



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018년 2월
박사학위논문

편백 초임계 추출 오일과
저면 캐모마일 오일의 항산화,
항히스타민 및 항염 효과

조선대학교 대학원

보완대체의학과

표 애 자

편백 초임계 추출 오일과
저먼 캐모마일 오일의 항산화,
항히스타민 및 항염 효과

Antioxidative, Antihistamine and Antiinflammatory
Effect of *Chamaecyparis Obtusa* Oil by Supercritical
Carbon Dioxide Extraction and German Chamomile Oil

2018년 2월 23일

조선대학교 대학원

보완대체 의학과

표 애 자

편백 초임계 추출 오일과
저면 캐모마일 오일의 항산화,
항히스타민 및 항염 효과

지도교수 이 미 자

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2017년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

표 애 자

표애자의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	문 경 래	印
위 원	남부대학교	교수	한 진 섭	印
위 원	조선대학교	교수	소 금 영	印
위 원	조선대학교	교수	홍 란	印
위 원	조선대학교	교수	이 미 자	印

2017년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	iii
도목차	v
ABSTRACT	vii
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법	4
A. 재료 및 기기	4
1. 시약	4
2. 기기	4
B. 실험방법	5
1. 오일성분 및 제조	5
2. 세포배양	8
3. MTT법을 이용한 세포독성 검정	8
4. 항산화 활성 측정	8
5. 비만세포 탈과립 측정	10
6. 히스타민 정량	10
7. β -hexosaminidase release assay	10
8. IL-4 and TNF- α secretion assay	11
C. 통계처리	11
III. 결과	12
A. MTT법을 이용한 세포독성 검정 결과	12
1. 편백 초임계 추출 오일의 세포독성	12
2. 저면 캐모마일 오일의 세포독성	14
B. 항산화 활성 측정	16
1. 전자공여능(EDA) 측정	16

2. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정	22
3. 지질과산화능(LPA) 측정	28
C. 비만세포 탈과립	34
1. 히스타민 유리억제 효과	34
2. β -hexosaminidase 분비에 미치는 영향	36
D. Cytokine 생산에 미치는 영향	38
1. IL-4 생성량에 미치는 영향	38
2. TNF- α 생성량에 미치는 영향	44
IV. 고찰	50
V. 결론	54
참고문헌	56

표 목 차

- Table 1. The component of *Chamaecyparis obtusa* oil extracted by the supercritical carbon dioxide extraction
- Table 2. The component of German chamomile oil
- Table 3. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the cell viability of RBL-2H3 cell by MTT assay
- Table 4. Effects of German chamomile oil on the cell viability of RBL-2H3 cell by MTT assay
- Table 5. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa* oil
- Table 6. The electron donating ability of German chamomile oil
- Table 7. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil
- Table 8. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa* oil
- Table 9. The superoxide dismutase like activity of German chamomile oil
- Table 10. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil
- Table 11. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa* oil
- Table 12. The lipid peroxidation activity of German chamomile oil
- Table 13. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil
- Table 14. The histamine secretory volume of the RBL-2H3 cell within extracts treatment
- Table 15. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on β -Hexosaminidase release of RBL-2H3 cells
- Table 16. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the production of IL-4 cytokine
- Table 17. Effects of German chamomile oil on the production of IL-4 cytokine
- Table 18. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on the production of IL-4 cytokine
- Table 19. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the production of TNF- α cytokine

Table 20. Effects of German chamomile oil on the production of TNF- α cytokine

Table 21. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on the production of TNF- α cytokine

도 목 차

- Figure 1. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the viability of RBL-2H3 cells.
- Figure 2. Effects of German chamomile oil on the viability of RBL-2H3 cells.
- Figure 3. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil).
- Figure 4. The electron donating ability of German chamomile oil (G oil).
- Figure 5. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil).
- Figure 6. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil).
- Figure 7. The superoxide dismutase like activity of German chamomile oil (G oil).
- Figure 8. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil).
- Figure 9. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil).
- Figure 10. The lipid peroxidation activity of German chamomile oil (G oil).
- Figure 11. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil).
- Figure 12. Inhibitory effects of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil against histamine release from RBL-2H3 cells.
- Figure 13. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on β -Hexosaminidase release of RBL-2H3 cells.
- Figure 14. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil) on the production of IL-4 cytokine in RBL-2H3 cells.
- Figure 15. Effects of German chamomile oil (G oil) on the production of IL-4 cytokine in RBL-2H3 cells.

Figure 16. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil) on the production of IL-4 cytokine in RBL-2H3 cells.

Figure 17. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil) on the production of TNF- α cytokine in RBL-2H3 cells.

Figure 18. Effects of German chamomile oil (G oil) on the production of TNF- α cytokine in RBL-2H3 cells.

Figure 19. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil) on the production of TNF- α cytokine in RBL-2H3 cells.

ABSTRACT

Antioxidative, Antihistamine and Antiinflammatory Effect of *Chamaecyparis Obtusa* Oil by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and German Chamomile Oil

Pyo, Ae Ja

Advisor : Prof. Lee, Mi Ja

Department of Complementary and Alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

Atopic dermatitis (AD) is one of the most common allergic diseases along with allergic rhinitis and bronchial asthma. The of AD patients rapidly increases every year, and its prevalence especially among children and adolescents has been steadily increasing. AD is considered as rather severe and intractable condition. The cause and mechanisms of AD have not been clearly identified yet. AD is being treated by using antihistamine, an antibiotic drug to prevent inflammation and infection, and steroid, an immunosuppressive and antiinflammatory agent. However, its treatment is difficult because there are various mechanisms of AD and the side effects caused by drugs cannot be neglected.

Recently, some research suggest that aromatherapy using oils extracted from plants with antioxidant effects is effective in treating AD, and it has been gaining much attention for the medical community that such aromatherapy can be a form of medicine for AD treatment. Therefore, this study intends to verify the Anti oxidative, Antihistamine and Antiinflammatory effects on AD of the *Chamaecyparis*

obtusata oil extracted through supercritical carbon dioxide extraction process and German chamomile oil.

As for the research method, RBL-2H3 cells, a mast cell line, were treated with supercritical carbon dioxide extracted *Chamaecyparis obtusata* oil (C oil), German chamomile oil (G oil) and the mixed oil of *Chamaecyparis obtusata* and German chamomile (CG oil) to perform the electron donating ability (EDA) test, the superoxide dismutase (SOD) like activity test, the lipid peroxidation activity (LPA) analysis, the analysis on their inhibitory effects on mast cell degranulation and mast cell histamine release, the β -hexosaminidase release assay and the IL-4 and TNF- α secretion assay.

The results of the research showed that the EDA of both C oil and G oil was high, especially with CG oil displaying a considerably high antioxidant capacity of 92.3% ($p < 0.001$). The results of measuring SOD like activity showed that the SOD like activity of both C oil and G oil was high, especially with CG oil displaying a considerably high SOD like activity effect of 91.0% ($p < 0.001$). The results of measuring LPA also showed that the LPA of both C oil and G oil was high, with CG oil displaying a considerably high LPA of 97.9% ($p < 0.001$). This indicates a high antioxidant capacity of C oil, G oil and CG oil. Regarding the inhibitory effect on the histamine release from RBL-2H3 cells, both C oil and G oil displayed an inhibitory effect in comparison with control groups and CG oil displayed a considerable synergy effect of 33.10% ($p < 0.01$). As for the inhibitory effect on the β -hexosaminidase secretion, both C oil and G oil displayed an inhibitory effect and CG oil displayed a synergy effect of 38.39% ($p < 0.01$). With regard to the inhibition of IL-4 and TNF- α production, both C oil and G oil displayed an inhibitory effect, and CG oil displayed synergy effects of 27.98% ($p < 0.05$) and 22.32% ($p < 0.01$) as to IL-4 and TNF- α , respectively.

The results of the research have confirmed that supercritical carbon dioxide extracted *Chamaecyparis obtusata* oil (C oil) and German chamomile oil (G oil) are worth utilizing in the alternative medicine treatment of AD and that a mixture

of *Chamaecyparis obtusa* and German chamomile oils (CG oil) has a synergy effect. From the results of the research, such utilization is expected the clinical treatment using aromatherapy.

Key Words : Supercritical carbon dioxide extracted *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil, Atopic dermatitis, Mast cell granulation, Antioxidant activity, Antihistamine, Antiinflammatory

I. 서 론

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 알레르기 비염, 기관지 천식과 함께 가장 대표적인 알레르기성 질환으로 지난 수 세기 동안 유아와 청소년에서 꾸준한 증가로 유병률이 2~3배 증가하였다[1, 2]. 산업화가 가속된 선진국에서는 2000년대 접어들면서 유병률이 15~30% 이상이 넘을 정도로 매우 빠른 속도로 증가하고 있다. 성인의 경우에도 매우 빠르게 증가로 2~3% 이상이 고통 받고 있어 인류가 해결해야 할 중요한 난치성 피부질환으로 인식되고 있다[3].

AD는 IgE 합성 증가와 연관된 만성 재발성 염증성 피부 질환으로 유전적, 면역학적, 환경적인 요인 등 다양한 유발요인에 의해 발생한다[4]. 건조증, 비강진, 습진 등의 징후와 가려움, 피부장벽의 손상, IgE 증가 등이 개인에 따라 다양하게 나타난다[5, 6]. 체내에서 단순포진, 특정 미생물에 대한 지연성 면역반응 감소, IgE 증가, 접촉 알러지에 대한 감수성 감소, 항원에 대한 임파구의 반응 감소, 과립구와 단핵구의 화학주성 감소와 같은 현상이 나타난다[6]. 감염, 스트레스, 계절과 기후변화, 자극에 의해 호전과 악화를 반복하고, 가족력을 특징으로 한다[7, 8].

AD를 비롯한 각종 피부염의 초기 증상들은 비만세포에서 분비되는 히스타민에 의해 일어나며 치료를 위해 항히스타민 계열의 약물을 사용하는 것이 일반적으로 [9] 임상적인 약물 치료는 사이토카인을 억제하는 스테로이드제제인 prednisone, dexamethasone, 천연물제제인 cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, 면역억제제인 pimecrolimus 등을 사용한다[10]. 그러나 이러한 방법들은 치료직후는 효과를 나타내나 환경조건이나 환자의 인체상태가 달라질 경우는 아토피 피부염이 재발되고 반복되는 특성을 가지고 있다[11]. 특히 장기간 스테로이드제를 사용할 경우 피부가 위축되거나 성장지연, 혈관확장, 저색소 침착, 백내장, 골다공증, 쿠싱증후군 유발 등의 여러 가지 부작용이 보고되고 있다[12, 13]. 스테로이드가 포함되어 있지 않은 면역억제제인 pimecrolimus를 사용하더라도 피부에 홍반, 가려움, 건조, 부종과 혈중, 짓무름, 태선화 등이 생기며 면역력이 약화되는 단점이 있다[14].

AD와 같은 만성질환에 대한 지속적인 약물치료 부작용에 대한 우려로 인해 대체 의학적 보완요법에 대한 관심이 증가하고 있다. 최근에는 천연추출물을 이용한

치료에 대한 관심이 높아지면서 아토피 피부염의 효과가 있는 식물이나 전통 한약 제제에 대한 효능에 대해 검증 절차도 빠르게 진행되고 있다. 오래 사용하더라도 부작용이 없으면서 효과가 좋고 아토피 증상이 재발되지 않는 근본적인 아토피 치료 약물과 치료방법을 찾아내는 것이 시급한 실정이다. 이러한 흐름 속에서 관심의 대상이 되고 있는 것 중 하나가 아로마테라피의 에센셜 오일이다.

에센셜 오일은 100% 천연 정유(natural essential oil)로 독특한 향기와 치료성분을 가진 휘발성 유기화합물로 알코올, 알데하이드, 에스테르, 케톤, 옥사이드 등을 포함하는 여러 가지 유기화합물로 구성되어 있다. 피부, 순환계, 후각계를 통하여 뇌의 변연계(limbic system)를 자극하며 종류에 따라 불안, 스트레스 해소, 피로 회복, 근육이완, 불면증, 항히스타민 작용, 항알러지 작용, 면역증진 등의 효과를 나타낸다[15]. 이러한 약효성분이 있는 천연 오일을 치료 목적으로 사용하는 것을 아로마테라피라 불리고 있으며 단순한 미용적 효과뿐만 아니라 아토피를 포함한 만성적이고 고질적인 난치성 질환에 까지도 치료 효과가 있다고 보고[16, 17]되고 있다.

편백(*Chamaecyparis obtusa*)은 구과목 측백나무과(Cupressaceae)에 속하며 노송나무라고 한다[18]. 편백 정유는 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있는데 활성산소를 제거하는 항산화효과가 있으며[19, 20], 피부사상균, 목재부후균, 식물 병원균뿐만 아니라 식중독을 야기하는 박테리아에 대한 생장을 억제하는 등 넓은 스펙트럼의 항 미생물 활성을 보이는 것으로 보고되고 있다[21, 22, 23]. 최근에는 편백 정유의 항아토피 피부염 개선효과[24] 및 항염증 효과[25]가 입증되면서 AD의 염증을 악화시키는 활성산소를 억제시키는 천연 항산화 물질로의 편백나무의 활용성에 대한 기대가 높아지고 있다.

