



Inhibitory Effect of Luteolin Liposome Solution by Animal Model for Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice

Moon-Jae Choi^{1,2}, Young-Moo Lee², Byung-Suk Jin³ and Bae-Hwan Kim^{4*}

¹Nabion Corporation, Seoul, Korea

²Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea

³Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul, Korea

⁴Department of Public Health, Keimyung University, Daegu, Korea

Atopic dermatitis is a common chronic inflammatory skin disease, associated with marked inflammatory cells (of mast cells and eosinophils) and severe itching, which leads to clinical problems in the pediatric population. This study was designed to investigate the inhibitory effects of luteolin liposome solution, that is entrapped the hydrophobic luteolin (one of the flavonoids) into ethosome to improve its stability, by using hapten-induced atopic dermatitis animal model (NC/Nga mice). The luteolin liposome treated mice showed anti-inflammatory effect as evidenced by the lowering of erythema and edema in clinical observation, reduction of inflammatory cell infiltration and epidermal thickness in histopathological examination, when compared with TNCB induced controls. Luteolin liposome solution also reduced the serum IgE level which played important roles in the atopic dermatitis model. These results suggest that luteolin liposome solution has some merit in this formulation showing inhibitory effects for the atopic dermatitis.

Key words: Atopic dermatitis, animal model, TNCB, luteolin liposome

(Received 21 January 2010; Revised version received 15 February 2010; Accepted 13 March 2010)

아토피성 피부염은 다양한 요인들의 복합작용에 의해 발생하는 면역과민반응으로 발병원인을 명확히 밝혀내기 어려운 질병으로 알려져 있고, 전체 어린이의 20%, 성인의 1-3% 정도가 발생하고 있으며, 지속적으로 발생이 증가하고 있는 질환이다(Schultz-Larsen and Hanifin, 2002; McGirt and Beck, 2006). 심한 소양감과 염증반응 등을 동반하기 때문에, 이러한 아토피성 피부염의 치료를 위해서 면역억제제를 이용한 치료가 많이 사용되고 있지만(Furie et al., 2004; Schuller et al., 2004; Wisselink and Willemse, 2009), 부작용이 없는 국소적인 항염 및 항알러지제의 필요성이 항상 제기되고 있다. 또한 더 효율적인 아토피성 피부염 치료를 위해 개발될 물질에 대한 평가법 연구도 꾸준히 진행되고 있다.

아토피성 피부염의 연구를 위해 많은 연구진에서 NC/Nga 마우스를 이용한 자연발생 모델(spontaneously developed

dermatitis)을 많이 이용하고 있는데, 최근에 이 모델에 hapten을 도포하여 발병율을 높이고자 하는 시도들이 많이 소개되어지고 있다(Matsuda et al., 1997; Taniguchi et al., 2003; Yano et al., 2003). NC/Nga 마우스의 자연발생 아토피 모델은 면역병리학적 이상이 사람에서 보여지는 병변과 매우 유사하지만(Shiohara et al., 2004), 자연 유발률이 낮고(50% 이하), 발병 양상의 편차도 다양하게 보여지는 단점이 있기 때문에(Matsumoto et al., 1999; Shiohara et al., 2004), 이런 단점을 보완하기 위해 hapten 및 mite 추출물의 처리량과 처리시기 등을 적절히 조절하여 아토피성 피부염의 발현율과 증상이 재현성 있게 나타나도록 하는 연구가 국내에서도 많이 진행되어지고 있다(Yun et al., 2008)

루테올린(luteolin; 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone)은 대부분의 과일, 야채 등의 식물에서 많이 함유되어 있는 폴리페놀의 일종으로서 우수한 항산화, 항염, 항알러지 효과가 보고되고 있으며 암을 억제하는 능력 또한 매우 우수하여 의약품, 식품, 화장품 분야에서 활발하게 연구가 진행되고 있는 물질이다(Chen et al., 2007; Ashokkumar and Sudhandiran, 2008; Kaefer and Milner, 2008). 그러나 루테올린은 수용액상에서 불용성이어서 다양한 분

*Corresponding author: Bae-Hwan Kim, Department of Public Health, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldaero, Dalseo-Gu, Daegu, 704-701, Korea
Tel: +82-53-580-5933
Fax: +82-53-580-5164
E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

야에서 널리 활용하는데 어려움이 많고 또한 산화 안정성이 낮은 단점을 지니고 있어 이러한 문제를 해결하기 위해 ethosome을 이용한 리포솜화를 시도하였다. Ethosome은 피부투과 증진제로 많이 사용되는 용매인 에탄올에 인지질을 용해시켜서 만들어지는 carrier로서, 에탄올이 carrier막의 유연성을 높이고 변형을 유도하면서 계면장력은 낮추고 동시에 각질층의 피부장벽을 낮추는 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Touitou et al., 1998; 2000).

