

자외선 B 파로 유도된 Hairless Mouse에서 탄닌의 피부 독성 억제효과 및 Heat Shock Protein 70의 생성억제 효과

이세윤¹ · 이민경² · 장동덕³ · 안령미⁴ · 안형수²

¹동덕여자대학교 종합약학연구소, ²약학과, ³식품의약품안전본부, ⁴보건관리학과

Inhibitory Effects of Tannic Acid on the Skin Toxicity and Heat Shock Protein Induction by UVB Irradiation in Hairless Mouse

Seh-Yoon Yi¹, Min-Kyung Lee², Dong-Deuk Jang³, Ryoung-Me Ahn⁴ and Hyung-Soo Ann²

¹Institute of Pharmacy, ²College of Pharmacy, ³Department of Pathology, Korea F.D.A,

⁴College of Natural Science, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

(Received March 20, 1997)

(Accepted April 2, 1997)

ABSTRACT : Inhibitory effects of tannic acid on skin toxicity and heat shock protein induced by UVB were investigated. Tannic acid was administered either topically or orally for 3 days to hairless mice, which were previously irradiated with UVB. UVB was found to cause skin erythema. However, the skin erythema was decreased when tannic acid was administered either topically or orally. The heat shock proteins, Hsp-78 kDa and 70 kDa, were induced by UVB irradiation, but the induction was decreased by treatment of tannic acid in both topically and orally administered groups. The hsp induction was more prominent in orally administered groups than in topically administered groups. However, the difference between two groups was not statistically significant. The route of administrations, topical and oral, does not affect the activity of tannic acid. In the skin tissue observation, tannic acid regenerated the epithelial cells with 7-9 cell layers which were injured by UVB. In conclusion, tannic acid has an ability to protect against UVB irradiation and regenerate the skin.

Key Words : UVB, tannic acid, skin toxicity, HSP 70, cell regeneration, hairless mouse

I. 서 론

Ultraviolet light(UV)에 피부가 노출되었을 때 표피 세포의 방어기전은 많은 관심이 되어왔다. UV는 파장에 따라 분류하는데, 400-320 nm를 UVA(Ultraviolet A), 320-280 nm를 UVB, 280-200 nm를 UVC로 나눈다(Fitzpatrick, T.B., 1990). 파장이 짧을수록 광에너지의 양은 증가되고, 이는 구성분자간의 결합을 파괴할 정도로 큰 양이어서 인체에 많은 변화를 가져온다. 가장 유해하다고 생각되는 UVC는 오존층에 의해 거의 흡수되고 UVA, UVB만이 지표에 도달되며 자외선중 UVB는 1-10%을 차지한다. 피부에 대한 파장별 자외선의 영향을 비교해 보면, UVB는 살갓의 표피층에 작용하고, 급속한 sunburn(화상, 홍반)을 일으킨다(Woodcock et al., 1976). 더 진행되면, 멜라닌 색소

형성, 색소침착으로 sun tan이 일어나고, 손상된 피부 세포를 수복하여 각화이상을 일으키고, 각질층중의 수분감소와 살갓이 거칠어지며, 만성 노출시 피부주름이 생긴다(Donald et al., 1987). UVB는 또한 DNA에 손상을 주며 glycosaminoglycan이 증가되어 collagen이 변하게 된다(Andrija et al., 1987; Jimbow et al., 1982). 자외선에 의해 발생하는 최소 홍반량(MED : Minimal erythema dose)이 지나쳐서 세포가 생기게 되면 대부분의 세포는 죽게 되고, 살아 남은 세포는 돌연변이의 가능성이 높아진다(Pathak et al., 1972).

또한, 자외선에 의한 변화는 세포막에 광화학적 자극을 주어서 단백질 특히, tryptophan이 변성되어 heat shock protein(hsp)의 생성을 빠르게 유도하거나(Seth et al., 1990), 피부에 이동되어 keratinocyte에서 합성되는 단백질을 변화시켜 hsp의 생성을 유도한다(Kandace et al., 1989). Hsp의 발생조건은 열에 의한

*이 논문의 일부는 농수산부 특정연구과제의 지원으로 이루어졌음.

충격이외에도 UVA, hydrogen peroxide, sodium arsenite, glucose의 부족 등 여러가지 원인이 있다. 특히, 열이외의 영향에 의해서는 32 KDa의 hsp가 증가된다 (Stephen *et al.*, 1989). Hsp 72 KDa의 경우에는 정상인의 fibroblast에서 합성이 되어 UV조사 6시간 후에 나타나며, DNA합성과정 중 S phase의 회복과 DNA를 복구하는 역할을 한다(Keiji *et al.*, 1992; Gensler *et al.*, 1994).