저먼 캐모마일 오일(German chamomile oil)은 캐모마일 꽃을 수증기로 증류하여 추출한 것으로 학명은 *Matricaria chamomile*로 사용된다. 유럽에서는 오래 전부터 캐모마일을 항염증제로 사용해 왔으며[17], 최근에 캐모마일의 항염증 효과는 페놀성 화합물(polyphenolic compound)에 연유하는 것으로 알려져 있다[26, 27, 28]. 캐모마일의 페놀성 화합물은 apigenin, quercetin, patuletin, luteolin이 있는데[28], luteolin이 항염 효과에 주요성분으로 알려져 있다[26]. 이 외에도 캐모마일은 진경 및 진정작용[29, 30] 등 다양한 약물 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구는 AD의 염증을 개선시킬 수 있는 소재를 발굴하고자 항염 및 항균작용을 하는 것으로 알려져 있는 편백 초임계 오일(*Chamaecyparis obtusa* oil, C oil)과 저먼 캐모마일 오일(German chamomile oil, G oil) 및 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일(CG oil)을 이용하여 항산화 활성을 검증하기 위한 전자공여능(Electron donating ability, EDA), superoxide dismutase (SOD) 유사활성 및 지질과산화능(Lipid peroxidation activity, LPA)에 미치는 영향과 RBL-2H3 세포를 이용하여 비만세포 탈과립 및 cytokine 생산억제 효과를 조사함으로써 에센셜오일을 이용한 아로마테라피적 측면에서 AD와 염증성 질환들에 대한 증상 개선 및 치료적 접근을 위한 유용성 있는 소재탐색을 위한 일환으로 본 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

A. 재료 및 기기

1. 시약

본 실험에 사용한 오일은 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일, 캐리어 오일인 호호바 오일(Jojoba oil)을 사용하였으며, 편백 초임계 추출 오일은 (재)전남 생물산업진흥원 나노바이오연구센터(전남, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 저먼 캐모마일 오일과 호호바 오일은 G.R. Davis Pty. (Queanbeyan, Australia)의 제품을 구입하여 사용하였다. 또한 비만세포의 일종인 RBL-2H3 세포(rat basophilic leukemia)는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 사용하였으며, 실험에 사용된 시약인 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), L-ascorbic acid, Ethanol (99%), MTT 용액(5.0 mg/mL in DPBS)은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 에센셜 오일의 농도 희석에는 ethanol 99%를 사용하였다.

세포배양에 사용된 10% FBS와 0.05% trypsin-EDTA solution 은 Gibco BRL (Grand NY, USA) 제품을, DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), pyrogallol, linoleic acid, ammonium thiocyanate, ferrous chloride, Compound 48/80, anti-DNP IgE는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Tris-HCl, PBS (pH 7.0), DNP-HSA, Siraganian buffer, substrate buffer는 Biosciences Pharminge Co. (USA) 제품을, 기타 시약은 분석용 등급 이상의 시약을 사용하였다.

2. 기기

CO₂ incubator, 48 well plate (Corning, USA), ELIZA reader는 Biosciences Pharminge Co. (USA), Microplate reader는 Molecular Devices Co. Ltd. (USA)

제품을 well plate는 Corning사 (USA), 원심분리기 등을 사용하였다.

B. 실험 방법

1. 오일성분 및 제조

(1) 시료 오일의 조제

편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일 및 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일(1 : 1)을 100 mL 호호바오일(캐리어 오일)에 25, 50, 75 및 100 μ L의 저장용액을 만들어 차광병에 넣어 냉장소에 보관하였다. 오일의 각 시료액 조제는 100 mL에 에탄올 전체 총액의 1%에 해당하는 1 mL를 넣어 녹인 후 실험에 필요한 오일농도는 저장액을 최종 농도로 희석 후 사용하거나 또는 직접 필요한 농도를 배양액에 첨가 사용하였다.

(2) 시료 오일의 성분

편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일의 주요 성분을 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

Table 1. The component of *Chamaecyparis obtusa* oil extracted by the supercritical carbon dioxide extraction

Chemotype	Compound	Content(%)	Distillation(%)
Monoterpene	sabinene	2.61-5.93	12.40
	β -myrcene	0.70-1.73	6.43
	limonene	1.27-3.10	8.94
	γ -terpinene	0.35-1.01	5.75
	delta-3-carene	0.39-1.20	-
	bornyl-acetate	5.20-7.13	5.21
	α -terpinyl acetate	15.36-19.61	10.77
Sesquiterpene	widdrene	0.26-2.24	0.11
	β -cubebene	0.75-0.99	2.62
	germacrene-D	2.30-4.19	0.40
	cubedol	7.81-12.29	1.84
	elemol	17.76-20.34	13.64
	germacrene-D-4-ol	1.35-4.95	-
	α -cedrol	0.15-0.95	0.15
	γ -eudesmol	0.34-0.78	4.13
beta-eudesmol	1.44-1.72	4.17	
Diterpene	stachen	3.54-15.06	2.44
	totalol	0.58-1.66	0.01
	ferruginol	1.00-3.79	0.02
Lignan	hinokinin	0.68-1.08	-
	asarinin	1.14-2.90	-
	racemic savinin	1.34-2.91	-
Lipid	octadecyl hexadecanoate	0.42-1.94	0.01

Table 2. The component of German chamomile oil

Compound	Content(%)
cis- β -ocimene	0.22
trans- β -ocimene	1.14
artemisia cetone	0.41
trans- β -farnacane	44.71
germacrene D	4.86
trans- α -farnesene	8.88
bisabolol oxyde B	3.51
α -bisabolol	5.86
chamazulene	0.90
bisabolol oxyde A	4.41
the others	25.1

2. 세포배양

비만세포의 일종인 RBL-2H3 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% Antibiotic Antimycotic solution (ABAM, 1X)이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 37°C, 5% 조건에서 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin - EDTA solution를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였으며, 실험과정의 모든 세포는 subculture passages 10이하의 세포를 사용하였으며 80~90%의 배양도를 기준으로 측정하였다.

3. MTT법을 이용한 세포독성 검정

MTT 시약이 살아있는 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 형성하는데, 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로써 이들 용해액의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포의 생존율을 측정하는 대표적인 방법이다[31].

시료에 의한 세포에 미치는 영향은 Mosmann[32]의 MTT 방법을 참고하여 측정하였다. 10% FBS와 1% ABAM (1X)이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 48 well plate (Corning, USA)에 5×10^4 cells/mL의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 시료를 농도별(0, 25, 50, 75 및 100 mg/mL)로 처리하고 24시간 배양한 후 MTT 용액 (5.0 mg/mL in DPBS)을 가하여 4시간 동안 환원반응을 유도하였으며 DMSO를 150 μ L 씩 분주하여 well에 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 평균값과 표준 편차를 구하였다. 대조군에는 시료 대신 phosphate buffered saline (PBS)를 사용하였다.

4. 항산화 활성 측정

(1) 전자공여능(Electron donating ability, EDA) 측정

전자공여능(Electron donating ability, EDA)의 측정은 Blois[33]의 방법을 변형 측정하였다. 에탄올에 녹인 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 DPPH 1 mL를 넣은 후 이를 vortex mixer를 이용하여 10초 동안 교반 후 실온에서 30분 동안 방치한 다음 ELIZA reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. 전자공여능은 시료용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(2) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하며 superoxide 반응성을 억제한다. SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동 산화에 의한 발색을 이용한 Marklund 와 Marklund의 방법으로 측정하였다[34]. 에탄올에 녹인 각 시료용액 0.2 mL에 Tris-HCl의 완충용액(50mM Tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 환원제 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응시켰다 여기에 1N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 멈춘 후 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 $100 - [(시료첨가구/무첨가구 \text{ 흡광도}) \times 100]$ 으로 나타내었다.

(3) 지질과산화능(Lipid peroxidation activity, LPA) 측정

지질과산화능(Lipid peroxidation activity, LPA)의 측정은 Kikuzaki 와 Nakatani [35]의 방법에 따라 에탄올과 시료를 혼합한 용액을 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid 4.1mL에 0.05 M PBS (pH 7.0)를 7.8 mL를 혼합한 후, 40°C의 암소에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 0.1 mL의 반응액을 취하여 30% ammonium thiocyanate 와 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL를 첨가하여 실온에 3분 동안 방치 후 ELIZA reader로 500 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군인 증류수와 비교·분석 하였다. 지질과산화 수치는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

5. 비만세포 탈과립 측정

비만세포에서의 탈과립(degranulation)을 관찰하기 위하여 Jung et al.[36]의 방법에 따라 RBL-2H3 세포 (2×10^5 cells/mL)를 6 well 배양판에서 24시간 동안 배양하고, 여러 농도의 시료 오일을 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 그리고 Compound 48/80 ($50 \mu\text{g/mL}$)을 처리하여 20분 동안 배양하고 현미경을 이용하여 탈과립 정도를 관찰하였다.

6. 히스타민 정량

RBL-2H3 세포(2×10^5 cells/mL)를 24 well plate에 24시간 동안 배양한 후 suction 통해 배지를 제거하고 새 배지를 $160 \mu\text{L}$ 를 분주하였다. RBL-2H3 세포의 히스타민 유리에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 오일을 $25 \mu\text{L}$ 를 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 여기에 Compound 48/80 ($50 \mu\text{g/mL}$)으로 20분간 자극하였다. 히스타민 정량은 세포배양 상층액 $100 \mu\text{L}$ 를 96 well plate에 분주하고 $200 \mu\text{L}$ histamine enzyme assay kit 용액을 첨가하였다[38]. 실온에 30분 동안 방치하고 Microplate reader를 이용하여 450 nm 에서의 흡광도를 측정하였다.

7. β -hexosaminidase release assay

알러지 초기반응의 지표인 탈과립에 대한 억제효과를 살펴보기 위하여 β -hexosaminidase의 분비를 측정하였다[37]. RBL-2H3 세포에 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 48 well plate 에 5×10^5 cells/mL의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (30 ng/mL)로 감작하고 37°C 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl , 5 mM KCl , 0.4 mM MgCl_2 , 25 mM PIPES , 40 mM NaOH , pH 7.2)로 2번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose , 1 mM CaCl_2 와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하고 시료를 각각 $50 \mu\text{L}$, 및 $100 \mu\text{L}$ 로 1시간 동안 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양 한 후 DNP-HSA ($10 \mu\text{g/mL}$)로 처리하여 1시간 동안 반응시키고 ice bath에서

10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 20 μ L를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-p-Nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 80 μ L를 넣고 37°C에서 30분 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 μ L를 첨가하여 반응을 종결시켰다.

Microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 처리군과 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 inhibition(%)를 산출하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - (T - N) / (C - N)] \times 100$$

C: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (-)

T: Cell (+), DNP-HSA (+), test sample (+)

N: Cell (+), DNP-HSA (-), test sample (-)

8. IL-4 and TNF- α secretion assay

RBL-2H3 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 5×10^5 cells/mL의 세포수가 되도록 분주하였다. 그 후 anti-DNP IgE (30ng/mL)로 감작하고 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer로 2번 세척한 다음 각 well 당 5.6 mM glucose, 1mM CaCl₂와 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer를 첨가하였다. 그 후 시료 오일(50, 100 μ L)을 처리하여 1시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 DNP-HSA (10 μ g/ml)를 처리한 후 4시간 동안 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 방치한 후 반응을 종결시켰다. 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4와 TNF- α 를 Microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4와 TNF- α 의 양을 계산하였다

C. 통계 처리

본 실험의 모든 자료는 SPSS 12.0 program에 의하여 처리하였으며 모든 실험 자료값은 mean \pm SD로 나타냈다. Student's t-test에 의하여 통계적 유의성을 비교하였고 p<0.05 미만을 유의한 수준으로 하였다.

III. 결과

A. MTT법을 이용한 세포독성 검정 결과

1. 편백 초임계 추출 오일의 세포독성

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 편백 초임계 추출 오일 농도를 10, 25, 50, 75 및 100 μL 로 처리한 결과를 Table 3에 나타내었다. 세포독성은 대조군 대비 각각 $98.25\pm 4.20\%$, $104.47\pm 3.25\%$, $100.32\pm 2.62\%$, $108.64\pm 4.32\%$ 및 $112.7\pm 3.58\%$ 의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 세포생존 90% 이상의 안전성을 나타내었으며, 특히 100 μL 농도에서는 $112.7\pm 3.58\%$ 로 나타나 유의한($p < 0.01$) 세포 증식효과가 나타났다(Figure 1).

