



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

2011년 2월  
석사학위 논문

Effect of the Extracts from  
the *Paeonia lactiflora*  
on Atopic Dermatitis

조선대학교 대학원

생물학과

김공민

작약 추출물의 아토피  
피부염 효과

Effect of the Extracts from the  
*Paeonia lactiflora* on Atopic Dermatitis

2011 년 2 월 25 일

조 선 대 학 교 대 학 원

생 물 학 과

김 공 민

작약 추출물의 아토피  
피부염 효과

지도교수 김 종 세

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2010년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

생 물 학 과

김 공 민

김공민의 석사학위논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교수 최 영 복



위 원 조선대학교 교수 김 종 세



위 원 조선대학교 교수 이 현 화



2010년 11월

조선대학교 대학원

# Content

LIST OF TABLE	III
LIST OF FIGURES	IV
ABSTRACT	V
I. 서론	1
II. 실험	5
1. 실험재료	5
2. 시약	5
2-1. 항균활성	5
2-2. DPPH radical 소거 활성	5
2-3. 폴리페놀함량	5
2-4. 플라보노이드 함량	5
2-5. 세포독성(MTT assay)	6
2-6. 아질산염(Nitric oxide)소거능	6
2-7. 탈과립억제효과( $\beta$ -hexosaminidase assay)	6
3. 피부세포 및 균주 배양	7
4. 실험에 사용된 기기	9
5. 실험 방법	10
5-1. 시료( <i>Paeonia lactiflora</i> ) 추출	10
5-2. 항균활성시험	10
5-3. 항산화 시험	11
5-3-1. DPPH radical 소거 활성	11
5-3-2. 폴리페놀 함량 시험	11
5-3-3. 플라보노이드 함량 시험	12
5-4. 세포독성(MTT assay)시험	12
5-5. 아질산염(Nitric oxide)소거능 시험	12
5-6. 탈과립 억제 효과 시험( $\beta$ -hexosaminidase assay)	13

III. 결과	14
1. 항균 활성 시험	14
2. DPPH radical 소거 활성 시험	17
3. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 시험	17
4. 세포독성(MTT assay) 시험	20
5. 아질산염(Nitric oxide)소거능 시험	20
6. 탈과립억제효과( $\beta$ -hexosaminidase assay)	24
III. 고찰	26
IV. 참고문헌	30
감사의 글	37

## LIST OF TABLES

Table 1. List of strains and media used for antibacterial experiments .....	8
Table 2. Antimicrobial activity of 100% ethanol extract from <i>Paeonia lactiflora</i> by paper disc . . . . .	15
Table 3. Polyphenolics and flavonids contents in <i>Paeonia lactiflora</i> plant extracts . . . . .	19
Table 4. Effect of <i>Paeonia lactiflora</i> plant extracts on RAW264.7 Cells viability . . . . .	22



## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Overview of interacting inflammatory mechanisms in a atopic dermatitis . . . . .	2
Fig. 2. Antimicrobial activity of 100% ethanol extract from <i>Paeonia lactiflora</i> by paper disc . . . . .	16
Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of <i>Paeonia lactiflora</i> plant extracts . . . . .	18
Fig. 4. Effects of <i>Paeonia lactifloras</i> plant extracts on RAW264.7 cells viability . . . . .	21
Fig. 5. Effect of <i>Paeonia lactifloras</i> extract on nitrite oxide production by LPS induced RAW264.7 macrophage . . . . .	23
Fig. 6. Effect of <i>Paeonia lactifloras</i> on antigen-induced degranulation of RBL-2H3 cell . . . . .	25

# Abstract

## Effect of the Extracts from the *Paeonia lactiflora* on Atopic Dermatitis

Kim Kong-Min

Advisor: Prof. Kim, Jong-Se, Ph.D

Department of Biology.

Graduate School of Chosun University

Atopic dermatitis is an intensely pruritic, chronically relapsing inflammatory skin disease. Recent studies have shed light on how the complex interrelation of genetic, environmental, immunologic, and pharmacologic factors contributes to the development of Atopic dermatitis. The clinical phenotype of Atopic dermatitis varies with age and may differ during the course of disease<sup>58</sup>. The eczematous lesions may present with acute (oozing, crusted, eroded vesicles or papules on erythematous plaques), subacute (thick and excoriated plaques), and chronic (lichenified, slightly pigmented, excoriated plaques) forms.

Current methods of treatment include atopic dermatitis, humectant, and treatment with corticosteroids is common to. However, long-term side effects of steroid use indicate that. Efficacy in atopic dermatitis, many researchers are interested about the natural and the use of herbal medicines in the therapeutic treatment of atopic dermatitis has been suggested recently.

In this study, the effect of the extract from *Paeonia lactiflora* root on atopic dermatitis was evaluated by determining their effects

on antimicrobial activity, DPPH radical scavenging activity, polyphenol's content, flavonoid content, nitric oxide production, and  $\beta$ -hexosaminidase release. Microbial strains and animal cell lines used in the experiments were *S.epidermidis*, *S.aureus*, *C.albicans* and RAW 264.7 cell, RBL-2H3 mast cell. The extracts of *Paeonia lactiflora* root were prepared by ethanol extraction.

Their antimicrobial activity against *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans* was examined by the paper disc agar diffusion assay. Inhibition zone of the ethanol extract (100 mg/ml) against *S.epidermidis*, *S.aureus*, *C.albicans* were 6.3, 5.0, 5.6 mm, respectively.

The antioxidant activities of extracts were used the method of DPPH radical and nitrite scavenging assay, total polyphenolics and flavonoid contents. The DPPH radical scavenging activity of the extract was assayed at various concentrations (15.5 ~ 500  $\mu$ g/ml). 500  $\mu$ g/ml concentration showed high activity more than 90%, similar activity to BHT and scavenging activity increased in a dose-dependent manner.

In this study, we evaluated the total phenolic content and flavonoid content of ethanolic extract from *Paeonia lactiflora* root. The extract contained  $29 \pm 3 \mu$ g/ml of total phenolics and  $12.7 \pm 3.1 \mu$ g/ml of flavonoids. Total phenolics content was higher than flavonoids.

The *in vitro* anti-inflammatory activity of the extract in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW.264.7 cells was investigated. The extract inhibited nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Furthermore, we examined cell viability of RBL-2H3 mast cell and  $\beta$ -hexosaminidase assay for detecting anti-histaminic effect in the extract. At the concentration of 10, 25, 50, 100, 250  $\mu$ g/ml of the ethanol extract,  $\beta$ -hexosaminidase release was inhibited 12.03, 16.91, 53.74, 58.70, and 80.24%, respectively.

These results suggest that the root extract of *Paeonia lactiflora* could be provide a considerable plant resource for the treatment of atopic dermatitis.

# 1. 서론

아토피 피부염은 가려움증을 보이는 만성적이고, 재발성의 염증성 피부 상태를 말하며, 주로 유아와 소아에서 많이 발생한다 (Park, 2007). 아토피 피부염의 유병기간은 1개월에서 44년으로, 평균  $11.40 \pm 8.64$ 년이며, 유병기간이 1개월~4년인 경우가 27%, 10년인 경우가 53.9%의 유병률을 가지고 있다고 보고되고 있다 (Lee, 2010).

아토피 피부염의 임상적 특징들을 발육 시기에 따라 살펴보면 유아기에는 아토피피부염의 첫 징후는 뺨에 나타나는 습진과 구진성 수포와 반점성 병소로 나타난다. 아동기에 습진성 병변(eczematous lesions), 보통 굽어지는 부분(ante-cubital fossae, 목, 팔목, 발꿈치)과 목의 뒷부분, 발등 그리고 손에 나타난다. 청소년과 성인에는 습진 병변이 아동기에서 청소년기, 성인기까지 계속되거나 그 질병이 성인기에 새로이 시작되면, 머리와 목뿐만 아니라 굽어지는 부분은 lichenified plaques와 관련된다 (Wollenberg, 2005).

