creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000237554

2009년 2월
석사학위논문

만병초 잎 추출물의 항균, 항염 효과

조선대학교 보건대학원

대 체 의 학 과

조 세 련

만병초 잎 추출물의 항균, 항염 효과

Anti microbacterial Activity and Anti inflammatory Effects of the Rhododendron brachycarpum D. Don Leaves Extracts

2009년 2월

조선대학교 보건대학원

대체의학과

조 세 련

만병초 잎 추출물의 항균, 항염 효과

지도교수 문 경 래

이 논문을 대체의학석사 학위신청 논문으로
제출함

2008년 10월

조선대학교 보건대학원

대체의학과

조 세 련

조세련의 대체의학 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 서재홍 인

위 원 조선대학교 교수 박상학 인

위 원 조선대학교 교수 문경래 인

2008년 11월

조선대학교 보건대학원

목 차

목차 ····· i
표 목차 ····· iii
그림 목차 ····· iv
ABSTRACT ····· v

I. 서론 ····· 1

II. 실험 재료 및 방법 ····· 2
1. 사용시료 ····· 2
2. 실험 균주 및 시포주 ····· 2
3.시약 및 배지 ····· 3
4. 시료의 추출 ····· 5
5. 세포 배양 및 처리 ····· 6
A. 항염증 실험을 위한 대식 세포 배양 ····· 6
B. 세포독성실험을 위한 세포 배양 ····· 6
C. 항염증실험을 위한 균주의 배양 ····· 6
6. 항균 항염의 측정 ····· 7
A. Agar diffusion 법에 의한 항균성 측정 ····· 7
B. 균에 대한 성장 억제효과 ····· 8
C. Nitric oxide(NO) 생성 평가 ····· 8
D. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정 ····· 8

III. 실험 결과
1. Agar diffusion 법에 의한 항균성 측정 결과 ····· 10
2. P. acnes균의 성장에 미치는 영향 ····· 13
3. S. aureus균의 성장에 미치는 영향 ····· 15

4. S. epidermidis균의 성장에 미치는 영향 ····· 17
5. MTT 정량에 의한 세포 생존률 측정 ····· 19
6. Nitric oxide(NO)생성 억제력 평가 ····· 20

Ⅳ. 고찰 ····· 21

Ⅴ. 결론 ····· 26

참 고 문 헌 ····· 27

표 목차

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiments ····· 3

Table 2. Composition of Nutrient(NB) ····· 3

Table 3. Composition of Cone oil medium ····· 4

Table 4. Composition of Pityrosporum medium 2····· 4

Table 5. Composition of Reinforced Clostidial Medium····· 5

Table 6. Antimicrobial activity of 10% extracts against various microbials····· 11

Table 7. Anti-microbial effect of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts on various microbial strains ····· 13

Table 8. Effects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for P.acnes growth with various concentration··· 15

Table 9. Effects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for S. aureus growth with various concentration 16

Table 10. Effects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for S. epidermidis growth with various concentration····· 18

Table 11. Inhibitory effets of extract of *Rhododendron brachycarpum D.Don* . on the production of nitric oxide in RAW 264.7cells····· 20

그림 목차

Fig.1 The photo of various microbials & inflammatory strains ····· 7

Fig.2 Anti microbial activity of extracts against various microbial····· 10

Fig.3 Antimicrobial activity of 10% extracts against various microbial····· 12

Fig.4 Effects of extracts for *P. acnes* growth with various concentration ····· 14

Fig.5 Effects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for *S.aureus* growth with various concentration····· 17

Fig.6 Eeffects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for *S. epidermidis* growth with various concentration····· 18

Fig.7 Inhibitory effets of extract of *Rhododendron brachycarpum D.Don* on the production of nitric oxide in RAW264.7cells····· 19

ABSTRACT

Anti microbacterial Activity and Anti inflammatory Effects of the Rhododendron brachycarpum D.Don Leaves Extracts

CHO Sei - Lyun
Advisor: Prof. Moon, Kyung Rye M.D., Ph.D.
Department of Alternative Medicine,
Graduate School of Health Science
Chosun University

It is the purpose of this study to investigate the anti *microbacterial Activity and anti inflammatory Effects* of water extract *Rhododendron brachycarpum D.Don* Leaves

The *Rhododendron brachycarpum D.Don* Extract which exhibit several beneficial effects including acne(pimple) and skin diseases was tested for anti-microbial activity and anti-inflammation effects.

The *Rhododendron brachycarpum D.Don* Extract showed antimicro bial activity against *Stapylococcus epidermis, Propionibacterium acnes.* and *Stapy lococcus epidermidis,* The growth of *Stapylococcus epidermis, Propionibacterium acnes.* and *Stapylococcus epidermis* was inhibited completely by addition of 10% of the extract.

Based on these results, it is concluded that the *Rhododen dron brachycarpum D.Don* Extracts can be applied to the acne and skin diseases.

I. 서론

우리나라 사람들의 건강에 대한 관심이 높아지면서 텔레비전과 인터넷 잡지 등 각종 언론 매체에 수많은 의료관련 정보들이 쏟아져 나오고 있다. 뿐만 아니라 천연물을 이용한 신약 개발 및 식품 소재로의 연구들도 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 반면에 여러 건강 기능성 식품들과 민간요법들이 전문가의 확인이나 의사의 처방 없이 일반 사람들도 쉽게 구해서 쓰이고 있다. 피부 질환을 보유한 어린이들은 병원이나 약국이외에 건강기능식품과 한약을 이용하는데 어느 정도 치료 효과를 나타내기도 하지만 불만인 이유로 효능이 없거나 비싸다는 의견이 많았다.(손정모,2007) 뿐만 아니라 약의 내성 문제와 그에 따른 부작용 문제가 심각하다. 이에 민간에서 간경화, 간염, 당뇨병, 고혈압, 저혈압, 관절염 , 무좀, 습진, 건선 등의 피부병에 효과가 있다고 여겨져 만병통치약처럼 사용되고 있는 만병초를 이용하여 그 효과를 확인해 보고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사용시료

본 연구에 사용한 만병초는 강원도 태백산의 해발 1,000m 부근에 자생하는 만병초를 채취하여 건조한 잎을 사용하였다. 열수 추출은 건조한 잎 0.2㎏에 증류수 2ℓ를 첨가하여 120℃의 Auto-clave에서 12시간을 추출 하여 Glass Microfiber filter (GF/C Whatman)을 이용하여 감압여과 하였다. 이 추출액을 Rotary evaporator N-100(Tokyo RIKAKIKAI CO. LTD Japan)로 냉각수 15℃, Water bath 50℃에서 3시간 회전 감압농축 시킨 후 Deep freeze -40℃에서 12시간 냉동 후 -50℃에서 48시간 동결 건조하여 시료를 얻었다.

2. 실험 균주 및 시포주

본 실험에 사용한 세포주와 균주는 Table 1에 나타난 바와 같이 피부상재균 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 균주로서 Stapylococcus aureus 와 병원성은 낮지만 친지방성 이상성 진균으로 정상피부의 모낭주위에서 발견되는 Malassezia furfur, 여드름 유발에 관여하는 Propionibacterium acnes, Stapylococcus 등이다. 따라서 본 실험에서는 Stapylococcus aureus KCTC 1928, Malassezia furfur KCTC 7743, Propionibacterium acnes KCTC 3320, Stapylococcus epidermidis KCTC 1927 균주를 KCTC에서 분양받아 사용하였다.

