



Alleviation of atopic dermatitis-related indications of the *Lonicera japonica* aqueous fraction produced by solid-state fermentation

Chi-yeol Yoo¹, Hyeong-U Son¹, Jong-Myung Kim², Sang-Han Lee^{1,3*}

¹Department of Food Science & Biotechnology, Graduate School, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Research Institute of Biotechnology, Farmbios Co., Ltd., Daegu 41566, Korea

³Food & Bio-Industry Research Institute, and Department of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

고체발효를 통한 인동 추출물의 항아토피 활성 증진효과 분석

유치열¹ · 손형우¹ · 김종명² · 이상한^{1,3*}

¹경북대학교 식품공학부, ²주식회사 팜바이오스, ³경북대학교 식품생물산업연구소

Abstract

In the process of screening the extracts of various medicinal herbs exhibiting with potent anti-atopic activity, we first confirmed the effect of the anti-atopic activity of the aqueous fraction of *Lonicera japonica* stem extract (aLj) obtained by the solid fermentation process by *Phellinus baumii* was identified to show anti-atopic activity for the first time. Further animal experiments revealed that the antioxidative activity of aLj had decreased, while the anti-atopic activity was increased compared to control. Moreover, treatment with aLj significantly decreased the infiltration of immune cells into inflammatory sites to 32% level observed with the control treatment in a DNFB-induced mouse model (NT). In particular, aLj dramatically decreased the number of eosinophils by aLj than those compared to Lj. The overall decrease in antioxidant activity and lack of significant differences in the β -hexosaminidase activity of aLj imply that the activity possessed by Lj itself was converted into an anti-atopic active substance through biotransformation during solid fermentation. Overall, these results suggest that the potential of aLj will be possible to use as a new functional biomaterial or functional food ingredient related with anti-atopic benefits.

Key words : *Lonicera japonica*, *Phellinus baumii*, solid fermentation, atopic dermatitis, DNFB (dinitrochlorobenzene)

서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 급작스럽게 발병하여 염증을 동반한 가려움을 유발하는 만성 피부질환이다. 아토피 피부염은 환자에게 극도로 심각한 통증과 스트레스를 주는 질환으로, 이의 예방과 치료에는 여러 가지 시도가 있었다. 아토피 피부염을 일으키는 주요 원인으로는 면역학적 요인, 환경적 요인, 유전적 요인으로 크게 세 가지로

분류할 수 있는데, 환경적 또는 면역학적 요인보다는 유전적인 영향이 중요하게 작용한다고 볼 수 있다. 현재 약 70개의 유전자가 아토피 피부염과 관련이 있다고 보고되었으며, 관련 유전자의 다형성(polymorphism)은 인종에 따라서 분포가 다르다(1).

한편, 다른 피부질환과는 달리 아토피 피부염의 피부병변에 침윤하는 염증세포는 주로 Th2 세포로서 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 과다하게 생성하여 혈중 IgE의 상승을 촉진하고, eosinophil의 증가를 유도하며, 비정상적인 monocyte에 의해 prostaglandin E의 생성이 증가하게 되고, 이로 인하여 Th1 림프구의 침윤이 억제된다. 또한 Th1 림프구는 아토피 피부염에서 쉽게 활성화되는 spleen cell로부터 유리된 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 의해서도 억제된다. 결국, 아토피 피부염에서 Th1 증식을 억제하고,

*Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr
 Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6577
 Received 28 May 2019; Revised 15 July 2019; Accepted 15 July 2019.
 Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

세포매개성 면역의 저하를 초래하게 된다. 각종 사이토카인(cytokines)은 혈관 내피세포를 활성화하여 여러 세포유착분자(cell adhesion molecules)의 발현을 유도하거나 증가시켜 T림프구(memory 계열의)의 복귀를 촉진시킴으로서 습진성 병변을 유발한다(2). 현재 사용되는 치료제로는 부신피질 호르몬제, 항히스타민제, 감마-인터페론 등이 사용되어 유의성 있는 치료효과를 보이고 있으나, 일부 환자들에게는 치료 반응이 적거나, 과민 반응 및 신독성, 간독성 등으로 인한 부작용이 문제가 되고 있다(3). 천연물을 원료로 한 신약 및 기존의 치료제에 천연물을 배합한 형태의 보습제, 국소 도포제 등의 개발도 활성화되기를 기대하면서, 다양한 천연물의 항염증, 항산화, 항균 및 소염감역제 작용 등의 많은 연구 결과가 보고되고 있으므로 좋은 치료 방법이 도출되기를 기대할 수 있다(4).