아토피 피부염의 주요한 특징 중 하나는 표피에 의해 수분 상실의 증가에 의해 보이는 병변과 비병변 표피지역에 영향을 주는 건조증이다 (Proksch, 2006). 이러한 건조증은 아토피 피부염에서 피부기능 저하에 대한 여러 가지 기전이 제시되어 왔는데, (i)세포외의 공간에 중요한 수분 보유 분자로 작용하는 피부 seramides 감소 (Sator, 2003), (ii)각질층의 PH 변화 (Ripke, 2004), (iii)Chymase의 과다 발현, (iv)Filaggrin의 결핍 또는 SCCE(Stratum Corneum Chymotrypsin Enzym) 또는 S100 단백질족과 같은 EDC(epidermal differentiation complex)분자의 결핍 등의 피부막 기능 저하 등을 들 수 있다. 건조한 피부는 계속 문제가 되는데, 겨울에 더욱 그러하다. 합병증으로 이차적인 박테리아와 바이러스의 감염으로 인한 것인데, 농가진과 같은 각질화를 유발하며, fulminant herpes simplex virus에 감염될 확률이 높다 (Wollenberg, 2005).

미생물에서 아토피피부염 환자는 병소피부와 정상피부의 독소를 생산하는 황색 포도상 구균(*staphylococcus aureus*)으로 균락을 이루고 있다 (Cardona, 2006). 이러한 균락 화는 아토피 피부염의 특정 염증미생물환경이 둔화된 항균 펩티드의 생산을 저해 한다 (Ong, 2002; Howell, 2006).

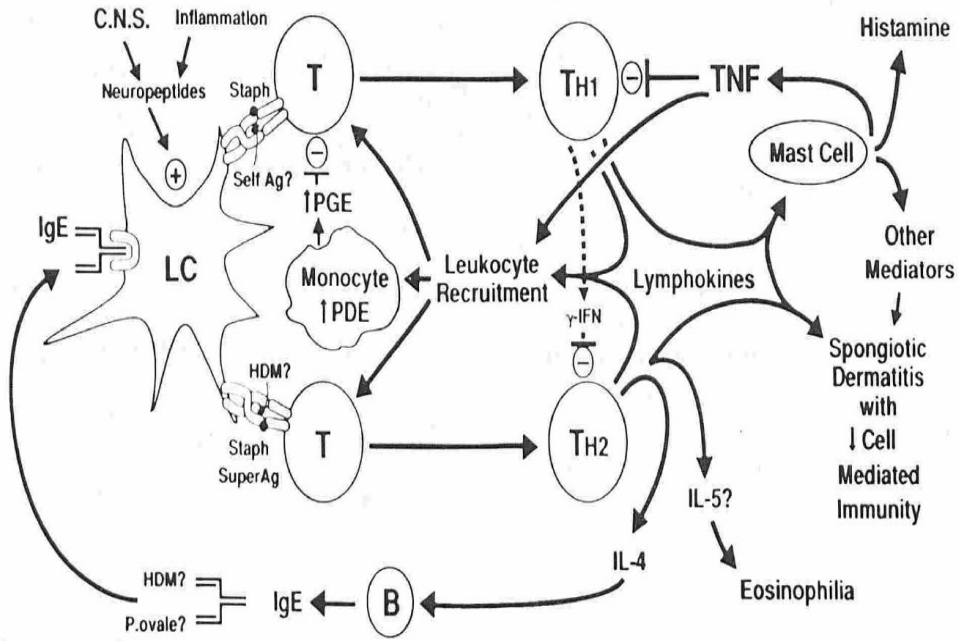


Fig.1. Overview of interacting inflammatory mechanisms in a atopic dermatitis (Cooper, 1994).

아토피 피부염을 유발하는 데에는 여러 세포들(T lymphocytes, Langerhans cells, eosinophils)과 인자들 (cytokines와 immunoglobulin, 특히 IgE)이 관여하는 것으로 알려져 있다. 사이토카인 Interleukin(IL)-4, IL-5의 증가와 IgE의 증가 및 interferon- $\gamma$ 의 감소와 interferon을 생산하는 T세포의 감소, Langerhans세포의 활성화 증가, 비만세포의 증가나 활성화 등이 대표적인 예이다. 즉, 알레르겐이 IgE에 의해 인식되면 랑게르한스세포 표면 IgE 부착 Fc 수용체에 유착되어 T림프구에 항원을 전달함으로써 T림프구가 활성화되게 된다. 이때 자가 펩타이드나 staphylococcus의 초항원(super-antigen)에 의해서도 T림프구가 활성화 될 수 있다. 다른 질환과 달리 아토피 피부염의 피부 병변에 침윤되는 염증 세포는 주로 Th2세포로서 IL-4, IL-5등의 사이토카인을 생성하여, 혈중 IgE의 상승을 촉진하고, 호산구의 증가를 유도한다. cAMP phosphodiesterase가 상승되어 있는 아토피 피부염의 비정상적인 단구에 의해 PGE의 생성이 증가하게 되고 이로 인해 Th1림프구의 침윤이 억제된다. 아토피 피부염에서 Th1의 감소된 기능은 Th1 증식을 억제하고 결국 세포 매개성 면역의 저하를 초래한다 (강태진, 2010).

일반적 아토피 피부염의 치료 중 알레르겐 회피는 아토피 피부염을 악화시키는 식품 알레르겐을 제거함으로써 아토피피부염의 임상적인 호전을 보였다는 연구 결과가 있으며, 아토피 피부염의 피부 관리에 있어 피부의 수분 공급 과 보습제를 함께 사용하면 각질층 장벽을 유지하고 재확립함으로써 아토피피부염 환자의 임상 지표들이 개선되었다. 아토피 피부염에서 알레르겐 특히 탈감작 효과가 있지만 아토피 피부염과 집먼지 진드기에 대한 즉시형 과민반응이 있는 소아를 대상으로 시행한 이중 맹검 연구는 8개월간의 탈감작 치료가 대조군보다 우월한 결과를 제시하지 못했다 (김정희, 2004).

국소 코티코스테로이드(topical Steroid) 방법은 급성 및 만성질환에 모두 효과를 보이면서 아토피피부염에 가장 중심이 되는 치료제로 자리매김하여 왔지만 처음으로 국소치료를 시작할 때 너무 강도가 약한 제제로 시작하면 아토피 피부염이 지속되거나 악화될 수 있으며 이는 치료에 대한 순응도를 감소시키는 원인이 된다는 단점을 가지고 있다. 또한 국소 칼시뉴린 억제제(topical calcineurin inhibitor)는 광범위한 면역 억제 및 항염증 효과 때문에 아토피피부염에 대한 국소치료를 가장 중요한 위치에 있

이면서도 국소 및 전신 부작용으로 환자들이 사용을 꺼리는 추세이다 (김정희, 2004).

이러한 치료제를 장기간 사용했을 때 피부의 위축이나 소아 환자에서 성장 지연의 기능성 등 각종 부작용이 문제되고 있어 새로운 치료에 대한 필요성이 증가하고 있다.

작약(*Paeonia lactiflora*)은 수천년 전부터 동양에서 보혈에 사용된 약재로써 미나리아재비과 *Panunculaceae Paeonia* 속에 속한다. 산지에서 자라며 줄기는 여러개가 한 포기에서 나와 곧게 서고 높이 60cm정도이며 잎과 줄기에 털이 없다. 뿌리는 여러개가 나오지만 가늘고 양끝이 긴 뾰족한 원기둥 모양으로 굽다. 작약의 주요 성분으로 paeoniflorine, paeonol, oxypaeoniflorine, paeonin, albiflorine, triterpenoids 화합물 등을 함유하고 있다 (김도순, 1990; 정동주, 1986).

