

## 감잎(柿葉) 추출물의 채취시기에 따른 항산화 활성 변화 및 아토피성 피부염 개선효과

정우영, 정종문\*

수원대학교 생명과학과

### Change of Antioxidative Activity at Different Harvest Time and Improvement of Atopic Dermatitis Effects for Persimmon Leaf Extract

Woo-Young Jung and Jong-Moon Jeong\*

Department of Life Science, The University of Suwon, Hwasung 445-743, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study was to investigate the anti-oxidative and anti-atopic dermatitis effects of persimmon leaf extract obtained from Cheongdo-gun, where more than 60% of Korean persimmon is produced.

**Methods :** Anti-oxidative effects of the crude persimmon leaf extract harvested monthly between May and November were determined by *in vitro* assay using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and superoxide dismutase (SOD)-like reaction. Anti-atopic dermatitis effects of the crude persimmon leaf extract were determined by using collagenase type I inhibition assay and by quantitative assays including serum histamine, prostaglandin E metabolite and leukotriene B<sub>4</sub> levels in animal model of atopic dermatitis using Balb/c mice.

**Results :** Persimmon leaf extract harvested in May had higher levels of total phenolic compounds (182.24 mg/g) and flavonoids (23.05 mg/g) than the ones of different month extract. Also, persimmon leaf extract harvested in May showed the most effective extract scavenging activities of DPPH free radical (13.39±0.21 µg/ml) and superoxide anion radical (40.52±2.32 µg/ml), leading to use the persimmon leaf extract harvested in May for the experiments hereafter. Persimmon leaf extract showed 326.71±4.6 µg/ml of 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for collagenase type I which is responsible for the degradation of extracellular matrix. In addition, persimmon leaf extract application group could decrease serum levels of histamine, prostaglandin E metabolite and leukotriene B<sub>4</sub> compared to the negative control in animal model of atopic dermatitis. Especially, persimmon leaf extract showed a significantly decreased serum leukotriene B<sub>4</sub> level relative to the levels of histamine and prostaglandin E metabolite.

**Conclusions :** Persimmon leaf extract showed anti-oxidative and anti-atopic dermatitis effects *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that persimmon leaf extract may have immunoregulatory function for alleviating atopic dermatitis by decreasing collagenase activity and mast cell activation.

**Key words :** persimmon leaf, anti-atopic dermatitis, anti-oxidative, 2,4-Dinitrochlorobenzen(DNCB), leukotriene B<sub>4</sub>

#### 서론

감나무(柿樹, *Diospyros kaki* Thunb)는 우리나라 중부 이남 지방에 주로 분포되어 있으며 생식하는 柿子 이외에도 柿葉, 柿花, 柿蒂 등은 예로부터 민간요법으로 사용되어 왔다. 그 중에서도 특히 柿葉은 주로 차로 이용되어 동의보감에 혈관

질환의 예방, 치료와 함께 자반증(혈관염증)에도 효과가 있다고 기록되어있다<sup>1)</sup>. 柿葉에는 비타민 C, 아미노산, 핵산, 페놀성 화합물, 유리당 등 여러 물질들이 다양하게 함유되어 있다<sup>2)</sup>. 柿葉은 총 페놀성 화합물 함량이 0.1~5.8%으로 다른 식물에 비하여 높으며<sup>3)</sup>, 우수한 항산화능과 항균성이 확인되었고, superoxide dismutase(SOD) 활성에도 관여하는 것으로 알려

\*교신저자 : Jong-Moon Jeong, Department of Life Science, The University of Suwon,  
· Tel : +82-31-222-6514, · Fax : +82-31-222-6514, · E-mail : jmjeong@suwon.ac.kr,  
· 접수 : 2011년 12월 10일 · 수정 : 2012년 1월 4일 · 채택 : 2012년 1월 13일

저 있다<sup>4-5</sup>). 그리고 피부 탄력유지와 감기 및 성인병 예방에 대한 약리작용 효과가 검증되었고 다양한 물질이 인간의 생리 기작에 영향을 줄 수 있는 가능성을 강력하게 시사하고 있다<sup>6-7</sup>).