인동은 일본, 중국 및 우리나라의 전국 각 처의 산야지 해발 50-600m 지역 산기슭 및 인가 부근의 독에 자생하는 반 상록 덩굴성 관목으로서, 꽃 봉우리는 금은화, 줄기와 가지는 인동등(忍冬藤)이라 한다. 인동은 수 세기동안 이뇨, 해독, 종기, 부종, 감기, 지형, 정혈, 구토 및 염증 등에 사용되어 왔는데, 현재 알려진 바에 의하면, 인동의 함유 성분으로는, caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, iso-chlorogenic acid 등의 가수분해형 tannin류와, loganin, sweroside, vogeloside, epi-vogeloside 등의 배당체의 iridoidglycoside 류, ronicerin, rhoifolin, orchnaflavon 등의 플라보노이드류, hedoragenin, oleanolic acid를 비당부로 갖는 triterpene계 saponin류 등이 알려져 있다(5).

이와 같이 인동은 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동꽃과 덩굴로서, 동양의학에서는 호흡기 감염, 당뇨병 및 관절염 치료와 독소에 대한 중화작용 및 해열제로 활용되어 왔다. 국내 금은화에 관련된 논문은 금은화 추출물의 세포 보호 효과, 미생물 발효 생성물의 항산화 효과, 항균·항염 등이 있다(6). 통상적으로 진균류에 의하여 고체발효를 거치면 기질인 식물은 보유한 활성이 저하하는 것이 일반적이다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 약200여종의 한약재 또는 식품의 소재로 사용가능한 식물에 대하여 독성성분을 저감시킬 의도로 고체발효를 하였으며 그 고체발효의 추출물에서 항아토피 활성이 증진된 인동 추출물을 발견하였으므로 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 준비 및 고체발효

실험에 사용한 인동(*Lonicera japonica*)은 대구 약령시장인 약전골목에서 2017년 4월 구입하여 이의 줄기(stem) 부분을 사용하였으며, 이는 voucher specimen (2017-Lj)으로 경북대 식품효소생물공학연구소(농생대3-213호)에 보관 중에 있다. 사용 전에 세척하여 불순물을 제거한 후 탈수하

였으며 이를 121°C, 20분간 멸균하여 준비하였다(Fig. 1a). 인동 100 g을 1 L 플라스크에 넣고, 10배 부피의 DW를 첨가하여 2시간 동안 진탕시킨 후 72시간 침지하고 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상등액을 취하였으며, 이를 동결 건조하여 각 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

고체발효에 사용된 상황버섯(*Phellinus baumii*)균사체는 (주)팜바이오스에서 관리하는 균사체를 이용하였다. 상황버섯 균사체를 potato dextrose agar(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 평판배지에서 25°C로 일주일간 배양하고, 이에 배지 1×1 cm를 잘라내어 potato dextrose broth(Difco) 조건의 flask에 접종하여 shaking incubator(JSSI-300C, JSResearch, Kongju, Korea)에서 25°C의 조건으로 3주간 배양하였다. 준비된 상황버섯 배양액을 멸균된 인동에 접종하고, incubator에서 25°C 조건으로 고체발효를 하였다. 고체발효의 결과, 백색의 상황버섯균 포자를 확인하였고(Fig. 1b), 이를 인동 원물 추출과 동일한 방법으로 추출 및 동결 건조하여 실험에 이용하였다.

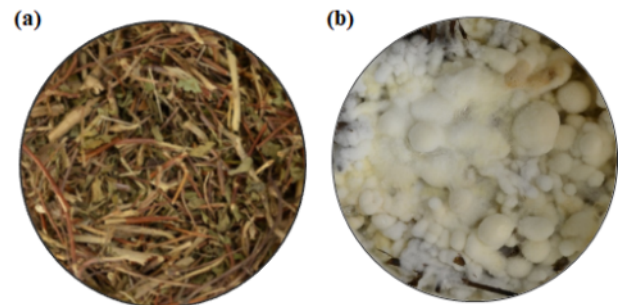


Fig. 1. A Classical appearance of *Lonicera japonica* stem and solid fermentation process.

(a) Dried *L. japonica* was cut and autoclaved for sterilization. (b) The autoclaved sample was cocultured with mycelia of *Phellinus baumii* for 2 weeks. The white color denotes spores and underlying *L. japonica* changed color as well as textures of the sample.

실험동물 준비 및 관리

실험에 사용된 동물은 (주)샘타코코리아(Osan, Korea)에서 공급받은 4-5주령의 수컷 C57BL/6마우스를 사용하였다. 공급받은 마우스는 마우스용 케이지(220×200×145 mm)에서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 실험실의 사육 환경은 온도 22±2°C, 상대습도 55±5%, 조명주기 12시간, 조도 200 lux로 조절하면서 사육하였다. 급이 사료는 pellet형 고형사료인 purina rat chow를 Nestle Purina Pet Care Korea Ltd. (Seoul, Korea)로부터 공급받아 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, 음수도 멸균 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 위의 모든 동물실험의 지침은 동물 실험 윤리위원회의 제반 규정을 엄격하게 준수하면서 실험하였다(KNU-2017-0072).