Tannic acid는 polyphenol류이며 약리 효과는 요즘 활발히 연구중이다. 현재까지 알려진 탄닌의 기능으로는 항암효과(Hirose *et al.*, 1994), NCF(neutrophil chemotactic factor) 분비(Specks *et al.*, 1995), 발암물질인 TPA(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 활성억제(Gali *et al.*, 1993), 항산화효과(Ramanathan *et al.*, 1992), DNA손상억제(Fu, 1991), free radical scavenger 작용등이 있다(Sasaki *et al.*, 1989). 항암효과는 특히, 유방암과(Hirose *et al.*, 1994) 빛에 의한 피부암에(Gensler *et al.*, 1994) 더욱 효과적이다. 탄닌은 Green tea, Sumach leaf, Aleppo gall, Tara pod, Rhus chinensis 등에서 추출하며, 유도체로는 epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate 등이 있다(Hirose *et al.*, 1994; Gali *et al.*, 1993; Fu, 1991; Towin, 1979).

본 실험에서는 hairless mouse에 UVB를 조사 후 탄닌이 피부를 방어하는데 중요한 역할을 하고 있는지를 알아보기 위해 hsp70 유도에 미치는 효과를 immunostaining으로 조사하였으며 표피조직을 채취하여 탄닌에 의한 피부 재생효과를 알아보았다. 또한 hairless mouse에 탄닌의 투여 경로를 ointment형태와 경구투여(p.o.)로 나누어 투여 경로에 따른 효과를 비교하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약 및 조제

Tannic acid($C_{14}H_{10}O_6 \cdot 2H_2O$, MW; 358)는 일본 약리 화학 공업에서, Ammonium persulfate와 H_2O_2 는 일본의 Junsei사에서, trizma base, TEMED, CBB R-250, urea, SDS molecular weight marker, 3,3'-diaminobenzidine, α -HSP 70(Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70)와 peroxidase conjugated HRP/anti(mouse IgG)/goat는 미국의 Sigma사에서 구입하였다. Ampholine(pH 3.5-10)는 Sweden의 Pharmacia에서 구입하였으며, 그 밖의 시약은 특급 시약

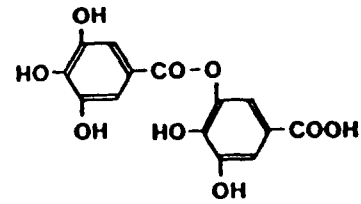


Fig. 1. Structural formula of Tannic acid named Digallic acid.

을 사용하였다.

Tannic acid(Fig. 1)를 이용하여 투여할 연고와 식수에 섞을 용액은 다음과 같은 방법으로 만들었다. 즉, 연고는 백색 vaselin을 사용하여, 5% 탄닌을 연고로 조제하였으며, 식수에 섞을 용액은 500 mg/kg/day로 섭취하게 매일 쥐의 음수량을 측정하여 tannic acid를 조제하여 식수로 투여하였다.

2. 기구 및 장치

자외선조사장치는 UVB 램프(FL 15 UV320, NIS, 최대파장 312 nm)를 사용하여 자체제작하였으며, 자외선량은 radiometer(6501-54 VLX-3W, France)를 사용하였다. homogenizer는 Ika사(독일), 1차 전기영동용 장치, power supply와 gel dry기는 ATTO사(Japan), rotator는 Marisol사(Japan), transblot cell 전사장치는 Bio-Rad사(Italia)를 사용했다.

3. 실험 동물

실험 동물은 국립안전보건연구원에서 분양받아 사육한 체중 30-35 g의 약 30주령된 암컷 hairless mouse(Skh: HR-1계)를 사용했으며, 4마리를 한 군으로 하였다.

정상쥐군을 "Normal 군"으로 표기하여 10일간 정상 사육하였으며, 대조군인 "Control 군"은 연고기체인 vaselin을 10일간 하루에 한번씩 등에 발라주었다. 5% 탄닌 ointment를 조제하여 등에 10일간 바른 군을 "탄닌 ointment 처치군"이라 하고, 탄닌을 10일간 음용한 군을 "탄닌 경구 투여군"이라고 표기하였다.

사육 7일째 "Normal"군을 제외한 나머지군은 등부만 노출되도록 고안된 cage에 넣은 후 자외선조사기에 cage를 넣고, UVB를 총 15 KJ/m²이 되도록 자외선을 조사시켰다. 자외선 조사후에도 계속 약물을 투여하였으며, 사육 10일째에 다음 실험으로 들어갔다. 자외선 조사후 10일째에는 약물투여하고 30분 경과후에 ether로 마취시킨 후, 피부를 채취하였다.

4. 실험 방법

1) Draize법에 의한 피부독성측정

자외선 조사후 3일째에 hairless mouse 피부의 발적정도를 Draize법(Esther *et al.*, 1989)으로 측정하고, ether로 흡입 마취시킨 후, 피부의 발적정도를 촬영하였다. 즉, 홍반과 가피형성(erythema and eschar formation)의 score는 홍반형성이 없는 단계가 0, 인식될 정도의 약한 홍반은 1, 주위피부와 분명하게 인식될 홍반은 2, 중증도에서 강한 정도의 홍반은 3, 심홍색의 강한 홍반과 각피형성시는 4로 하였다. 또, 부종형성(edema formation)의 score는 부종이 없을때 0, 아주 경한 부종은 1, 주위피부와 구별가능한 분명한 부종은 2, 1 mm정도되는 중증도의 부종은 3, 심한 부종으로 1 mm이상되며 주위에 퍼지는 부종은 4로 하였다.