이번 시험에서는 앞서 언급된 NC/Nga 마우스에서 hapten을 이용하여 유도한 아토피성 피부염 모델에서, 루테올린 리포솜 용액을 경피도포하여 아토피 피부염 증상을 완화하는지 여부를 확인해 보았다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

7주령의 암컷 NC/Nga 마우스를 오리엔트바이오(경기도 성남)로부터 구입하여, 7일간 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험동물실의 환경은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 40-60%, 명암 주기 12시간으로 유지하였으며, 실험동물용 사료(퓨리나코리아)와 음수(여과멸균정제수)를 제한없이 공급하였다. 본 연구에서의 동물실험은 동물보호법의 3R 및 실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 원칙을 준수하고 윤리적인 측면을 고려하면서 수행하였다.

시험물질(루테올린)의 ethosome 제조

Ethosome막의 주성분인 HPC (hydrogenated phosphatidylcholine)와 루테올린(Wilshire Tech)을 9:1의 비율로 섞은 혼합물 1g을 에탄올 1mL와 함께 플라스크에 넣은 후 입구를 마개로 막고 60°C 의 온도가 유지되는 항온조에서 완전히 녹인 후, 졸 상태의 용액이 된 상태에서 증류수 1mL를 넣고 2분 이상 자석교반 시키면 수화액정(hydrated liquid crystal)이 형성시켰다(수화단계). 그후 교반기를 계속 돌린 상태로 전단력을 가하면서 정량송액 펌프를 이용 증류수 60mL를 약 5 mL/min의 속도로 한 방울씩 서서히 첨가하여 수화 액정을 나노 크기의 carrier 형태 입자로 분산하여 ethosome을 만들었다. 항온조에서 위 과정을 총 10분가량 진행한 후 플라스크를 bath type의 sonicator에 옮겨 10분간 초음파를 가한 후 상온으로 옮겨 약 1시간 정도 자석교반 시키면서 서서히 냉각시켰다.

시험군의 구성

7일간의 적응 후, 체중을 기초로 시험군 당 5마리씩 4군으로 나누었다. 모든 시험군의 경우, 시험물질 투여 전날 등부위를 제모하였으며, 이중 3개 군에서의 아토피성 피부염 유발은 이전의 연구를 참고하여(Taniguchi et al.,

2003), 첫 주에 5% TNCB (1-Chloro-2,4,6-trinitrobenzene, Aldrich) 150 μL 를 등부위에 1회 도포한 후, 2주째부터 1% TNCB를 주 1회 5주간 등부위에 발라주어 아토피 피부염을 유발하였다. 마지막 TNCB (1%) 도포한 후, T1군은 루테올린 리포솜 용액을, T2군은 루테올린 물질을 PEG400에 녹여 0.1% 농도가 되도록 마리당 150 μL 씩 주 5회 2주간 경피 도포하여, TNCB 대조군 및 NC(정상대조군)과 결과를 비교 분석 하였다.

일반상태 및 긁는 횟수 측정

시험기간 동안 매일 1회씩 임상 증상 및 사망여부를 관찰하였다. 실험동물의 소양감을 군간 비교하기 위해, 마지막 처치 다음날 및 부검 전에 캠코더를 이용하여 30분간 긁는 횟수를 촬영 분석한 후 군간 비교하였다. 긁는 행동은 소양감에 의한 행동외에 정상적인 grooming 행동일 수도 있으므로(Carstens and Kuraishi, 2004), 앞다리를 이용하여 안면 혹은 귓바퀴 부위를 긁는 행동(facial scratching)은 제외하고 뒷다리를 이용하여 등 부위의 아토피 유발 부위 피부를 긁는 행동(hindlimb scratching)만을 긁는 행동의 횟수로 측정하였다.

피부 측정

TNCB 마지막 처치시와 시험종료시에 피부측정장치인 Tewameter (TM300, CK electronic GmbH, Germany)를 이용하여 TEWL (transepidermal water loss)를 측정하였으며, Corneometer (CM825, CK electronic GmbH, Germany)를 이용하여 수분함유량을 측정하여 군간 비교하였다.