작약의 주요 효과로는 진통, 해열, 진경, 이뇨, 조혈, 지한 등의 효능을 가지고 있다. 복통, 위통, 두통, 설사복통, 류머티즘성 관절염, 월경불순, 월경이 멈추지 않는 증세, 대하증, 식은땀을 흘리는 증세, 신체 허약증에 쓴다. 백작약은 수렴작용과 해열작용을 나타내고 간의 기운이 멎친 것을 풀어주고 통증을 감소시켜주는 작용이 있어 각종 통증과 함께 생리불순, 생리통, 대하, 가슴, 옆구리와 배 아픈 증상, 팔다리의 경련과 통증 등에 효과를 나타낸다. 또한 몸이 허하여 땀이 많이 나는 증에 응용한다.

북한에서 펴낸 『동의학사전』에서는 ‘맛은 쓰고 시며 성질은 약간 차다. 간경, 비경, 폐경에 작용한다. 혈을 보하고 통증과 땀, 출혈을 멈추며 간화를 내리고 소변이 잘 나오게 한다. 혈허증, 혈허로 배가 아픈 데, 위장 경련으로 배가 아픈데, 팔다리가 오그라들며 아픈 데, 신경통, 류머티즘성 관절염, 월경통, 흉통, 간화로 머리가 아프고 어지러운데, 신경쇠약, 월경과다, 부정 자궁출혈, 자한, 식은땀, 이질, 대하, 뾰루지 등에 쓴다. 달이거나 환으로 또는 가루 내어 먹는다. 백작약의 전초도 지사약으로 쓴다. 허한증에는 백작약은 쓰지 않으며, 여로와는 배합금기이다.’ 라고 기록하고 있다 (배철우, 메디칼박스, 2008).

따라서 본 연구에서는 작약의 아토피 피부염 치료제로서의 이용가능성을 알아보려고 먼저 작약 추출물의 항균 활성 및 항산화, 세포독성 및 No 생성 제거 효과를 실험한 후, mast cell에 추출물의 탈과립 억제능 시험을 통해 항히스타민 및 항 알레르기 작용을 관찰하였다.

## II. 실험

### 1. 실험재료

실험에 이용된 작약은 2009년도에 경상북도 의성군에 위치한 의성작약농장에 의뢰하여 구입을 하여 사용 하였다.

### 2. 시약

#### 2-1. 항균활성

사용 균주로는 *staphylococcus epidermidis*(KCTC1917), *staphylococcus aureus*(ATCC12692), *candida albicans*(KCTC7965)를 사용하였으며 Tryptic Soy Broth(TSB, Difo), Bacto agar, Yeast Extract는 Difco에서 구입하여 사용하였다.

#### 2-2. DPPH radical 소거 활성

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, D-9132, sigma), BHT(2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol, B1378, sigma), Vit C(Ascorbic acid, A5960, sigma), DMSO(Dimethyl sulfoxide, D5879, sigma) 시약을 사용하였다.

#### 2-2. 폴리페놀함량

Standard는 tannin acid를 사용하였으며 Folin-denis, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 사용 하였다.



### 2-3. 플라보노이드 함량

Standard는 naringin을 사용하였으며 Diethylene glycol과 1N-NaOH를 사용하였다.

### 2-5. 세포독성(MTT assay)

세포배양을 위한 시약은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, USA)에서 Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin을 구입하여 사용하였다.

### 2-6. 아질산염(Nitric oxide) 소거능

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)배지를 사용하였으며 washing용액으로는 PBS(-)을, Trypsin-EDTA, Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin, Lipopolysaccharide(LPS), Griess시약을 사용하였다.

### 2-7. 탈과립 억제 효과( $\beta$ -hexosaminidase assay)

배지는 MEM배지를 사용하였으며 NaCl, KCl, dextrose(sigma, D9434), MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, PIPES(sigma, P6757), NaOH(sigma, S5881), BSA, DNP-HSA(sigma, A6661), citric acid(aldrich, 251275), sodium citrate(sigma, S4641), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(sigma, 2127), NaHCO<sub>3</sub>(Sigma, S6014), P-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminide(Mpbio, 0215424390)를 사용하였다.

### 3. 피부세포 및 균주 배양

본 실험에 사용한 macrophage cell(RAW464.7)은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% Fetal Bovine Serum(FBS)과 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가하여 생육배지로 사용하였고, mast cell(RBL-2H3)은 MEM배지에 10% FBS와 penicillin-streptomycin을 첨가하여 생육배지로 사용하였다. 세포는 2~3일마다 culture dish의 80% 정도까지 자랐을 때 계대 배양하였다. 항균 실험에 사용한 균주는 피부상재균 중 염증을 유발하는 균주 2종(*s. epidermidis*, *s. aureus*)과 무좀과 칸디다증의 원인균 1종(*c. albicans*)을 사용하였다 (Table 1).

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

Strains	Culture collection	Optium condition	
		Media	Temp
<i>staphylococcus epidermidis</i>	KCTC1917	TSB/BA	37°C
<i>staphylococcus aureus</i>	ATCC12692	TSB/BA	37°C
<i>candida albicans</i>	KCTC7965	YMB/YMA	37°C

#### 4. 실험에 사용된 기기

Rotary vacuum evaporator(Tokyo Rikakikai Co., Japan), Freeze dryer (Ilisin, Korea), UV/Vis spectrophotometer(Shimadzu, Japan), Centrifuge (Hitachi, Japan), shaking water bath(Hanbaek Co., Korea), pH meter (Orin Research, Inc. U.S.A), inverted fluorescence microscope(Nikon, Japan), CO<sub>2</sub> incubator(Hanbaek Scientific Co., Korea), autoclave (Hanbaek Scientific Co., Korea), microplate reader(Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

## 5. 실험 방법

### 5-1. 시료 추출

작약을 600g씩 분쇄하여 Ethyl Alcohol(2500ml)을 용매로 사용하고 Digital Heating Mantle를 이용하여 5시간 동안 가열하고 이것을 Filter Paper(Advantec, 185mm)를 이용하여 여과하였다. 여과시킨 용매는 다시 Rotary Evaporator를 이용하여 감압 농축 후 드라이 오븐에 건조를 시켜 사용하였다.

### 5-2. 항균활성 시험

추출된 항균성 물질의 항균력 검색은 paper disc법을 사용하였다. 순수 분리된 각 균주의 단일접락을 취해 10ml의 균 생육 액체배지에 접종하여 각각 균주의 생육적온에서 18~24시간씩 3회 배양한 후 항균활성 시험 균주로 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각 균주의 15%의 한천이 첨가된 생육배지를 멸균하여 petridish에 15ml씩 분주하여 기충용 배지를 응고 시켜 사용하였다. 각각의 시험 균 농도를 650nm에서 Optical density(O.D)가 0.4( $10^6$  CFU/ml)가 되게 한 후 0.7% 한천이 첨가된 중층용 배지에 무균적으로 가하여 잘 혼합한 다음 기충용 배지 위에 분주한 다음 고르게 응고시켜 이종의 균 접종 중층배지를 만들었다. 충분히 굳은 고체 배지위에 멸균된 8mm paper disc를 올려놓은 후 0.5~0.125mg/disc가 되도록 추출물을 흡수시킨 다음 37°C에서 12~24시간 동안 배양 후 disc 주위의 clear zone을 관찰하였다.