또한 마우스 상피세포주(mouse epidermal cell)인 JB6 cell 와 마우스 복강 마크로파아지 (mouse peritoneal macrophage)인 RAW264.7 cell line을 KCTC에서 분양받아 사용하였다.

3.시약 및 배지

항균성시험에 사용한 시험균주의 생육배지는 KCTC에서 추천한 것을 사용하였으며 배지의 조성은 다음과 같다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiments

KCTC NO	Strains	Media
1928	*Staphylococcus aureus subsp.aureus*	Nutrient
1917	*Staphylococcus epidermidis*	Nutrient
7743	*Malassezia furfur*	Cone oil medium
		Pityrosporum medium 2
3320	*Propioniba*	Reinforced Clostidial Medium
	Mouse epidermal cell [JB6 cell]	
AC28116	Mouse peritoneal macrophage [RAW264.7]	

Table 2. Composition of Nutrient(NB)

Media	Components	contents
Nutrient	Beef extract Peptone Agar Distilled water	3.0g 5.0g 15.0g 1.0 L
	pH	6.8

Table 3. Composition of Cone oil medium

Media	Components	contents
Cone oil medium	Place a few drops of sterile corn oil on slants of emmon's AgarEmmon's Agar Sabouraud's Glucose Broth (Difco 0382) Agar Distilled water	 30.0g 20.0g 1.0 L
	Adjust pH Autoclave at	6.8-7.0 121℃ for15min.

Table 4. Composition of Pityrosporum medium 2

Media	Components	contents
Pityrosporum medium 2	-Emmon's Agar plus 0.5% yeast extract in olive oil -Sabouraud's Glucose Broth(Difco 0382) Agar Distilled water	30.0 20.0g 1.0 L
	Adjust pH to Autoclave at	6.8-7.0 121℃ for15 min

Table 5. Composition of Reinforced Clostidial Medium

Media	Components	Contents
Reinforced Clostidial Medium	Tryptose	10.0g
	Beef extract	10.0g
	Yeast extract	3.0g
	Dextrose	5.0g
	Sodium chloride	5.0g
	Soluble strarch	1.0g
	Cysteine hydrochloride	0.5g
	Sodium acetate	3.0g
	Agar	15.0g
	Distilled water	1.0L

4. 시료의 추출

Rhododendron brachycarpum D.Don 의 부위별 액상 추출물은 중탕가열을 통한 열수추출법을 사용하였다. 준비된 시료를 각각 부위별로 구분하고 시료 1㎏에 3l의 증류수를 첨가하여 Homegenizer로 5분 동안 마쇄한 후 24시간동안 상온에서 교반 침출시킨 후 1차 추출하고 다시 증류수3L를 가하여 동일한 방법으로 2차 추출한 뒤 추출액 모두를 합하여 0.45㎛ membraen filter로 여과(Whatman No-2)하였다. 이 추출여액을 Rotary vaccum evaporator(회전감압농축기)로 50℃수욕상에서 감압농축하여 점조성의 추출물로 만들고 급 냉동시설에 보관해 두고 필요시 용도에 따라 희석하여 사용하였다.

실험에 사용전 샘플내의 미생물을 완전 제거하기 위해 autoclave에서 120℃상태에서 20분간 멸균을 행하였다.

5. 세포 배양 및 처리

A. 항염증 실험을 위한 대식 세포 배양

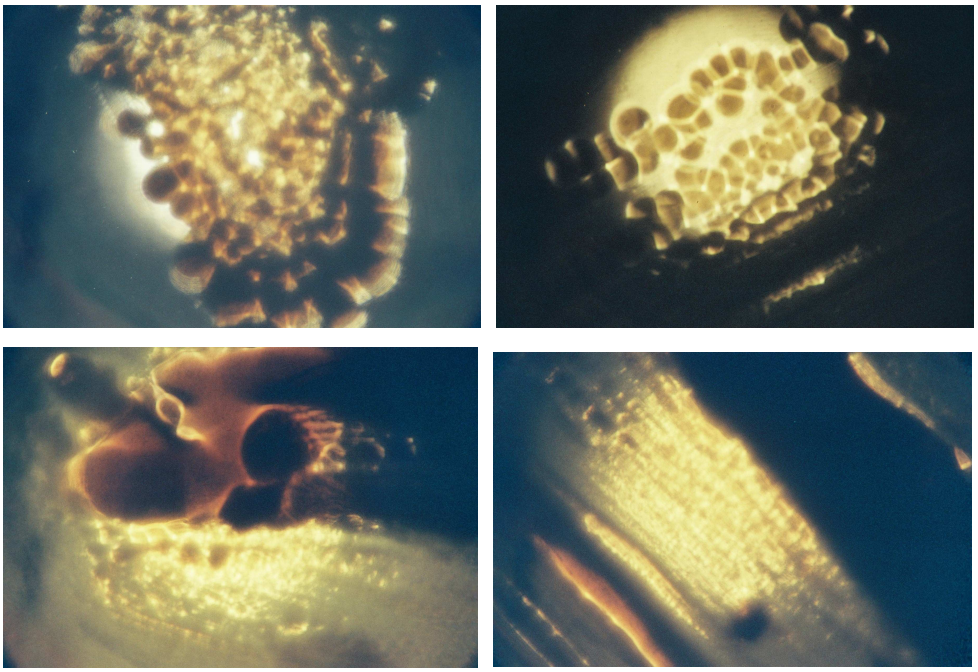
KCTC에서 구입한 대식세포주 RAW 264.7(monocyte)는 10% FBS와 100unit/㎖의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM배지를 사용하며 37℃, 5% CO2 incubator에서 배양하였다.

B. 세포독성실험을 위한 세포 배양

KCTC에서 구입한 마우스 섬유모세포의 일종인 L929세포주의 세포배양은 10% FBS와 100unit/㎖의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM배지를 사용하며 37℃, 5% CO2 로 조정된 incubator에서 배양하여 3일마다 교환하였다. 배양된 세포주는 1trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계측기(Hemocytometer)로 세포수를 계산하였다. 세포독성시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5×10^3cell/well이 되도록 세포부유액을 120㎕씩 분주하여 배양한 후 실험하였다.

C. 항염증실험을 위한 균주의 배양

염증을 일으키는 Stapylococcus aureus , Malassezia furfur KCTC 7743, 여드름 균인 Propionibacterium acnes는 배지에 지속적인 개체 배양을 시도하면서 실험하였다.



< Figure 1.> The photo of various microbials & inflammatory strains

A : *Stapylococcus aureus* B.: *Stapylococcus epidermi0ɨs*

C : *Malassezia furfur* D : *Propionibacterium acnes*

6. 항균 항염의 측정

A. Agar diffusion 법에 의한 항균성 측정

항균활성 검사는 Agar diffusion 법을 이용하였다. 각기 균을 성장할 수 있도록 고체배지를 제조하고 그 위에 배양된 균주를 100㎕를 도말한 후 10분동안 배지의 표면을 도말한 후 배지위에 직경 10㎜의 paper disk 를 올려놓고 추출샘플을 10%와 1%(w/v)로 희석한 용액 50㎕씩을 각각 떨어뜨렸다. 37℃ incuvater에 보관하면서 paper주위에서 미생물의 성장이 억제되는 clear

zone의 직경크기를 조사비교하면서 항균활성효과를 1차 확인하였다.