피부 육안병변 관찰 및 조직병리학적 검사

시험물질 투여로 인해 피부에 보여질 수 있는 피부염 증상들(염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피탈피 등)을 주의깊게 관찰하였고, 부검 시 등피부를 적출하여 10% neutral formalin에 고정하고 탈수시킨 후 paraffin으로 포매하여 조직절편을 제작하였다. 제작된 조직절편은 H&E 염색을 실시하여 표피와 진피에서 피부염에 관련된 병변을 관찰하였으며, 표피의 두께를 군당 비교하였다. 또한 toluidine blue 염색을 통해 비만세포 수와 탈과립 양상을 분석하였다.

혈청 내 IgE 및 Histamine 측정

Th2 cytokine의 영향을 받아 B cell에 의해 분비되어지는 혈청 내 IgE level은(Renz et al., 1994), 세포 면역능의 편향성을 평가하여 아토피성 피부염 발현유무를 판단하는 중요한 지표가 되므로 측정하였다. 혈청 내 IgE 분석을 위한 Enzyme-Linked Immunosorbent (ELISA) Assay를 위해 실험 종료 시 각 동물을 isoflurane 마취 하에 개

복하여 후대정맥으로부터 혈액을 채취하고 원심분리기에 넣어 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 이를 -20°C 에 보관하여 분석에 사용하였다. IgE의 수준 측정은 sandwich ELISA 방법에 의하여 실시하였다(SHIBAYAGI ELISA kit, Japan).

통계처리

통계적 분석은 SPSS 17.0 for windows (SPSS Inc., USA)를 이용하여 one-way ANOVA를 이용하였고 각 군간의 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 분석을 실시하였고, 통계적 유의수준은 $P<0.05$ 로 하였다.

결 과

일반상태 및 굶는 횟수 관찰

시험기간 중 시험물질에 기인한 변화로 인정되는 임상 증상 이상과 체중변화는 관찰되지 않았으며 사망한 개체도 없었다(data not shown). 피부 굶는 횟수에 있어서 정상 대조군(NC)에 비해 TNCB 대조군은 유의성 있는 증가가 관찰되었고($P<0.05$), 시험물질 처치군은 유의성은 없었지만 모두 감소하는 경향을 보였다(Table 1).

피부측정 결과

TEWL수치의 경우 시험물질 처치군인 T1 (Luteolin Liposome solution) 및 T2 (Luteolin)군은 처치전(0 week)에 비해서는 2주 후 유의성 있는 감소를 보였지만($P<0.01$), TNCB 대조군도 유의한 감소를 보여($P<0.01$) 자연회복에 의한 결과로 큰 의미는 없는 수치라 판단되며, 시험종료시 측정결과 TNCB 대조군과 비교해 볼 때 시험물질처치군인 T1 및 T2군은 유의성은 없지만 비슷하거나 약간 감소하는 경향을 보였다(Table 2).

Corneometer에 의한 수분함유량 측정결과, T1 (Luteolin

Liposome solution) 및 T2 (Luteolin)군은 정상 대조군(NC)에 비해서 유의성 있게 낮게 관찰되었으며($P<0.05$), TNCB 군과도 비슷한 정도로 관찰되었다(Table 3).

피부 육안병변 관찰 및 조직병리학적 검사

부검전 처치부위의 육안관찰에 있어서 TNCB군은 홍반, 부종뿐만 아니라 가피탈피와 농양성 구진 및 개체에 따라 심한 경우 출혈소견까지 보여 사람의 아토피 피부염의 증상과 매우 흡사한 피부병변을 나타내었고, T1 (Luteolin Liposome solution)군은 많이 회복되어 관찰되었지만, T2 (Luteolin)군은 아직도 자극이 남아 있는 양상으로 관찰되었다(Figure 1). 자극의 지표로 볼 수 있는 표피의 두께(epidermal hyperplasia, hyperkeratosis)에 있어서는 TNCB 대조군이 정상 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었고, T1 (Luteolin Liposome solution)군 및 T2 (Luteolin)군에서는 TNCB 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보여 피부내의 자극은 개선되고 있음을 알 수 있었다. 조직병리학적으로 염증세포침윤은 TNCB 대조군에 비해 T1 및 T2군에서 약간 회복되어 관찰되었다(Table 4, Figure 2).