페놀성 화합물은 항산화의 기능뿐만 아니라 항균, 항알레르기, 충치예방, 심장질환 및 당뇨병 예방에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 플라보노이드, phenolic acid, phenyl propanoid, quinone 류 등을 포함하고 있다<sup>8-10</sup>).

최근 산업 발달로 인하여 인공 합성물질의 범람과 환경오염이 가속화되면서 알러지를 유발시키는 알러젠이 급증하는 추세이다. 알레르기 반응은 크게 4가지 유형(I~IV)으로 나뉘며 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 및 기관지 천식 등의 알레르기 질환들은 제 I형 알레르기 반응(type 1 allergic reaction)에 속한다<sup>11</sup>). 제 I형 알레르기 반응에 중요한 역할을 하는 비만세포(mast cell)는 주로 치부, 호흡기, 림프관 주위, 혈관 주위, 위장관의 점막, 뇌 등의 생체 내 결합조직에 널리 분포되며<sup>12-17</sup>), 세포 내에 histamine과 같은 염증 매개물질을 포함하는 과립이 면역글로불린 E (immunoglobulin E, IgE)에 의해 탈과립되면서 알레르기 반응을 나타낸다<sup>18</sup>). 또한, 비만세포 내에는 아라키돈산(arachidonic acid)을 기질 삼아 5-리폭시게나제(5-lipoxygenase, 5-LO)가 류코트리엔류(leukotrienes, LTs)를, 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)는 프로스타글란딘류(prostaglandins, PGs)를 생성하며<sup>19</sup>), 이렇게 생성된 LTs 가운데 LTB<sub>4</sub>는 알레르기 증상 발현에 중요한 매개 역할을 하고<sup>20-23</sup>), PGs 가운데 PGE<sub>2</sub>는 염증 반응에서 통증에 관련하여 중요한 역할을 한다<sup>24</sup>). 이러한 염증 매개 물질들의 합성 및 방출로 인하여 혈관의 이완, 조직 내 면역 세포 침윤, 가려움, 부종, 통증 등 알레르기 반응을 악화시키는 역할을 주도한다.

알레르기 반응에 의하여 유발되는 아토피성 피부염, 알레르기성 접촉피부염 등의 치료제로 부신피질호르몬제나 항히스타민제 등이 이용되고 있으나, 부신피질호르몬은 급성부신기능부전을 유발시키고, 장기간 투여에 따른 부작용으로 세균의 감염에 대한 저항력이 약화되고, 소화성궤양, 골다공증 및 백내장 등을 일으키고 있는 것으로 보고되고 있다. 항히스타민제는 일시적인 진정작용이 있지만, 염증 완화에 근본적인 치료제로서는 부적합한 것으로 보고되고 있다<sup>25-27</sup>). 따라서 PGE<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>), LTB<sub>4</sub>(leukotriene B<sub>4</sub>) 그리고 히스타민 등의 혈액 내의 방출에 대한 억제 활성을 갖는 천연 물질들은 제 I형 알레르기 (비염, 아토피성 피부염, 기관지 천식) 예방 및 개선제로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 I형 알레르기 중에서 특히 아토피성 피부염은 최근에 활발히 연구되어지고 있다. 하지만 다른 제 I형 알레르기 대표 질환인 비염과 기관지 천식에 비해 연구가 아직 많이 미흡한 실정이다. 아토피성 피부염은 만성 재발성, 습진성 알레르기 피부 질환으로 홍반, 부종, 소양증, 부스럼, 각질화 등을 동반한다. 또한 아토피성 피부염 환자에게는 매트릭스 구조 단백질(Matrix metalloprotein) 중의 하나인 콜라겐(collagen)이 콜라게나아제(collagenase)에 의해 분해되어 피부 장벽이 손상되고 이는 피부 감염과 염증에 대한 감수성을 높게 된다<sup>28</sup>). 이 때 eicosanoid 생합성 효소와 매트릭스 구조 단백질 분해 효소(Matrix metalloproteinases, MMPs) 등과 같은 초기 염증 인자들이 아토피성 피부염 발생 및 증상 악화에 중요한 역할을 하며<sup>29-30</sup>), 이러한 이유로 피부장벽 기

능 손상은 아토피성 피부염의 중요한 지표가 될 수 있으며 초기 염증 인자인 MMPs를 억제하면 피부 질환을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다.