### 5-3. 항산화 시험

#### 5-3-1. DPPH radical 소거 활성 시험

항산화 활성 검색은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하였다. DPPH 용액 100 $\mu$ m과 농도별 추출물을 각각 100 $\mu$ l씩 취하여 혼합하고 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 radical 농도를 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 517nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(Scavenging activity)으로 표시하며, Ic50은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양( $\mu$ g)으로 나타내었다. 항산화 물질로 잘 알려진 BHT(Butylated hydroxytoluene)와 Vitamin C(ascorbic acid)와 비교하였으며, 다음 식으로 전자공여능(%)을 구하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 5-3-2. 폴리페놀 함량 시험

총 폴리페놀함량은 Folin-Denis법에 따라 (AOAC, 1990), 추출물 0.1g에 methanol 10ml을 가하여 70 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 추출한 후 1mg/ml로 희석하여 사용하였다. 검액 50 $\mu$ l에 증류수 650 $\mu$ l를 넣은 후 Folin-Denis reagent를 50 $\mu$ l가하여 3분 동안 실온에서 반응시킨다. 반응시킨 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화 용액을 100 $\mu$ l 첨가하고, 최종 볼륨을 1ml로 맞추기 위해 증류수 150 $\mu$ l를 넣어 혼합시켰다. 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer(Pharmacia Biotech ultrospec-2000)를 사용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험은 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 tannic acid(Sigma, USA)의 농도를 0~500 $\mu$ g/ml 이 되도록 하고 총 페놀 함량을 구하였다.

### 5-3-3. 플라보노이드 함량 시험

총 플라보노이드 함량은 Davis 등(1959)의 방법에 따라, 추출물 0.1g에 methanol을 10ml을 가하여 70℃에서 30분 동안 추출 한 후 1mg/ml로 만들어 사용하였다. 검액 100 $\mu$ l에 1ml의 diethylene glycol을 첨가하고 다시 1N NaOH 100 $\mu$ l을 넣어 잘 혼합시켜 37℃ incubater에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer(Pharmacia Biotech ultrospec-2000)를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 naringin(Sigma Co., USA)의 농도를 0~300 $\mu$ g/ml이 되도록 하여 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

### 5-4. 세포독성 시험(MTT assay)

Murine macrophage RAW264.7 세포의 보호효과를 관찰하기 위하여 O'Toole 등의 방법을 응용하여 실험하였다. 96well plate에 RAW264.7 세포를 well 당  $1 \times 10^5$  cell/well로 분주하고, 24시간 배양 후 추출물을 농도별로(400 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ g/ml, 12.5 $\mu$ g/ml) 배지에 희석하여 첨가하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 배양한 후 Microplate Reader(Bio-rad USA)를 이용하여 540nm에서 광도를 측정하였다.

### 5-5. 아질산염(Nitric oxide) 소거능 시험

RAW264.7 세포에 대하여 DMEM배지를 이용하여 well당  $1 \times 10^5$  cell/well로 분주하고 24시간 배양 후 추출물을 농도별로(200 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ g/ml) 배지에 희석하여 첨가하였다. 1시간 후 시험물질에 LPS(1 $\mu$ g/ml)를 처리하고 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 표준 농도 곡선은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 연속 희석하여 얻었다.

## 5-6. 탈과립 억제 효과 시험 ( $\beta$ -hexosaminidase assay)

EMEM(10% FBS)에 RBL-2H3세포를 배양하여 24 plate well에 각 well 당  $2.0 \times 10^5$  cell/500 $\mu$ l를 분주하고 IgE(200ng/ml final dose)를 투여 한 후 12hr동안 37 $^{\circ}$ C incubator에 보관하였다. Media suction 후 siraganian buffer를 이용하여 2번 세척하였다. 세척 후 추출물을 농도별로(250 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 0 $\mu$ g/ml) 190 $\mu$ l씩 첨가한 후 30분 동안 배양하였다. Antigen(DNP-HAS, 25ng/ml final dose)을 첨가하고 10~15min 동안 배양한 후 put the plate on ice 5min: terminate the reactions 해주었다. 각 well에 있는 물질을 96well(n=4)에 상층액 30 $\mu$ l씩 분주하고 1mM P-NAG in citrate buffer를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C incubator에 1시간 동안 보관 후 250 $\mu$ l 0.1M carbonate buffer(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>2</sub>)를 첨가한 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 405nm에서 광도를 측정하였다.



### III. 결과

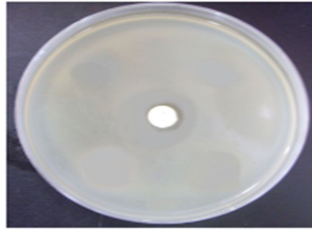
#### 1. 항균 활성시험

추출물에 대하여 피부 상재 균주 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 *s. epidermidis*, *s. aureus*, 무좀 및 칸디다증의 원인균인 *c. albicans*에 대하여 100mg/ml로 항균활성 실험을 하였으며 항균력 측정은 clear zoned의 크기로 판단하였다.

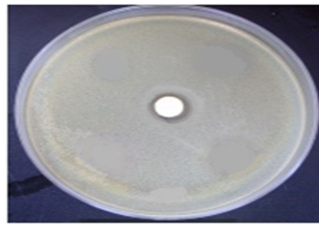
실험 결과 작약은 *s. epidermidis*에서 clear zone의 크기가 6.3mm로 항균 활성이 높은 결과가 나왔으며, *s. aureus*에서는 작약 5mm로 상당한 저해활성을 보였으며, *c. albicans*의 경우 5.6mm 활성을 보임으로서 이들 식물의 추출물이 아토피 피부염에 염증을 유발하는 피부상재균을 억제하는 것으로 나타났다 (Table 2).

Table 2. Antimicrobial activity of 100% ethanol extract from *Paeonia lactiflora* by paper disc (100mg/ml).

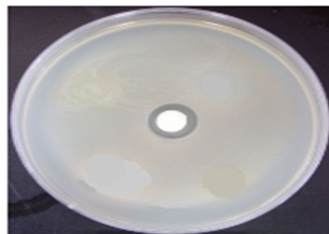
sample	inhibition zone(mm)		
	<i>s. epidermidis</i>	<i>s. aureus</i>	<i>c. albicans</i>
<i>Paeonia lactiflora</i>	6.3	5	5.6



(a)



(b)



(c)

Fig. 2. Antimicrobial activity of 100% ethanol extract from *Paeonia lactiflora* by paper disc(100mg/ml).  
a:*s.epidermidis* b:*s.aureus* c:*c.albicans*

## 2. 항산화 시험

### 2-1. DPPH radical 소거 활성 시험

작약 추출물에 대하여 천연항산화제로서 이용가능성을 확인하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 작약이 vitamin C와 유사한 90%효과가 나타났다 (Fig. 3).

### 2-2. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 시험

작약 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, naringin을 기준물질로 하여 측정하였다.

폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 측정 결과 작약에서  $29 \pm 3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $12.7 \pm 3.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  함량이 확인되었다 (Table 3).

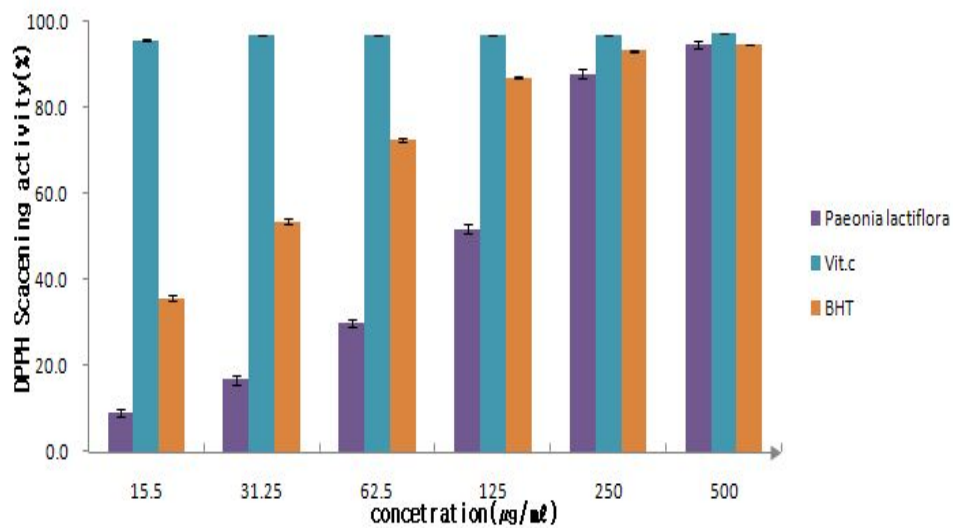


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *Paeonia lactiflora* plant extracts compared with vitamin C and BHT. DPPH free radical scavenging activities of extracts in various concentration were measured using spectrophotometric methods.