DNFB 처리에 의한 아토피 유발 마우스 모델

접촉성 유도에 의한 알러지 완화 활성은 다음과 같이

수행하였다. 순화 과정을 거친 마우스에 0.5% DNFB (dinitrochlorobenzene benzene; Sigma, St. Louis, WA, USA)를 acetone: olive oil 의 용매에 4:1의 비율로 희석하여 용액 50 μ L를 해당 마우스의 복부에 주사하였으며, 6, 7, 8, 10, 14, 16일에 0.2% DNFB (acetone: olive oil=4:1) 용액 20 μ L를 총 6회에 걸쳐 귀 부위에 도포하여 재감작 (resensitization)시켜 아토피를 유발시켰다. 한편, 시료의 경우는 DNFB 처리 후 아토피 유발 마우스의 귀 표면에 9, 11, 12, 13, 15, 17일에 시료 20 μ L(100 μ g/mL)를 총 6회에 걸쳐 도포하였다. 시험 마지막인 19일에 귀를 절개 후, 10% 포르말데히드에 고정하였다. 샘플은 Lj(인동의 잎의 물 추출물) 또는 afLj(인동의 잎에 상항버섯 균사체로 고체발효시킨 물 추출물)로 지칭하였다. 고정된 검체는 수세 및 탈수, 파리핀 포매 과정을 거쳐 5-6 μ m의 크기로 절편을 제작한 후, hematoxylin-eosin (HE)을 이용하여 염색하여 현미경으로 관찰하였으며(7), ear thickness, ear epidermis thickness, total cell counting 및 eosinophil counting은 전보(8)에 준하여 측정하였다.

Cell viability

Rat 비만세포인 RBL-2H3은 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA), 1% penicillin-streptomycin(Hyclone, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Hyclone, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Gunma, Japan) 조건에서 배양하였다. 세포의 생존율은 MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(Sigma, St. Louis, WA, USA)를 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포를 1×10⁵ cells/mL의 농도로 준비하여 96-well plate에 200 μ L씩 분주한 뒤 시료를 첨가하고 18시간 배양한 후, 배지를 제거하고 FBS가 포함되어 있지 않은 DMEM 배지 100 μ L과 10 μ L MTT 용액(5 mg/mL)을 가하고 1시간 더 배양하였다. 환원된 formazan을 측정하기 위하여, 배지를 제거하고 DMSO 200 μ L를 넣어 녹인 후, ELISA reader(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 첨가하지 않은 값을 100%로 계산하여 상대적으로 비교하였다.

β -Hexosaminidase assay

β -Hexosaminidase assay는 Chung 등(9)의 방법을 변형하여 실험하였다. RBL-2H3세포를 0.5 μ g/mL의 DNP-IgE (dinitrophenyl immunoglobulin E, Sigma)가 첨가된 배지에 1×10⁵ cells/mL의 농도로 96-well plate에 200 μ L씩 분주한 뒤, CO₂ incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Gunma, Japan)에서 12 h 동안 배양하였다. 그 다음, 상층액을 제거하고, siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 FBS가 제외된 DMEM 배지에

시료를 20 μ g/mL로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Gunma, Japan)에서 30 min 동안 더 배양시켰다. 2 μ g/mL DNP-BSA (albumin from bovine serum, 2,4-dinitrophenylated, Sigma, St. Louis, WA, USA)을 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Gunma, Japan)에서 2시간 동안 배양시킨 후, 상층액 40 μ L를 96-well plate에 옮기고 substrate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5)를 40 μ L 넣고 1시간 동안 다시 배양시켰다. 200 μ L의 반응정지액을 첨가하여 반응을 종결시킨 후 spectrophotometer(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH radical 소거 활성

Free radical-scavenging activity는 radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용하여 Kang 등(10)의 방법을 변형하여 실험하였다. 각 용매 추출물의 농도 별 시료 10 μ L와 0.2 mM DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 190 μ L를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)을 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH inhibition (\%)} = \frac{\text{Ab (control)} - \text{Ab (sample)}}{\text{Ab (control)}} \times 100$$

Ab (control): 무처리군, Ab (sample): 처리군

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

활성측정 시료에 대한 ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)는 일반적으로 널리 이용되는 색의 변화로서 항산화능을 측정하는 Heo 등(11)의 방법을 변형하여 사용하였다. C₂H₃NaO₂와 acetic acid(C₂H₄O₂)를 이용하여 acetate buffer(pH 3.6, 23 mM)를 조제하고 40 mM HCl과 TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine)를 이용하여 10 mM TPTZ solution을 만들었다. 반응용액은 acetate buffer (pH 3.6, 23 mM), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 10:1:1의 비율로 섞어 만든 후, 실험 전까지 37°C를 유지하였으며, 96-well plate 마이크로 플레이트 (well volume: 200 μ L)에 용매별 시료(2 μ L)와 발색시약(198 μ L)을 처리한 다음, 약 30분 간 암소에서 방치한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

