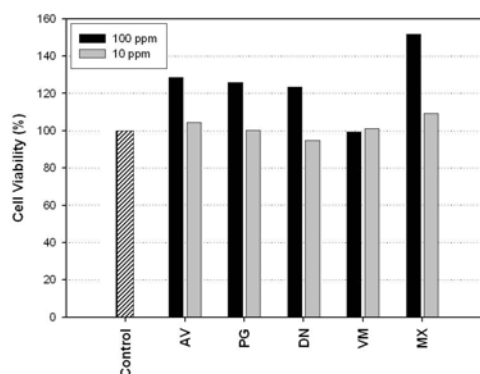


Fig. 1. Cell viabilities of various medicinal herb extracts on macrophage RAW264.7 cells by MTT assay. Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN), Viola mandshurica W. Becker (VM) and mixture of the above extracts (MX).

3.2. 항산화능 실험결과

약용식물추출물의 항산화 효과 평가는 DPPH scavenging assay를 통하여 수행하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl ; 진보라색)는 안정한 free radical로서 다른 화합물과 반응하여 non-free radical이 되면 옅은 황색물질로 변한다. 따라서 진보라색상의 감소정도는 약용식물추출물의 항산화능에 비례한다 [19]. 약용식물추출물의 항산화능을 실험한 결과, 노회는 10 ppm 및 100 ppm 농도에서 각각 88, 90%의 항산화능을 나타내었고 석류와 자화지정도 100 ppm 농도에서 각각 96, 95%의 항산화능을 나타내었다. 석곡의 경우 100 ppm에서 75%의 항산화능을 보여 다른 추출물에 비해 항산화능이 떨어지는 것으로 판단되었다 (Fig. 2). 일반적으로 태양광선에 노출되는 식물들은 자외선에 의해 발생하는 free radical이 식물체의 구성성분이 산화(과산화)되는 것을 방어할 수 있는 항산화성분을 가지고 있다. 일광에 장시간 노출되는 선인장과 식물인 노회의 경우는 isorabaichromone, feruoylaloetin, p-coumaroylaloetin 같은 aloetin 유도체들이 항산화작용을 하며 [23], 특히 노회는 phenolic compounds나 flavonoids뿐만 아니라 ascorbic

acid, β -carotene, α -tocopherol 같은 항산화제를 함유하고 있기 때문에 항산화능이 우수한 것으로 판단된다 [24].

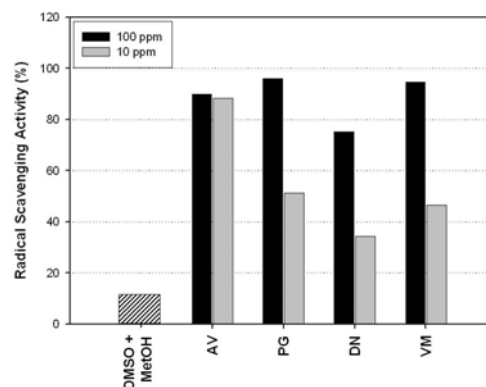


Fig. 2. Radical scavenging activities of various medicinal herb extracts by DPPH assay. Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN) and Viola mandshurica W. Becker (VM)

3.3. 대식세포를 이용한 항염증효과 실험결과

대식세포는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 외부항원 자극 시 nitric oxide(NO) 및 TNF- α 를 분비함으로써 염증반응에 관여한다. 따라서 약용식물추출물이 nitric oxide(NO) 및 TNF- α 의 생성을 억제하게 되면 항염증효과를 기대할 수 있다.

3.3.1 Nitric Oxide 생성억제 실험결과

NO는 원래 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 쇼크로 인한 혈관 확장 및 염증반응을 가속화하여 조직손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO를 효과적으로 억제하는 것은 염증질환 치료에서 유용한 방법으로 여겨지고 있다 [25,26,27]. 대식세포에 대한 실험에서 노회, 석류, 석곡, 자화지정 및 혼합추출물 모두 농도 의존적으로 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다. 특히, 노회 및 석곡 100 ppm 처리군에서는 LPS에 의한 NO 생성을 거의

100 % 억제 하는 효과를 나타내었다 (Fig. 3). 석곡은 phenanthrenes 과 bibenzyls 들이 NO생성을 강력하게 억제하고 [28], 노회외의 경우는 hydroxyanthraquinone 계의 aloe-emodin이 NO생성을 억제한다고 보고되었다 [29]. 하지만 노회외의 polysaccharide계의 acemannan은 NO생성을 촉진한다는 보고도 있다 [30]. 본 연구에서는 노회외의 에탄올추출물을 실험하여 수용성성분인 acemannan은 포함되지 않은 것으로 판단된다.