B. 균에 대한 성장 억제효과

control 배지를 대조군으로 하고 추출액을 함유한 배지(1%,5%,10% w/v)를 제조하여 피부에 염증을 유발할 수 있는 Stapylococcus aureus 균주와 여드름 유발에 관여하는 Propionibacterium acnes 배양액을 액체배지에 $1\times10^{5}\sim1\times10^{6}$ CFU/㎖가 되게 첨가한 후 37℃에서 진탕 배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 증류수로 적정 희석하여 600㎚에서 OD값을 측정하여 균의 성장을 확인하였다.

C. Nitric oxide(NO)생성평가

RAW264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^{5} cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 추출물 시료와 LPS(1㎍/㎖)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO 양은 Griess시약 1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenedia mine in 2,5%(v/v) phosphoric acid을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100㎕와 Griess시약 100㎕를 혼합하여 96 well plate에서 10분동안 반응시킨 후 540㎚ 에서 흡광광도를 측정하였다.
생성된 NO양은 sodium nitrite($NaNO_2$)를 standard 로 비교하였다.

D. MTT 정량에 의한 세포생존률 측정

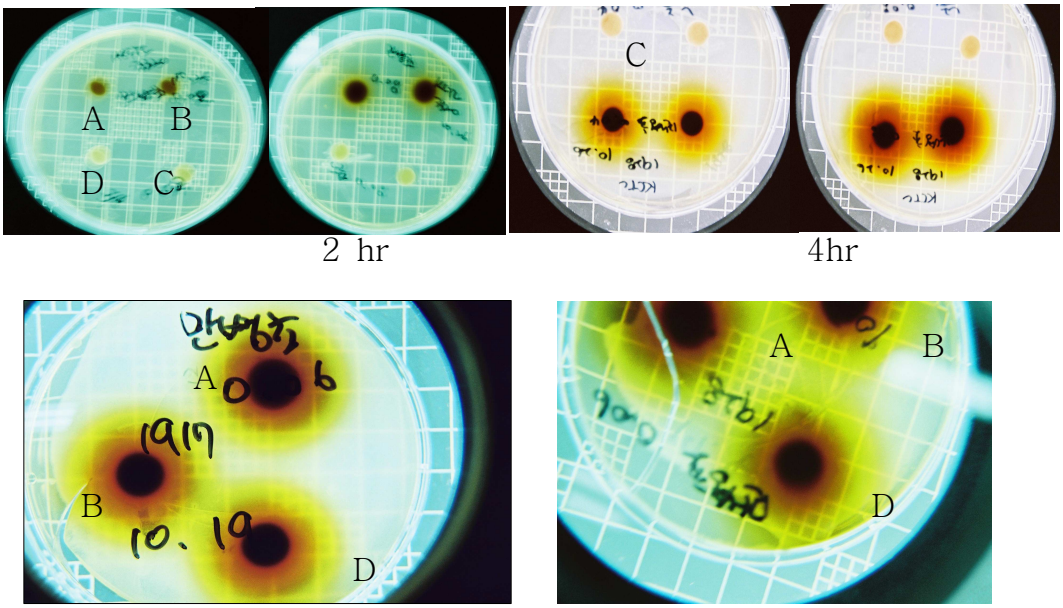
본 연구에서는 Yamauchi 과 Mosmann 방식 중 후자를 택하였다.
MTT(3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoilum bromide) 정량은 생 세포내 미토콘드리아의 Dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색

Formazan 측정으로 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방식으로서 Mosmann 방식은 배양한 세포주를 각각 5×10³cell/㎖이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 1, 50, 100, 200, 500, 1000ppm 농도의 시료추출물이 첨가된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200 ㎍/㎖ 가 포함된 배양액을 well당 200㎕씩 넣은 후 다시 3시간동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 100㎕/well씩을 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 Microplate Reader를 흡광도 570nm에서 측정하였다.

III. 실험 결과

1. Agar diffusion 법에 의한 항균성 측정 결과

염증 세균 및 여드름 균에 대한 항균 효과를 측정하기 위해 Agar diffusion method법을 사용하였다. 성장기의 중간단계에 있는 균배양액 100 ㎕를 한천배지 위에 도말하고 10분 동안 배지의 표면을 건조하였다. 그 후 배지위에 직경 10㎜의 paper disk 를 올려놓고 추출샘플을 10%와 1%(w/v)로 희석한 용액 50㎕씩을 각각 떨어뜨렸다. 37℃ incubator에 12~24 시간 보관하면서 paper주위에서 미생물의 성장이 억제되는 clear zone의 직경크기를 조사하였다. < Figure 2.>



2 hr 4hr

6 hr 8 hr

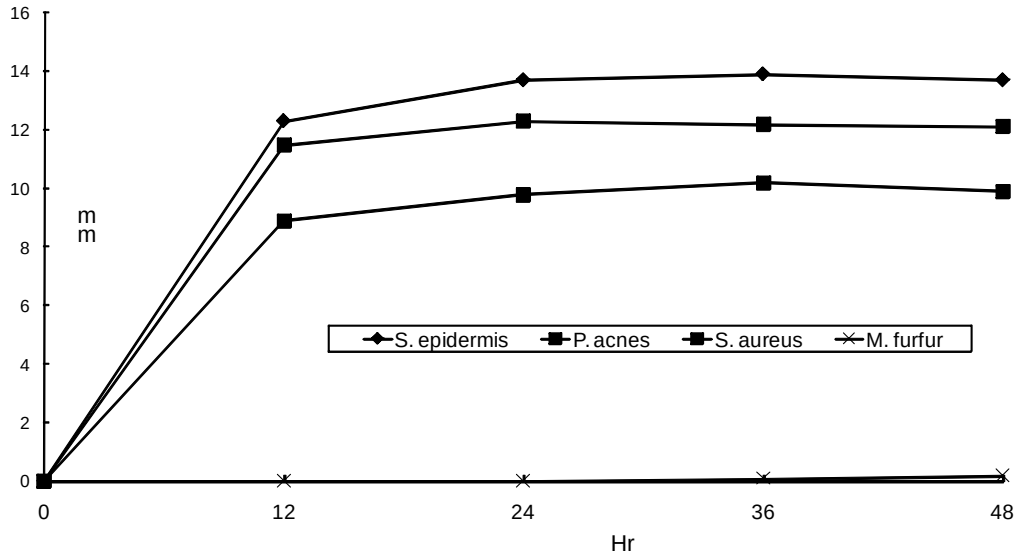
< Figure 2. > Antimicribal activity of extracts against various microbials

A : *Stapylococcus aureus* B : *Stapylococcus epidermidis*
C : *Malassezia furfur* D : *Propionibacterium acnes*

Table 6. Anti-microbial activity of 10% extracts against various microbials

Strains	clear zone				
	0	12hr	24hr	36hr	48hr
S. *epidermidis*	0	12.3	13.7	13.9	13.7
P. acnes	0	11.5	12.3	12.2	12.1
S. aureus	0	8.9	9.8	10.2	9.9
M. furfur	0	0	0	0.1	0.2

만병초 추출물의 농도를 10%로 하고 시간대별로 clear zone 형성과정을 관찰하였다. 항균 가장 높은 반응은 S. *epidermidis* 가 36 hr을 기준으로 13.9 mm로 가장 높았고 P. acnes.는 12.2mm , S. aureus는 10.2mm 순으로 염증세균 과 여드름 균에 대한 항균 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 피부의 모낭 주위에서 발견되는 친 지방성 이상성 진균인 M. furfur에 대하여는 10% 농도에서 36시간이 경과한 후에서 clear zone의 직경크기변화가 매우 미약하게 나타나 열수추출액에서는 항 진균성이 없음을 알 수 있었다. <Table 6.>



< Figure 3. > Anti microbial activity of 10% extracts against various microbials.