CUPRAC assay

Cupric ion reducing antioxidant capacity assay는 Apak의 방법(12)을 변형하여 측정하였다. DW, 10 mM CuCl₂, 75 mM neocuproine을 제조하고, 각각을 실험 직전에 100:1:1 비율로 혼합하여 사용하였다. 시료를 96-well plate에 각각 2 μ L 주입하고 혼합된 CUPRAC solution 198 μ L를 첨가한

후 37°C에서 빛을 차단한 상태로 20분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

실험결과는 ANOVA Tukey post-hoc test로 통계적 유의성을 엑셀프로그램으로 SD(standard deviation) 값을 구하여 산정하였다. 유의차가 p<0.05일 때 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

아토피 유발 마우스 모델에서의 인동발효추출물(aflj)의 활성 변화

인동의 발효 유무에 따라 제조된 추출물의 항아토피 활성을 확인하였다. DNFB를 마우스 귀에 처리한 결과, 소양감, 홍반, 부스럼 등이 육안 상 확인되었다. 시료 처리군 별 외형적인 증상을 확인한 결과, 인동 추출물(Lj)에서는

DNFB를 처리한 마우스와 거의 유사한 형태를 보였으나, 인동발효추출물(aflj)을 처리한 마우스에서는 무처리군(NT)와 유사할 정도로 아토피 증상이 완화되는 것을 확인하였다(Fig. 2a). 특히, 이러한 증상이 복합적으로 일어날 경우 귀의 두께가 Fig. 2b and c에서 보듯이 비정상적으로 두꺼워지는데, 이들 귀의 두께를 DNFB를 100%로 하였을 때, 상대적으로 귀의 두께의 감소를 계산해 본 결과, Lj, aflj에서 각각 96%, 73%로, 귀의 표피층 두께(ear epidermis thickness)는 Lj, aflj에서 각각 110%, 71%로 나타났다(Fig. 2d and e). 또한, 염증부위의 면역세포 침투현상을 확인하기 위하여, 동일한 면적 내의 총 세포수는 DNFB 마우스 대비 Lj, aflj에서 각각 67%, 32% 값을 나타냈으며, 호산구는 각각 50%, 22% 값으로 감소한 것으로 알 수 있었다(Fig. 2f and g). 따라서, 본 실험 결과에서는 인동(Lj) 추출물

항아토피 활성은 미미했던 반면, 인동 발효(aflj) 추출물에서는 항아토피 활성이 인동 추출물에 비교하여 훨씬 증가한 것으로 확인되었다.