2) 병리조직학적 관찰

조직준비는 동물을 CO₂ 기체로 희생시킨 후 등쪽피부를 떼어내어 filter paper에 편평하게 부착하여 10% 중성 포르말린에 고정된 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하였다.

3) Heat shock protein 생성 측정

(1) 피부시료준비

동물을 ether로 마취시킨 다음 표피를 떼어내어 피하지방을 제거한 뒤 시료를 Anderson의 방법으로 균질화하였다. 즉 피부를 잘게 잘라 9M Urea buffer(in 2% Nonidet P-40, 2% 2-Mercaptoethanol, 2% Ampholine (pH 3.5-10))를 넣고 polytron homogenizer로 균질화하였다. 균질화한 시료는 4°C, 3,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 4°C, 15,000 rpm으로 다시 원심분리하여 상층액을 시료액으로 하였다.

(2) Electrophoresis

전기영동은 Laemmli(1970)의 SDS-PAGE 1차 전기영동 방법을 이용하였다. 전기영동은 미니젤을 이용하였는데, 분리젤의 아크릴아미드 농도는 10%였다. 전기영동용 시료는 균질화한 피부시료에 sample 조제용 완충액(250 mM Tris-HCl in 2% SDS, 20% Glycerol, 0.02% BPB, pH 6.8)을 동량가하여 끓는 water bath에 5분간 처리한 후 냉각시킨 sample을 한 lane에 1 mg/ml가 되도록 주입하여, 젤전체를 15 mA로 영동시켰다. 이때 사용한 molecular weight marker는 Sigma사의 SDS-6H였고, 영동용 buffer는 25 mM Tris-HCl/130 mM Glycine buffer(0.1% SDS) pH 8.5을 사용했다.

영동이 끝난 젤은 하룻밤 shaking하면서 염색(0.2% CBB R-250 in 20% methanol, 10% acetic acid)한 후, 탈색시켰다. 탈색이 끝난 젤은 장기보관을 위해 mild dryer(Atto, Japan)로 건조하였다.

(3) Immunostaining

전기영동시킨 분리젤은 면역염색을 위해 Towin(1979) 등의 방법으로 western blotting 및 면역염색을 실시하였다. Western blotter는 Bio Rad사의 Trans blot cell 전사장치를 사용하였는데 영동액(25 mM Tris, 130 mM Glycine buffer)의 온도가 상승하는 것을 막기위해, 4°C를 유지하면서, 28V로 15시간 통전하였다. 이때 사용한 전사막은 PVDF membrane(ProBlott™사, 미국)이었다.

Western blotting시킨 PVDF 막은 1차 항원으로는 hsp 70을, 2차 항원으로는 peroxidase conjugated HRP/anti(mouse IgG)/goat를 사용하여 면역염색을 행하였으며, 염색은 3-3' diaminobenzidine을, 탈색은 증류수를 사용하였다. 즉 단백질이 전사된 PVDF 막은 PBS sol. (8% NaCl, 0.2% KCl, 2.88% Na₂HPO₄, KH₂PO₄, 0.05% Tween)에 넣어 세척한 후 막을 blocking sol.(3% skimmed milk in PBS)에 넣어 하룻밤두었다. 1차 항원을 blocking sol.으로 10,000배 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 막을 1차 항원용액에서 꺼내어 희석한 second antibody sol.(1 : 8,000 in PBS)에 막을 넣고 4°C에서 1~2시간 shaking한 후, PBS로 세척한 다음 염색하였다.

계산은 사용한 marker의 각 성분의 Rf값을 구한 후, 이를 semilog지에 그려 미지의 단백질 분자량을 구하였다.

(4) 단백질정량

피부균질액 시료는 Lowry의 방법을 이용하여 단백질을 측정하였는데 이때 사용한 표준물질은 BSA (Bovine serum albumin)이었다.

4) 통계처리

실험 결과는 mean ± S.E.M.으로 나타내었고, 통계적 유의성은 student's t test로 검정하였다.

III. 결 과

1. Draize법에 의한 피부 독성 측정과 탄닌의 효과

피부발적을 보면, 사육시작 7일째에 UVB 조사시킨 후 3일동안 육안으로 피부의 발적정도를 관찰하였다. UVB 조사 후 1일째는 control군, 탄닌 ointment 처치군

과 탄닌 경구투여군이 거의 비슷하게 눈, 코주위가 극히 약하게 발적되고, 2일째에 탄닌 ointment 처치군과 탄닌 경구투여군에는 등에 인식 될 정도의 작은 상처가 생기기 시작했고, control군은 주위피부와 구분이 가능한 정도로 상처가 생겼다. 3일째에 control군은 깊고 심한 상처가 생기고, 일부는 각피가 벗겨졌고, 탄닌 ointment 처치군의 일부는 분명한 상처가, 탄닌 경구투여군의 일부는 2일째와 비슷한 상처가 나타났다. 그리고 모든 군에서 부종은 관찰되지 않았다. 발적은 control군이 normal군에 비해 유의성있는 차이($p < 0.001$)를 보였으며, 탄닌 경구투여군($p < 0.01$)과 탄닌 ointment 처치군($p < 0.05$)은 control군에 비해 유의성있는 차이를 보였으므로 탄닌 처치가 자외선에 의한 피부손상을 어느정도 방어하는 것으로 생각한다(Upreti *et al.*, 1991; Horikawa *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1991). 또한, 외관상으로는 탄닌 경구투여군이 탄닌 ointment 처치군보다 자외선에 의한 피부독성의 방어 효과가 있는 것으로 나타났다. 자외선 조사후 3 일째의 동물의 등부위를 Draize 방법으로 측정하여 Table 1에 나타내었다.