만병초 잎 추출물을 첨가하지 않은 배지를 대조군으로 하고 농도차이를 1%, 5% 10%로 각각 차이를 두고 농도에서 시간을 달리한 후 시간대별로 600nm 흡광광도계에서 측정하였으며 결과는 S. epidermidis 가 가장 빠르게 증가하였으며 P. acnes. , S. aureus 순으로 균체량의 증가 속도를 확인하였다.< Figure 3.>

20ml∼100ml 농도별 효과 측정에서는 60∼80ml사이에서 다소 큰 변화를 보였으며 특히 P. acnes의 변화가 크게 나타났으나 S. epidermis에는 미치지 못하였다. 따라서 여드름 유발 균에 대한 항균 효과가 큼을 알 수 있었다. <Table 7.>

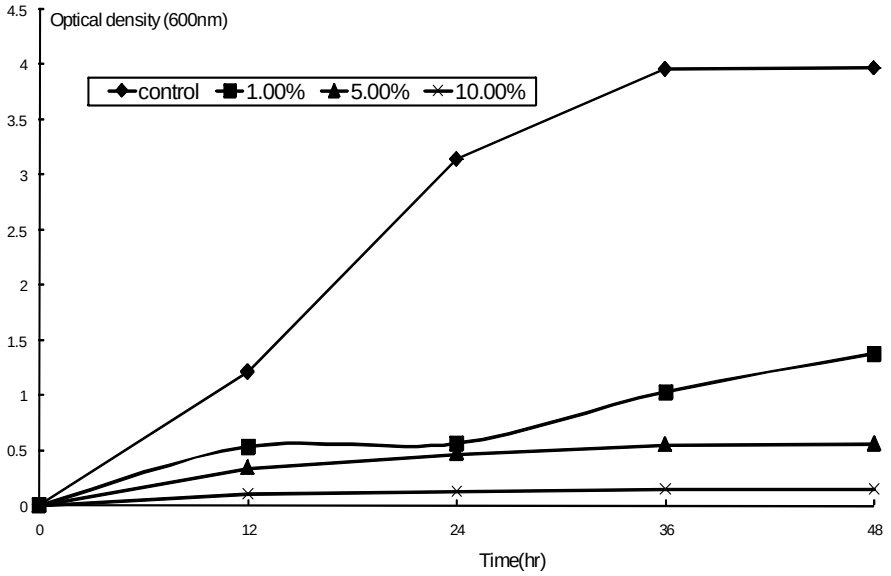
Table 7. Anti-microbial effect of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts on various microbial strains

Strains	clear zone on plate				
	20ml	40ml	60ml	80ml	100ml
S. *epidermidis*	2.1	4.8	7.3	10.2	13.7
P. acnes	1.4	3.1	5.9	9.6	12.1
S. aureus	0.7	3.2	5.8	7.4	9.9
M. furfur	0	0	0	0	0

2. P. acnes균의 성장에 미치는 영향

P. acnes 균은 여드름을 유발시키는 균으로 알려져 있다. 다양한 물질들을 사용하여 여드름 치료와 예방에 사용되고 있다. *P. acnes* 균에 천연약물인 만병초 잎 추출물이 항균력 효과가 있는가를 측정하기 위해 agar diffusion 법을 통해 항균활성을 실험한 결과 항균력이 있는 것으로 나타났다. 그 결과를 가지고 직접 배양배지에 적용 균이 성장하는데 어느 정도의 영향을 미치는지 실험하였으며 만병초 잎 추출물이 *P. acnes* 의 성장에 미치는 영향을 농도별 시간대별로 측정한 OD값이다. 추출물을 단계별로 P. acnes 배지에 첨가하여 균을 접종하였고 추출물을 함유하지 않은 배지의 경우 균의 유도기를 일정하게 주었다. 급격한 균체량의 증가를 나타내는 대수증식기를 측정하였고 일정 시간이 지난 후 균은 정지기에 들어간 시간대를 측정하였다. 만병초 잎 추출물을 함유하고 있지 않은 대조군의 경우 24시간 동안 급격한 균체량의 증가를 나타내다가 36시간이 지난 후 균체량의 증가가 정지기에 감을 관찰하였다. 1.00%일 때는 24시간까지 어느 정도 억제하다가 그 후로는 균체량이 점차적으로 증가됨을 알 수 있었고 10.0% 추출물을 첨

가한 배지에서는 48시간에서 24시간 과 거의 동일한 균체량이 관찰되었다. 이는 1.00% 첨가했을 때 만병초 잎 추출물이 P. acnes의 성정을 어느 정도 저해하지만 균을 완전히 억제하지 못한다는 것을 보여준다. 10.0% 첨가 조건에서 만병초 잎 추출물은 P. acnes의 선장에 대해 억제력이 나타났으며 10.0% 이상일 때 가장 효과가 있다는 것을 말한다.< Figure 4. >



< Figure 4. >Effects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for P. acnes growth with various concentration

그러나 추출물이 첨가된 배지는 농도에 따라 일정기간 유도기가 관측되었고 점차적으로 균체량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 일정시간이 지난 후 균체의 급속한 증가가 관측되었고 농도조건에 따라 유도기가 다름으로서 추출물

이 P. acnes의 성장 억제에 영향을 준다는 것을 확인하였다.
농도조건에 따라 다르게 나타나는 유도기를 측정하여 표로 정리하였다.<Table. 8>

Table 8. Effects of *Rhododendron brachycarpum D.Don* extracts for P.acnes growth with various concentration

Treatment	Time(hr)				
	0	12	24	36	48
control	0	1.21	3.14	3.96	3.97
1.00%	0	0.53	0.56	1.03	1.38
5.00%	0	0.34	0.47	0.55	0.56
10.00%	0	0.11	0.13	0.15	0.15