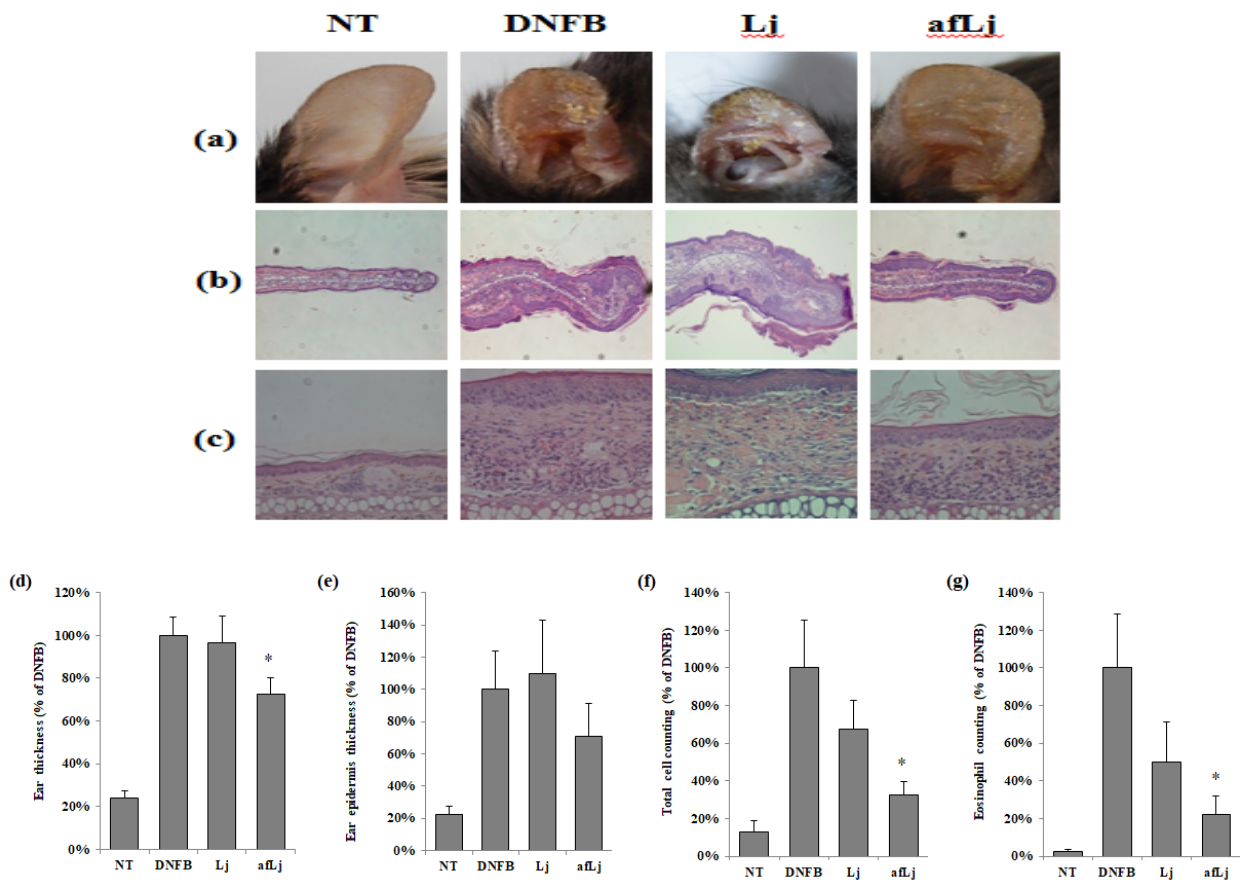


Fig. 2. Anti-atopic effects of *Lonicera japonica* stem by solid fermentation with *Phellinus baumii* in a DNFB-induced atopic model.

Without NT, all of sample group were treated to 0.2% of DNFB. NT: no treatment group, DNFB: 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene, Lj: *Lonicera japonica*, aflj: aqueous fraction produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* on *Lonicera japonica* stem. Topical application was carried out by 6 times (20 µL of 100 µg/mL aflj). (a) A classical image of ears. Five mice was used for each group. (b,c) Histochemical analysis by HE staining. (b) 40×, (c) 100× magnifications. (d-g) The one-way analysis of variance was used with Tukey post-hoc test. *p<0.05.

β-Hexosaminidase assay에 의한 활성 변화

체내에 천식이나 비염과 같은 알레르기 반응이 일어날 경우, 비만세포에 히스타민이 분비된다. 히스타민은 비만세포 내 과립에 존재하는데, β-hexosaminidase 또한 저장된 과립 내부에 존재하므로, 세포 밖으로 분비되는 현상 즉 탈과립(degranulation)의 지표로 이용되고 있다. 세포 밖으로 분비된 이 효소 활성은, 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 사용되고 있다(13).

먼저, 비만세포인 RBL-2H3 세포에서의 독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, Ljd와 aLj의 3, 10, 30 μg/mL 농도에서 인동 및 인동 발효 추출물에서는 세포 독성이 없는 것으로 판단되었다(Fig. 3a). 이 결과를 토대로, β-hexosaminidase의 활성을 측정한 결과, 10 μg/mL 농도에서는 대조군(control)에 대비하여 Lj와 aLj에서 각각 70,

67%의 활성을, 30 μg/mL 농도에서는 각각 37, 25%로서 aLj에서 일부 미미하게 활성이 증가한 것을 확인하였다(Fig. 3b). 따라서, 세포수준에서 알레르기 반응에 의한 히스타민 분비를 억제하는 활성은 인동추출물과 이의 발효추출물 모두에서 유사한 활성을 나타내며, 발효에 따른 차이는 크게 없음을 확인하였다.

항산화 활성의 감소확인

발효 유무에 따른 항산화 활성을 비교하기 위하여, 항산화 실험에 관한 3가지 assay를 실시하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 100 μg/mL 농도 기준으로 Lj와 aLj에서 각각 64%, 3%로 발효 후에 라디칼 소거능이 약 61% 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4a).