피부내 비만세포(mast cell) 개수의 경우 TNCB 대조군은 정상 대조군(NC)에 비해 유의성 있는 증가가 보였고, TNCB 대조군에 비해 시험물질 처치군인 T1 (Luteolin Liposome solution) 및 T2 (Luteolin)군에서는 모두 유의성

Table 1. The frequency of scratching in NC/Nga mice

Weeks	NC	TNCB	T1	T2
0	0.8±0.8 ^a	6.0±2.6 ^b	5.2±2.6 ^b	5.2±2.2 ^b
2	0.6±0.5 ^a	4.4±2.1 ^b	2.6±1.5 ^{ab}	2.4±1.7 ^{ab}

Unit: times in 30 minutes

NC: Normal control, TNCB: TNCB induced control, T1: Luteolin liposome solution, T2: Luteolin

Values with different superscripts (a,b) in the same row are significantly different ($P<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 2. Changes in transepidermal water loss (TEWL) of NC/Nga mice

Weeks	NC	TNCB	T1	T2
0	12.08±2.93 ^a	75.04±13.89 ^b	80.28±15.58 ^b	76.44±27.05 ^b
2	12.34±3.78 ^a	41.68±12.78 ^b	38.44±20.27 ^b	38.90±22.51 ^{ab}

Unit: g/m²/h

NC: Normal control, TNCB: TNCB induced control, T1: Luteolin liposome solution, T2: Luteolin

Values with different superscripts (a,b) in the same row are significantly different ($P<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 3. Changes in water capacity of NC/Nga mice by Corneometer

Weeks	NC	TNCB	T1	T2
0	37.74±25.79 ^b	16.86±2.93 ^a	14.01±7.27 ^a	16.74±5.04 ^a
2	30.85±4.32 ^b	19.06±11.22 ^a	19.86±4.37 ^a	20.23±7.19 ^a

Unit: Arbitrary unit

NC: Normal control, TNCB: TNCB induced control, T1: Luteolin liposome solution, T2: Luteolin

Values with different superscripts (a,b) in the same row are significantly different ($P<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

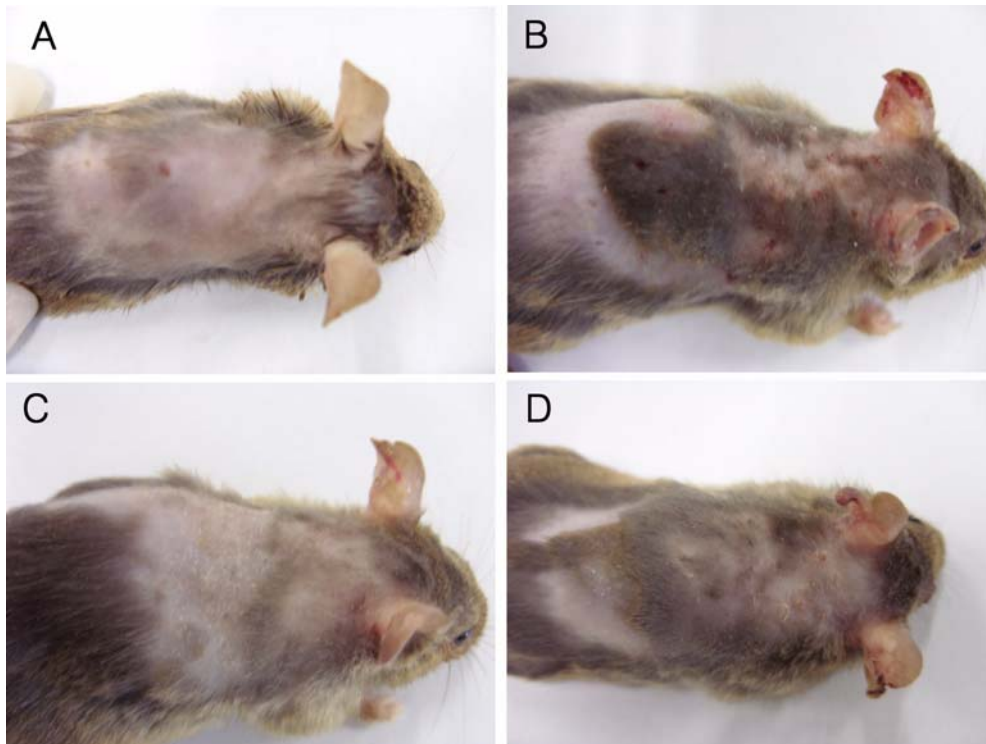


Figure 1. Gross lesions of NC/Nga mouse skin. A: Normal control, B: TNCB induced control, C: Luteolin liposome solution, D: Luteolin.

있는 감소가 관찰되었다. 탈과립 비율은 유사하게 관찰되었다(Table 5, Figure 3).