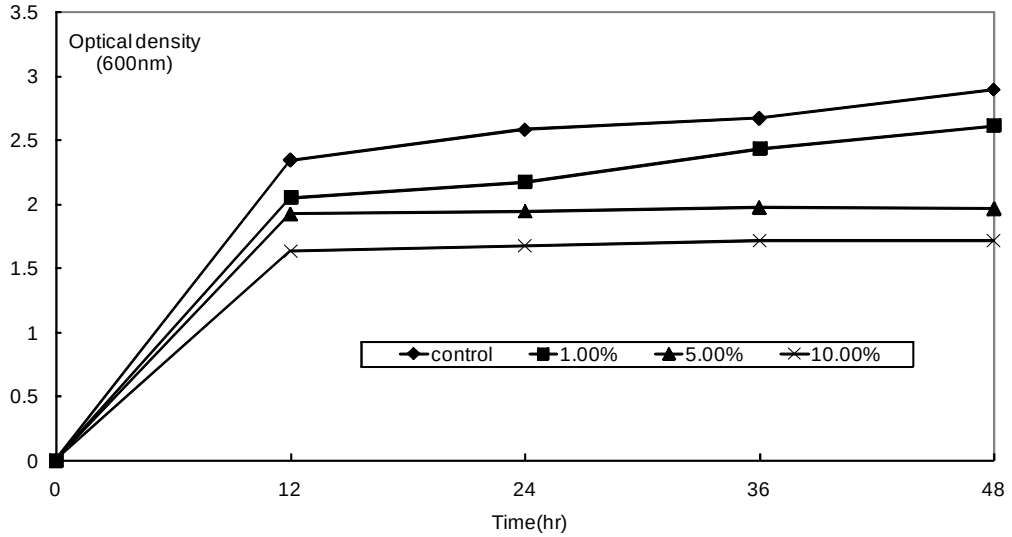
3. S. aureus균의 성장에 미치는 영향

만병초 잎 추출물이 S. aureus 의 성장에 미치는 영향을 농도별 시간대별로 측정한 OD값이다.
그러나 추출물이 첨가된 배지는 농도에 따라 일정기간 유도기가 관측되었고 점차적으로 균체량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 일정시간이 지난 후 균체의 급속한 증가가 관측되었고 농도조건에 따라 유도기가 다름으로서 추출물이 S. aureus의 성장 억제에 영향을 준다는 것을 확인하였다. 만병초 잎 추출물을 함유하고 있지 않은 대조군의 경우12시간 동안 빠른 속도로 균체량의 증가가 있었고 그 후 균체량의 정지기에 들어갔다. 1.00% 첨가했을 때 12시간까지는 균체량이 증가되었고 24시간대까지 억제하다가 그 후로 조금씩 균체량이 증가하였다. 5.00% ,10.0% 첨가한 각각의 배지에서도 12시간 까지는 일정 속도로 균체량의 증가를 보여주다가 12시간에서 균체의 증가 속도

가 정지기에 들어갔으면 균의 억제력은 10.0%일 때 더 컸다. S. aureus 에 대해서 1.00% 만병초 잎 추출물은 24시간이후로는 억제력이 미미하며 5.00% 와 10.0% 첨가 조건에서 만병초 잎 추출물은 S. aureus 의 성장에 대해 억제력이 나타났으며 10.0% 이상일 때 효과가 더 큼을 나타냈다. <Table 9.>< Figure 5. >

Table 9. Effects of *Rhododendron brachycarpum D. Don* extracts for S. aureus growth with various concentration

Treatment	Time(hr)				
	0	12	24	36	48
control	0	2.34	2.58	2.67	2.89
1.00%	0	2.05	2.17	2.43	2.61
5.00%	0	1.92	1.94	1.97	1.96
10.00%	0	1.63	1.67	1.71	1.71



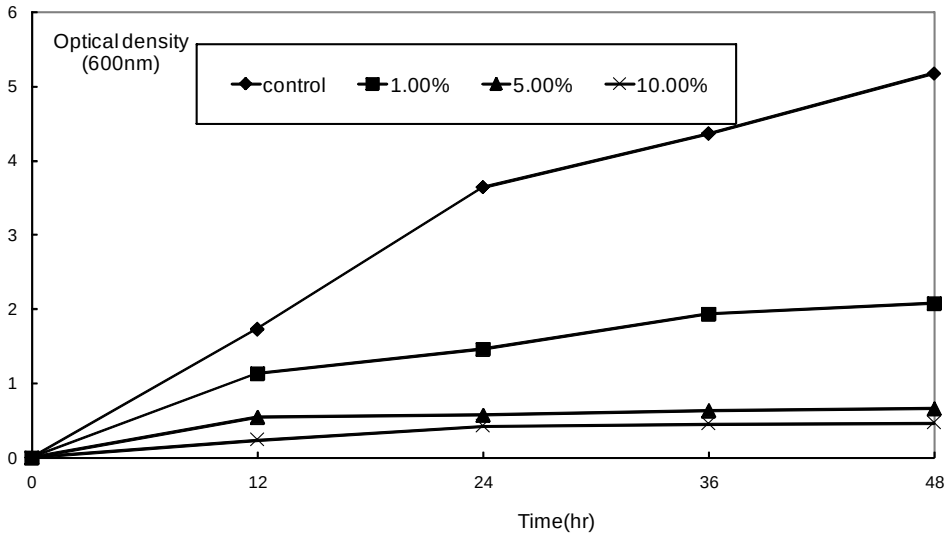
< Figure 5. >Effects of *Rhododendron brachycarpum D. Don* extracts for S. aureus growth with various concentration

4. S. epidermidis균의 성장에 미치는 영향

S. epidermidis 의 성장에 미치는 영향을 농도별 시간대별로 측정한 OD값이다. 만병초 잎 추출물은 여드름 유발균인 S. epidermidis 만을 배지에 접종하고 추출물을 첨가하지 않았을 경우 24시간대 까지 일정하게 증식하였으며 특별하게 유도기를 거치는 것 같지는 않았다. 24시간이 경과 후 증식식속도가 저하되었으며 만병초 잎 추출물을 농도별로 투여하였을 경우 5.00%이상에서 두드러지게 성장 저해 효과를 보여주었다. 따라서 만병초 잎 추출물 5.00% 농도가 S. epidermidis의 성장에 영향을 미치며 24시간 경과부터는 더 이상의 증식은 없이 일정한 패턴을 유지하였다. <Table. 10>< Figure 6. >

Table. 10 *Effects of Rhododendron brachycarpum D.Don extracts for S. epidermidis growth with various concentration*

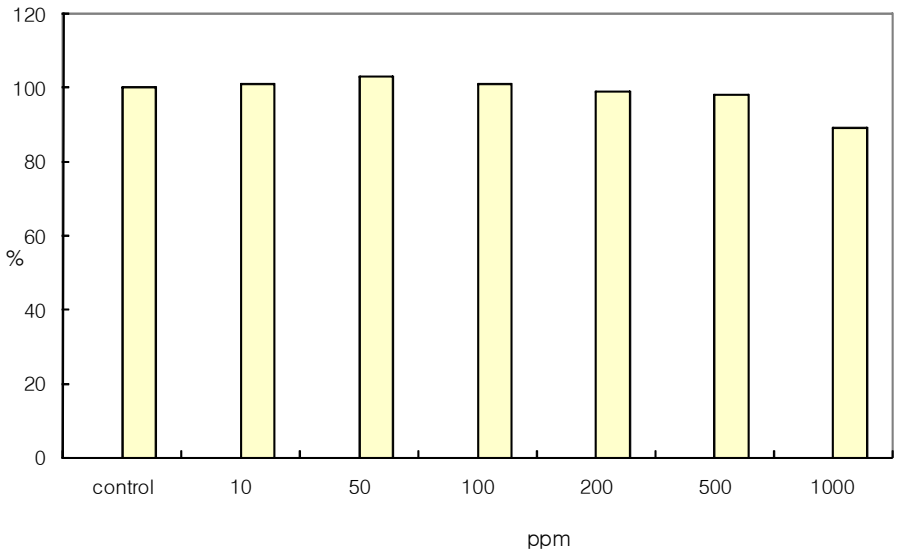
Treatment	Time(hr)				
	0	12	24	36	48
control	0	1.73	3.64	4.36	5.17
1.00%	0	1.13	1.46	1.93	2.08
5.00%	0	0.54	0.57	0.63	0.66
10.00%	0	0.24	0.43	0.45	0.47



< Figure 6. > Effects of *Rhododendron brachycarpum D. Don* extracts for S. epidermidis growth with various concentration