Table 3. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the cell viability of RBL-2H3 cell by MTT assay

<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil(μL)	Cell viability	<i>P</i> value
	% of control	
10	98.25 ± 4.20	
25	$104.47\pm 3.25^*$	$p < 0.05$
50	$100.32\pm 2.62^{**}$	$p < 0.01$
75	$108.64\pm 4.32^{**}$	$p < 0.01$
100	$112.70\pm 3.58^{**}$	$p < 0.01$

The date indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

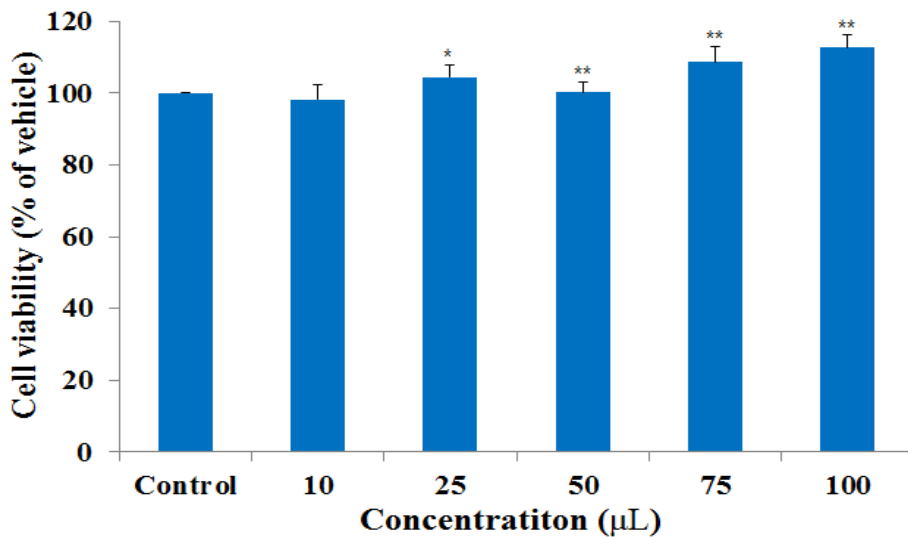


Figure 1. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the cell viability of RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^4 cells/mL) were treated with the indicated concentrations (10, 25, 50, 75 and 100 µL) of *Chamaecyparis obtusa* oil for 24 hr. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. The absorbance was measured at 570 nm using ELISA reader. The results were presented by the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs untreated group.

2. 저먼 캐모마일 오일의 세포독성

RBL-2H3 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 저먼 캐모마일 오일 농도를 10, 25, 50, 75 및 100 μ L로 처리한 결과를 Table 4에 나타내었다. 세포독성은 대조군 대비 각각 98.32 \pm 2.45%, 98.02 \pm 4.04%, 98.75 \pm 4.20%, 96.54 \pm 3.76% 및 95.7 \pm 2.25%의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 세포생존 90% 이상(p <0.05)의 안전성을 나타내었다(Figure 2).

Table 4. Effects of German chamomile oil on the cell viability of RBL-2H3 cell by MTT assay

German chamomile oil(μ L)	Cell viability	<i>P</i> value
	% of control	
10	98.32 \pm 2.45*	p <0.05
25	98.02 \pm 4.04	
50	98.75 \pm 4.20**	p <0.01
75	96.54 \pm 3.76**	p <0.01
100	95.70 \pm 2.25**	p <0.01

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * p <0.05, ** p <0.01

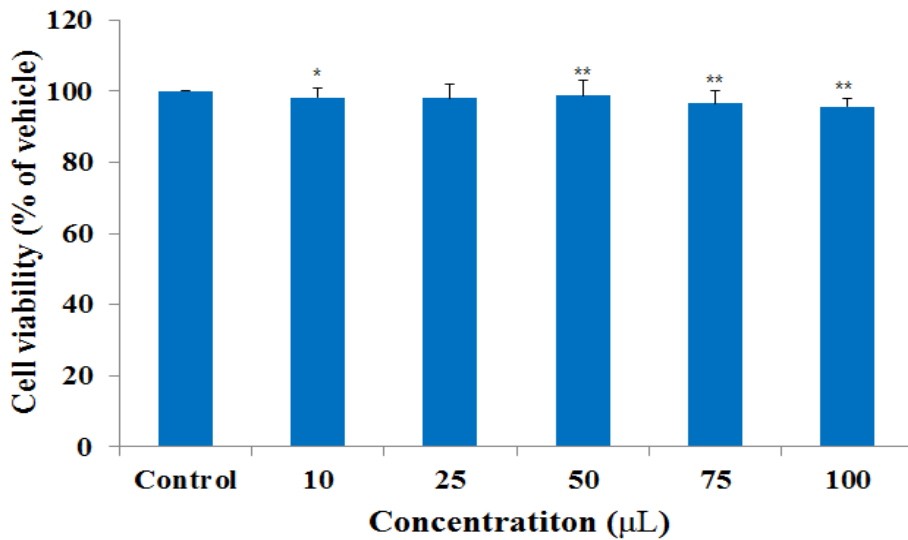


Figure 2. Effects of German chamomile oil on the cell viability of RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^4 cells/mL) were treated with the indicated concentrations (10, 25, 50, 75 and 100 µL) of German chamomile oil for 24 hr. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. The absorbance was measured at 570 nm using ELISA reader. The results were presented by the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs untreated group.

B. 항산화 활성 측정

아토피 피부염을 악화시키는 원인이 되는 활성산소와 같은 산화 스트레스 물질에 대한 항산화 효능을 알아보기 위해 항산화 효능 측정기준으로 사용되고 있는 전자공여능, SOD 유사활성 효과 및 지질과산화능에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 전자공여능(EDA) 측정

(1) 편백 초임계 추출 오일의 전자공여능 측정

편백 초임계 추출 오일의 EDA를 알아보기 위하여 각각 25, 50, 75, 100 uL가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 5에 나타내었다.

EDA는 대조군 대비 각각 $17.8 \pm 2.5\%$ ($p < 0.05$), $39.9 \pm 3.9\%$ ($p < 0.05$), $57.8 \pm 3.5\%$ ($p < 0.01$), $82.7 \pm 5.8\%$ ($p < 0.001$)로 나타났으며 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 3).

Table 5. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa* oil

<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil(uL)	Electron donating ability	P value
	% of control	
25	$17.8(0.29 \pm 0.06)^*$	$p < 0.05$
50	$39.9(0.67 \pm 0.04)^*$	$p < 0.05$
75	$57.8(0.97 \pm 0.19)^{**}$	$p < 0.01$
100	$82.7(1.39 \pm 0.15)^{***}$	$p < 0.001$

The date indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

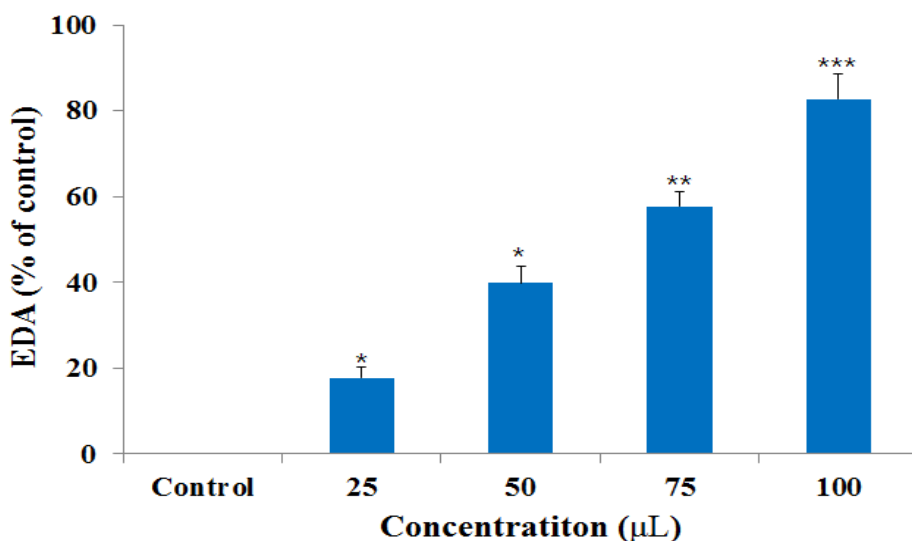


Figure 3. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil).

Initially, 2 mL of ethanol sample solutions containing 25, 50, 75 and 100 µL of C oil was added to 1 mL of 0.2 mM DPPH and was left to stand for 30 min. Then, the absorbance at 517 nm was measured, and the decreasing absorbance rates of the oil-treated groups and control group were expressed as percentages. The C oil showed statistically significant increases compared with those of the control group, with 100 µL treatment in particular leading to a higher statistically significant increase. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. EDA, electron donating ability; C oil, *Chamaecyparis obtusa* oil; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; M±SD, mean±standard deviation.

(2) 저면 캐모마일 오일의 전자공여능 측정

저면 캐모마일 오일의 EDA를 알아보기 위하여 각각 25, 50, 75, 100 uL가 각각 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 6에 나타내었다.

EDA는 대조군 대비 각각 14.8±2.8% ($p<0.01$), 33.0±3.6% ($p<0.05$), 53.7±5.4% ($p<0.01$), 72.8±4.7% ($p<0.01$)로 나타났으며 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 4).

Table 6. The electron donating ability of German chamomile oil

German chamomile oil(uL)	Electron donating ability	<i>P</i> value
	% of control	
25	14.8(0.20±0.06)**	$p<0.01$
50	33.0(0.45±0.07)*	$p<0.05$
75	53.7(0.73±0.11)**	$p<0.01$
100	72.8(0.99±0.08)**	$p<0.01$

The date indicates the mean±SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

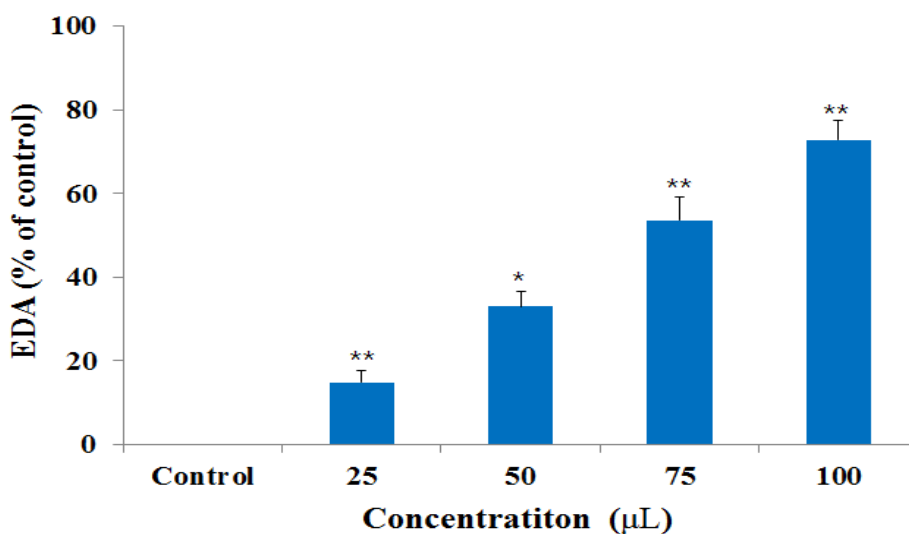


Figure 4. The electron donating ability of German chamomile oil (G oil).

Initially, 2 mL of ethanol sample solutions containing 25, 50, 75 and 100 µL of G oil was added to 1 mL of 0.2 mM DPPH and was left to stand for 30 min. Then, the absorbance at 517 nm was measured, and the decreasing absorbance rates of the oil-treated groups and control group were expressed as percentages. The G oil showed statistically significant increases compared with those of the control group, with 100 µL treatment in particular leading to a higher statistically significant increase. The data are shown as the $M \pm SD$ for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. EDA, electron donating ability; G oil, German chamomile oil; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; $M \pm SD$, mean \pm standard deviation.

(3) 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일의 전자공여능 측정

편백 초임계-저먼 캐모마일 오일의 EDA를 알아보기 위하여 각각 25, 50, 75, 100 uL가 각각 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 7에 나타내었다. EDA는 대조군 대비 각각 20.4±3.7% ($p<0.05$), 44.4±5.3% ($p<0.05$), 70.6±4.3% ($p<0.01$), 92.3±5.8% ($p<0.001$)로 나타났으며 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 5).

Table 7. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil

<i>Chamaecyparis obtusa</i> - German chamomile oil(uL)	Electron donating ability	P value
	% of control	
25	20.4(0.29±0.06)*	$p<0.05$
50	44.4(0.63±0.06)*	$p<0.05$
75	70.6(0.87±0.06)**	$p<0.01$
100	92.3(1.27±0.06)***	$p<0.001$

The date indicates the mean±SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

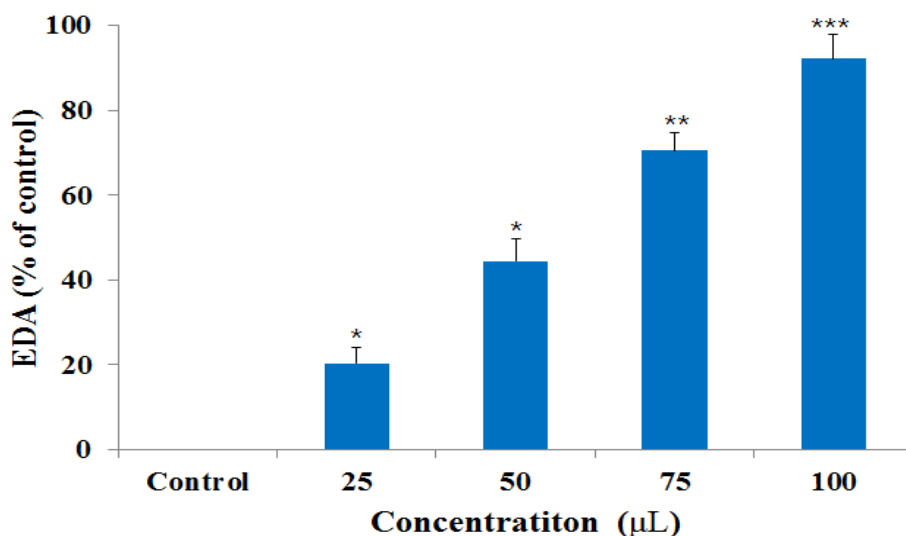


Figure 5. The electron donating ability of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil).