Table 3. Polyphenolics and flavonids contents in *Paeonia lactiflora* extracts

( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

---

Sample	Total phenolics	Total flavonoids
<i>Paeonia lactiflora</i>	$29 \pm 3$	$12.7 \pm 3.1$

---

### 3. 세포독성 시험(MTT assay)

작약 추출물이 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시료를 농도 별로 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 시료의 처리 농도 의존적으로 세포 독성이 더 강해지는 것을 관찰하였으며, 시료 농도 별 세포 생존율의 80%이상인 농도를 정하여 다음 실험에 적용하였다 (Table 4, Fig. 4).

### 4. 아질산염(Nitric oxide) 소거능 시험

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide(NO) 생성된 NO양을 Griess시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 측정결과 작약은 농도 의존적으로 대조군인 LPS(1μg/ml) 단독 처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 나타내었다 (Fig. 5).

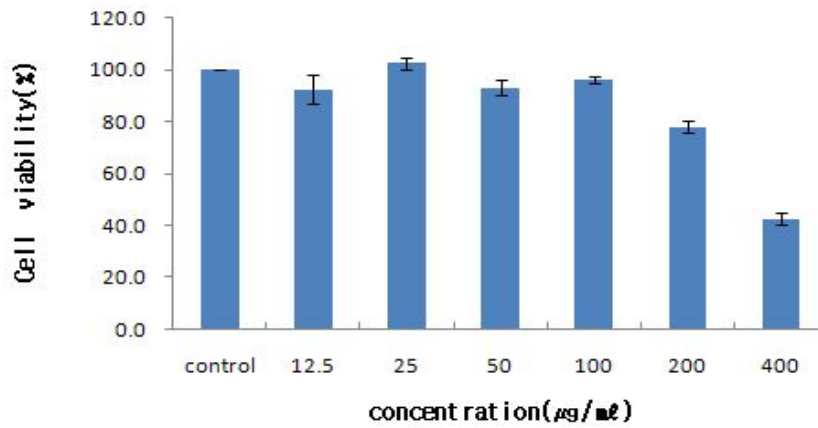


Fig. 4. Effects of *Paeonia lactiflora* plant extracts on RAW264.7 cells viability. Cells were treated with indicated concentrations of *Paeonia lactiflora* extracts for 24hrs. Cell viabilities were measured using MTT assay. The viability of untreated control cells were defined as 100%. Results are shown as mean  $\pm$  SD (n=3)



Table 4. Effect of *Paeonia lactiflora* plant extracts on RAW264.7 Cell viability.

Samples	Concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	12.5	25	50	100	200	400
<i>P. lactiflora</i>	92.4 $\pm 5.5$	102.5 $\pm 2.2$	93.2 $\pm 3.2$	96.5 $\pm 1.3$	78.1 $\pm 2.2$	42.5 $\pm 2.5$

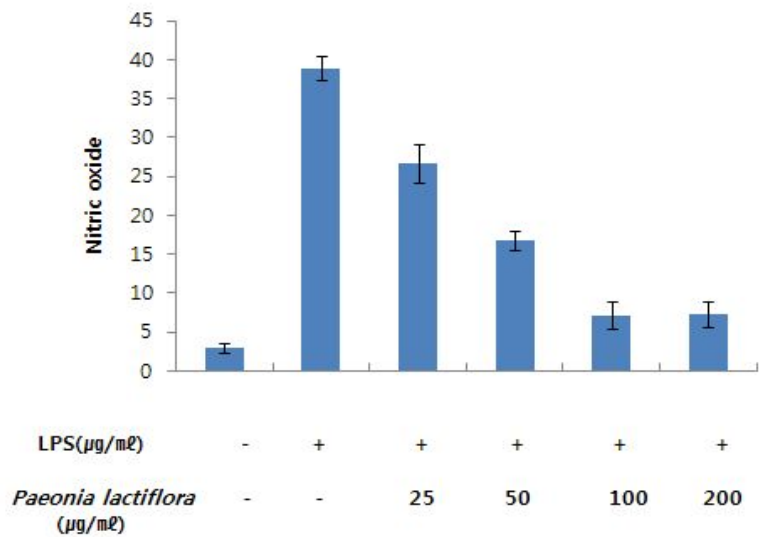


Fig. 5. Effect of *Paeonia lactiflora* extract on nitrite oxide production by LPS induced RAW264.7 macrophage. The cells were treated with LPS alone or plus various concentration of *Paeonia lactiflora*.

The production of NO was evaluated by Griess reaction. The values of NO mean  $\pm$  S.D. From three independent experiments \*P<0.05, \*\*p<0.05 vs. LPS-treated group.

## 5. 탈과립 억제 효과 시험( $\beta$ -hexosaminidase assay)

1차적으로 독성테스트를 하여 독성이 없는 농도를 설정하였고, 2차적으로 독성이 없는 조건의 추출물 농도에서 작약의 탈과립 억제효과를 분석하였다. 추출물이 아토피 피부염 환자에 유발되는 소양증을 개선할 수 있는지  $\beta$ -hexosaminidase assay 분석을 통하여 확인한 결과, 작약에서 상당한 탈과립 억제능을 보였음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

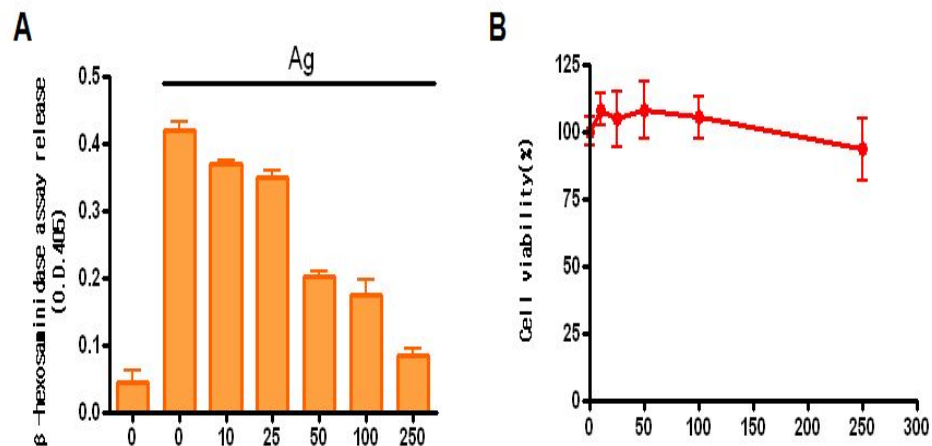


Fig. 6. Effect of *Paeonia lactiflora* on antigen-induced degranulation of RBL-2H3 cells.

(A) The cells were incubated overnight in 24-well plates with 200 ng/ml of DNP-specific IgE in medium. The medium was replaced with Tyrode buffer that contained the indicated concentrations of *Paeonia lactiflora* for 30 min before stimulation with 25 ng/ml of DNP-HSA for 15 min in order to measure the release of  $\beta$ -hexosaminidase.

(B) Cytotoxicity. RBL-2H3 cells incubated overnight in the medium containing 200ng/ml of DNP-specific IgE were treated in various concentrations of *Paeonia lactiflora* for 2hrs and the viability determined by Ez-Cytox kit.