5. MTT정량에 의한 세포생존률 측정

Mosmann 방식에 따라 10, 50, 100, 200, 500, 1000ppm 농도의 만병초 잎 추출물을 포함한 배양액에서 마우스 상피세포주(mouse epidermal cell)인 L929 Cell을 24시간 배양한 후 세포 증식율을 측정하여 대조군과 비교하였다. 만병초 잎 추출물이 50ppm과 100ppm에서 1%, 3% 증가하였고 200ppm과 500ppm에서는 3-5%감소하였음을 확인하였다. 1000ppm에서 11%정도의 세포독성을 유발하면서 세포의 생존을 방해하고 있음을 확인하였다. 이상의 실험에서 만병초 잎 추출물이 1,000ppm 이상에서 세포독성이 유발하고 있음을 알 수 있다. < Figure 7. >



< Figure 7. > Cell viability as assessed by the MTT assay for L 929 cell line pretreated for 24h with *Rhododendron brachycarpum D. Don* . The data are presented as the arithmetic mean percent of the control

6. Nitric oxide(NO)생성 억제력 평가

체내의 염증과정에서는 다량의 NO가 생성되는데 만병초 추출물을 농도별로 전처리하고 LPS로 NO생성을 유도 했을때 NO생성이 억제되었다. 만병초 잎 추출물의 NO의 생성 억제력을 측정한 실험을 한 결과, 생성된 NO양은 sodium nitrite($NaNO_2$)를 standard 로 , 25㎍/㎖부터 미량이지만 농도 의존적으로 NO생성을 억제하고 있음을 보여주었다. < Table 11. >

Table 11. Inhibitory effect of extract of *Rhododendron brachycarpum D.Don* . on the production of nitric oxide in RAW 264.7cells

Treatment	Composition (%)		
	10㎍/㎖	25㎍/㎖	50㎍/㎖
Extract of *Rhododendron brachycarpum D.Don leaves*	0.56	2.65	3.89

Ⅳ. 고찰

염증은 균의 감염, 열 ,외상 항원 항체반응 등 생체조직의 기질 변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전 을 말한다. 염증을 일으키는 원인은 여러 가지가 있지만 물리적 인자(기계적 상해 작용, 온도· 방사선 등)와 화학적 인자(강산을 비롯한 독극물 등), 병원 미생물(세균감염 등의 기생충에 의한 것), 면역학적 자극(알레르기 등) 등을 들 수 있으며, 이중에 병원 미생물에 의한 것이 가장 많다. (박광균, 1999)

우리 인체는 피부를 포함한 몸 전체에 상재균이 많이 존재하고 있다. P. acnes 대표적인 여드름 유발균으로 피지선에서 분비되는 피지를 통해 증식하며 여드름 발생과 염증의 원인이 되는 호지성균이다. 세균성 lipase와 같은 지방분해효소와 화학주성인자를 분비하여 피지를 triglyceride와 free fatty acid로 가수분해하고 free fatty acid는 모낭벽을 파괴하여 모낭 내용물을 진피내로 유출시켜 염증반응이 일어나게 된다. (Peter G.Smith 1977;Leyden J.J., McGinley K.J.,1983) 수종 황금 등의 천연 추출물이 항균효과가 있다고 실험하였다. (손대범,2004; 오성문,2006; 최관호,2007; 유진곤,2007)

S. aureus 과 S. epidermidis 은 인체에 흔히 감염을 일으키는 세균으로 뾰루지나 옹종, 농가진 같은 피부염증을 유발한다. S. aureus은 3,4기 중증 화농성 여드름에서 흔히 발견되고 있고 때로 혈류를 따라 전신에 전파되어 폐렴, 골수염을 일으키기도 한다. 모낭은 정상적으로 다양한 미생물총을 함유하고 있다. 가장 흔한 미생물로는 누두하부에 혐기성 디프테리아균인 P. acnes 가 있으며, 상부인 말단누두부에는 M. furfrur 가 존재하고 모낭주위의 피부표면에는 호기성인 S. epidermidis가 존재한다. (이건섭,1999;서울대미생물교실,2008) 그러므로 여드름을 예방 치료하기 위해서 피지 생성과 염증반응을 억제시키고 P. acnes 증식 또한 억제 시켜야 한다. 한방에서 쓰이는 약재의 혼합 추출물을 가지고 S. aureus에 대한 항균 효과 (손대범,2004, 원영

호,2005, 김진만,2005) 를 실험하였다.

천연 에센셜 오일을 가지고 P. acnes , S. aureus 과 S. epidermidis 에 대해 항균 실험을 하기도 하여 에센셜 오일 자체로는 여드름 균에 미미한 영향을 미친다는 결과를 얻기도 하였다. (홍지연,2007)

만병초 (Rhododendron brachycarpum D. Don)는 진달래과에 진달래속에 속하는 고산지대에 많이 자라는 상록관목으로 만병초 잎은 고무나무 잎을 닮았고 꽃은 철쭉꽃을 닮았다. 지리산, 설악산 ,오대산 , 태백산, 울릉도 등 주로 고산지대와 북부지방의 고산지대에 자생하고 있으며 여름에 희색 꽃이 핀다.

전 세계 약 1,000종이 자생하며 우리나라에는 약 11종이 분포되어 있다. 백두산에 노랑색 꽃이 피는 노란 만병초의 군락이 있고 , 울릉도에는 붉은 꽃이 피는 홍만병초가 알려져있다. 천상초(天上草), 뚝갈나무, 만년초, 풍엽, 석암엽 등 여러 이름으로 불리고 있다. 중국에서는 칠리향(七里香) 또는 향수(香樹)라는 이름으로 부르는데 꽃에서 좋은 향기가 나기 때문에 붙은 이름이다. (최진규 ,2007) 키는 1미터 가량이고 잎은 가죽질이며 타원형에 표면은 짙은 녹색이며 뒷면은 연두색이고 그물맥이 뚜렷하며 길이 3~5cm이고 너비는 2~3cm이다. 꽃은 담황색 혹은 흰색으로 줄기 끝에 3~10송이씩 달리고 깔때기 모양이며 지름 3~4cm이다. 수술은 10개이고 암술대는 1개이다. 씨방에는 갈색 털이 있다. 열매는 삭과로 타원형이다. 개화기는 5~7월이고 결실기는 9월이다. 土深이 깊고 腐植質이 많은 肥沃適潤한 곳에서 잘 蕃盛하며, 주야간 온도 차이가 심하지 않은 곳이 적지이고 이러한 곳에 植栽하면 아름다운 잎과 꽃을 감상할 수 있다. 공해에는 약하나 분무기나 물로 자주 씻어줌으로써 잘 자라게 할 수 있다.