2. 조직학적 관찰

아무것도 처리하지 않은 대조군의 hairless mouse 피부는 다른동물과 유사하게 2-3층의 표피상피와 엉성하게 배열된 교원섬유, 피지선, 모낭과 hairless mouse에서 특징적으로 나타나는 각질화된 낭(keratinized cyst)이 관찰되고 있다(Fig. 2-A). 탄닌 만을 급여한 군의 mouse도 대조군과 같은 조직소견을 보였다. Ultraviolet B(UVB) 조사 2일 후의 피부는 진피층이 교원섬유의 증가에 의

하여 정상피부보다 2-3배 비후되고 있었고 염증세포의 침윤과 섬유화세포 등이 관찰되고 있었다.

표피층은 상피세포가 소실되어 1-2층으로 되었고 상

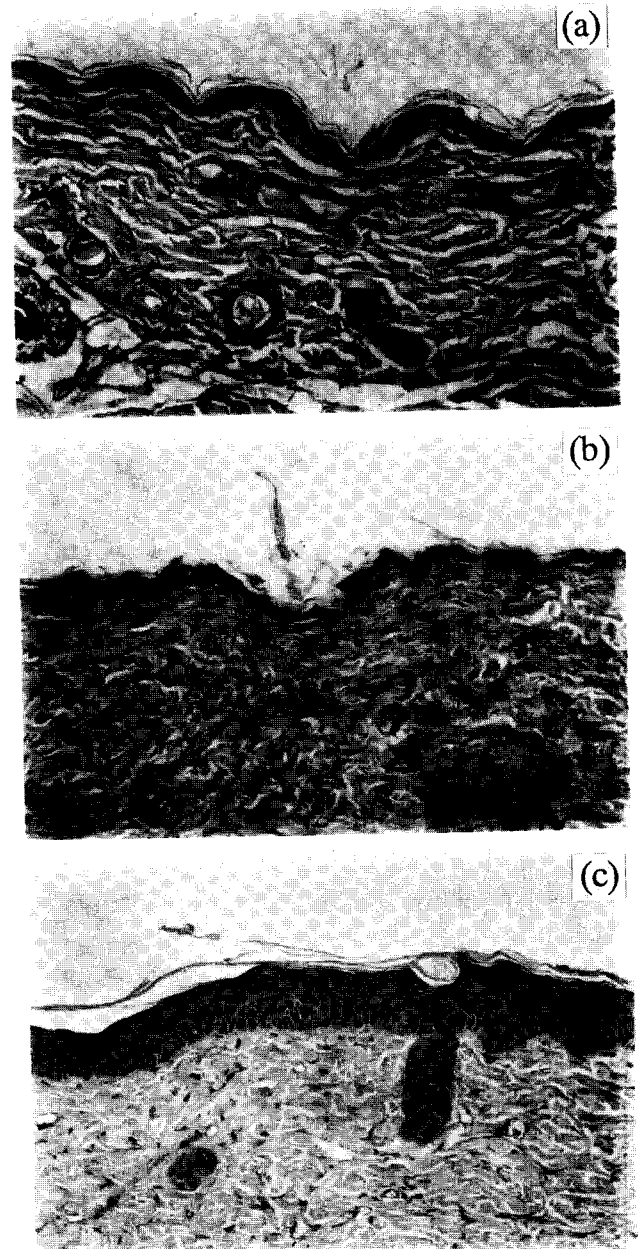


Fig. 2. Skin tissues from hairless mouse(Hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

A. Skin tissues without treatment ; The epidermis is approximately 2-3 cell layers thick and loose arranged collagen bundles, sebaceous gland, hair follicle, and keratinized cyst are in dermis.

B. Skin tissues from UVB irradiated hairless mouse; Note the degenerated epidermal epithelial cells with 1-2 thick layers, thickened subcutaneous layers with increased collagen bundles and inflammatory cells under the epidermal layer.

C. Skin tissues with treatment of tannic acid on UVB irradiated skin; Note the regenerated epithelial cells. the epidermis was thickend with 7-9 cell layers.

Table 1. Comparison of skin in hairless mouse by the Draize method

	Erythema	Edema	Reaction rate ^{a1}
Normal	0	0	0
Control ¹⁾	$3.16 \pm 0.25^{###}$	0	1.56
Tannic acid ²⁾ (ointment)	$2.25 \pm 0.25^*$	0	1.13
Tannic acid ³⁾ (p.o.)	$1.50 \pm 0.29^{**}$	0	0.75

Results are expressed as a mean \pm S.E.M.(N=4.)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from control.