혈청 내 IgE 측정

시험종료시 아토피성 피부염의 대표적인 면역학적 지표인 혈청내 IgE 수준을 측정한 결과 TNCB에 의한 아토피 유도군은 정상 대조군 보다 유의성 있는 증가가 관찰되었으며, 시험물질 처치군인 T1 (Luteolin Liposome solution) 및 T2 (Luteolin) 군의 혈청내 IgE level은 TNCB 대조군에 비해 모두 유의성 있는 감소를 보였다(Table 6).

고 찰

아토피성 피부염에 대한 효과를 정확히 평가하기 위해서는 신뢰성 높은 평가 모델을 선택하는 것이 중요하다. 효능평가용 아토피성 피부염 in vivo 모델은 발현 시기와 발현 정도에 있어 균일해야 하며, 도출되는 결과도 재현

성이 높아야 한다. 특히 일본에서 많이 연구되어지고 있는 NC/Nga 마우스의 자연발생 피부염 모델은 발현성이 높지 않아, NC/Nga 마우스에 hapten 처치로 인해 유발시키는 아토피성 피부염 모델이 현재 각광을 받고 있다 (Shiohara *et al.*, 2004). 본 연구에서도 최근 아토피성 피부염 치료물질 효능 평가에 가장 많이 사용되어지는 hapten 유발 모델을 이용하여 효능을 평가하였다. 일반적으로 hapten으로는 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) (Lee *et al.*, 2006)나 TNCB (Taniguchi *et al.*, 2003)가 많이 사용되어지고 있는데, 본 평가에서는 TNCB를 사용하였다. 이와 같은 hapten을 피부에 반복 노출 시 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 투여농도와 횟수, 그리고 투여 부위에 따라 Th1 면역반응의 우세를 배경으로 하는 접촉성 피부염을 유도하거나 아토피성 피부염의 특성인 Th2 면역기능 향진을 가져올 수 있다고 알려져 있다(Plitnick *et al.*, 2002; Taniguchi *et al.*, 2003; Goutet *et al.*, 2005; Cumberbatch *et al.*, 2005).

Table 4. Epidermal thickness of NC/Nga mice

Weeks	NC	TNCB	T1	T2
2	27.54±6.02 ^a	105.63±43.37 ^c	34.87±10.91 ^{ab}	52.74±17.76 ^b

Unit: μm

NC: Normal control, TNCB: TNCB induced control, T1: Luteolin liposome solution, T2: Luteolin

Epidermal thickness was determined by the average of three sites (short, medium, long-size each) in same fields of microscope. Values with different superscripts (a,b,c) in the same row are significantly different ($P<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

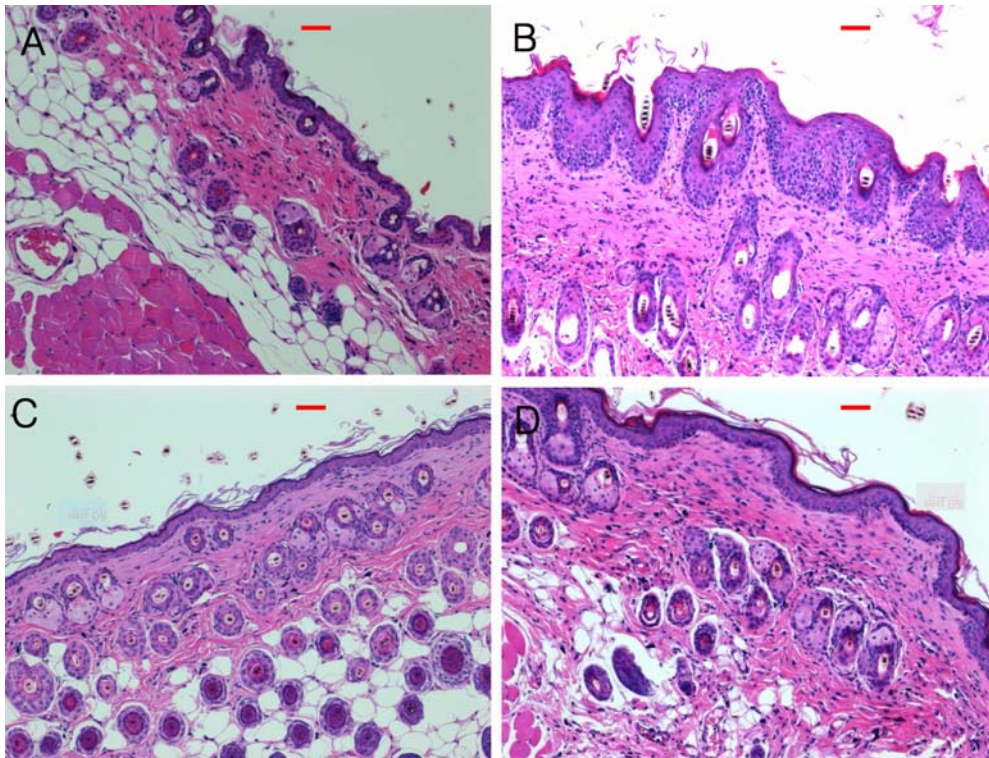


Figure 2. Histological observation of NC/Nga mouse skin by H&E staining (×100) (red bar=50 μm). A: Normal control, B: TNCB induced control, C: Luteolin liposome solution, D: Luteolin.