Each bar shows the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

## IV. 고찰

아토피 피부염은 가려움증을 보이는 만성적, 재발성 염증성 피부상태를 말하며, 주로 유아와 소아에서 많이 발생한다 (Leung, 2003; Sturgil, 2004). 이미 산업화가 진행된 선진국에서는 호흡기, 소화기, 피부를 통한 이물질 및 새로운 물질의 접촉 기회가 많아짐에 따라 아토피 알러지 질환의 환자들이 증가하는 경향을 보이고 있으며 우리나라에서도 이러한 경향이 현실로 나타나고 있다 (Jo, 2007). 보고서에 의하면 1964년 Copeman과 Wallace는 아토피 피부염에 박시니아가 동반된 예를 보고하였고, 1996년 Solomon과 Telnwer는 아토피 피부염에 전염성 연속증이 동반된 예를 보고한 이래, 아토피 피부염 환자는 바이러스나 진균 감염에 대한 감수성이 높다고 알려져 있다. 또한 바이오의약품, 유전공학식품, 각종 항암제 등의 혼용으로 면역계 이상에 의한 자가면역질환이나 감작성 및 알레르기 유발성이 증가하고 있어 이에 대한 안전성 연구가 요구되고 있다 (Lee *et al.*, 2010).

아토피 피부염은 Allergen이 IgE에 의해 인식되면 Langerhans cell 표면 IgE부착 Fc수용체에 부착되어 T림프구에 항원을 전달함으로써 T림프구가 활성화되게 된다. 이는 아토피 피부염의 피부병변에 침윤되는 염증세포는 주로 Th2세포로서 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 과다하게 생성하여 혈중 IgE의 상승을 촉진하고 eosinophil의 증가를 유도한다. 결국 아토피 피부염에서 Th1 세포의 증식을 억제하고 세포매개성 면역의 저하를 초래한다 (Sin *et al.*, 2010).

본 연구에서는 약용식물 작약을 에탄올로 추출한 후 이 추출물에 대해 피부 상재균주 중 피부에 염증을 유발하는 *staphylococcus epidermidis*, *staphylococcus aureus* 와 무좀과 칸디다증의 원인균인 *candida albicans*에 대한 항균 활성을 paper disc방법에 따라 시험하였다.

*s.epidermidis* 균은 아토피 피부염에 매우 중요한 인자중의 하나로 황색포도상구균이며 아토피 환자의 90%정도는 피부에 포도상 구균과 연쇄상 구균이 감염되어 있으며 아토피 질환은 황색 포도상 구균이 생산하는 초 항원(super antigen) 독소에 의해서 피부염이 유발 또는 악화 되는 것으로 알려져 있다 (Heaton *et al.*, 2003). 항균 활성 실험결과 작약 추출물 100 mg/ml 농도에서 6.3mm의 항균활성의 결과가 나왔다.

*S. aureus*는 피부에 정상 세균총으로 기회감염을 통하여 국소 및 전신감염을 유발하는 그람양성구균으로 화농성 감염의 80%이상을 차지하는 감염성 질환의 주요 원인균으로 알려져 있다 (Park *et al.*, 2007). 항균활성 실험 결과 작약 추출물의 100mg/ml 농도에서 5mm의 항균활성의 결과가 나왔다. Park (2007) 과 Choi (2009) 등은 작약 에탄올 추출물의 10mg/ml에서 10mm와 4,000µg/disc에서 9mm와 결과가 나왔으며, Hwang (2000) 등은 작약 메탄올 추출물 2000µg/ml에서 12mm의 항균 활성을 보였다.

표재성 피부 칸디다증은 피부와 점막에 생기는 표재성 질환으로 *C. albicans*가 주 원인균으로 알려져 있으며 (Odom *et al.*, 2000), *C. albicans*은 작약 추출물의 100mg/ml 농도에서 5.6mm의 항균활성 결과를 보였으며 보고에 따르면 Park (2007) 등의 논문에서는 10mg/ml에 10mm의 항균 활성을 보였다. 작약의 본 실험과 연구 보고 (Hwang *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2007; Choi, 2009)에 따른 항균활성의 차이를 보이고 있는데 이는 식물의 생산 지역별, 사용한 용매에 의한 유용성분이 서로 다르기 때문이라고 사료되어 진다.

페놀계 화합물은 식물에서 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조를 가지고 있으며 phenolic hydroxyl기가 항산화 등과 같은 생리활성을 나타낸다 (Lee *et al.*, 2005). 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 측정 결과 작약 추출물의 10mg/ml 농도에서 각각  $29 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ 과  $12.7 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$ 의 함량을 나타내었는데 (Table. 3), Park (2002) 연구 보고에 의하면 폴리페놀은 100mg/ml의 농도에서  $145 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ 의 결과와는 추출물의 농도차에 따른 변화로 보는데 농도차를 감안한다면 유사한 실험결과를 나타내었다.

Free radical은 인체내에서 지질 또는 단백질등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다 (Kim *et al.*, 1995). 작약의 천연항산화제로 이용 가능성을 확인하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 500µg/ml에서 작약이 대조군인 vitamin C와 BHT와 유사한 90%효과가 나타났다 (Fig. 3). 실험결과는 백작약 열수추출물 100µg/ml 이용한 Jeong (2003)과 에탄올 추출물 1mg/ml이용한 Choi (2003)의 농도에서 BHA(90%)와 거의 동등한 DPPH 라디칼 소거능 보여 연구 결과와 유사하였다.

대식세포 (RAW264.7)는 인체 면역계의 중요한 역할을 담당하고 있는 대표적인 세포이며 탐식세포 (貪食細胞)라하며 (Park, 2008), LPS에 의한 대식세포의 활성화는 다양한 염증매개물질 (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) 등을 유도하며, 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO생성 과정으로 이어지게 된다 (Vane *et al.*, 1971; Funk *et al.*, 1991). 본 실험에서 각 시료별 세포 생존율이 80%이상인 농도를 정하여 (Table. 4), 생성된 NO양을 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하고 추출물은 농도 의존적으로 대조군이 LPS (1 $\mu$ g/ml) 단독 처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 나타내었다 (Fig. 5). 연구 보고에 의하면 RAW 264.7을 이용한 유자 (Lee *et al.*, 2006), 큰비쭝 (Yoon *et al.*, 2007), 산겨릅나무 (Won *et al.*, 2008), 상항버섯 (Jeoung *et al.*, 2009) 등의 천연물도 NO생성을 저해한다는 결과가 나와 있다.

비만세포 (RBL-2H3)는 천식이나 알레르기성 비염과 같은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다. 이 세포의 표면은 immunoglobulin (IgE) 수용체 (Fc  $\epsilon$ RI)의 cross-linking으로 활성화되면 비만세포의 과립내의 화학매개체(histamine, proteoglycan, serine proteases, carboxypeptidase A, sulfatases, exoglycosidases)등과 같은 특이적인 사이토카인을 분비하면서 알레르기 염증의 초기 반응과 후기 반응을 일으킨다 (Marshall, 2004). 항알러지 효과를 측정하기 위한 방법으로는 IgE로부터 감작된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하는 것이 일반 적이지만 비만세포에서 분비되는 히스타민의 농도가 매우 낮고 측정과정이 복잡하여 현재는  $\beta$ -hexosaminidase assay가 널리 이용된다.  $\beta$ -hexosaminidase assay는 호염구나 비만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하여 천식, 비염과 같은 알레르기 반응에 의해 세포 밖으로 분비되므로 탈과립의 지표로 이용되며 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용하게 사용되고 있다 (Lee *et al.*, 1999; Choi, 2002). 본 실험에서는  $\beta$ -hexosaminidase assay를 이용하였으며 그 결과 Fig. 6 와 같이 상당한 탈과립 억제능을 보였음을 알 수 있었다. 현재 작약추출물에 의한 비만세포 탈과립 억제 효과에 대한 연구 결과는 지금까지 보고된 바가 없다. 하지만 비만세포를 이용한 탈과립 실험 연구 보고서를 보면 구지뽕 (Oh, 2009), 석류 (Park, 2008), 고창초 (Lee, 2009), 차조기 (Kim, 2010), 감초 (Kim, 2010),

결명자 및 유근피, 포근령의 추출 혼합물 (Yang, 2010)에서 비만세포의 탈과립 억제 효과 발표를 하였으며 최근 들어 천연물을 이용한  $\beta$ -hexosaminidase assay를 통한 항알러지 검사가 진행되는 것을 볼 수 있다.