$p < 0.001$: Significantly different from normal.

^{a1} Reaction rate = $\frac{2(\text{Erythema} + \text{Edema})}{\text{Total animal number}}$

¹⁾ Control group represents hairless mouse irradiated UVB(total 15KJ).

²⁾ Tannic acid ointment group was topically administered as 5% tannic acid ointment for 3 days after UVB irradiation and 7 days treatment before UVB irradiation.

³⁾ Tannic acid (p.o.) group was orally administered as a dose of 500 mg/kg/day for 3 days after UVB irradiation and 7 days treatment before UVB irradiation.

피세포는 핵이 농축되고 호산성의 세포질로 이루어져 UVB 조사에 의해 손상되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-B). UVB 조사와 함께 tannin을 급여하고 4일 후의 mouse의 피부는 표피층이 7-9층 으로 이루어져 있었고 세포의 핵은 과염색성을 보이며 커져있어 손상된 표피층 상피세포가 재생되고 있었다. 또한 UVB조사 2일 후엔 관찰되었던 염증세포는 나타나지 않았다.

3. 자외선으로 유도된 단백질 및 Heat shock protein

피부시료의 1차 전기영동 후 정상군에는 없으나, 대조군과 약물처리군에 나타난 띠를 a-i로 표시하고, 정상군과 대조군에는 없으나 약물처리군에 나타난 띠를 x, y로 표시한 후, marker의 Rf값과 비교하여 분자량을 구한 결과는 다음과 같다. 즉, UVB 조사로 인하여 유도된 단백질은 a; 166 KDa, b; 159 KDa, c; 106 KDa, d; 78 KDa, e; 75 KDa, f; 65 KDa, g; 60 KDa, h; 54 KDa, i; 52 KDa이었다. 탄닌 투여군에 x; 63 KDa, y; 37 KDa이 나타났는데, 이것이 artifact에 의한 것인지, 탄닌에 의해 유도된 것인지는 다음 실험을 통해 확인해 봐야 할 것이다(Fig. 3A).

UVB 조사로 유도된 단백질 중 hsp 70 KDa family가

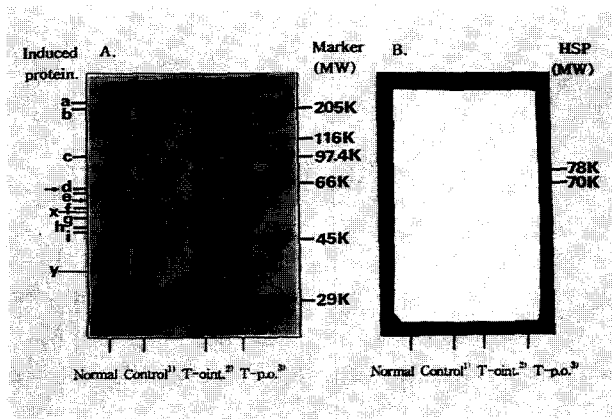


Fig. 3. A. Electrophoresis according to 9.9%T polyacrylamide gel of the back skin of hairless mouse.

B. Immunostaining according to HSP-70 monoclonal antibody of the back skin of hairless mouse.

¹⁾ Control group represents hairless mouse irradiated UVB(total 15KJ).

²⁾ Tannic acid ointment group was topically administered as 5% tannic acid ointment for 3 days after UVB irradiation and 7 days treatment before UVB irradiation.

³⁾ Tannic acid (p.o.) group was orally administered as a dose of 500 mg/kg/day for 3 days after UVB irradiation and 7 days treatment before UVB irradiation.

a-i was protein induced by UVB; Maybe, x, y was protein induced by Tannic acid (a; 166 KDa, b; 159 KDa, c; 106 KDa, d; 78 KDa, e; 75 KDa, f; 65 KDa, g; 60 KDa, h; 54 KDa, i; 52 KDa, x; 63 KDa, y; 37 KDa, →; 78 KDa, 70 KDa).

있는가를 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. Fig. 3A에서 표시된 것과 같이 유도된 단백질중 d와 e-f 중간의 단백질(→로 표시)이 immunostaining 후에 두 띠가 관찰되었으며 hsp 78 KDa와 70 KDa로 계산되었다. 자외선을 쬐이지 않은 normal군에는 hsp가 관찰되지 않았으며 control군, 즉 자외선을 15KJ 쬐여준 군과 그 후 탄닌을 처리한 군에서 hsp 띠가 관찰되었다. 그러나 control군에서는 UVB조사에 의해 생성된 heat shock proteins의 띠가 굵게나타났으나 탄닌 ointment 처리군과 탄닌 경구투여군에서는 탄닌이 UVB 조사시 발생하는 영향을 감소시켰다. 그러나 탄닌의 투여경로에 따르는 차이는 볼 수 없었다(Fig. 3B).