만병초는 민간에서 만병통치약이라 하여 쓰이고 있다. 만병초 잎을 우려 낸 차를 오래 마시면 정신이 맑아지고 피가 깨끗해지며 정력이 좋아진다. 특히 여성들이 먹으면 불감증을 치료할 수 있고 정력이 세어진다고 한다. 습관성이 없으므로 오래 복용할 수 있다. 간경화, 간염, 당뇨병, 저혈압, 고혈압,

관절염 등에도 좋은 효과가 있다고 여겨지며 해열 ,이뇨 복통에도 널리 사용하고 있다. 무좀을 포함한 각종피부병에도 만병초 달인 물로 자주 씻거나 발라준다.(박종희,1995) 만병초 달인 물을 진딧물이나 농작물의 해충을 없애는 자연 농약으로 쓸 수도 있으며 화장실에 만병초 잎 몇 개를 넣어 두면 구더기가 다 죽는다. 만병초 달인 물로 소, 개, 고양이 등 가축을 목욕시키면 이, 벼룩, 진드기 등이 다 죽어버린다.(최진규 ,2007) 약으로 쓰는 것은 주로 잎인데 잎에는 Andromedotoxin 이라는 유독성분이 함유되어 있어서 구토, 뇌빈혈, 맥박이 느려지고 소변량이 줄어들며 설사가 나는 부작용을 겪을 수 있으므로 쓰는 양에 주의를 요하는 식물이다. (최영전, 2006) 만병초 잎의 EtOH 추출물과 각 분획물들의 세포독성을 측정한 결과 , 대부분의 시료 0.5mg/ml 이하의 농도에서 35% 이하의 세포 독성이 나타났다. 세포 DNA에 대하여 매우 약한 손상만 일으키는 것이 확인되었다.(변경섭, 2005)

성분으로는 수분 56.9% 탄수화물 36.1% 회분 2.1% 조단백질 3.3% 조지방 함량 1.6% 지방산에서 behenic acid 50% 로 가장 많았고 palmitic a linoleic arachidic stearic linolenic oleic 순으로 나타났다. 비타민 A30.6 mg/100g , 비타민 C 90.2 mg/100g 비타민 E는 알파-tocopherol 67.3mg/100g 베타-tocopherol 16.6 mg/100g 감마-tocopherol 8.5 mg/100g이 확인되었다. K, Mg, Na, Mn, P, Zn, Fe, Cu 순으로 무기질이 확인 되었다.(변경섭,2005) 플라보노이드, triterphenoid, geraniol 등도 확인되었다.

우피두견(牛皮杜鵑)이라 하여 이질과 설사에 유효하며, 요통, 사지동통에 일정한 지통 작용이 있다. 심장 수축 능력을 향상시키고, 정맥압을 내린다. 항균작용이 있다고 적혀있다.(안덕균,2000; 최진규, 2006)

중국의 의학 사전인 <중약대사전>에 성질이 평하고 맛은 달고 시큼하며 생리불순, 토혈, 자궁출혈, 직장궤양출혈, 이질, 관절염을 치료한다고 적혀있다. <중국장백산약용식물채색도지>에는 중추신경을 억제하여 통증을 멎게 하고 혈압을 뚜렷하게 낮추며 수렴, 발한, 항균, 강심 작용이 있어 이질과 사지마

비 ,신경통 류머티스성 관절염을 치료하는 효능이 있다 고 하였다. 약물 달인 물은 동물의 중추 신경에 대하여 억제 작용이 있고, 혈압을 하강시킨다. (최영전, 2006)

일본에서는 동속 식물인 *Rbododendron metternicbii var. bondoense* 의 잎을 석남엽이라고 하여 민간에서 頭風, 內傷의 치료에 응용하고 있다.(김태정, 1996) 중국에는 14가지 종류의 만병초가 자라고 있으며 모두 약용으로 사용되며 만성기관지염, 골수염, 객혈 등의 치료에 쓰이고 있다. (小學館, 1985)

만병초는 희귀 수종으로 그에 대한 연구는 미진한 실정이다. 수종의 생육환경 및 재배 육종에 대한 연구 (이언동,2007;김재진,2004;홍혜옥, 1984) 가 있다. 성분 연구로는 Flavonoid의 분리 연구 (최재수,1979) 와 식물 화학적 성분 연구 (장기욱, 2005)을 하였다. 만병초 잎 추출물의 식품소재 활용을 위한 기초 성분 분석 및 Free radical 소거 활성과 유전 독성과 사람의 암세포주 등에 대한 세포독성 실험(변경섭,2005) 을 하였다.

이에 본 논문에서는 만병초 중에 민간에서 약재로 많이 사용되는 만병초 잎의 열수추출물을 이용하여 여드름 및 염증을 유발시킬 수 있는 네 균주들을 가지고 항균 및 항염 작용에 대해 실험해 보고자 하였다. S. aureus , M. furfur , P. acnes , S. epidermidis 를 이용하여 실험한 결과 만병초 잎 추출물은 10.0% 에 36hr을 기준으로 S. epidermidis 가 13.9 mm로 가장 높았고 P. acnes.는 12.2mm , S. aureus는 10.2mm 순으로 염증세균 과 여드름 균에 대한 항균 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 M. furfur에서는 항균 작용이 아주 미약하게 나타났다. S. aureus , P. acnes , S. epidermidis 는 5.00%에서부터 균 성장 억제 효과가 나타났고 10.0 %일 때는 항균 활성이 더 커졌다. 이것으로 보아 농도 의존적으로 항균 작용이 일어남을 알 수 있다.

NO(nitric oxide)는 NOS 효소에 의해 만들어지며 생산된 과량의 NO는 피부염증을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 한다.(

Kim, J.M.,2006) 만병초 잎 추출물의 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성 억제량을 측정한 결과 25㎍/㎖부터 미량이지만 NO생성을 억제하고 있는 것으로 나타났다. MTT 정량에 의한 세포 생존률을 측정한 결과 L929 세포에 1000ppm 이상에서 세포 독성이 유발 되는 것을 확인하였다. 이상의 실험 결과를 종합해 보면 만병초 잎 추출물은 M. furfur을 제외한 P. acnes , S. aureus, S. epidermidis 대하여 항균 활성을 보였고 정상 세포에 대한 독성은 약하게 나왔다.

V. 결론

만병초 잎의 열수추출물의 세포독성을 측정하고 피부에 있는 균 중 여드름과 염증을 유발시키는 S. aureus , P. acnes와 S. epidermidis 와 Malassezia furfur 에 대한 항균 및 항염 효과를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 만병초 잎의 열수추출물이 S. epidermidis 에서 균체량의 성장을 억제 작용이 가장 크게 나타났다. P. acnes 와 S. aureus 에서도 항균 효과가 나타났다.

2. 정상피부의 모낭에서 여드름생성에 간여하는 Malassezia furfur 에는 항균성이 미약하게 나타났다.

3. 생성된 NO양은 sodium nitrite($NaNO_2$)를 standard 로 비교한 결과 25㎍/㎖부터 미량이지만 NO생성을 억제하고 있음을 보여주었다.

4. MTT 정량에 의한 세포 생존률을 측정한 결과 L929 세포에 1000ppm 이상에서 세포 독성이 유발 되는 것을 확인하였다.

5. 만병초는 민간요법으로 약재시장에서 많이 이용되고 있는 약초이지만 그 약리 및 임상적인 연구는 미진한 실정이다. 본 실험은 열수추출에서 이루어졌으나 향후 다른 실험방법을 통해 보다 실증적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

참고문헌

김재진, 여항산 일대의 삼림식생에 관한 생태학적 연구, 창원대학교 석사 학위논문, 2004.

김진만, 수종의 한약 복합 추출물의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구, 원광대학교 박사학위논문, 2005.

김태정, 「한구구의 자원식물 III」, 서울대학교출판부, 서울, p.219, 1996.

대한피부과학회교과서편찬위원회,「피부과학」,서울.pp.161-6 461-4. 2001.

박광균, 「구강생화학」, 12장 면역과 염증 , 군자출판사, 서울, p.101, 1999.