이상의 결과 작약 추출물은 피부에 염증을 유발할 수 있는 균주(*s. epidermidis*, *s. aureus*, *c. albicans*)에서 항균활성이 확인되었고, 항산화 시험 결과 DPPH radical 소거능은 500 $\mu$ g/ml에서 vitamin C와 유사한 90% 효과가 나타났다. 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 시험 결과 10mg/ml에서 각각 29 $\pm$  3 $\mu$ g/ml과 12.7 $\pm$  3.1 $\mu$ g/ml의 함량을 나타내었다. NO 소거능 실험에서 작약 추출물의 농도(25 $\mu$ g/ml ~ 200 $\mu$ g/ml)에서 대조군인 LPS(1 $\mu$ g/ml) 단독 처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 나타내었다. 비만세포를 통한 작약 추출물의 탈과립 억제효과를 분석한 결과, 10, 25, 50, 100, 250 $\mu$ g/ml에서 농도 의존적으로 탈과립 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

이러한 시험 결과를 토대로 작약 추출물은 향후 아토피 피부염을 개선, 치료하기 위한 천연 의약품 개발에 좋은 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.



## V . 참고 문헌

- Cardona ID, Cho SH, Leung DY. Role of bacterial superantigens in atopic dermatitis: implications for future therapeutic strategies. *Am. J. Clin Dermatol.*, 7: 273 ~ 279, 2006.
- Cho Hae-Yeon , Antimicrobial Activity of *Paeonia japonica* Extract and Its Quality Characteristic Effects in *Sulgidduk*, *Korean J. FOOD COOKERY SCI.*, 25: 435 ~ 444, 2009.
- Choi Soo-Im, Lee Yun-Mi, and Heo, Tae-Ryeon , Screening of Hyaluronidase Inhibitory and Free Radical Scavenging Activity *In vitro* of Traditional Herbal Medicine Extracts. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*, 18(4): 282 ~ 288, 2003.
- Choi OB. Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *Korean Journal of Food and Nutrition*, 15:382 ~ 385, 2002.
- Cooper KD. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and treatment. *J. Invest Dermatol.*, 102:128 ~ 37, 1994.
- Funk,c.d, Frunk,L.B, Kennedy,M.E, Pong,A.S.and Fitzgerald, G.A.: Human platelet/ erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment *FASEB J.*, 5: 2304, 1991.
- Hwang, Jae-Sun, Chun, Hui-Jung and Han Young-Sil , Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Jakyak, *KOREAN J. SOC. FOOD SCI.*, 16(5), 2000.

- Heaton T, Maon D, Venaille T and Hoit P, *Staphylococcal enterotoxin* induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease the hygiene hypothesis in reverse. *Allergy*, 58: 252 ~ 256, 2003.
- Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, Jones JF, Wong C, Streib JE, *et al.* Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity*, 24: 341 ~ 348, 2006.
- Jeong Ill-Yun, Lee Joo-Sang, Oh Heon, Jung Uhee, Park Hae-Ran and Jo Sung-Kg, Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of *Paeonia japonica* on Oxidative Stress and Identification of Its Active Components. *Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, 32(3), 739 ~ 744, 2003.
- Jeoung, Young Jun, Choi Se Young, Chi Sun An, Jeon Yun Hee, Dong Ki Park, and Bcoung OU Lim, Comparative Effect on Anti-Inflammatory Activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinills lintells* Grown in Germinated Brown Rke Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 17(2): 97 ~ 101, 2009.
- Jo HyunIk, Byung-Cheul, Hyugll Kim, Effects of Herbal Prescriptions on the Immunological Parameter in Ptients with Atopic & Allergic Diseases. *Korean J. Oriental physiology & Pathology*, 21(6): 1646 ~ 1654, 2007.
- Kim, Jeong Mi, Kim Dae Jung, Kim Tae Hyuk, Kim Hyun Sook, Choe Myeon, Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effect of Water Extract from *Perillae Semen* in RBL-2H3 Cells *Korean J. Nutr.*, 43(4): 367 ~ 373, 2010.

- Kim Jeong Mi, Kim Dae Jung, Kim Tae Hyeuk, Bael Jong Mi, Kim Hyun Sook and Myeon Choe, Effects of Water Extract of *Glycyrrhiza uralensis* on  $\beta$ -Hexosaminidase Release and Expression of the Cytokines of RBL-2H3 Mast Cells, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 18(4): 231 ~ 237, 2010.
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee NY Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci.*, 27:80 ~ 86, 1995.
- Lee E, Choi EJ, Cheong H, Kim YR, Ryu SY and Kim KM.. Anti-allergic actions of the leaves of *Castanea crenata* and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. *Archives of Pharmacal Research.*, 22: 320~ 324, 1999.
- Lee Eun-Jung, Whang Eun-Yeong, Whang Key, Lee In-Seon, and Yang Seun-Ah, Anti-allergic Effect of *zizania latifolia* Turcz Extracts *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 41(6): 717 ~ 721, 2009.
- Lee JH and Min DB Nutraceuticals, aging, and food oxidation. Akoh *et al*(ed). in Handbook of Functional Lipids. Taylor & Francis Group, *CRC press*. New York, USA. 325 ~ 333, 2005.
- Lee Hye-Ja, Kang Gyeong-Jin, Yoon Weon-Jong, Kang Hee-Kyoung, kim Young-Suk, Kim So-Mi, and Yoo Eun-Sook, Anti-inflammatory Effect of Unripe Fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW264.7 and HaCaT Cells, *Kor. J. Pharmacogn.* 37(2):74 ~ 80, 2006.

- Lee Hye In, Tae Young Han, Seong Jun Seo, Do Won KIM, Dermatologic Diseases Associated with Atopic Dermatitis in Koreans: Multicenter Study. *Korean J. Dermatol.*, 48(3): 179 ~ 183, 2010.
- Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 361:150~60, 2003.
- Marshall JS. Mast cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 787 ~ 799, 2004.
- Oh Phil-Sun, Lee Hye-Jin, and Lim Kye-Taek., Inhibitory Effect of Glycoprotein Isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau on Histamine Release and COX-2 Activity in RBL-2H3 Cells, *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 41(4): 405 ~ 412, 2009.
- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* , 347:1151 ~ 1160, 2002.
- Odom RB, James WD and Berger TG., Andrew's diseases of the skin. 9th ed. *philadelphia, WB Saunders*. 379 ~ 386, 2000.
- Proksch E, Folster-Holst R, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J. Dermatol Sci.*, 43: 159 ~ 169, 2006.
- Park Wan su, Study on Biological Effect of Multi-Herbal Drug KOC0-P1 on Mouse Macrophage Raw 264.7 Cells, *Kor. J. Herbology* 23(2): 151 ~ 157, 2008.