IV. 고 찰

자외선 조사량별 작용을 보면, 적당량에는 소독 및 살균작용, 활성형 vitamin D의 생합성과 뼈를 강하게 해 준다. 그러나, 양이 지나치면 elastic fiber의 증가와 collagen이 감소되어 피부노화(photoaging)가 유발되며 (Bissett *et al.*, 1989), 색소침착증(Kligman *et al.*, 1980) 피부암(Gange, 1987), 자외선에 의해 손상된 눈 각막의 내피세포 수가 감소하여 교연력이 될수록 백내장율을 증가시키며, 면역기능저하등 여러가지 유해작용을 한다(Woodcock *et al.*, 1976; Andrija *et al.*, 1989; Aberer *et al.*, 1981).

자외선 특히, UVB는 조사량에 비례하여 표피각질세포의 직접 손상이 유발되어 일광화상세포의 형성이 증가되고, 표피각질세포의 손상으로 면역 및 염증 조절에 관여하는 세포활성물질(cytokine)의 분비 장애가 발생한다(Wolff *et al.*, 1989). UVB 20-70 mJ/cm²에서는 작은 홍반(erythema) 또는 최소홍반량(MED)이 증가되고, MED의 10-15배에서 부종(edema)이 생성된다 보고되었다. 본 실험에서는 총 15 KJ/m²의 UVB 조사로 홍반이 형성되어 각피가 벗겨졌으나 부종은 형성되지 않았다. 이 상태에서 탄닌의 피부에 대한 방어효과는 현저하게 나타났다. 또한 조직을 채취하여 표피세포를 염색해 본 결과 UVB 조사 후 피부손상으로 정상세포보다 비후해지면서 염증세포가 침윤되는 현상으로 상피세포의 소실이 관찰되었으나 탄닌처리 후 표피세포는 층이 두꺼워지면서 상피세포가 재생됨이 관찰되었다. 이 결과는 탄닌의 세포재생 능력을 증명하여 주었으며 탄닌의 전처리의 결과도 UVB에 대한 방어효과를 나타내어 피부손상이 적어 정상적인 피부조직을 관찰하였다.

피부는 각화세포가 대다수 차지하고, melanin색소를 만드는 색소세포나 면역에 관여하는 langerhans CLC

이 겹쳐 있다(Seth *et al.*, 1990). 원래 정상표피의 langerhans cell는 Ia항원을 나타내는 유일한 세포로서 골수에서 기원하고, 표피, 진피, 림프절, 흉선 등에 존재하며(Aberer *et al.*, 1981), Ia항원, IgG의 Fc부분과 보체(C3b)에 대한 수용체를 갖는 세포로서 항원 발현 및 접촉과민반응(Wolff *et al.*, 1987), 피부이식 거부반응 등 세포 매개성 면역기능의 진초역할을 담당한다(Stingl *et al.*, 1978; Silberberg *et al.*, 1976). LC에 대한 자외선 조사량이 10-20 mJ/cm²일 경우 T6 및 HLA-DR 등의 세포막 항원 자체에 변화가 아닌, 항원처리 능력에 일과성 장애가 생기는 기능적인 손상이 초래되고(Czernielewski *et al.*, 1984), 80-240 mJ/cm²(MED의 1-3배)일때는 표피 LC 표지자의 분포장애와 응괴(aggregation), 세포질내 공포(vacuolization)가 형성되고(Iacobelli *et al.*, 1985), 320-480 mJ/cm²(MED의 4-6배)에는 LC세포막 단열(fragmentation)파괴와 구조적 변화가 초래되어서 표피 langerhans cell 감소와 함께 수상 돌기의 소실이 일어난다. Spangrude(1983) 등은 자외선에 의해 임파구이동이 변화되고, Norris(1990) 등은 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)도 표피 LC 감소로 인해 감소된다고 한다.

UVB에 의한 피부손상은 스트레스 반응과 관련되어 oncogene, heat shock proteins(hsps)이나 interleukin-1 또는 metallothioneins과 같은 단백질을 유도한다고 알려져 있다. 특히 hsp70은 UVB에 노출시 단백질이 유도되는 현상은 hsp가 매개체가 되어 손상된 부분의 복구에 연관됨을 알 수 있다. Hsp70 단백질은 더 큰 손상에 대한 세포의 저항력과도 연관되어 있어서 방어기능도 알려져 있다. UVB 조사로 유도된 단백질중 hsp 70 KDa family가 있는지를 확인하기 위해 immunostaining을 행한 결과 자외선을 조사한 군에서 모두 hsp 78 KDa와 70 KDa를 확인하였다(Fig. 3). 이때 UVB를 조사하지 않은 normal군에는 hsp70이 나타나지 않고, control군, 즉 UVB 조사군과 탄닌 ointment 처치군과 탄닌 경구투여군에만 hsp70이 유도되었다. 그러나 control군에서는 UVB 조사에 의해 생성된 heat shock protein이 antibody와 반응하여 띠가 굵게 나타났으며, 탄닌 ointment 처치군과 탄닌 경구투여군에서는 탄닌이 UVB 조사시 발생하는 영향을 감소시켜 띠가 control군보다 가늘게 관찰되었다. 그러나, 탄닌의 투여 경로에 따른 큰 차이는 볼 수 없었다. 탄닌이 hsp70의 유도에 어떠한 영향이 있으며 피부방어의 하나의 지표로서 관찰한 결과 탄닌에 의해 hsp70의 유도가 억제됨을 보아 탄닌이 피부손상시 보호작용 또는 방어기능에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한, Fig 3의 A에서 표시

된 것과 같이, UVB 조사에 의해 유도된 단백질중 d와 e-f중간의 단백질(→로 표시)이 immunostaining 후에 나타난 hsp와 일치되는 것으로 보아 이는 UVB조사에 의해 유도된 hsp임을 다시 확인할 수 있었다(Kandace *et al.*, 1989; Stephen *et al.*, 1989).