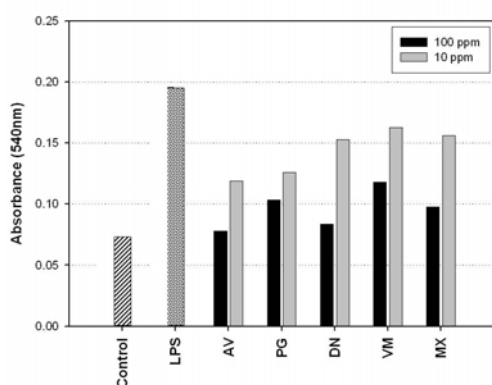


Fig. 3. Inhibitory effects of various medicinal herb extracts on lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) secretion in macrophage RAW264.7 cells. Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN), Viola mandshurica W. Becker (VM) and mixture of the above extracts (MX).

3.3.2 TNF- α 생성억제 실험결과

약용식물추출물이 염증성 cytokine인 TNF- α 의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다[20]. 노회외의 경우 100 ppm 농도에서 LPS에 의한 TNF- α 증가를 53 % 억제하였으나 석류, 석곡, 자화지정 및 혼합추출물의 경우도 100 ppm 농도에서 TNF- α 생성을 각각 26, 42, 41, 36 % 정도 억제하였다 (Fig. 4). 이는 노회, 석곡, 자화지정은 TNF- α 생성억제효과가 큰 것으로 나타났으며 석류의 경우는 그 효과가 적었다. 특히 노회외의 경우는 NO 및 TNF- α 생성 모두를 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

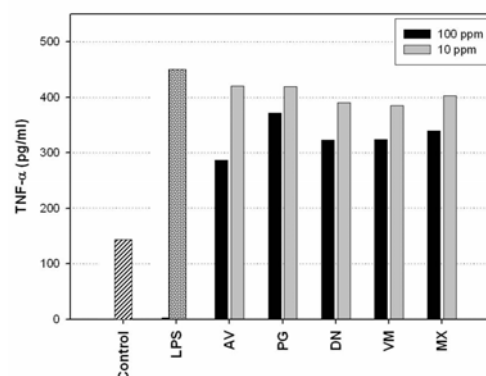


Fig. 4. Inhibitory effects of various medicinal herb extracts on lipopolysaccharide-induced TNF- α secretion in macrophage RAW264.7 cells. Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN), Viola mandshurica W. Becker (VM) and mixture of the above extracts (MX).

3.4. 비만세포를 이용한 항알레르기효과 실험결과

비만세포는 세포내 granule안에 히스타민, protease, leukotriene 및 각종 cytokine을 포함하고 있는 세포로서, 특히 외부항원에 의해 IgE가 활성화되면 이에 반응하여 급격하게 mediators를 세포외로 분비한다. 그 결과, 혈관 확장, 혈관침투성 증가 및 다양한 염증관련 세포의 조직내 침윤을 유도함으로써 알레르기 유발에 결정적 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 외부 항원에 의한 비만세포의 활성을 효과적으로 억제할 경우 알레르기 유발을 억제할 수 있을 것으로 기대된다. 약용식물추출물의 항알레르기 효과를 in vitro 실험방법으로 조사해 보기 위하여, 비만세포주인 HMC-1세포를 이용하였다. HMC-1 세포는 백혈병 환자의 말초혈관으로부터 분리된 비만세포로서, 미성숙 비만세포의 특징을 보인다. 이 세포는 매우 낮은 수준의 histamine을 가지고 있으며, 표면형 IgE 수용체를 발현하지 않는다. 그러므로 HMC-1은 항원 유도성 IgE 수용체 결합에 의한 활성화는 나타나지 않는 것으로 알려져 있으나 phobol ester와 calcium ionophore에 의해 IgE 의존적 활성화와 유사한

세포활성화가 일어나기 때문에 비만세포 연구에 널리 이용되는 세포이다 [31].