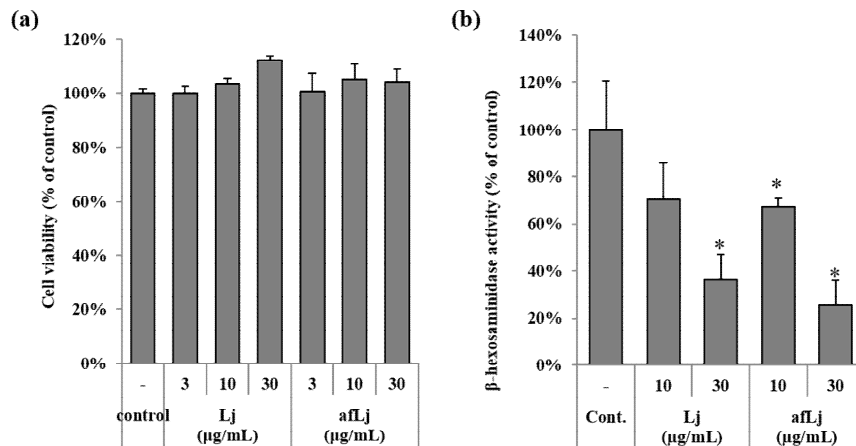


Fig. 3. Inhibitory effect of Lj on activity of β-hexosaminidase in RBL-2H3 cells stimulated with IgE - antigen.

(a) Cell viability by MTT assay was performed. (b) β-Hexosaminidase assay was performed using DNP-IgE. The values are means ± SD with triplicate experiments. Lj: *Lonicera japonica*, aLj: aqueous fraction produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* on *Lonicera japonica* stem. *p<0.05, compared to control group.

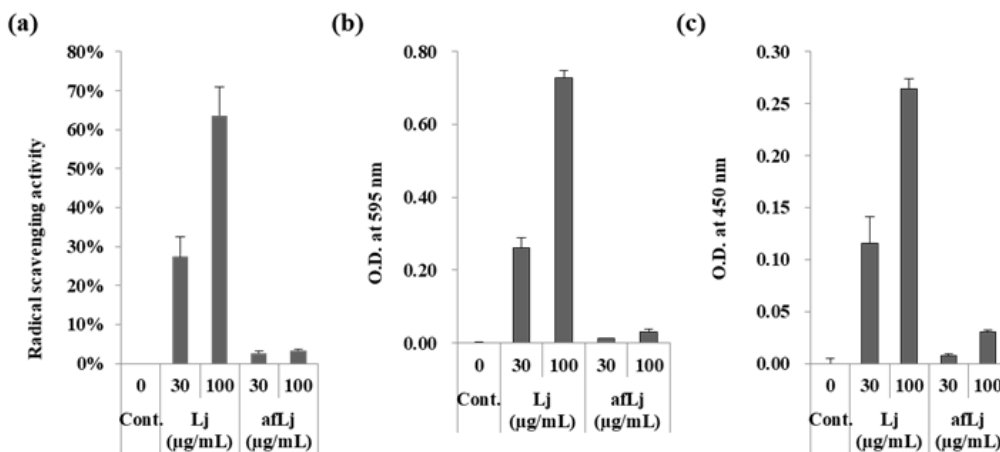


Fig. 4. Comparison of antioxidant activities of Lj and its solid fermented extract. Lj: *Lonicera japonica*, aLj: aqueous fraction produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* on *Lonicera japonica* stem.

(a) DPPH assay, (b) FRAP assay, (c) CUPRAC assay. Statistical significance was performed by unpaired two-tailed students t-test. *p<0.05 compared with control.

FRAP assay 결과에서도, 100 µg/mL 농도에서 595 nm의 O.D.값은 Lj와 aLj에서 각각 0.727, 0.030으로서, 인동 자체의 항산화 활성은 측정되나, 발효 후의 항산화능은 거의 없는 것으로 확인되었다(Fig. 4b). CUPRAC assay에서도, 100 µg/mL 농도에서 Lj와 aLj에서 각각 0.265, 0.031의 흡광도를 나타내었으며(Fig. 4c). 결과적으로, 항산화 3종의 실험 모두에서 동일한 양상으로, 인동 추출물이 발효 후에는 항산화 활성이 급속히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

인동은 한의학적으로 유용한 약재로서 특히, 이를 건조하여 만든 인동차는 부종이나 이뇨작용이 우수하여 건강차로서 자리매김하였다. 이 인동은 현재까지 알려진 바로는 폴리페놀화합물이 다양하게 함유되어 있는데, tannin류, iridoide류, flavonoid류, triterpene류, saponin류 등이 대표적인 기능성 물질이다. 이미 전보에서 Shin 등(14)은, 계피를 상황버섯 균사체로 고체발효시킨 추출물에서 DNFB에 의한 항아토피 활성을 연구하였다. 그 결과, 원재료 계피에 비해 발효시킨 추출물은 MMP-2, MMP-9, MMP-10의 억제 활성과 아토피 개선활성이 증가되는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 이 소재이외에 상황버섯 균사체를 이용한 고체발효가 항아토피 활성에 증진시키는 연구를 지속하던 중, 인동이 매우 우수한 활성을 보유함을 발견하게 되었다.