Initially, 2 mL of ethanol sample solutions containing 25, 50, 75 and 100 µL of CG oil was added to 1 mL of 0.2 mM DPPH and was left to stand for 30 min. Then, the absorbance at 517 nm was measured, and the decreasing absorbance rates of the oil-treated groups and control group were expressed as percentages. The CG oil showed statistically significant increases compared with those of the control group, with 100 µL treatment in particular leading to a higher statistically significant increase. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. EDA, electron donating ability; CG oil, *Chamaecyparis obtusa* oil-German chamomile oil; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; M±SD, mean±standard deviation.

2. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

(1) 편백 초임계 추출 오일의 SOD 유사활성 측정

편백 초임계 추출 오일의 SOD 유사활성을 알아보기 위하여 각각 25, 50, 75 및 100 μ L가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 8에 나타내었다.

SOD 유사활성은 대조군 대비 각각 $14.8 \pm 1.4\%$ ($p < 0.05$), $18.3 \pm 2.3\%$ ($p < 0.05$), $40.0 \pm 3.8\%$ ($p < 0.01$), $79.1 \pm 1.9\%$ ($p < 0.001$)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 6).

Table 8. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa* oil

<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil(μ L)	Superoxide dismutase	<i>P</i> value
	like activity % of control	
25	$14.8(0.17 \pm 0.007)^*$	$p < 0.05$
50	$18.3(0.21 \pm 0.007)^*$	$p < 0.05$
75	$40.0(0.46 \pm 0.007)^{**}$	$p < 0.01$
100	$79.1(0.91 \pm 0.007)^{***}$	$p < 0.001$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

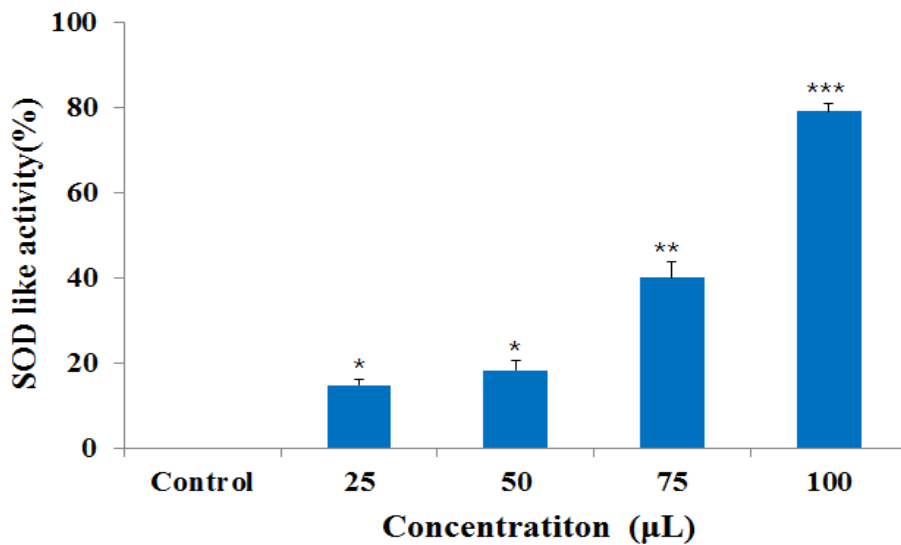


Figure 6. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil).

Chamaecyparis obtusa oil were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 mL. and 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL. for 10 min 25°C and SOD like activity determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 mL of 1N HCl. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. SOD, superoxide dismutase; C oil, *Chamaecyparis obtusa* oil; M±SD, mean±standard deviation.

(2) 저면 캐모마일 오일의 SOD 유사활성 측정

저면 캐모마일 오일의 SOD 유사활성을 측정한 결과 25, 50, 75 및 100 μ L가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 9에 나타내었다.

SOD 유사활성은 대조군 대비 각각 $9.5 \pm 0.9\%$ ($p < 0.05$), $13.6 \pm 1.2\%$ ($p < 0.05$), $34.8 \pm 2.7\%$ ($p < 0.01$), $62.1 \pm 3.9\%$ ($p < 0.001$)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 7).

Table 9. The superoxide dismutase like activity of German chamomile oil

German chamomile oil(μ L)	Superoxide dismutase	<i>P</i> value
	like activity % of control	
25	9.5 (0.04 \pm 0.007)*	$p < 0.05$
50	13.6 (0.09 \pm 0.007)*	$p < 0.05$
75	34.8 (0.23 \pm 0.007)**	$p < 0.01$
100	62.1 (0.41 \pm 0.007)***	$p < 0.001$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

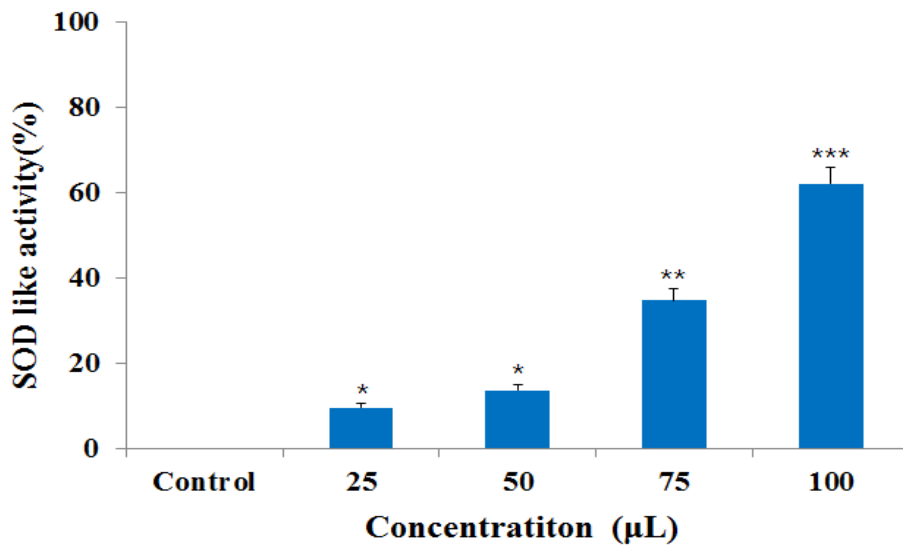


Figure 7. The superoxide dismutase like activity of German chamomile oil (G oil).

German chamomile oil were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 mL and 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL for 10 min 25°C and SOD like activity determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 mL of 1N HCl. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. SOD, superoxide dismutase; G oil, German chamomile oil; M±SD, mean±standard deviation.

(3) 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일의 SOD 유사활성 측정

편백 초임계-저먼 캐모마일 오일의 SOD 유사활성을 알아보기 위하여 각각 25, 50, 75 및 100 μL 가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 10에 나타내었다. SOD 유사활성은 대조군 대비 각각 $11.3 \pm 1.5\%$ ($p < 0.05$), $21.2 \pm 2.8\%$ ($p < 0.01$), $45.0 \pm 3.1\%$ ($p < 0.001$), $91.0 \pm 2.9\%$ ($p < 0.001$)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 8).

Table 10. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil

<i>Chamaecyparis obtusa</i> - German chamomile oil(μL)	Superoxide dismutase like activity	<i>P</i> value
	% of control	
25	11.3 (0.09 \pm 0.007)*	$p < 0.05$
50	21.2 (0.17 \pm 0.011)**	$p < 0.05$
75	45.0 (0.36 \pm 0.024)***	$p < 0.001$
100	91.0 (0.67 \pm 0.042)***	$p < 0.001$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

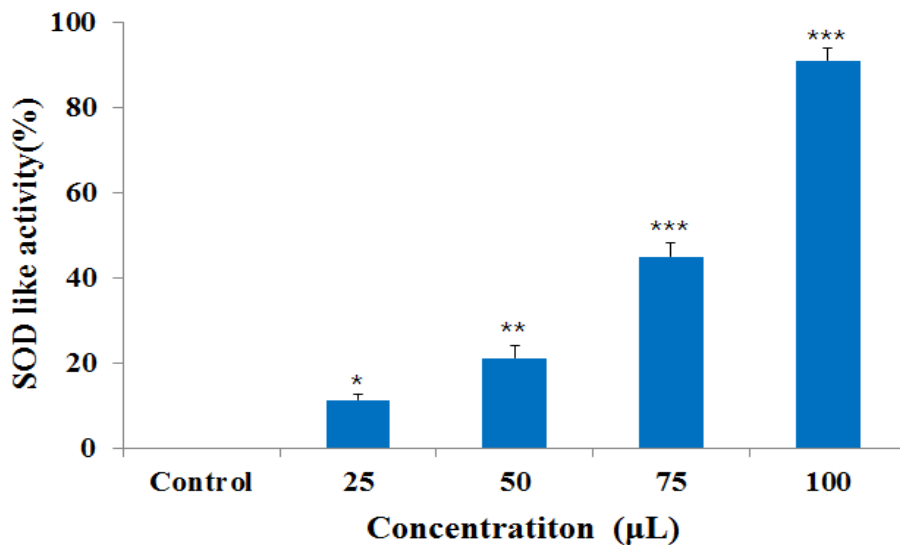


Figure 8. The superoxide dismutase like activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil).

Chamaecyparis obtusa-German chamomile oil were reacted with tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 mL and 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL for 10 min 25°C and SOD like activity determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 mL of 1N HCl. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. SOD, superoxide dismutase; CG oil, *Chamaecyparis obtusa* oil-German chamomile; M±SD, mean±standard deviation.

3. 지질과산화능(LPA) 측정

(1) 편백 초임계 추출 오일의 지질과산화능 측정

편백 초임계 추출 오일의 LPA를 조사하기 위하여 각각 25, 50, 75, 100 μL 가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 11에 나타내었다.

LPA는 대조군 대비 각각 $69.4 \pm 3.9\%$ ($p < 0.01$), $75.3 \pm 2.7\%$ ($p < 0.01$), 85.8 ± 4.6 ($p < 0.001$), $92.6 \pm 5.4\%$ ($p < 0.01$)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 9).

Table 11. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa* oil

<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil(μL)	Lipid peroxidation activity	<i>P</i> value
	% of control	
25	69.4 (0.522 \pm 0.17)**	$p < 0.01$
50	75.3 (0.566 \pm 0.14)**	$p < 0.01$
75	85.8 (0.645 \pm 0.18)***	$p < 0.001$
100	92.6 (0.696 \pm 0.32)**	$p < 0.01$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

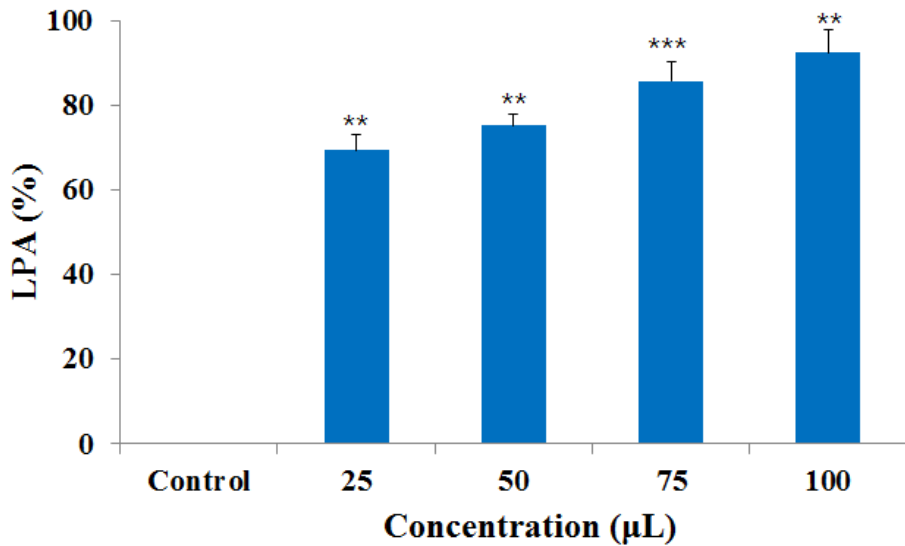


Figure 9. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil).

The activity of *Chamaecyparis obtusa* oil was assessed at concentrations of 25, 50, 75 and 100 uL. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. LPA, lipid peroxidation activity; C oil, *Chamaecyparis obtusa* oil; M±SD, mean±standard deviation.

(2) 저먼 캐모마일 오일의 지질과산화능 측정

저먼 캐모마일 오일의 LPA를 조사하기 위하여 각각 25, 50, 75, 100 μ L가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 12에 나타내었다.

LPA는 대조군 대비 각각 $61.6 \pm 3.2\%$ ($p < 0.01$), $68.4 \pm 4.8\%$ ($p < 0.01$), $78.8 \pm 5.7\%$ ($p < 0.01$), $80.5 \pm 3.8\%$ ($p < 0.01$)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 10).

Table 12. The lipid peroxidation activity of German chamomile oil

German chamomile oil(μ L)	Lipid peroxidation activity	<i>P</i> value
	% of control	
25	61.6 (0.462 \pm 0.07)**	$p < 0.01$
50	68.4 (0.514 \pm 0.09)**	$p < 0.01$
75	78.8 (0.592 \pm 0.11)**	$p < 0.01$
100	80.5 (0.605 \pm 0.22)**	$p < 0.01$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. ** $p < 0.01$.