비만세포주인 HMC-1세포에 약용식물추출물을 농도별로 처리한 후, HMC-1를 활성화시키기 위하여 A23187 및 PMA를 첨가한 후 염증매개 cytokine인 TNF- α 의 생성이 영향을 받았는지 ELISA를 수행 하였다. 그 결과 석곡은 50 ppm 농도에서 63 % 정도 TNF- α 생성을 억제하였고, 노회 및 석류는 50 ppm 농도에서 각각 30, 25% TNF- α 생성을 억제 하였다. 그러나 자화지정은 A23187과 PMA에 의한 비만세포 활성화 과정에서의 TNF- α 생성을 억제 하지 못하였다 (Fig. 5).

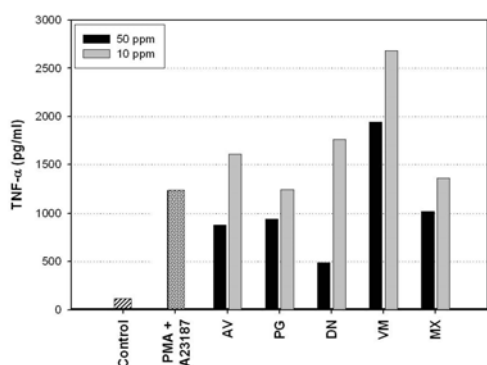


Fig. 5. Inhibitory effects of various medicinal herb extracts on A23187/PMA-induced TNF- α secretion in HMC-1 cells. Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN), Viola mandshurica W. Becker (VM) and mixture of the above extracts (MX).

3.5. 국소알레르기반응 실험결과

비만세포 의존적 알레르기성 염증에 대한 효과를 검증하기 위하여 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 compound 48/80-induced skin reaction을 유도하였다. Compound 48/80은 formaldehyde에 의하여 교차연결된 phenethylamine의 혼합 다당체다 [32]. 이 compound 48/80은 비만세포의 세포막에 작용하여 세포 밖에 있는 칼슘을 세포 안으로 유입시켜 세포안 자유칼슘을 증가시키며, 2차 신호 전달자들인 cAMP(cyclicadenosine monopho-

sphate)과 cGMP(cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 양에 변화를 일으켜, 비만세포의 탈과립과 histamine을 유리시키는 비만세포 활성화 물질이다. 비만세포 활성화 자극들에 의해 비만세포가 활성화되면 많은 매개물질들이 세포 밖으로 방출되고, 이들 매개물질들에 의해 다양한 알레르기 증상들이 나타난다 [33,34]. 그리고 Evans Blue는 혈장내 plasma albumin과 강하게 결합하고 있다. 알레르기반응에 의해 혈관투과성이 증가하면 혈관으로부터 혈장과 함께 피부조직으로 이동하게 된다. 약용식물추출물의 항알레르기 효능은 적출된 흰쥐 피부조직의 색상을 육안 판정하는 데, 청색색상의 침윤이 적은 피부조직이 항알레르기 효능이 높은 것이다

적출된 흰쥐 피부조직의 색상을 육안 판정한 결과, 석곡은 대조군(control)에 비해 현저한 항알레르기 효과를 나타내었으며, 석류, 자화지정, 노회는 상대적으로 적은 항알레르기 효과를 나타내었다 (Fig. 6). 석곡은 in vitro 실험인 비만세포주인 HMC-1세포에 대해 항알레르기 효과가 가장 우수했으며 in vivo실험인 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐에 대해 항알레르기 효과가 가장 우수하였다. 일반적으로 ROS(Reactive Oxygen Species)에 관련된 질환인 급성위축성 위염, 당뇨, 피부노화, 심혈관계 질환 등에 석곡이 항산화작용에 의해 효과적이라고 알려져 있으나 [35], 면역조절작용이 있다는 연구결과도 있다 [36].