DNFB를 이용한 아토피 유도의 모델에 비교하여, 집먼지진드기가 실제 인체에 아토피를 유발하는 것이 더 유사한 모델(15)이므로, 이 방법으로 유도된 아토피 모델에서 인동의 상황버섯 고체발효 추출물의 항아토피 활성을 검증해 볼 필요성이 있다고 사료된다. 특히, 아토피 증상에 따라 T-helper cell의 unbalance에 따라 증가하는 사이토카인(IL-4, IL-13, IL-17E(IL-25), IL-31, IL-33)등의 조절 여부를 추가적으로 확인할 필요가 있다고 판단된다. 한편, 아토피 피부염에 사용되고 있는 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 스테로이드계 약물의 부작용과 유산균 생균의 부착물에 따른 아토피 피부염의 한계점을 극복하여 더욱 근본적인 아토피 피부염의 치료에 효과적인 유산균 제재 개발이 요구되고 있다(15). 아토피 피부염을 치료하는 데 있어서 기존의 스테로이드계 약물의 약제내성 등의 부작용을 개선하기 위해 프로바이오틱스 연구가 대안으로 제시되었다. 이는 파라프로바이오틱스 제제로 실험적 입증단계로 집먼지진드기 항원으로 유발시킨 만성 아토피 피부염 동물모델에 경구투여함으로써 치료효과를 여러 가지 면역관련 바이오마커를 통해 입증하고, 이를 바탕으로 만성 아토피 피부염 치료기전을 밝힐 수 있었다. 그 결과, 아토피 피부염 치료의 평가항목 중 하나인 SCORAD수치가 10점 수준에서 최대 2.3점으로 71.3%의 만성, 중증도 아토피 피부염 치료효과

를 나타내었다(15). 본 연구에서도 한약재가 다수의 약재를 사용하는 복합의 경우에는 더욱 에스트로젠 유사물질이 과다하게 검출될 수 있으므로 이러한 단점을 보완하기 위하여 진균류에 의한 고체발효를 통하여 한약 자체가 지닌 독성물질을 저감화시키기 위한 일환으로 고체발효기법을 적용하였다. 그 결과, MTT assay에서도 공시 농도에서는 독성을 나타내지 않으며 항산화 활성을 나타내는 다수의 유용성분이 진균류에 의하여 소실되었음에도 불구하고 항아토피 활성이 우수하게 나타난 특이한 발견이었다. Lee (16)의 연구에서는 마 품종별 고체발효시 항산화 활성이 장마, 병마, 둥근마에서 각각 51.8%, 66.4%, 42.2%에서 64.7%, 74.7%, 52.8%로 증가한다고 보고하였다. 또한, Son 등(8)은 약썩의 잎을 영지버섯으로 고체발효시키고 이의 추출물을 조제하여 DNFB에 유발된 아토피 유도 마우스에 도포하여 피부에 염증효과가 억제되는지의 여부를 확인한 결과, 귀 조직과 표피의 두께 및 피부 조직에서의 호산구 침윤은 고체 발효 과정을 거친 약썩의 물 추출물에서 항아토피 효과가 현저히 증가함을 발견하였는데, 아토피 증상의 바이오마커인 산화 질소(NO) 합성 효소(NOSs), matrix metalloproteinase(MMP)-2, -7, -9, -12, -14 및 -19의 mRNA 발현이 강력하게 저해됨을 발견하였다. 이와 같은 결과는 약썩의 물 추출물이 고체발효의 과정을 거치는 동안 유용한 화합물을 분비함으로써 항아토피 활성이 증가하였음을 입증해 주는 결과로 추정되었다. 이와는 대조적으로 본 연구 결과에서는 항산화 활성이 급격히 감소(Fig. 4a-c)하는데도 불구하고, 항아토피 활성이 증가(Fig. 2g)하는 것을 보면, 최적의 생물변환(biotransformation)의 조건 최적화는 식물 소재의 효용성 증진에 필수불가결한 과정이라 할 수 있다. 이는 앞서 확인한 항아토피 활성이 발효 후에 증가한 것이 항산화와 관련된 물질(예를 들면 폴리페놀계의 화합물)들이 고체 발효에 의해 변환됐을 가능성을 배제할 수 없으며 β-hexosaminidase assay에 의하여 고체발효한 인동 추출물에서는 발효하지 않은 추출물에 비교하여 큰 차이가 나지 않는 것을 감안한다면, 고체발효에 의하여 항산화 물질이 특정 아토피 활성 물질로 변환 되었을 가능성이 높다고 판단되어지나 추후 더 확인이 필요하다고 사료된다. 발효에 의해 항아토피 활성이 증가된 3종류의 발효 물질(상황발효+계피, 상황발효+마황, 상황발효+복령)에서 DNFB에 의한 염증 유도 반응을 현저히 감소시킨 선행결과를 이미 확보하고 있으므로 이들에 대한 상세한 기전연구는 추후에 추진해 볼 만하며, 이 같은 효과는 이너뷰티나, 향장소재 개발에도 응용이 가능하리라 기대된다.