박종희, 만병초의 생약학적 연구, 한국생약학회, 1995.

변경섭, 만병초의 식품소재 활용을 위한 기초 성분 분석 및 Free radical 소거 활성과 DNA의 산화적 송상에 대한 보호 효과, 강원대학교 석사학위논문 2004.

서울대학교의과대학미생물교실,「병원미생물학」,IX장세균감염,서울대학교출판부, 서울, pp.223-226, 2008.

서은성, 가감청상방풍탕의 항염증 효과에 대한 실험적 연구, 원광대학교 석사학위논문 2005.

小學館, 「上海科學技術出版社篇」, . 中葯大辭典. 中國, pp. 13- 73 ,1985.

손대범, 대황,황금, 황백 복합 추출물의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구, 원광대학교 석사학위논문, 2005.

손정모, 어린이의 피부질환 보유 어린이의 건강기능식품 섭취와 한약 복용 실태조사, 중앙대학교 석사학위논문, 2007.

안덕균, 「한국본초도감」, 교학사 ,서울, p. 751, 2003.

오성문, 약용식물로부터 여드름 원인 미생물에 대한 천연 항균제 탐색, 연세대학교 석사학위논문 2006.

이건섭, 「진단미생물학」, 고려의학, 서울, p.322-3,359-74, 1999.
이언동, 생태수목원 조성에 관한 연구, 진주산업대 석사학위논문 , 2007.
이윤희, 천연물질의 항균특성 및 단백질 분리 연구, 한국기술대학원 석사학위논문, 2005.
원영호, 삼황세제가감방의 항균, 항염 및 항알레르기 효과에 대한 실험적 연 구, 원광대학교 석사학위논문, 2005.
원해영, 사철쑥의 항염 효과에 관한 연구, 원광대학교 석사학위논문, 2004.
장기욱, 만병초의 식물 화학적 성분 연구 , 성균관대학교 석사학위논문 2005.
蕭培根, 「중국본초도감」(강병수, 이유미 공역), 여강출판사, 서울, p.31, 1994.
최관호, 전도산이 여드름 유발균과 염증에 미치는 영향, 상지대학교 박사학위논문 2007.
최영전, 「한국 민속식물」, 아카데미서적 서울, p.108, 2006.
최재수, 만병초의 Flabonoid 성분에 관한 연구 ,부산대학교 석사학위논문 1979.
최진규, 「약이 되는 우리풀 꽃 나무」, 한문화 ,서울, p.299, 2007.
홍지연, 천연항균성분을 이용한 여드름 개선 화장품에 관한 연구, 숙명여자대학교 석사학위논문 2007.
홍혜옥, 韓國産 萬病草에 관한 연구 , 강원대학교 박사학위논문 ,1984.
B. Frei, Natural antioxidants in human health and disease, Academi press, San Diago, pp.1-21, 1944.
Choi J.S., Han S.Y., Park J.C., Choi J.H., Woo W.S., Flavonoids from the leaves Rhododendron brachycarpum arch Pharm Res. (9) pp.222-236, 1986.
Choi S.M., Kim M.J., Choi Y.H.,Ahn H.J., Yun Y.P., Antibacterial Effect of Several Natural Products against Propionibacterium acnes. Kor. J. phamacogn. pp.42, 89-94, 1998.
Dean RT, Gieseg, Davies MJ, Reactive speciees and their accumulation on radical damaged proteins. Trends Bioche. Sci, pp.18; 437-441 1993.

Devy, C. and Gautier, R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. Biochem, Pharmacol, pp.39;399-405, 1990.

Heo M.Y., Antigenotoxicity of Ginseng Petroleum Ether Extract and its action Mechanism. J. Fd. Hyg. Safety 13(3) pp.243-251, 1988.

Hikino H., Ito K., Ohta T., Takemoto T., Stereostructure of rhodojaponin I, II, toxins of Rhododendron japonicum, and of asebotoxin of Pieris japonica. Chem. Pharm. Bull., 17, pp.1078-1079, 1969.

Hong H.O., Lee G.E., Yoo K.C., Han K.H., Studies on the wild Rhododendron brachycarpum in korea.. J. Kor. Soc. Hort. Sci 21(1) pp.57-61, 1983.

H.Y., Lee J.H., Inhibitory Effect of korean Mistletoes on the Oxidative DNA Damage. Korea J. Medicinal Crop Sci. 11(2) pp.89-96, 2003.

J.H., Growth Enhancement and Cytotoxicity of korean Mistletoes fractions on Human Cell Lines. Korean J. Medicinal Crop Sci. 11(1) pp.62-70, 2003.

Keaney, J.K., D. Hamby, and G. Gowland. The follicular distribution and abundance of resident bacteriaon human skin. J. Gen. Micribiol. pp.130; 797-801, 1984.

Leyden J.J., McGinley K.J.,Cavalieri S Propionbacterium acnes resistance to antibiotics in acne patients. J. Am Acad Dermatol. pp.8;41-6, 1983.

O. I. Aruoma Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, J. Amer. Oil Chem, pp.75; 199-212 1998.

Park H.R., Kim S.H., Anti-inflammatory Activities of Herbal Preparation (HemoHIM), Lab. Anim. Res. 21(3) pp.267-271, 2005.

Park J.H., Kim J.S., Jeong A.Y., Namba T A Pharmaco gnostical Study on the 'Man Byung Cho' Kor. J. pharmacogn 26(2), pp.168-174, 1995.

Peter G, Smith AL Group A Streptococcal infection of the skin

and pharynx. N Engl J Med. pp. 297,311-5, 1977.

Schidt, HHW, Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: Methods in Nitric Oxide Research, edited by Freelisch M, and Stamler J. Chichester, UK; Wiley pp.491-497, 1996.

Steele RW. Recurrent Stapylococcal infection in families. Arch Dermatol. pp.116, 189-96 ,1980.

Yoo T.M., Yi S.Y., Chung S.Y., Seung S.A., Rheu H.M., Lee E.B., Yang S.A., Studies on the Antiinflammatory Effects of Natural Products., Kor. J. phamacogn pp. 269-275, 1998.

Yu C.Y., Kim S.H., Lim J.D., Kim M.J, Chung I.M., Intraspecific relationship analysis by DNA markers and in vitro cytotoxic and antioxidant activity in Eleutherococcus senticosus. Toxicology in vitro 17 pp.229-236, 2003.

Ward, P. A. Mechanism of endothelial cell injury. J. Lab. Clin. Med. pp. 118;421-5, 1991.

저작물 이용 허락서

학 과	대체의학과	학 번	20078655	과 정	석사
성 명	(한글) 조세련 (한문) 曹 世 連 (영문)Cho, Sei-Lyun				
주 소	전라남도 화순군 화순읍 부영아파트 606				
연락처	Email : newcsl@hanmail.net				
논문제목	(한글) 만병초 잎 추출물의 항균, 항염 효과				
	(영문) *Anti microbacterial Activity and Anti inflammatory Effects* of the *Rhododendron brachycarpum D. Don* Leaves Extracts				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

1. 저작물의 DB 구축과 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장체에의 저장, 전송 등 을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경을 금지함.
3. 배포, 전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등을 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간 종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판 허락을 하였을 경우 1개월 이내에 소속 대학에 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송, 출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2009년 02월 일

저작자 : 조 세 련 (인)

조 선 대 학 교 총 장 귀하