- Park Young Lip and Park Joon, Pathogenesis of Atopic Dermatitis, *korea Journal of Investigative Dermatology*, 14(3): 67 ~ 72, 2007.
- Park Young-Sook, Antioxidative Activities and Contents of Polyphenolic Compound of Medicinal Herb Extracts, *J. East Asian Soc. Dietary Life*, 12(1), 2002.
- Park Hyun Suk, Kyung Jin Min, Chun Geun Cha, Jin Wook Song, Jin Chang Son, Antimicrobial Activities Against Oral Microbes and Growth-inhibitory Effect on Oral Tumor Cell by Extract of *Paeonia lactiflora*, *Kor. J. Env. Hlth.*, 33(1): 21 ~ 29, 2007.
- Park Kyong-Tae, Shim Sun-Yup, and Chun Soon-Sil, Inhibitory Effects of *Punica granatum* L. Extracts on Degranulation in Human Basophilic KU812F Cells, *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 40(6): 702 ~ 706, 2008.
- Ripke F, Schreiner V, Doering T, Maibach HI. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 5: 217 ~ 223, 2004.
- Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad Dermatol.*, 48: 352 ~ 358, 2003.
- Sturgil S, Bernard LA. *Atopic dermatitis update*. *Curr Opin Pediatr.*, 16: 396 ~ 401, 2004.

- Shin Yong-Kyu , Jin-Chul Heo, Jin-hyung Lee and Sang-Han Lee, Analysis of the Anti-Allergic Activities of Active Components Produced by Solid Fermentation of *Phellinus baumil* and *Ephedra sinica*, *Korea J. Food Preserv.*, 17(2): 297~300, 2010.
- Vane, J. R.:Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New. Biol.*, 23: 232, 1971.
- Wollenberg A., Wetzel S., Burgdorf WH., Haas J., Viral infections in atopic dermatitis: pathogenic aspects and clinical management. *J. Allergy Clin Immunol.*, 112: 667 ~ 674, 2003.
- Won So-Jung, Park Hee-Juhn, Lee Kyung-Tae, Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by salidroside through the NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 cells *Kor. J. Pharmacogn.*, 39(2): 110 ~ 117, 2008.
- Yang Hee-Jin, Park Kye Win, Kim Hyun-Suck , Cho Soo-Muk , and Park Ki-Moon, Effect of Anti-atopic Allergic Reaction in response to Oriental Herb Extracts. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 42(1): 109 ~ 114, 2010.
- Yoon Weon-Jong, Lee Jung-A , Kim Kil-Nam , Kim Ji-Young, and Park Soo-Yeong, In vitro Anti-inflammatory Activity of the Artemisia fukudo Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 39(4): 464 ~ 469, 2007.

- 강재춘, 뿌리를 뽑는 아토피 치료, 피레토 세라피, 메디칼박스, 35p.
- 강태진, 이상로, 아토피 피부염의 원인과 치료관리, *BioWave* 12(3): 2010.
- 김도순. 시호·백작약의 항스트레스효과에 관한 실험적 연구. 석사학위논문, 원광대학교, 1990.
- 김정희, 아토피 피부염의 최신 지견. 소아 알레르기 및 호흡기학회지 14(1): 12~23, 2004.
- 배철우, 아토피 건선 치료법, 메디칼박스, 264 ~ 265, 2008.
- 정동주, 백작약수침이 생쥐의 진통 및 항경련효과에 미치는 영향. 석사학위 논문, 대구한의과대학, 1986.

## 감사의 글

앞만 보며 달려온 석사 2년 째 드디어 실험의 결실을 맺으며 졸업 논문을 쓰게 되었습니다. 생물학과 학생회장, 창업동아리 팀장, 누리조교, 행정조교 재직중에 많이 도움을 주신 학과장님이시자 지도 교수님이셨던 김종세 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 또한 실험실 생활을 하면서 행정조교 일을 할 수 있도록 시간 조정 및 실험을 할 수 있도록 실험 방향, 실험에 필요한 기자재 및 시약을 조달해 주신 이숙영 교수님께도 감사의 말씀 들입니다. 행정조교 일을 하면서 많은 도움을 주신 윤소현 선생님과 교학팀에서 저를 항상 아끼시고 좋은 말씀을 해주신 자연대 학장님이신 정현숙 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

이번 논문 수정에 있어 많이 신경써주신 최영복 교수님과 이현화 교수님께도 감사의 말씀을 전하고 행정조교 하면서 많이 부족한 면이 있었지만 항상 위로해주시고 힘이 되어주셔서 감사합니다.

실험실 생활을 하면서 실험 파트너로 많은 도움을 주시고, 실험 방향을 제시해주시고 실험 실패 시 의논하며 함께 방향을 재설정하게 도와주신 류민정 박사님께도 감사의 말씀을 전합니다.

또한 실험실에 계신 장은숙 선생님. 힘들때 항상 위로와 격려를 해주신 선생님. 선생님 결혼 축하드립니다.

군대 전역하고 학교에 복학하여 보게 되면서 지금까지 옆에서 많은 도움을 준 강주연 후배님. 행정조교 일을 하면서 자리를 많이 비웠는데 항상 자리 지키며 나의 행정조교 일을 도와줘서 고맙습니다.

행정 조교 일을 하면서 학과 일을 많이 도와준 학생회 애들 고맙습니다. 09년도 학생회장이었던 박정선, 부회장 김동환, 예비역장 정신구, 조영희, 10학년도 학생회장 이승원, 부회장 변기수, 총무 이종찬 학생회 일을 하면서 형이 화도 많이 내고 잘해준건 없지만 형 믿고 따라와서 감사하게 생각하고 있습니다. 앞으로 여러분들 취업 잘하고 잘사는 모습 보았으면 좋겠습니다. 저는 여러분이 항상 다 잘 될거라 믿습니다.

항상 힘들때 위로의 말과 나의 말을 잘 들어주었던 중학교 동기이자 대학교 학과 동기인 윤선미에게도 감사의 말을 전합니다.

무슨 일 있을때 마다 같이 걱정해주고 위로 해준 고등학교 친구들 허정록, 최정인, 김종완, 송오현 감사합니다. 그리고 저를 많이 아끼고 사랑해



주신 외할머니 감사합니다. 몸 건강하시고 저 장가가고 증손자 낳는 모습 보시면서 행복하면서 저희 친척들이 지금과 같이 항상 화목하기를 바랍니다.

마지막으로 세상에 하나뿐인 우리 가족, 아버지, 어머니, 누나 및 조카 유정이, 유은이, 유완이 감사의 마음을 전 합니다. 유정이 유은이 유완이 아직 어리지만 삼촌에게 잘 자라가는 모습 보여주면 고마울 거 같습니다. 그리고 하나 뿐인 우리 누나. 동생이 되어서 누나에게 많은 도움 못 준거 미안하고 항상 그래도 나에게 많은 도움을 주워서 고맙습니다. 앞으로 사회 나가면 조카들에게도 더욱 신경 많이 쓰는 삼촌이 되겠습니다. 그리고 나를 강한 사나이로 살아 갈수 있게 많은 조언을 해주신 우리 매형에게도 감사합니다. 저 대학 및 대학원 까지 보내기 위해 고생 많이 하신 아버지, 어머니님. 지금까지 편하게 공부 할 수 있게 해준 부모님께 정말 감사하고 졸업하면 취업하여 꼭 효도 하겠습니다.

2010년 12월 석사 학위를 마치며.....

김공민 올림

저작물 이용 허락서					
학 과	생물학과	학 번	20097267	과 정	석사
성 명	한글 김 공 민	한문 金 功 珉	영문	KIM KONG MIN	
주 소	광주 광역시 북구 중흥동 372-21				
연락처	e-mail : kgm0901@hanmail.net				
논문제목	한글 작약 추출물의 아토피 피부염 효과				
	영문 Effect of the extracts from the <i>Paeonia lactiflora</i> on atopic dermatitis				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 -  조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함</li> <li>2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함)</li> <li>3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함</li> <li>4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함</li> <li>5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락할 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함</li> <li>6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음</li> <li>7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함</li> </ol> <p style="text-align: center;"> <b>동의여부 : 동의( 0 )    반대(    )</b> </p> <p style="text-align: center;"> 201    년    월    일 </p> <p style="text-align: center;"> 저작자 :    김 공 민 (인) </p> <p style="text-align: center;"> <b>조선대학교 총장 귀하</b> </p>					