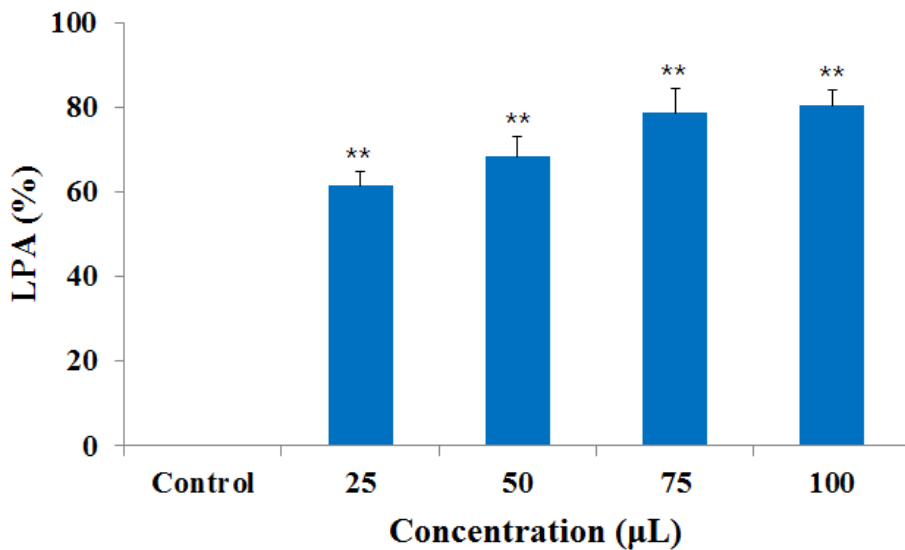


Figure 10. The lipid peroxidation activity of German chamomile oil (G oil). The activity of German chamomile oil was assessed at concentrations of 25, 50, 75 and 100 uL. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as $^{**}p < 0.01$. LPA, lipid peroxidation activity; G oil, German chamomile oil; M±SD, mean±standard deviation

(3) 편백 초임계-저면 캐모마일 오일의 지질과산화능 측정

편백 초임계-저면 캐모마일 오일의 LPA를 조사하기 위하여 각각 25, 50, 75, 100 μL 가 포함된 에탄올 시료를 분석한 결과를 Table 13에 나타내었다. LPA는 대조군 대비 각각 $72.2 \pm 4.2\%$, $84.4 \pm 3.6\%$ ($p < 0.01$), $88.3 \pm 5.3\%$ ($p < 0.05$), $97.9 \pm 2.8\%$ ($p < 0.001$)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 11).

Table 13. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil

<i>Chamaecyparis obtusa</i> - German chamomile oil(μL)	Lipid peroxidation activity	<i>P</i> value
	% of control	
25	72.2 (0.543 \pm 0.19)	
50	84.4 (0.635 \pm 0.17)**	$p < 0.01$
75	88.3 (0.664 \pm 0.21)*	$p < 0.05$
100	97.9 (0.736 \pm 0.17)***	$p < 0.001$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

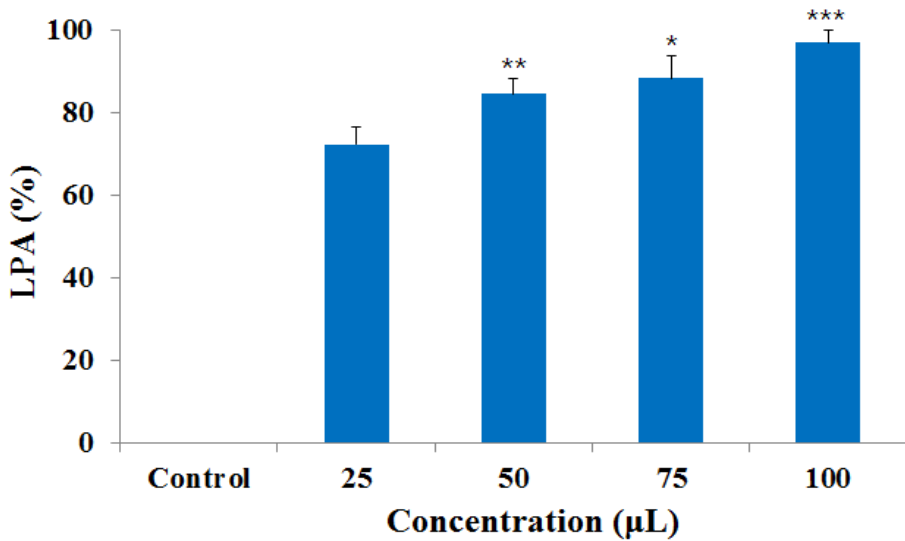


Figure 11. The lipid peroxidation activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil).

The activity of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil was assessed at concentrations of 25, 50, 75 and 100 µL. The data are shown as the M±SD for triplicate experiments, with the significance of the difference from the control given as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. LPA, lipid peroxidation activity; CG oil, *Chamaecyparis obtusa* oil-German chamomile; M±SD, mean±standard deviation.

C. 비만세포 탈과립

1. 히스타민 유리 억제 효과

RBL-2H3 세포를 Compound 48/80으로 자극시키면 히스타민과립은 세포내부에 서 외부로 이탈한 히스타민의 양을 측정 한 결과를 Table 14에 나타내었다. 대조군 의 히스타민 방출량 100% (16.37±0.027)을 기준하여 25 µL가 포함된 편백 초임계 추출 오일, 저먼 캐모마일 오일, 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일로 처리 시 각각 50.88±4.2%, 62.0±3.6%, 33.10±4.8%로 나타났다(Figure 12). 무처리 세포의 히스타민 과립양은 0.23±0.014 ppm 이었다.

Table 14. The histamine secretory volume of the RBL-2H3 cell within extracts treatment

	Treatment of cell	Absorbance	Histamine (ppm)	P value
			% of control	
	Control (C48/80)	1.377	100(16.37±0.027)	
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil	1.287	50.88(8.33±0.021)*	p<0.05
Compound 48/80	German chamomile oil	1.261	62.0(10.15±0.032)**	p<0.01
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> -German chamomile oil	0.757	33.10(5.42±0.021)**	p<0.01

The data indicates the mean±SD for triplicate experiments and significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01

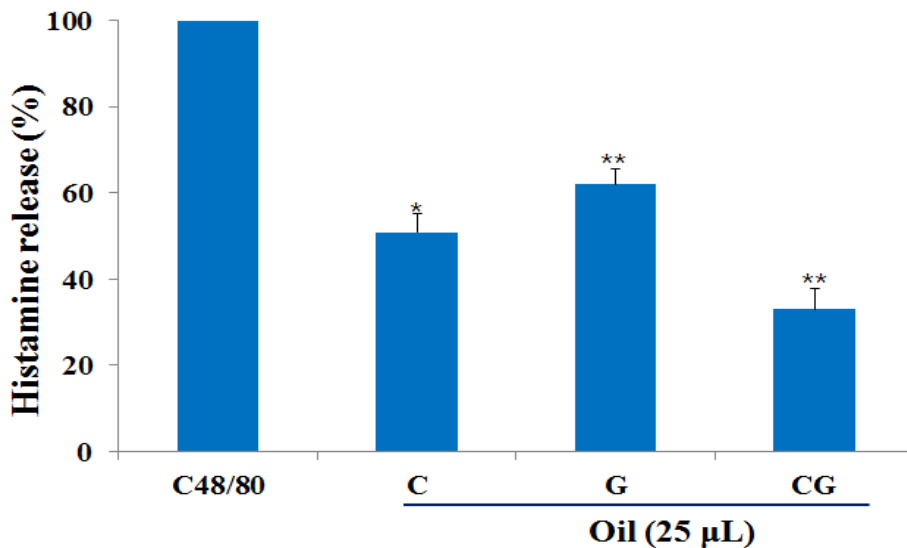


Figure 12. Inhibitory effects of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil against histamine release from RBL-2H3 cells.

Mast cells (3×10^4 cell/mL, 100 μ L) were incubated for 24 hr in CO₂ incubator and then pre-treated 25 μ L of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (final concentration 0.5 mg/ml) for 15 min. Supernatants were collected, freeze-dried, and resuspended with 100 μ L of PBS. Histamine were measured by competitive ELISA methods. The data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. * p <0.05 versus Control; ** p <0.01 versus compound 48/80 only group.

2. β -hexosaminidase 분비에 미치는 영향

항원-항체 결합단계에서 β -hexosaminidase 분비량을 측정한 결과를 Table 15에 나타내었다. 50 μ L 농도에서 편백 초임계 추출 오일, 저먼 캐모마일 오일, 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일에서 각각 $50.29 \pm 8.50\%$ ($p < 0.05$), $43.42 \pm 4.50\%$ ($p < 0.01$), $40.19 \pm 5.50\%$ ($p < 0.05$)로 나타났으며, 100 μ L 농도에서 각각 $50.36 \pm 6.06\%$ ($p < 0.05$), $41.28 \pm 6.06\%$ ($p < 0.05$), $38.39 \pm 6.10\%$ ($p < 0.01$)로 나타났다(Figure 13). 이는 모든 농도에서 유의성 있는 효과를 나타내었다.

Table 15. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on β -Hexosaminidase release of RBL-2H3 cells

	β -Hexosaminidase release % of control	
	50(μ L)	100(μ L)
<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil	$50.29 \pm 8.50^*$	$50.36 \pm 6.06^*$
German chamomile oil	$43.42 \pm 4.50^{**}$	$41.28 \pm 6.06^*$
<i>Chamaecyparis obtusa</i> - German chamomile oil	$40.19 \pm 5.50^*$	$38.39 \pm 6.10^{**}$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

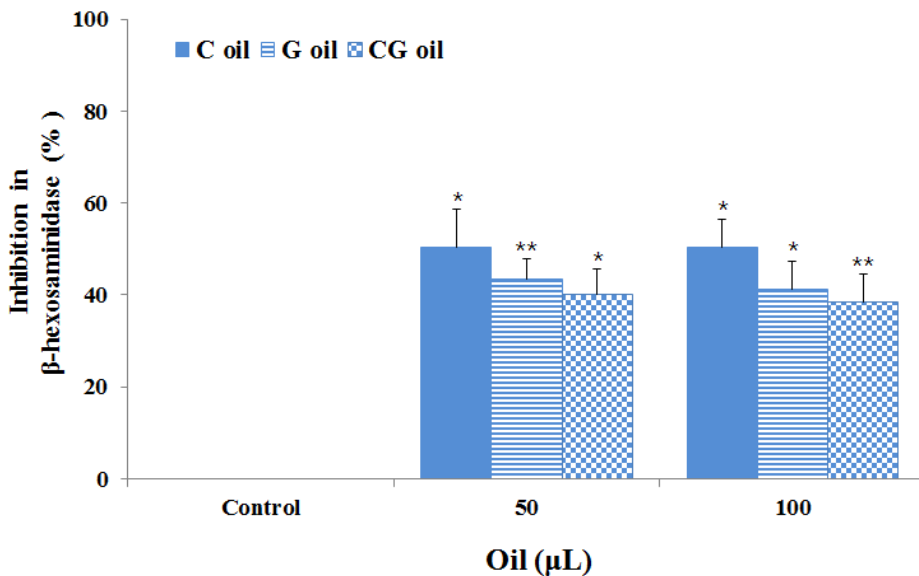


Figure 13. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil, German chamomile oil and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on β -Hexosaminidase release of RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with IgE (30 ng/mL) overnight and treated with *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil), German chamomile oil (G oil) and *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil) (50 and 100 μ L) for 1 hr prior to their DNP-HSA stimulation. The absorbance was measured with a microplate reader at 405 nm. Results represent as the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs stimulated group.

D. Cytokine 생산에 미치는 영향

1. IL-4 생성량에 미치는 영향

RBL-2H3 세포에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.32 ± 0.10 pg/mL이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 10.08 ± 0.76 pg/mL로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다.

(1) 편백 초임계 추출 오일

편백 초임계 추출 오일을 50, 100 μ L 농도별로 처리한 RBL-2H3 세포에서 분비된 IL-4의 양을 Table 16에 나타내었다. IL-4의 양은 항원으로 자극한 세포 대비 각각 5.42 ± 0.26 pg/mL, 3.98 ± 0.34 pg/mL로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Figure 14).