현재까지의 柿葉 연구에서는 柿葉 추출물의 항산화 효과에 대해 다수의 연구가 진행되어 있으나 항알레르기 효과, 특히 아토피성 피부염 개선에 관한 연구가 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 감 생산량의 약 60%를 차지하는 국내 최대 감 생산지 하나인 청도의 柿葉을 시기별(5월~11월)로 채취하고 추출하여 그 추출물들의 총 페놀성 화합물, 플라보노이드 함량 및 항산화 효과(DPPH 라디칼 포착 효능, superoxide dismutase 유사 활성효능)를 확인하였다. 그 중 가장 높은 함량과 효과를 나타낸 추출물을 선별하여 collagenase type I (MMP-1)저해 활성을 확인하였다. 또한 항아토피성 피부염 효능을 측정하기 위하여 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)로 아토피성 피부염이 유도된 Balb/c mouse에 柿葉 추출물을 투여 시킨 후 혈청 내 염증 매개 물질들의 수치를 측정하여 柿葉의 아토피성 피부염 증상 완화 및 개선의 가능성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), xanthine, xanthine oxidase, catechin hydrate, collagenase type I, from *clostridium histolyticum*, promethazine hydrochloride, 4-phenyl-azobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg, 2,4-Dinitrochlorobenzene

(DNCB)는 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. Prostaglandin E metabolite EIA kit, Leukotriene B<sub>4</sub> EIA kit는 Cayman사(Ann Arbor, USA)에서 구입하여 사용하였고, Histamine ELISA kit는 Neogen사(Lexington, KY, USA)에서 구입하여 사용하였다. UV-VIS 분광광도계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy Co., Ivyland, USA)모델, ELISA autoreader는 VERSA max(Molecular devices Co., Sunnyvale, USA) 모델을 사용하였다. 추출기와 반응조는 Extraction Water Bath와 일반 반응조(CHOJALAB Co., Hwaseng, Gyeonggi-do)를 사용하였다. 추출에 이용된 柿葉은 잎의 형태를 갖추기 시작한 5월부터 낙엽이지기 직전인 11월까지 청도군 소재의 청도 감 클러스터 사업단으로부터 매월 1회씩 신선한 상태로 제공받아 사용하였다. 그 외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

### 2. 柿葉 추출물 제조

柿葉 추출물 제조는 신선한 柿葉을 흐르는 물로 2회 세척하고 이를 50℃ 건조기에서 24시간 건조 후 분쇄하여 분말 형태로 만들어 사용하였다. 이를 60% ethanol과 1:7의 무게 비율로 혼합하여 추출기에 넣고 30℃에서 2시간 교반 추출하였다. 2시간 후 추출물을 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과한 후 60℃에서 감압농축(Rotavapor rotary evaporators, Büchi, Switzerland)하여 추출분말 상태로 제조하였다. 이를 진공 포장하여 서늘한 암실에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 3. 실험동물 관리 및 사육

Balb/c계 마우스(수컷, 6주령)는 (주) 오리엔트 바이오 (Gyeonggi-do, Gapyeong)에서 구입하였고, 본 실험실의 사육실에서 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 모든 동물군에는 자유로운 식이와 식수를 제공하였다. 사육실 온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $55 \pm 5\%$  및 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다.