4. 결론

아토피 피부염증상완화에 효과적인 약용식물추출물을 발굴하기 위해 노회, 자화지정, 석류, 석곡 등 4종의 약재를 선정하여, 세포독성, 항산화, 항염증, 항알레르기 등의 효능을 in vitro 및 in vivo test방법으로 평가하였다.

대식세포에 대한 세포독성 실험결과, 노회, 석류, 석곡, 자화지정, 등 모든 한약추출물들이 처리 농도가 100 ppm까지 세포독성을 나타내지 않았다. 약용식물추출물의 항산화능 실험결과, 노회, 석류, 자화지정은 높은 항산화능을 나타내었고, 특히 노회는 낮은 농도에서 가장 높은 항산화능을 보였다. 석곡의 경우 다른 추출

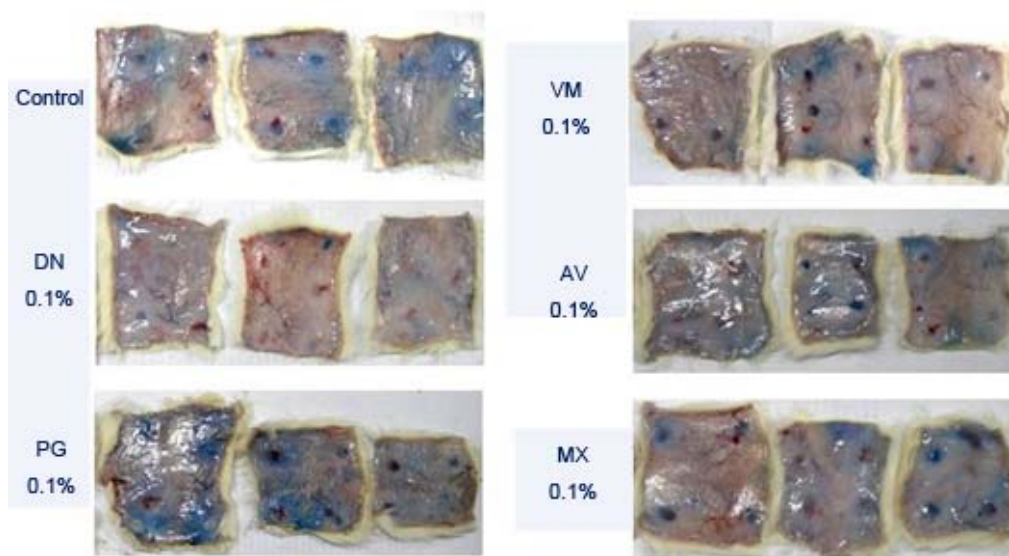


Fig. 6. Inhibitory effects of various medicinal herb extracts on Compound 48/80-induced allergy reaction in male Sprague-Dawley rats. Aloe vera L. (AV), Punica granatum L. (PG), Dendrobium nobile L. (DN), Viola mandshurica W. Becker (VM) and mixture of the above extracts (MX). DN exhibits the highest inhibitory effect, while PG does the lowest effect.

물에 비해 항산화능이 떨어지는 것으로 판단되었다

대식세포에 대한 NO생성억제 실험결과, 노회, 석류, 석곡, 자화지정 및 혼합추출물 모두 농도 의존적으로 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다. 특히, 노회 및 석곡의 경우는 LPS에 의한 NO 생성을 거의 100% 억제 하는 효과를 나타내었다. 대식세포에 대한 TNF- α 생성억제 실험결과, 노회, 석곡, 자화지정은 TNF- α 생성억제효과가 큰 것으로 나타났으며 석류의 경우는 그 효과가 적었다.

비만세포주인 HMC-1세포에 대한 TNF- α 생성억제 실험결과, 석곡, 노회, 석류는 TNF- α 생성을 억제하였고, 특히 석곡은 63%라는 높은 TNF- α 생성억제효과를 보였다. 그러나 자화지정은 비만세포 활성화 과정에서의 TNF- α 생성을 효과적으로 억제하지 못하였다

Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 국소알레르기반응 실험결과, 석곡은 대조군에 비해 현저한 항알레르기 효과를 나타내었으며, 석류, 자

화지정, 노회는 상대적으로 적은 항알레르기 효과를 나타내었다.