Hsp70은 열충격이나 독성물질로부터 세포를 보호하는 작용이외에 발생과정이나 분화를 조절하는것도 알려져 있다. 세포가 열에 노출하면 일정한 시간 후에 회복되는 기전을 thermotolerance라 하는데 이것은 cell death와 연관지을 수 있다. Thermotolerance의 유도는 apoptotic cell death로부터 세포를 보호하게 된다. 즉 열에 노출시킨 세포는 thermotolerance가 유도하게 되고 이 상태에서 apoptosis를 유도하는 drugs를 자극시키면 cell death로부터 보호받을 수 있을 것이다. UVB 노출은 열에 의한 충격도 배제할 수 없으므로 탄닌이 apoptosis를 유도하는가를 실험할 계획이다. Tumor suppressor 단백질인 p53는 핵에 존재하며 세포증식을 조절한다(Agoff *et al.*, 1993). Hsp70도 cell cycle 중 late G1에서 early S기에 발현되므로 p53과 아주 유사하고 Hsp 70의 promoter에서 전사를 저지시킨다. 그러므로 탄닌이 hsp와의 상관 관계에 있는 p53이나 oncogene의 발현에 어떠한 영향이 있는가도 실시할 계획이다.

V. 결 론

본 실험에서는 hairless mouse에 UVB 조사시 탄닌을 피부도포(5% 연고) 및 경구투여(500 mg/kg/day)로 각각 7일간 처치한 후 자외선 B 파를 조사시켜, 자외선에 의한 손상을 탄닌이 억제하는지를 Draize법과 조직학적 관찰로 조사하였다.

UVB와 조사시 정상군에 비해 피부에 발적이 초래되었다. 탄닌 ointment 처치군 및 탄닌 경구투여군은 대조군에 비해 피부발적이 감소되었고, 조직관찰에서도 UVB에 의해 손상된 피부가 재생됨이 관찰되었다. Heat shock protein 70 KDa monoclonal antibody를 사용하여, hsp-78 KDa와 70 KDa를 immunostaining으로 측정된 바 대조군에 비해 탄닌 ointment 처치군과 탄닌 경구투여군이 감소되었다. 이때 탄닌 경구투여군이 피부도포군에 비해 UVB에 의한 hsp 생성 등 피부독성 억제효과가 보다 컸으나, 유의성있는 차이는 없었다. 이상의 결과는 탄닌이 free radical 제거작용에 의해 heat shock protein 생성을 감소시키며, 경구 및 피부도포시 모두 유사하게 억제효과가 있음을 제시해 준다.