### 4. 총 페놀성 화합물 함량 측정

柿葉 추출물의 총 페놀성 화합물의 함량은 Gutfinger<sup>31)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 1 mL에 2%(w/v) sodium carbonate 용액 1 mL를 가하여 3분간 상온에서 반응시킨 후, 50%(v/v) Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켰다. 이 반응물 1 mL를 취하여 분광광도계를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 총 페놀성 화합물의 함량은 catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

### 5. 총 플라보노이드 함량 측정

柿葉 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Kim 등<sup>32)</sup>의 방법으로 측정하였다. 시료 0.5 mL에 95%(v/v) ethanol 1.5 mL, 10%(w/v) aluminium chloride 용액 0.1 mL, 1 M potassium acetate 용액 0.1 mL 그리고 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반을 하고 실온에서 30분간 방치하였다. 그 후 증류수를 대조액으로 하여 반응액을 분광광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

### 6. DPPH 라디칼 포착 효능 측정

柿葉 추출물의 DPPH 라디칼 포착능을 확인하기 위하여 Yasushi 등<sup>33)</sup>의 문헌을 변형하여 실험하였다. 0.2 mM 농도가 되도록 ethanol에 용해한 DPPH 0.75 mL에 시료 0.075 mL과 증류수 0.675 mL를 첨가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후, 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 포착능(%)은  $[1 - (\text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}] \times 100$  식으로부터 구하였다. 그 결과는 DPPH 라디칼을 50% 포착할 때의 농도인 50% scavenging activity concentration(SC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었다.

### 7. Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성효능 실험

柿葉 추출물의 SOD 유사 활성효능을 확인하기 위하여 Kim 등<sup>34)</sup>의 방법으로 측정하였다. 시료 0.025 mL, 발색액(0.4 mM xanthine and 0.24 mM nitro blue tetrazolium in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) 0.25 mL, 효소액(0.05 unit/mL xanthine oxidase in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) 0.25 mL을 첨가하고 혼합하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 반응 정지액(70 mM sodium dodecyl sulfate) 1 mL을 첨가하여 효소 반응을 정

지시킨 다음 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사 활성효능(%)은  $[1 - (\text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}] \times 100$  식으로부터 구하였다.

그 결과는 50% SOD 유사 활성효능을 나타내는 농도인 SC<sub>50</sub>값으로 나타내었다.

### 8. Collagenase type I 저해활성 실험

柿葉 추출물의 collagenase type I 저해활성 측정은 Wüsch 등<sup>35)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질액(0.3 mg/mL 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg in 0.1 M tris-HCl buffer contain 4mM calcium chloride ,pH 7.5) 0.25 mL, 시료(in 0.1 M tris-HCl buffer contain 4 mM calcium chloride and 10% DMSO, pH 7.5) 0.1 mL, 효소액(0.2 mg/mL) 0.15 mL를 첨가하여 혼합 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응 정지액(25 mM citric acid) 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨다. 이 때 ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고 8000 Xg에서 5분간 원심분리 후 상등액을 분광광도계를 이용하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase type I 저해 활성(%)은  $[1 - (\text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}] \times 100$  식으로부터 구하였다. 그 결과는 collagenase type I 50% 저해 활성일 때의 농도를 50% inhibition activity concentration (IC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었다.

### 9. DNCB로 유발된 아토피성 피부염 억제 효과

DNCB를 이용한 아토피성 피부염 유발 실험은 Dezan 등<sup>36)</sup>과 Kwon 등<sup>37)</sup>의 문헌을 변형하여 실험하였다. 실험동물(Balb/c 마우스)은 총 40마리를 사용하였으며 AOO 도포군(AOO군), 음성대조군, 양성대조군 그리고 시료군으로 나누어 각 10마리씩 배정하였다. 유사 아토피성 피부염을 유발하기 전 Balb/c 마우스의 등 부위를 1.5×1.5 cm<sup>2</sup> 크기로 면도기를 사용하여 제모 후 24시간 동안 안정화 시켰다. 이후 DNCB를 용매 물질(AOO, acetone : olive oil = 4 : 1 혼합)을 사용하여 1% 또는 0.2%가 되도록 제조하였다. 우선 1% DNCB는 음성대조군, 양성대조군, 시료군에 각각 100 μL씩 일주일에 2일 간격으로 3회 등 부위에 도포하여 아토피성 피부염을 유발시켰고 AOO군에 동량의 AOO를 동일한 방법으로 처리하였다. 아토피성 피부염이 유발됨을 확인 후 일주일 동안 시료군에는 柿葉 추출물(50 mg/kg body weight)을, 양성대조군에는 promethazine hydrochloride(1 mg/kg body weight)를 그리고 AOO군과 음성대조군에는 증류수를 1일 1회씩 경구투여 하였다. 일주일간의 경구투여가 종료된 후 다음 일주일 동안 0.2% DNCB를 음성대조군, 양성대조군, 시료군에 100 μL씩 처리하고 AOO군에는 동량의 AOO를 2일 간격으로 3회 등 부위에 도포하여 아토피성 피부염을 재 유발시키고 외형 관찰 후 희생부검 하였다. 아토피성 피부염에 대한 柿葉 추출물의 효과는 항히스타민제로 잘 알려진 promethazine hydrochloride를 양성대조군으로 하여 비교하였다.