즉 아토피성 피부염의 경우 동일 hapten이라도 투여 양, 횟수, 부위에 따라 Th1 혹은 Th2 면역반응으로 치우칠 수 있다고 보고된 바 있으므로(Mueller *et al.*, 1989; Goutet *et al.*, 2005; Friedman, 2006), TNCB의 투여횟수와 기간 등을 정확히 조절하여 아토피를 유발하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 아토피 피부염 유발 결과 피부의 육안적인 관찰에서 피부염이 확연하게 유발되었으며, 조직병리학적 검사에서 epidermal hyperplasia와 진피층 내에 염증세포 침착이 관찰되었고, 도포부위에 피부염과 소양감이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 기존 연구(Renz *et al.*, 1994)에서도 설명했듯이 아토피에 있어 가장 중요한 지표인 B 세포에 의한 혈중 IgE 수치가 Th2 면역반응에 의해 상승되었으므로 시험물질에 의한 아토피 피부염 효능 평가에 적합한 모델로 형성되었다고 할 수 있다.

아토피 피부염에서 증가되었던 소양감과 혈중 IgE 수치

는 시험물질(Luteolin Liposome solution 및 Luteolin) 도포에 의해 감소하는 양상을 보였다. 아토피에서 증가된 혈중 IgE는 피부내 비만세포(mast cell)의 탈과립을 일으켜 histamine등의 염증성 매개인자를 분비하여 소양감을 유발하는 것으로 알려져 있는데(Falus와 Merétey, 1992; Malaviya *et al.*, 1996; Menzies-Gow *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 1999) 시험물질은 IgE 수치를 감소시킴으로서 소양감 억제 기전에 작용 하고 있음을 알려 준다. 마찬가지로 조직병리학적 검사 결과 염증의 감소와 진피내 비만세포 수의 감소도 동일한 기전으로 유발된 증상이라 판단된다.

이번 시험에서는 표피수분 손실량(TEWL)과 피부내 수분함유량을 측정하였는데, 이는 피부 손상을 간접적으로 평가해 볼 수 있는 지표로 알려져 있다(Elias and Menon, 1991; Hruza and Pentland, 1993). 본 시험결과 자극이 가장 심하게 유도된 TNCB대조군에 비해 약간 개선되는

Table 5. Number of mast cells and ratio of degranulation by Toluidine blue staining

	NC	TNCB	T1	T2
Total No of mast cell	79.2±11.5 ^a	176.6±17.8 ^c	134.0±26.1 ^b	125.3±37.8 ^b
Mean No of degranulation	59±8.6 ^a	117±12.9 ^b	101.6±22.9 ^b	94±28.4 ^b
Deganulation/total No.	74.5	66.1	75.8	75.2

NC: Normal control, TNCB: TNCB induced control, T1: Luteolin liposome solution, T2: Luteolin

The number of mast cells was determined by the average of five different fields with an eyepiece of ×100 magnification.

Values with different superscripts (a,b,c) in the same row are significantly different ($P<0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