참고문헌

- Aberer, W., Schuler, G., Stingl, G., Herbert, H. and Klaus, W. (1981): Ultraviolet light depletes surface markers of langerhans cells, *J. Invest. Dermatol.*, **76**(3), 202-210.
- Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I.H., and Wu, B. (1993): Regulation of the human promoter by p53. *Science* **259**, 84-87.
- Andrija, K., Wayne, W., and Albert, G. Jr. (1987): Light-induced dermal toxicity: effects on the cellular and molecular level, *Dermatotoxicology*. 3rd edited by Francis, N. M. and Howard, I. M. pp 377-412, Hemisphere Publishing Cor, New York.
- Bissett, D.L., Hannon, D.P. and Orr, T.V. (1989): Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* **50**, 763-769.
- Czernielewski, J., Vaigot, P. and Asselineau, D. et al. (1984): In vitro effect of UV radiation on immune function and membrane markers of human langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* **83**, 62-65.
- Donald, L.B., Daniel, P.H. and Thomas, V.O. (1987): An animal model of solar aged skin : Histological, physical, and visible changes in UV irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* **46**(3), 367-378.
- Esther, P. and Howard, I.M. (1989): *Dermatotoxicology, Principles and Methods of toxicology*. 2nd edited by A.Wallace Hayes., 397-398, Raven Press, New York.
- Fitzpatrick, T.B. (1990): Trend in dermatology-Ozone depletion and dermatologist Need we prepare for the consequences of a UVB "Holocaust" in next decades. *Dermatology*, Sober, A.J., Fitzpatrick, T. B., 13, Mosby Year Book, St. Louis.
- Fu, N. (1991): Protective effect of tannic acid against TPA and cigarette smoke condensate induced DNA strand breaks in human white cells and its antioxidant action. *Chung. Kuo. I. Hsueh. Yuan. Hs-ueh. Pao.* **13**, 347-352.
- Gali, H.U., Perchellet, E.M., Gao, X.M., Bottari, V. and Perchellet, J.P. (1993): Antitumor-promoting effects of gallotannins extracted from various sources in mouse skin in vivo. *Anticancer Res.* **13**, 915-922.
- Gange, R.W. (1987): Acute effects of ultraviolet radiation in the skin., *Dermatology in General Medicine*. Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., 3rd, et al. 1451-1470, Mc Graw-Hill Book Co, New York.
- Gensler, H.L., Gerrish, K.E., Williams, T. and Rao, G. (1994): Prevention of photocarcinogenesis and U-V-Induce immunosuppression in mice by topical tannic acid. *Nutr. Cancer.*, **22**, 121.
- Hirose, M., Hoshiya, T., Akagi, K., Futakuchi, M. and Ito, N. (1994): Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechins and other naturally occurring antioxidants in female Sprague Dawley rats protected with 7,12-dimethylbenz[a]phenanthracene., *Cancer Lett.*, **83**, 149-156.
- Horikawa, K., Mohri, T., Tanaka, Y. and Yokiwa, H. (1994): Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs., *Mutagenesis*, **9**, 523-526.
- Iacobelli, D., Hashimoto, K. and Takahashi, S. (1985): Effect of ultraviolet radiation on guinea pig epidermal Langerhans cell cytomembrane. Light and electron microscopic studies. *Photodermatol.* **2**, 132-143.
- Jimbow, K. and Uesugi, T. (1982): New melanogenesis and photobiological processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV exposure : Ultrastructural differentiation of precursor melanocytes from langerhans cell, *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 108-115.
- Kandace, J.W., Bryan, E.L., Narda, L.W. and Joanne Z. (1989): Correlation between the induction of heat shock protein 70 and enhanced viral reactivation in mammalian cells treated with Ultraviolet light and heat shock. *Cancer res.* **49**, 735-742.
- Keiji, S. and Masami, W. (1992): Augmented expression of HSP72 protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet light, *Biochem. Biophys. res. com.*, **186**, 1257-1264.
- Kligman, L.H., Akin, F.I. and Kligman, A.M. (1980): Sunscreens prevent ultraviolet photocarcinogenesis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **3**, 30-35.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, **227**, 680-685.
- Norris, D.A., Lyons, M.B., Middleton, M.H., Yohn, J.J. and Kashihara-Sawanu, M. (1990): Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 132-138.
- Pathak, M.A., Kramer, D.M. and Gungerich, U. (1972): Formation of thymine dimers in mammalian skin by ultraviolet radiation in vivo, *Photochem. Photobiol.*, **15**, 177-185.
- Ramanathan, L. and Das, N.P. (1992): Inhibitory ef-

- fects of some natural products on metal-induced lipid oxidation in cooked fish. *Biol. Trace. Elem. Res.*, **34**, 35-44.
- Sasaki, Y., Imanishi, H., *et al*, (1989): Suppressing effects of tannic acid on the frequencies of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in mammalian cells, *Mutat. Res.*, **213**, 195-203.
- Seth, S., Krishnamurthy, R. and Lawrence, E.H. (1990): Secondary structure of mammalian 70-kilodalton Heat Shock cognate protein analyzed by circular dichroism spectroscopy and secondary structure. *Biochem.* **29**(36), 8199-8206.
- Silberberg, I., Baer, R.L. and Rosenthal, S.A. (1976): The role of langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs, *J. Invest. Dermatol.*, **66**(4), 210-217.
- Spangrude, G.J., Bernhard, E.J., Ajioka, R.S. and Daynes, R.A. (1983): Alterations in lymphocyte homing patterns within mice exposed to ultraviolet radiation, *J. Immunol.*, **130**(6), 2974-2981.
- Specks, U., Kreofsky, T.J., Limper, A.H. *et al*. (1995): Comparison of neutrophil chemotactic factor release by human and rabbit alveolar macrophages in response to tannin exposure. *J. Lab. Clin. Med.*, **125**, 237-246.
- Stephen, M.K. and Rex, M.T. (1989): Heme oxygenase is the major 32 kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 99-103.
- Stingl, G., Katz, S.I., Clement, L., *et al*, (1978): Immunologic functions of Ia-bearing epidermal langerhans cells. *J. Immunol.*, **121**(5), 2005-2013.
- Towin, H.(1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354.
- Upreti, K.K., Das, M., and Khanna, S.K. (1991): Role of antioxidants and scavengers on argemone oil-induced toxicity in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**, 531-537.
- Wang, Z.Y., Agarwal, R., *et al*, (1991): Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols, *Carcinogenesis*, **12**, 1527-1530.
- Wolff, K. and Stingl, G. (1987): Cellular interaction and skin the epidermis as an immune organ. *Triangle*, **26**, 139.
- Woodcock, A. and Magnus, I.A. (1976): The sunburn cell in mouse skin : preliminary quantitative studies on its production. *Br. J. Dermatol.*, **95**, 459-468.