상기의 결과들에 의하면 노회, 석류, 석곡, 자화지정 및 복합추출물은 항산화, 항염증, 항알레르기 등의 효능을 가지고 있어 아토피 피부염의 증상을 개선 완화할 수 있는 약용식물추출물소재로서 활용할 수 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 충남대학교 김창덕교수와 오비엘랩의 이민호연구소장의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. K. Wolff, et al., "Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine", 7thed,

- p.146, McGraw-Hill, NewYork (2008)
2. Y. S. Kang, K. Y. Kyeong, M. J. Rang, D. H. Hwan, Y. K. Lee, W. K. Cho, S. K. Choi and S. K. Han "Science of Cosmetics and Health Care Product", vol 1, p. 325, Shinkwang Publisher, Seoul (2008)
 3. S. Bonness and T. Bieber, Molecular Basis of Atopic Dermatitis, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **7**, 382 (2007)
 4. W. Abramovits, Atopic Dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **53**, S86 (2005)
 5. N. Novak and T. Bieber, The Role of Dendritic Cell Subtypes in the Pathophysiology of Atopic Dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **53**, S171 (2005)
 6. Y. L. Chung and S. H. Lee, Atopic Dermatitis, *The J.S.B.R.*, **3**, 40 (2001)
 7. T. Horikawa and M. Ichihashi, Efficacy of Glycoceramide-containing Cream and Lotion on Atopic Dermatitis, *Fragrance Journal*, **14(10)**, 29 (1999)
 8. B. D. Park, J. K. Youm, S. K. Jeong, E. H. Choi, S. K. Ahn and S. H. Lee, The Characterization of Molecular Organization of Multilamellar Emulsions Containing Pseudoceramide and Type III Synthetic Ceramide, *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 794 (2003)
 9. H. Tagami, Treatment of the Atopic Dermatitis Skin and Skin Care, *Fragrance Journal*, **18(6)**, 13 (2003)
 10. H. Tamura and T. Kinokuni, Skin Care Ingredients for Atopic Dermatitis, *Fragrance Journal*, **18(6)**, 60 (2003)
 11. S. W. Choi, Y. S. Son., H. K. Kang, B. H. Son, Y. I. Park, S. K. Lee, Y. M. Kim and M. H. Chung, Effect of Aloe Vera Component on Proliferation of Human Skin Cells, *Korean Journal of Investigative Dermatology*, **5(2)**, 179(1998)
 12. J. H. Hamman, Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel, *Molecules*, **13**, 1599 (2008)
 13. M. Y. Yoon, J. Y. Kim, J. H. Hwang, M. R. Cha, M. R. Lee, K.J. Jo and H.R. Park, Protective Effect of Methanolic Extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced Neurotoxicity in PC12 cells, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **50(1)**, 63 (2007)
 14. Y. G. Kim, G. H. Yang and S. I. Cho, Anti-oxidative Effects of *Dendrobium* Herba on Toxic Agent Induced Kidney Cell Injury, *Kor. J. Herbology*, **20(4)**, 53 (2005)
 15. B. H. Song, H. N. Ai Tran and S. Y. Bae, Pomegranate (*Punica granatum*) as Resources of Phytoestrogen and Anticancer Substances, *K. J. Microbiol. Biotechnol.*, **35(2)**, 81 (2007)
 16. H. H. Kim and J. H. Koh, Estrogenic activity and Physiological Active Components of Iranian Black Pomegranate Seed Extracts, *Food Engineering Process*, **11(4)**, 305 (2007)
 17. W. C. Ko and M. K. Shin, Experimental Studies on the Analgesic and Antiphlogistic Effects of *Viola* Herba, *Kor. J. Pharmacogn.*, **18(4)**, 210 (1987)
 18. B. U. Lee and D. H. Kim, Inhibitory Effect of *Viola* herba extract on Inflammatory Cytokine Production by IL-1 β and TNF- α in cultured Human Synovial Cells, *Kor. J. Herbology*, **18(3)**, 89 (2003)
 19. M. S. Blois, Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, **26**, 1199 (1958)
 20. H. W. Jung and Y. K. Park, Inhibitory Effects of *Coptidis Rhizoma* on the LPS-induced production of Nitric oxide and TNF- α in mouse macrophage cells, *Kor. J. Herbology*, **21(2)**, 165 (2006)
 21. J. H. Kim, J. H. Chun, S. Y. Kim, Y. K. Park, The Effects of *Ampelopsis Radix* on Allergic Inflammation in PMA-stimulated Human Mast Cells, *Kor. J. Herbology*, **23(4)**, 91 (2008)
 22. T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay