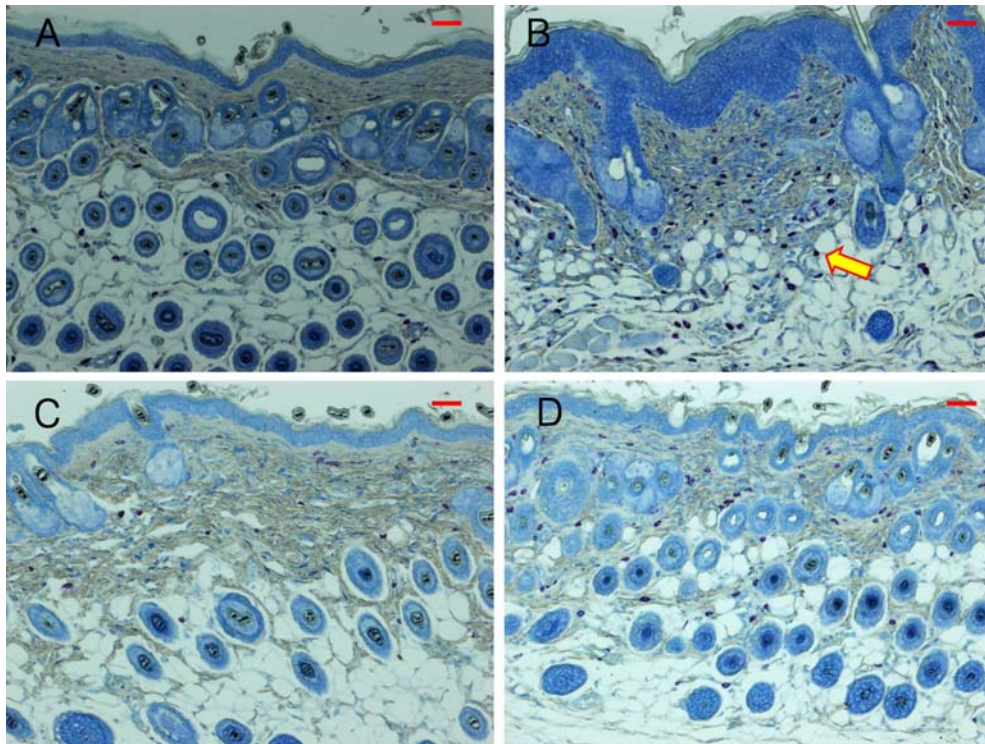


Figure 3. Histological observation of NC/Nga mouse skin by Toluidine blue staining ($\times 100$) (red bar=50 μm). A: Normal control, B: TNCB induced control, C: Luteolin liposome solution, D: Luteolin. There are many mast cells (arrow) in TNCB control (B).

경향은 보였으나 큰 차이는 관찰되지 않았다.

루테올린(luteolin)은 우수한 항산화, 항염, 항알러지가 있는 폴리페놀의 일종으로 알려져 있어(Chen et al., 2007; Ashokkumar and Sudhandiran, 2008; Kaefer and Milner, 2008) 충분히 아토피 치료효과를 기대할 수 있을 거라 판단되지만 수용액에서 불용성이고 안정성이 낮아 본 시험에서는 ethosome을 이용한 리포솜화를 통해 효과를 같이 비교하게 되었다. 시험결과 리포솜화된 루테올린은 기존의 루테올린과 비교시 아토피 피부염의 중요 지표인 혈중내 IgE 수준은 약간 덜 감소하였지만 비슷한 수준으로 감소하였고, 자극과 염증지표에서는 훨씬 개선된 양상으로 관찰되어 성공적인 제제로 판단되었다.

결론적으로 본 시험조건에서 Luteolin Liposome solution은 TNCB유도 아토피 모델에서 TNCB대조군에 비해 표피수분손실과 수분함유에 있어는 개선을 보이지 못했지만 병리학적으로 볼 때 피부염증에 있어 개선이 있는 것으로 판단되고, 특히 혈청내 IgE level과 피부 진피내 비

만세포에 있어 유의한 감소 등을 보여 아토피 피부염에 있어서는 효과가 있음이 인정되었다.

참고문헌

- Ashokkumar, P. and Sudhandiran, G. (2008) Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed. & Pharmacotherapy* 62, 590-597.
- Carstens, E. and Kuraishi, Y. (2004) Animal models of itch: scratching away at the problem. In *Itch Basic Mechanisms and Therapy* (Yosipovitch, G. ed.), pp.35-50, Informa Healthcare, USA.
- Chen, C.Y., Peng, W.H., Tsai, K.D. and Hsu, S.L. (2007) Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci.* 81, 1602 - 1614.
- Cumberbatch, M., Clelland, K., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2005) Impact of cutaneous IL-10 on resident epidermal Langerhans' cells and the development of polarized immune responses. *J. Immunol.* 175(1), 43-50.
- Elias, P.M. and Menon, G.X. (1991) Structural and lipid biochemical correlation of the epidermal permeability barrier.