요 약

강력한 항아토피성 활성을 나타내는 여러 가지 약초 추

출물을 선별하는 과정에서, 먼저 *Phellinus baumii*의 고형 발효 과정에 의한 *Lonicera japonica* stem extract (afLj)의 물 분획의 항아토피 효과를 확인했다. 그 결과, 동물실험에서, 항아토피 활성은 대조군에 비해 증가하는 반면, afLj의 항산화 활성은 감소한다는 것을 밝혔다. 염증 부위로의 면역 세포침윤은 DNFB로 유도한 마우스(NT)에 비해 대조군의 32% 수준으로 급격히 감소했다. 흥미롭게도, afLj에 의한 호산구의 수는 Lj에 비해 현저하게 감소했다. 항산화 활성의 감소와 β -hexosaminidase 활성의 유의한 차이는 LJ 자체가 보유한 활성이 고체발효 과정에서 생물 변환을 통해 항아토피 활성물질로 전환되었음을 의미한다.

전체적으로, 이러한 결과는 afLj가 항아토피 활성에 관련된 새로운 기능성 소재, 기능성 식품성분 또는 이너뷰티스 재료 사용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문(저서)은 2017학년도 경북대학교 연구년 교수 연구비에 의하여 연구되었습니다. 제1 및 제2저자는 BK21플러스사업의 지원을 받았습니다.

References

1. Heo JC, Lee KY, Lee BG, Choi SY, Lee SH, Lee SH (2010) Anti-allergic activities of ultra-fine powder from persimmon. *Korean J Food Preserv*, 17, 145-150
2. Gantner F, Tenor H, Gekeler V, Schudt C, Wendel A, Hatzelmann A (1997) Phosphodiesterase profiles of highly purified human peripheral blood leukocyte populations from normal and atopic individuals: a comparative study. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 527-535
3. Choi HJ, Sim BY, Miyamoto T (2015) Effects of *Lobophytum crassum* extract (MC-1) on various immunological factors related to pathogenesis of atopic dermatitis in *Dermatophagoides pteronyssinus* treated NC/Nga mice. *Kor J Herbology*, 30, 95-101
4. Son IP, Lim YY, Kim HM, Kim MY, Suk JM, Kim YH, Kim KH, Kim BJ, Kim MN (2012) The Effect of the mixed herbal extract lotion for Korean patient with atopic dermatitis: A pilot study. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol*, 2012, 32, 26-33
5. Pyo SS (2009) Development and validation of HPLC method for sweroside determination in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) extract. *Chungbuk National University, Korea*, p 1-41
6. Shin JH, Yoo SK (2012) Antioxidant properties in microbial fermentation products of *Lonicera japonica* Thunb. extract. *J East Asian Soc Dietary Life*, 22, 95-102
7. Kim MA, Son HU, Nam DY, Cha YS, Shin YK, Choi YH, Lee SH (2012) Inhibitory effect of *Angelica keiskei* extract in an atopic dermatitis animal model. *Korean J Food Preserv*, 19, 792-798
8. Son HU, Lee S, Heo JC, Lee SH (2017) The solid-state fermentation of *Artemisia capillaris* leaves with *Ganoderma lucidum* enhances the anti-inflammatory effects in a model of atopic dermatitis. *Int J Mol Med*, 39, 1233-1241
9. Chung MJ, Ha TJ, Choi HN, Lee JS, Park YI (2011) Inhibitory effects of anthocyanins isolated from black soybean (*Glycine max* L.) seed coat on degranulation and cytokine generation in RBL-2H3 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 1662-1667
10. Kang SA, Han JA, Jang KH, Choue R (2004) DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33, 1112-1118
11. Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH (2006) Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food Preserv*, 13, 83-87
12. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, 52, 7970-7981
13. Park SB, Kang KH, Yoon HJ, Ko WS (2011) Inhibitory effect of *Ulmus davidiana* on β -hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3 cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 24, 86-95
14. Shin YK, Heo JC, Lee JH, Lee SH (2010) Analysis of the anti-allergic activities of active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica*. *Korean J Food Preserv*, 17, 297-300
15. Lee SH (2018) Therapeutic effects of tyndallized *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 on chronic atopic dermatitis induced by house dust mite. *Konkuk University, Korea*, p 1-118
16. Lee JG (2014) Antioxidant activities and Monacolin K production on solid-state fermentation of diverse Yam by *Aspergillus* species strain. *Korean J Microbiol*, 50, 53-59