Table 16. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the production of IL-4 cytokine

<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil(μ L)	IL-4 cytokine (pg/mL)	P value
	% of control	
anti-DNP IgE	100 (10.08 ± 0.76)	
50	53.76 (5.42 ± 0.26)*	$p < 0.05$
100	39.48 (3.98 ± 0.34)*	$p < 0.05$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$

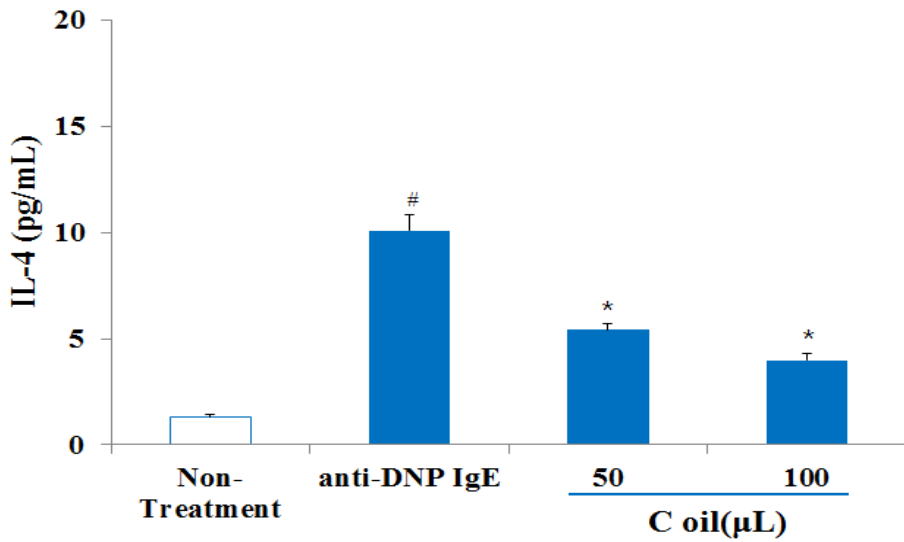


Figure 14. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil) on the production of IL-4 cytokine in RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/mL) for 24 hr and stimulated by DNP-HSA (10 μ g/mL). C oil (50 and 100 μ L) was pretreated for 1 hr prior to DNP-HSA stimulation for 4 hr. IL-4 concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. # $p < 0.05$ vs vehicle group, * $p < 0.05$ vs stimulated group.

(2) 저먼 캐모마일 오일

저먼 캐모마일 오일을 50, 100 μL 농도별로 처리한 RBL-2H3 세포에서 분비된 IL-4의 양을 Table 17에 나타내었다. IL-4의 양은 항원으로 자극한 세포 대비 각각 6.38 ± 0.35 pg/mL, 4.25 ± 0.48 pg/mL로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Figure 15).

Table 17. Effects of German chamomile oil on the production of IL-4 cytokine

German chamomile oil(μL)	IL-4 cytokine (pg/mL)	P value
	% of control	
anti-DNP IgE	100 (10.08 \pm 0.102)	
50	63.29 (6.38 \pm 0.35)*	$p < 0.05$
100	42.16 (4.25 \pm 0.48)*	$p < 0.05$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$

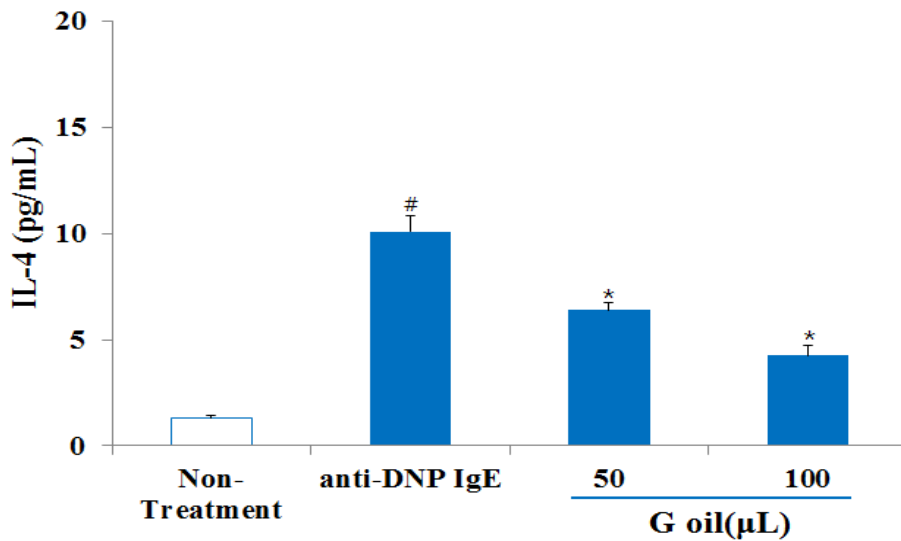


Figure 15. Effects of German chamomile oil (G oil) on the production of IL-4 cytokine in RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/mL) for 24 hr and stimulated by DNP-HSA (10 μ g/mL). G oil (50 and 100 μ L) was pretreated for 1 hr prior to DNP-HSA stimulation for 4 hr. IL-4 concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. # $p < 0.05$ vs vehicle group, * $p < 0.05$ vs stimulated group.

(3) 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일

편백 초임계-저먼 캐모마일 오일을 50, 100 μL 농도별로 처리한 RBL-2H3 세포에서 분비된 IL-4의 양을 Table 18에 나타내었다. IL-4의 양은 항원으로 자극한 세포 대비 각각 3.96 ± 0.19 pg/mL, 2.82 ± 0.15 pg/mL로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Figure 16).

Table 18. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on the production of IL-4 cytokine

<i>Chamaecyparis obtusa</i> - German chamomile oil(μL)	IL-4 cytokine (pg/mL)	<i>P</i> value
	% of control	
anti-DNP IgE	100 (10.08 ± 0.102)	
50	39.29 (3.96 ± 0.19)*	$p < 0.05$
100	27.98 (2.82 ± 0.15)*	$p < 0.05$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$

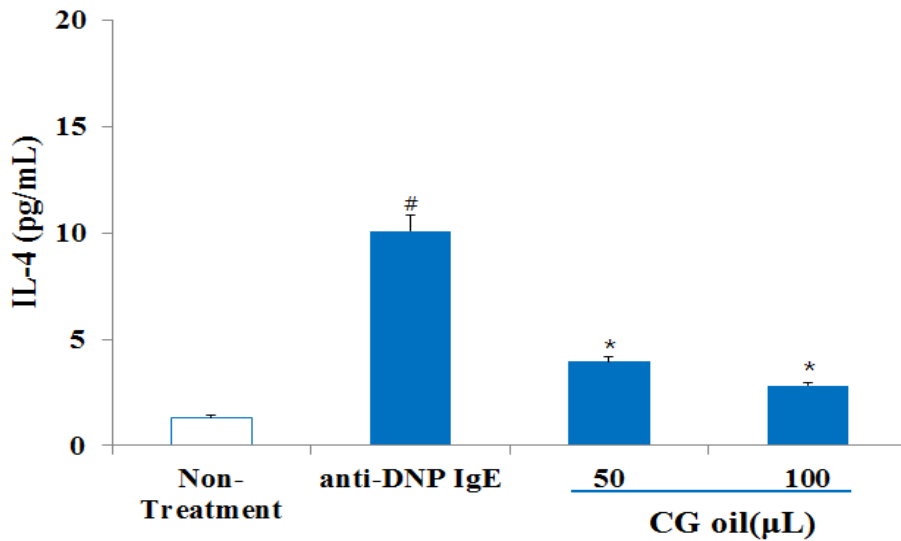


Figure 16. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil) on the production of IL-4 cytokine in RBL-2H3 cells. The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/mL) for 24 hr and stimulated by DNP-HSA (10 μ g/mL). CG oil (50 and 100 μ L) was pretreated for 1 hr prior to DNP-HSA stimulation for 4 hr. IL-4 concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. # $p < 0.05$ vs vehicle group, * $p < 0.05$ vs stimulated group.

2. TNF- α 생성량에 미치는 영향

RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 16.03 ± 0.78 pg/mL이었으며, 항원으로 자극한 세포에서 35.04 ± 0.71 pg/mL로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다.

(1) 편백 초임계 추출 오일

편백 초임계 추출 오일을 50 및 100 μ L 농도별로 처리한 RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양을 Table 19에 나타내었다. TNF- α 의 양은 항원으로 자극한 세포대비 각각 29.94 ± 0.53 pg/mL, 25.27 ± 1.24 pg/mL로 나타나 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였다(Figure 17).

Table 19. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on the production of TNF- α cytokine

<i>Chamaecyparis obtusa</i> oil(μ L)	TNF- α (pg/mL)	P value
	% of control	
anti-DNP IgE	100 (35.04 ± 0.81)	
50	65.47 (29.94 ± 0.53)**	$p < 0.01$
100	29.33 (25.27 ± 1.24)**	$p < 0.01$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. ** $p < 0.01$

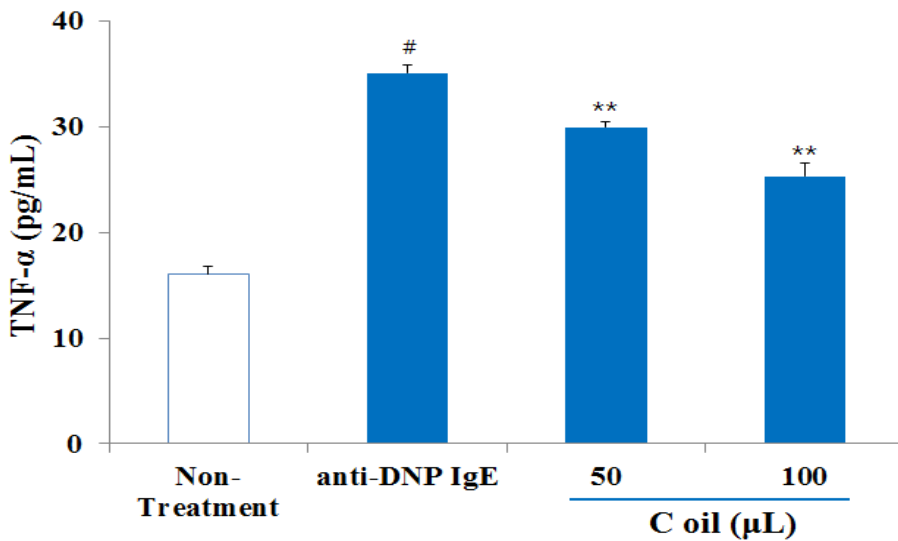


Figure 17. Effects of *Chamaecyparis obtusa* oil (C oil) on the production of TNF- α cytokine in RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/mL) for 24 hr and stimulated by DNP-HSA (10 μ g/mL). C oil (50 and 100 μ L) was pretreated for 1 hr prior to DNP-HSA stimulation for 4 hr. TNF- α concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. # $p < 0.05$ vs vehicle group, ** $p < 0.01$ vs stimulated group.

(2) 저면 캐모마일 오일

저면 캐모마일 오일을 50 및 100 μL 농도별로 처리한 RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양을 Table 20에 나타내었다. TNF- α 의 양은 항원으로 자극한 세포대비 각각 30.28 ± 1.37 pg/mL, 27.45 ± 1.15 pg/mL로 나타나 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였다(Figure 18).

Table 20. Effects of German chamomile oil on the production of TNF- α cytokine

German chamomile oil(μL)	TNF- α (pg/mL)	<i>P</i> value
	% of control	
anti-DNP IgE	100 (35.04 ± 0.81)	
50	69.32 (30.28 ± 1.37)**	$p < 0.01$
100	32.25 (27.45 ± 1.15)**	$p < 0.01$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. ** $p < 0.01$

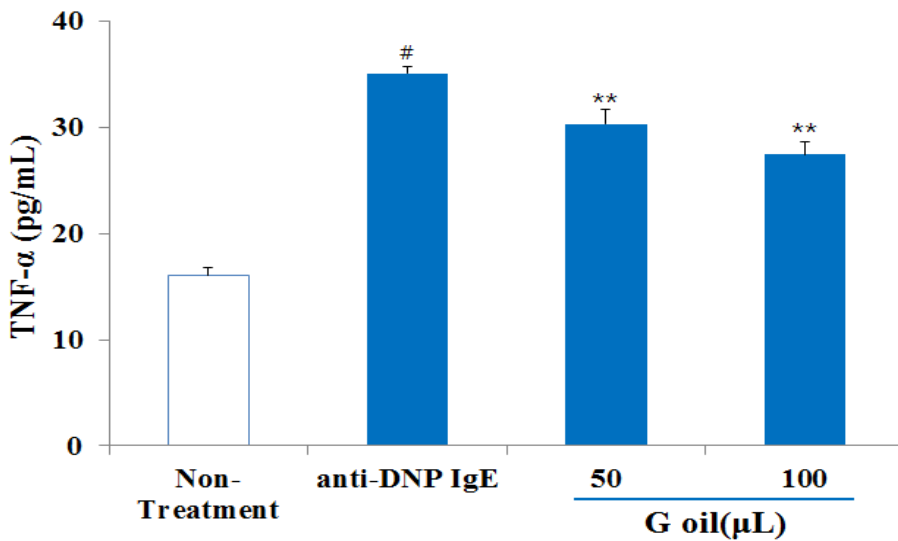


Figure 18. Effects of German chamomile oil (G oil) on the production of TNF- α cytokine in RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/mL) for 24 hr and stimulated by DNP-HSA (10 μ g/mL). G oil (50 and 100 μ L) was pretreated for 1 hr prior to DNP-HSA stimulation for 4 hr. TNF- α concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. # $p < 0.05$ vs vehicle group, ** $p < 0.01$ vs stimulated group.

(3) 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일

편백 초임계-저먼 캐모마일 오일을 50 및 100 μL 농도별로 처리한 RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양을 Table 21에 나타내었다. TNF- α 의 양은 항원으로 자극한 세포대비 각각 23.21 ± 0.42 pg/mL, 18.73 ± 1.15 pg/mL로 항원으로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였다(Figure 19).