- for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, **65(1-2)**, 55 (1983)
23. A. Yagi, A. Kabash, N. Okamura, H. Haraguchi, S. M. Moustafa, T. I. Khalifa, Antioxidant, Free Radical Scavenging and Anti-Inflammatory Effects of Aloesin Derivatives in Aloe vera, *Planta Med*, **68(11)**, 957 (2002)
 24. N. Ozsoy, E. Candoken and N. Akev, Implications for Degenerative Disorders, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2(2)**, 99 (2009)
 25. J. Y. Min and Y. K. Park, Effect of Dipsaci Radix Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Mouse Macrophages, *Kor. J. Herbology*, **24(4)**, 189 (2009)
 26. M. B. Grisham, D. Jourd'Heuil and D. A. Wink, Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites : implications in inflammation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* , **276**, G315 (1999)
 27. C. Nathan, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.*, **6**, 3051 (1992)
 28. J. S. Hwang, S. A. Lee, S. S. Hong, X. H. Han, C. Lee, S. J. Kang, D. H. Lee, Y. S. Kim, J. T. Hong, M. K. Lee and B. Y. Hwang, Phenanthrenes from *Dendrobium nobile* and Their Inhibition of the LPS-induced Production of Nitric Oxide in Macrophage RAW 264.7 cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 3785 (2010)
 29. S. Mijatovica, D. Maksimovic-Ivanica, J. Radovica, D. Popadich, M. Momcilovica, L. Harhajia, D. Miljkovic and V. Trajkovic, Aloe-emodin Prevents Cytokine-induced Tumor Cell Death: the Inhibition of Auto-toxic Nitric Oxide Release as a Potential Mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61(14)**, 1805 (2004)
 30. L. Zhang and I. R. Tizard, Activation of a Mouse Macrophage Cell Line by Acemannan: The Major Carbohydrate Fraction from Aloe vera Gel, *Immunopharmacology*, **35**, 19 (1996)
 31. J. H. Butterfield, D. Weiler, G. Dewald and G. J. Gleich, Establishment of an Immature Mast Cell Line from a Patient with Mast Cell Leukemia, *Leuk. Res.*, **12**, 345 (1988)
 32. K. Tasaka, M. Mio, K. Izushi and I. Aoki, Role of the Cytoskeletons on Ca^{2+} Release from the Intracellular Ca^{2+} Store of Rat Peritoneal Mast Cell, *Skin Pharmacol.*, **4**, 43 (1991)
 32. N. Yoshii, M. Mio, M. Akagi and K. Tasaka, Role of Endoplasmic Reticulum, an Intracellular Ca^{2+} Store, in Histamine Release from Rat Peritoneal Mast Cell, *Immunopharmacol.* , **21**, 13 (1991)
 33. E. K. Kim, G. Z. Li, O. H. Chai and C. H. Song, Inhibitory effect of *Arctium lappa* on Compound 48/80-induced Mast Cell Activation and Vascular Permeability, *Korean J. Phys. Anthropol.*, **17**, 55 (2004)
 34. G. H. Yan, Y. H. Choi, O. H. Chai and C. H. Song, Inhibitory Effect of Bear Bile on Compound 48/80-induced Mast Cell Activation and IgE-mediated Vascular Permeability, *Korean J. Phys. Anthropol.*, **22(1)**, 71 (2009)
 35. X. Zhang, J. K. Xu, J. Wang, N. L. Wang, H. Kurihara, S. Kitanaka and X. S. Yao., Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*, *J. Nat. Prod.*, **70**, 24 (2007)
 36. S. D. Park, G. H. Lee, Y. S. Lee, Y. K. Kwon, J. H. Park, S. M. Choi and S. W. Shin, Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Adenophora Radix*, *Liriodopsis Tuber*, *Dendrobium Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma* and *Polygonati Rhizoma*, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **21 (2)**, 414 (2007)