Table 6. Plasma IgE levels of NC/Nga mice

Weeks	NC	TNCB	T1	T2
2	734.0 \pm 364.6 ^a	4,303.3 \pm 523.0 ^c	3101.1 \pm 780.5 ^b	2,503.2 \pm 1,041.5 ^b

Unit: ng/mL

NC: Normal control, TNCB: TNCB induced control, T1: Luteolin liposome solution, T2: Luteolin

Values with different superscripts (a,b,c) in the same row are significantly different ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

- Adv. Lipid Res.* 24, 1-27.
- Falus, A. and Merétey, K. (1992) Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions. *Immunol. Today* 13(5), 154-156.
- Friedman, P.S. (2006) Contact sensitization and allergic contact dermatitis immunobiological mechanisms. *Toxicol. Lett.* 162, 49-54.
- Furue, M., Terao, H., Moroi, Y., Koga, T., Kubota, Y., Nakayama, J., Furukawa, F., Tanaka, Y., Katayama, I., Kinukawa, N., Nose, Y. and Urabe, K. (2004) Dosage and adverse effects of topical tacrolimus and steroids in daily management of atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 31(4), 277-283.
- Goutet, M., Pépin, E., Langonné, I., Huguet, N. and Ban, M. (2005) Identification of contact and respiratory sensitizers using flow cytometry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205(3), 259-270.
- Hruza, L.L. and Pentland, A.P. (1993) Mechanism of UV induced inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 15(2), 111-115.
- Kaefer, C.M. and Milner, J.A. (2008) The role of herbs and spices in cancer prevention. *J. Nutri. Biochem.* 19, 347-361.
- Lee, S.H., Baek, S.J., Kim, H.A. and Heo, Y. (2006) 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis like immune alteration in mice. *J. Toxicol. Pub. Health* 22(4), 357-364.
- Malaviya, R., Morrison, A.R. and Pentland, A.P. (1996) Histamine in human epidermal cells is induced by ultraviolet light injury. *J. Invest. Dermatol.* 106(4), 785-789.
- Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W. and Ra, C. (1997) Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* 9(3), 461-466.
- Matsumoto, M., Ra, C., Kawamoto, K., Sato, H., Itakura, A., Sawada, J., Ushio, H., Suto, H., Mitsuishi, K., Hikasa, Y. and Matsuda, H. (1999) IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.* 162(2), 1056-1063.
- McGirt, L.Y. and Beck, L.A. (2006) Innate immune defects in atopic dermatitis. *J. of Allergy and Clin. Immunol.* 118(1), 202-208.
- Menzies-Gow, A., Ying, S., Sabroe, I., Stubbs, V.L., Soler, D., Williams, T.J. and Kay, A.B. (2002) Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J. Immunol.* 169(5), 2712-2718.
- Mueller, D.L., Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 445-480.
- Plitnick, L.M., Loveless, S.E., Ladics, G.S., Holsapple, M.P., Selgrade, M.J., Sailstad, D.M. and Smialowicz, R.J. (2002) Cytokine profiling for chemical sensitizers: application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179(3), 145-154.
- Renz, H., Brodie, C., Bradley, K., Leung, D.Y. and Gelfand, E.W. (1994) Enhancement of IgE production by anti-CD40 antibody in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93(3), 658-668.
- Schuller, E., Oppel, T., Bornhövd, E., Wetzel, S. and Wollenberg, A. (2004) Tacrolimus ointment causes inflammatory dendritic epidermal cell depletion but no Langerhans cell apoptosis in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 114(1), 137-143.
- Schultz-Larsen, F. and Hanifin, J.M. (2002) Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 22, 1-24.
- Shiohara, T., Hayakawa, J. and Mizukawa, Y. (2004) Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *J. Dermatol. Sci.* 36(1), 1-9.
- Taniguchi, Y., Kohno, K., Inoue, S., Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (2003) Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *International Immunopharmacol.* 3(9), 1313-1324.
- Toutou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B. and Eliaz, M. (2000) Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release*, 65, 403-418.
- Toutou, E., Meidan, V.M. and Horwitz, E. (1998) Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J. Control. Release*, 56, 7-21.
- Wisselink, M.A. and Willemse, T. (2009) The efficacy of cyclosporine A in cats with presumed atopic dermatitis: A double blind, randomised prednisolone-controlled study. *The Vet. Journal*, 180, 55-59.
- Yano, S., Umeda, D., Yamashita, S., Yamada, K. and Tachibana, H. (2009) Dietary apigenin attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J. Nutri. Biochem.* 20(11), 876-881.
- Ying, S., Robinson, D.S., Meng, Q., Barata, L.T., McEuen, A.R., Buckley, M.G., Walls, A.F., Askenase, P.W. and Kay, A.B. (1999) C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophilia, and relationship to basophils and other C-C chemokines (monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES). *J. Immunol.* 163(7), 3976-3984.
- Yun, J.W., Kim, H., Kang, H.J., Koh, J.Y. and Kim, B.H. (2008): Models for Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Lab. Animal Research*, 24(1), 59-66.