Table 21. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil on the production of TNF- α cytokine

<i>Chamaecyparis obtusa</i> - German chamomile oil(μL)	TNF- α (pg/mL)	<i>P</i> value
	% of control	
anti-DNP IgE	100 (35.04 ± 0.81)	
50	60.53 (23.21 ± 0.42)**	$p < 0.01$
100	22.32 (18.73 ± 1.15)**	$p < 0.01$

The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. ** $p < 0.01$

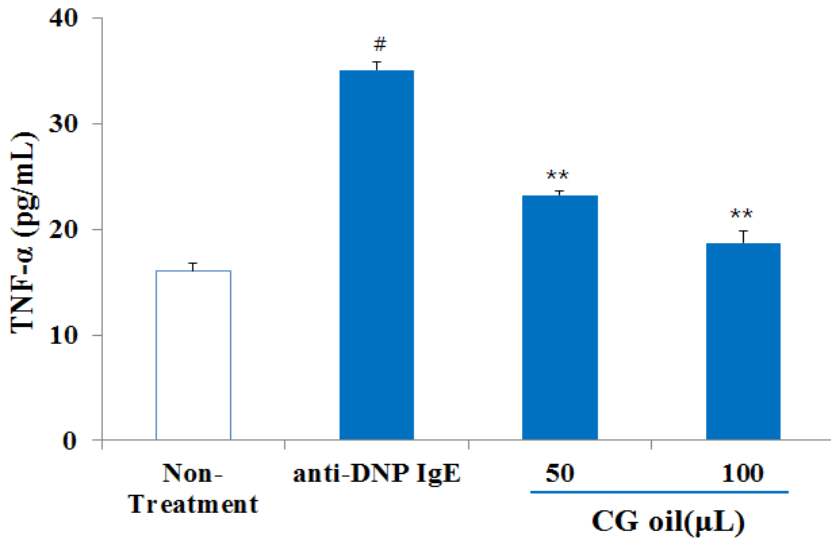


Figure 19. Effects of *Chamaecyparis obtusa*-German chamomile oil (CG oil) on the production of TNF- α cytokine in RBL-2H3 cells.

The cells (5×10^5 cells/mL) were sensitized with anti-DNP IgE (30 ng/mL) for 24 hr and stimulated by DNP-HSA (10 μ g/mL). CG oil (50 and 100 μ L) was pretreated for 1 hr prior to DNP-HSA stimulation for 4 hr. TNF- α concentration was measured from cell supernatant using ELISA method. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. Results represent as the mean \pm SD. # p <0.05 vs vehicle group, ** p <0.01 vs stimulated group.

IV. 고 찰

아토피성 피부염은 알레르기성 비염, 천식과 함께 대표적인 아토피성 질환으로서 알레르기성 습진, 소아 습진, 굴절부 습진, 범발 신경 피부염 등으로 불리기도 한다 [39]. 아토피성 피부염은 비정상적인 피부혈관 반응이나 면역학적 반응을 동반하고 홍반, 부종, 심한소양증, 삼출, 부스럼 딱지와 인설(鱗屑)을 특징으로 한다[40]. 염증 세포의 침윤이 특징인 만성 소양성 염증 피부질환[41]으로 환경 및 생활방식 요인과 화약제품 사용의 증가가 아토피성 피부염의 발병 증가 원인으로 알려져 있다 [42]. 아토피성 피부염의 초기반응은 항원의 자극에 의해 항체 IgE가 생산된 후 항체가 비만세포 표면의 high affinity receptor에 결합하였을 때 항원이 재침입하면 수용체와 결합하고 있는 항체와 결합하여 비만세포 내로 신호를 빠르게 전달하여 알레르기를 일으키는 화학적 매개물질(cytokine, histamine, leukotrienes)을 분비하여 염증과 가려움증을 나타낸다[43]. 최근 활성산소(ROS)가 아토피 피부염의 유발요인의 하나로 알려지면서 아토피 피부염과 ROS간의 상호작용을 밝히려는 연구가 시도되고 있다[44]. ROS는 체내의 신호전달 체계를 망가뜨리고 노화촉진, 암, 관절염, 에이즈, 피부질환, 피부주름, 색소침착, 여드름, 아토피 등 생리적인 항상성이 깨지면서 면역력과 저항력을 떨어뜨리는 등 신체와 피부에 문제를 일으키게 된다[45]. 아토피 피부염 환자의 각질층에는 활성산소에 의해 손상된 단백질들이 정상인에 비해 크게 증가되며, SOD의 활성도가 크게 감소해 있다는 연구결과가 있다[46].

본 연구에서는 허브에서 추출한 에센셜 오일에서 항히스타민 작용, 항알러지 작용, 면역증진 등에 유효한 효능이 있다고 밝혀져 있는[15], 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일에 대하여 AD의 치료적 대체물질로 활용 가능성을 연구하였다.

먼저 RBL-2H3 세포에 대하여 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일의 10 uL에서 부터 100 uL의 농도에서 MTT-assay로 세포에 대한 안전성을 검증한 결과 농도 범위 내에서 세포 독성이 나타나지 않았다.

한편 항산화능력의 조사에 있어서 전자공여능(EDA), SOD 유사활성, 지질과산화능(LPA)의 측정결과는 편백 초임계 추출 오일, 저먼 캐모마일 오일 및 편백 초임계-

저먼 캐모마일 혼합오일 모두에서 대조군 대비 유의한 증가를 나타냈으며, 농도에 비례하여 증가하였다. 특히 100 μ L의 처리의 경우 매우 유의한 효과를 나타냈다. 따라서 본 연구에서 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일은 모두 항산화능을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 혼합오일의 처리가 단독 처리보다 혼합오일의 상승효과를 확인하였다.

서영미[44]는 라벤다 오일과 프랑킨센스 오일의 DPPH radical 소거능과 SOD 유사활성은 시료 모두에서 농도에 비례하여 증가하였고, 각각의 오일 처리에서 대조군에 비하여 활성이 농도에 비례하여 증가하는 한편 지질과산화능은 대조군에 비하여 70-90%의 유의한 저해능을 나타내었으며, 혼합오일 처리에서는 단독 처리보다 상승효과를 나타냈다고 하였다. 조영재 등[47]은 캐모마일 추출액의 전자공여능을 측정한 결과 높은 전자공여능을 보여주었다고 하였으며, 조소은[46]은 편백잎 증류추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 항산화 활성 효과를 농도 의존적으로 높게 나타냈다고 하였다. 또한 김선주[48]는 달맞이꽃종자 오일의 지질과산화능 측정에서 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다고 하였다. 이는 본 실험 결과와 일치하는 것으로 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일은 항산화 효과가 있음은 물론 혼합한 편백 초임계-저먼 캐모마일 오일의 경우 상승 효과가 있음을 시사하고 있다.

히스타민은 비만세포의 탈과립에 의해 분비되는 물질 중에서 가장 잘 알려져 있고 즉시형 과민 반응을 일으키는 중요한 인자이며[49] 가려움증, 발진과 같은 알러지 반응을 유도하는 매개 물질로 알려져 있다[50].

본 실험에서 RBL-2H3세포에 대한 히스타민 유리 억제 효과는 25 μ L가 포함된 편백 초임계 추출 오일, 저먼 캐모마일 오일 및 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일로 처리 시 Compound 48/80으로 자극시킨 히스타민 방출량 대비 각각 50.88%, 62.0%, 33.10%로 나타났다.

β -hexosaminidase는 비만세포의 과립 내에 저장되어 있으며 비만세포가 면역적 활성을 일으킬 때 탈과립되어 분비된다[51]. 그러므로 β -hexosaminidase의 측정은 비만세포의 활성과 탈과립을 억제하는 효능을 조사하는데 널리 활용되는 방법이다[52]. 본 실험에서 β -hexosaminidase 분비에 미치는 효과는 편백 초임계 추출 오일, 저먼 캐모마일 오일 및 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일 50 μ L 농도에서 각각

50.29%, 43.42%, 40.19%로 나타났으며, 100 μ L 농도에서 각각 50.36%, 41.28%, 38.39%로 나타나 항원으로 유도된 비만세포의 탈과립을 현저히 억제하였으며, 특히 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일에서 상승효과를 나타내었다. 이는 편백 초임계 추출 오일, 저먼 캐모마일 오일 및 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일의 전 처리가 비만세포의 히스타민 유리를 억제한 것으로 판단되며 이는 향후 부작용이 낮으면서도 알러지성 질환을 효과적으로 조절하는데 이용될 수 있는 가능성을 제시하여 주고 있다

염증성 질환은 IL-1 β , TNF- α , GM-CSF 같은 전구 염증 사이토카인과 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6와 IL-13 같은 Th2 사이토카인을 합성하여 분비한다[53, 54]. 이러한 사이토카인은 염증세포의 조직 침투와 후기 알러지 반응의 유도에 중요한 역할을 하며[55], 비만세포나 B 세포를 활성화하여 병변을 더욱 가속화시킨다[56, 57, 58]. 특히 IL-4는 AD와 같은 염증성 질환에서 B 세포를 형질세포로 전환시켜 IgE의 항체생성을 자극하는 인자로 작용한다[7, 59]. TNF- α 는 주로 비만세포, 대식세포, 호염기구, 호중구, 호산구와 상피세포 등 알러지성 폐의 염증에 반응하여 활성화된 여러 세포에 의해 생산되며, 비만세포와 호염기구에서 항원 항체반응의 결과로 합성, 분비되는 강력한 염증매개 물질이다[60].

본 연구에서는 RBL-2H3 세포에서 분비된 IL-4의 양은 항원으로 자극한 세포에 비해 농도별(50, 100 μ L)로 처리한 세포에서 편백 초임계 추출 오일은 각각 53.76%, 39.48%로 유의한 감소를 보였으며, 저먼 캐모마일 오일은 각각 63.29%와 42.16%로, 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일은 각각 39.29%와 27.98%로 유의한 감소를 보였다. 또한 RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양은 항원으로 자극한 세포에 대비하여, 농도별(50, 100 μ L)로 처리한 세포에서 편백 초임계 추출 오일은 각각 65.47%와 29.33%로 유의한 감소를 보였으며, 저먼 캐모마일 오일은 각각 69.32%와 32.25%로, 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일은 각각 60.53%와 22.32%로 유의한 감소를 보였다.

본 연구결과에서 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일은 IL-4과 TNF- α 의 생산을 유효하게 억제하였으며, 혼합오일의 경우 상승효과가 있음을 시사하고 있다. 구영희[61]는 IL-4 생성을 억제함으로써 과도한 Th2 cell의 세포분화를 조절하고 초기 아토피 피부염의 진행을 차단시키는 효과가 있다 하였으며, 이러한 결과는

비만 세포에서 사이토카인의 분비는 아토피와 같은 피부질환의 만성화에 관여하며 이를 조절함으로써 해당 질환의 개선 및 치료에 중요한 역할을 담당하고 있다[62]는 것과 일치하는 것이다.

편백 초임계 이산화탄소 추출 오일의 경우 monoterpene 보다는 sesquiterpene의 함유량이 높고, stachen과 같은 diterpene이 주요성분으로 구성되어 있는 것으로 조사되었다[63]. Sesquiterpene 성분 중에는 elemol의 함유량이 증류법에 의한 편백 정유에 비해 1.5배 높게 나타났으며, 편백정유의 항알러지 효과는 elemol, cedrol, eudesmol 등의 sesquiterpene에 의해 나타난다고 보고하였다[64, 65]. 편백 초임계 이산화탄소 추출 오일의 경우 monoterpene 보다는 sesquiterpene의 함유량이 높고, 특히 항알러지 효과물질인 elemol의 함유율이 증가하여 항알러지 효과가 증가된 것으로 보인다.

이상의 결과에서 편백 초임계 추출 오일과 저면 캐모마일 오일의 전자공여능(EDA), SOD 유사활성 및 지질과산화능(LPA)과 같은 항산화 효과가 높았으며, 편백 초임계 추출 오일과 저면 캐모마일 오일의 단독 처리보다 혼합오일 처리가 더욱 유의한 항산화능을 나타내었으며, 히스타민 유리억제 효과와 β -hexosaminidase 분비 억제 효과 및 cytokin (IL-4, TNF- α) 생성 억제효과를 확인하였으며, 특히 혼합오일이 더 높은 효과가 있음을 제시하고 있다. 편백 초임계 추출 오일과 저면 캐모마일 오일의 AD와 그 외 염증성 질환들에 대한 증상 개선 및 치료적 접근을 위한 유용성 있는 소재로 활용가치가 있을 것으로 확인되었다.

V. 결 론

본 연구에서는 편백 초임계 추출 오일(C oil) 과 저먼 캐모마일 오일(G oil) 및 편백 초임계-저먼 캐모마일 혼합오일(CG oil)에 대하여 전자공여능(EDA), SOD 유사활성 및 지질과산화능(LPA) 측정을 통하여 항산화 활성을 측정하였으며, 히스타민 유리 및 β -hexosaminidase 분비측정을 통하여 비만세포의 탈과립에 미치는 영향과 IL-4 생성량, TNF- α 생성량 측정을 통하여 항염 효과에 미치는 영향에 대하여 상호 비교 조사하였다.

연구결과는 다음과 같다.

1. C oil과 G oil 모두에서 RBL-2H3 세포에 대한 세포독성은 10, 25, 50, 75 및 100 μ L 농도에서 90%이상의 생존율을 나타내었다.

2. C oil 과 G oil의 항산화 활성을 측정한 결과 전자공여능(EDA), SOD 유사활성 및 지질과산화능(LPA)과 같은 항산화능은 대조군 대비 모두에서 유의한 효과를 나타내었으며 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 C oil과 G oil의 혼합한 CG oil 처리가 단독 오일 보다 더 높은 항산화능을 나타내었다.

3. RBL-2H3세포에서 히스타민 유리 억제 효과는 25 μ L가 포함된 C oil, G oil, CG oil로 처리 시 Compound 48/80으로 자극시킨 히스타민 방출량 대비 각각 50.88%, 62.0%, 33.10%로 억제효과를 나타냈다.

4. β -hexosaminidase 분비에 미치는 효과는 C oil, G oil 및 CG oil 50 μ L 농도에서 각각 50.29% ($p < 0.05$), 43.42% ($p < 0.01$), 40.19% ($p < 0.05$)로 나타났으며, 100 μ L 농도에서 각각 50.36 \pm % ($p < 0.05$), 41.28% ($p < 0.05$), 38.39% ($p < 0.01$)로 나타나 C oil, G oil 및 CG oil이 항원으로 유도된 비만세포의 탈과립을 현저히 억제하였으며, 특히 CG oil에서 상승효과를 나타내었다.

5. IL-4의 양은 항원으로 자극한 세포에 비해 농도별(50 and 100 μ L)로 처리한 세포에서 C oil은 각각 53.76%, 39.48%로 유의한 감소를 보였으며, G oil은 각각 63.29%와 42.16%로, CG oil은 각각 39.29%와 27.98%로 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다.

6. TNF- α 의 양은 항원으로 자극한 세포에 비해 농도별(50 and 100 μ L)로 처리한 세포에서 C oil은 각각 65.47%와 29.33%로 유의한 감소를 보였으며, G oil은 각각 69.32%와 32.25%로, CG oil은 각각 60.53%와 22.32%로 유의한($p < 0.01$) 감소를 보였다.

본 연구 결과로 편백 초임계 추출 오일과 저먼 캐모마일 오일이 항산화 활성, 비만세포 탈과립과 cytokine 생산억제 효과를 확인하였고 에센셜 오일을 이용한 아로마테라피적 측면에서 아토피 피부염과 그 외 염증성 질환들에 대한 증상 개선 및 병변에 효능이 높은 치료적 접근을 위한 유용성 있는 소재로 활용가치가 클 것으로 판단된다. 향후 아토피 피부염이 유발된 동물모델 연구와 임상적 실험을 통한 가능성과 에센셜 오일의 화학적 특성 등 지속적인 과학적 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Park YL, Park J. Pathogenesis of Atopic Dermatitis. Korean Journal of Investigative Dermatology. 2007;14(3):67-72.
2. Lee HR. Atopic Dermatitis. Department of Pediatrics, Medical College, Hallym University, Korea. 2000;43:1161-1167.
3. Heo JH, Song HN, Jang SL. Effects of Gagambojungikgi-tang on the Immune Mediators Regulation and Wound Healing in the rSj26 or Chemical Antigen induced Atopic Dermatitis Model Mice. The Korea Journal of Herbology. 2008; 23(1):53-61.
4. Andrew Blauvelt, Sam T Hwang, Mark C Udey. Allergic and immunologic diseases of the skin. Allergy Clinical Immunology. 2003;111(2):560-570.
5. Ko HY. Study about Combinational Treatment of Gosamgamibang(GGB) Chenggihaedoksan(CHS) in TNCB-induced NC/Ng a Mice. PhD Dissertation, Daejeon Univ Korea. 2010.
6. Daniels J, Harper J. The epidemiology of atopic dermatitis. Hosp Med. 2002; 63:649-652.
7. Donald YML, Mark B, Michael D, Ichiro N, Qutayba AH. New insights into atopic dermatitis. J Clin Invest. 2004;113(5):651-657.
8. Leung DYM. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. J. Allergy Clin. Immunol. 2000;105:860-876.
9. Assanasen P, Naclerio RM. Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. Allergy. 2000;55(Suppl 64):17-27.
10. Hanifin JM, Scott RG, Sai CC. Elevated leukocyte cyclic AMP-phosphodiesterase in atopic disease: a possible mechanism for cyclic AMP-agonist hyporesponsiveness. Allergy clinical immunology. 1982;70(6):452-457.
11. Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. Current Allergy and Asthma Reports. 2009;9(4):265-272.

12. Jang HS. Diagnosis and Treatment of Atopic Dermatitis. *Korean Journal of Family Medicine*. 2002;23(7):840.
13. Kapp A, Papp K, Bingham A, Holst RF, Ortonne JP, Potter PC, Gulliver W, Paul C, Molloy S, Barbier N, Thurston M, Prost Y. Long-term management of atopic dermatitis in infants with topical pimecrolimus, a nonsteroid anti-inflammatory drug. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:277-284.
14. Smith CH. New approaches to topical therapy. *Clinical and experimental dermatology*. 2000;25(7):567-574.
15. Cerrato P. Aromatherapy: Is it for real?. *RN*. 1998;6(6):51-52.
16. Kang KH, Kim KW, Kim DH. Utilization pattern and cost of medical treatment and complementary alternative therapy in children with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Respiratory Disease*. 2012;19(2):27-36.
17. Drummond EM, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier J, O'iordan D, Gibney ER. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytotherapy Res*. 2013;27(4):588-594.
18. Kim HS, Sang KH, Joo YM. Evaluations on the Deodorization Effect and Antibacterial Activity of *Chamaecyparis Obtusa* Essential Oil. *Korean Journal of Odor Research and Engineering*. 2009;8(3):111-117.
19. Park MJ, Choi WS, Min BC, Kim HY, Kang HY, Choi IG. Antioxidant Activities of Essential Oils from *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of The Korean Wood Science and Technology*. 2008;36(6):159-167.
20. Lee DS, Lim MS, Kwan SS, Kim SY, Park SN. Antioxidative Activity and Componential Analysis of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract. *Journal of The Industrial and Engineering Chemistry*. 2012;23(1):93-99.
21. Gwak KS, Park MJ, Jeung EB, Chang JW, Choi IG. Comparison of Antifungal Activities of Monoterpenes and Sesquiterpenes in Essential Oil from *Chamaecyparis obtusa* Against Dermatophytes. *Journal of The Korean Wood Science and Technology*. 2006;34(3):46-55.

22. Lee SS, Kang HY, Choi IG. Studies on Biological Activities of Woody Essential Oils. *Journal of The Korean Wood Science and Technology*. 2002; 30(1):48-55.
23. Jung JY, Kim GS, Kim KR. Studies on Antioxidative and Antimicrobial Activity from Hinoki Cypress Oil. *The Journal of Cosmetological Science*. 2010;6(4): 407-417.
24. Joo SS, Yoo YM, Ko SH, Choi WS, Park MJ, Kang HY, Choi KC, Choi IG, Jeung EB. Effects of Essential Oil from *Chamaecyparis obtusa* on the Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesions and the Suppression of Th Cytokines. *Journal of Dermatological Science*. 2010;60(2):122-125.
25. An BS, Kang JH, Yang H, Jung EM, Kang HS, Choi IG, Park MJ, Jeung EB. Anti-inflammatory Effects of Essential Oil from *chamaecyparis obtusa* Via the Cyclooxygenase-2 Pathway in Rats. *An International Journal Devoted to Molecular Medicine*. 2013;8(1):255-259.
26. Taliou A, Zintzaras E, Lykouras L, Francis K. An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders. *Clin Ther*. 2013;35:592.
27. Bhaskaran N, Srivastava JK, Shukla S, Gupta S. Chamomile confers protection against hydrogen peroxide induced toxicity through activation of Nrf2-mediated defense response. *Phytotherapy Res*. 2013;27:118.
28. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem*. 2010;122:987.
29. Kagawa D, Jokura H, Ochiai R, Tokimitsu I, Tsubone H. The sedative effects and mechanism of action of cedrol inhalation with behavioral pharmacological evaluation. *Planta Med*. 2003;69:637.
30. Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J. Clin. Pharm. Ther*. 2002;27:391.
31. Denizot F, Rita L. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and

- reliability. *J Immunol Methods*. 1986;22:271-277.
32. Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
 33. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;26.
 34. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *The FEBS Journal*. 1974;47:469-474.
 35. Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci*. 1993;58:1407-1410.
 36. Jung JK, Jung HM, Seo WG, Park YK. Anti-allergic effect of *Osterici Radix* water extract in human mast cells. *Kor. J. Herbology*. 2010;25(3):35-41.
 37. Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Nakamura A, Yoshikawa M. Anti-allergic principles from Thai zedoary: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004;12(22):5891-5898.
 38. Kim MJ, Kim JY, Kwon B, Ji GE. Article : Food Science/Microbiology ; Inhibitory Effects of Genistein and Water Extracts of Various Herbs on Histamine Release. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. 2011;54(1):95-98.
 39. Lee SH, Min KJ, Lee KO, Sin JS, Kim YC. Effect of German Chamomile Oil Application to Atopic Dermatitis Mice on the Change of Serum IgE Level. *Journal of The Korean Society of cosmetology*. 2008;14(2):337-345.
 40. Kim HJ. Analysis of Atopic Dermatitis Patients according to the Sasang Constitution. *The Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology Society*. 2003;16(3):200-209.
 41. Rudikoff D, Lebwohl M. Atopic dermatitis. *Lancet*. 1998;351:1715-1721.
 42. Peden DB. Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2000;

- 108:475-482.
43. Barnes PJ. New direction in allergic diseases : Mechanism-based anti-inflammatory therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;106:5-18.
 44. Seo YM. Study on the antioxidant and therapeutic effects of essential oil on atopic dermatitis induced in NC/Nga mouse model. PhD Dissertation, Wonkwang Univ Iksan Korea. 2010.
 45. Jang JB, Park OR, Yun TE. Free Radicals, Physical Performance, Aging and Antioxidants. *The Korean Journal of Ideal Body & Beauty.* 2010;2(1):19-27.
 46. Cho SE. Anti-oxidative, Anti-inflammatory And Immunomodulatory Effects of *Chamaecyparis obtusa* Leaves Extracts for Atopic Dermatitis. PhD Dissertation, Konkuk Univ Korea. 2012.
 47. Cho YJ, Yoon SJ, Kim JH, Chun SS. Biological Activity of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* 2005;34(4):446-450.
 48. Kim SJ. Effect of Evening Primrose Oil and Mixed Oil of Evening Primrose-Rosemary on Atopic Dermatitis-Induced Animal Model. PhD Dissertation, Chosun Univ Korea. 2016.
 49. Moon PD, Na HJ, Kim HM. Action of enzyme food, Green Life Enzyme of systemic and local ana-phyllaxis. *Orient Pharm Exp Med.* 2003;3:46-50.
 50. Andrew D, AD Craig. Spinothalamic lamina Ineurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nature Neuroscience.* 2001;4(1):72-77.
 51. Marquardt DL, Walker LL. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor- κ B activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2000;105(3):500-505.
 52. Granberg M, Fowler CJ, Jacobsson SO. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2-arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE-dependent antigen-induced β -hexosaminidase, serotonin and TNF α release from rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells.

- Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2001;364(1):66-73.
53. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7(2):93-104.
 54. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine*. 2012;106(1):9-14.
 55. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997;77(4):1033-1079.
 56. Rousset F, Rorbert J, Andary M. Shift in Interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87:58-69.
 57. Lim JH, Kang H, Park YM, Cho SH, Lee SY. Effect of substance P on Production of interleukin-12 and interferon-gamma from peripheral blood mononuclear cells of chronic severe atopic dermatitis patients. *The Official Publication of the Korean Society of Allergology*. 2001;21(4):636-646.
 58. Yeo EJ, Han JK, Kim YH. Topical Application of Atopy cream-jawoongo ointment(A-J) of Ointment Inhibits Biostir mite antigen cream induced Atopy Dermatitis by Local Action in Nc/Nga Mice. *Journal of Haehwa medicine, Oriental Medicine, Daejeon univ*. 2008;17(2):185-198.
 59. Wright RJ, Cohen RT, Cohen S. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(1):23-29.
 60. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature*. 1990;346(6281):274-276.
 61. Ku YH. Therapeutic Effects of Cheonggisang Extract on NC/Nga Mice with Atopic Dermatitis-like Skin Lesions. *phD Dissertation, Dongguk Univ Korea*. 2007.
 62. Ackermann L, IT Harvima. Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF- α and their degranulation is associated with expression

- of ICAM-1 in the epidermis. Arch. Dermatol. Res. 1998;290:353-359.
63. Kim JW, Choi WS, Lee SS, Park MJ. Comparative Study on The Composition of Essential Oil by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydro-distillation from *Chamaecyparis obtusa* Leaves. Journal of The Korean Wood Science & Technology. 2015;43(4):494-503.
 64. Park MJ, Lee SM, Gwak KS, Jeung EB, Chang JW, Choi IG. Investigation of Active Antifungal Compounds of Essential Oil from *Chamaecyparis obtusa* Against Dermatophytes, *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes*. Journal of The Korean Wood Science and Technology. 2005;33(3):72-78.
 65. Choi IG, Kim KJ, Kim YM, Park MJ, Lee YS, Jeoung DI. Fractions of *Chamaecyparis obtusa* Display Antiallergic Effect in RBL2H3 Cells. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology. 2006;16(11):1747-1752.