### 10. 혈청 내 염증 매개 물질의 수치 변화

희생 부검한 동물의 심장에서 채혈하여 실온에서 5800 Xg

로 20분간 원심 분리하여 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청을 competitive ELISA 방식의 kit을 이용하여 혈청 내 염증 매개물질들(histamine, prostaglandin E metabolite and leukotriene B<sub>4</sub>)의 농도를 측정하였다. 염증 매개물질들 가운데 PGE<sub>2</sub>는 혈액 내에서 구조가 쉽게 변하는 특성을 가지기 때문에 prostaglandin E metabolite 측정하는 것으로 이를 대신하였다. 이때 각각의 실험 방법은 ELISA kit의 제조사에서 공급한 방법을 사용하였다.

## 11. 통계분석

실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차(mean±SEM)로 나타냈으며, 각 실험군 간의 유의성 검정은 p<0.05에서 student's t-test로 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 총 페놀성 화합물 함량과 플라보노이드 함량 측정

총 페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 지니며 페놀성 화

합물의 phenolic hydroxyl기가 단백질과 같은 거대 분자와의 결합을 통해 여러 가지의 생리기능을 지닌다고 보고되어져 있다<sup>38-39</sup>. 또한 플라보노이드 류는 약 4000여개의 화합물로 식물에 널리 존재하는 노란색 계열의 색소를 나타내며 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방, 항염증, 항알레르기 등 여러 가지 긍정적인 생리활성이 보고되어져있다<sup>40-41</sup>. 시기별(5~11월) 채취한 柿葉 추출물의 총 페놀성 화합물과 플라보노이드 함량 그리고 추출 수율을 측정한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 추출물들의 수율은 5월부터 11월까지 각각 14.74, 17.02, 13.55, 15.44, 16.11, 21.28 그리고 20.04%로 10월과 11월의 추출물이 다소 높은 수율을 보였다. 총 페놀성 화합물 함량은 5월부터 11월까지 각각 182.24±0.71, 179.85±0.92, 178.50±5.86, 150.76±5.14, 136.95±2.39, 143.53±4.53 그리고 105.67±0.01 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 각각 23.05±0.36, 18.66±2.66, 9.2±0.36, 11.41±0.47, 11.35±1.51, 17.2±0.18 그리고 7.67±0.36 mg/g으로 나타났다. 총 페놀성 화합물과 플라보노이드의 함량 모두 5월 柿葉 추출물에서 가장 높은 함량이 나타났다. 이러한 결과는 柿葉이 채취시기에 따라 성분의 변화가 심한데 개화 시기인 5월 중순부터 6월 초순이 비타민 및 페놀성 화합물이 함량 면에서 가장 높으며, 이는 柿葉이 성장하면서 점차 양이 감소하는 것으로 보고된 Jeng 등<sup>42</sup> 이전의 실험들과 유사한 결과를 나타내었다.

Table 1. Content of Total Phenolic Compounds and Flavonoids in Persimmon Leaves Extracts (May~Nov).

Persimmon leaves extract	Picking month						
	5	6	7	8	9	10	11
Extract(%)	14.74	17.02	13.55	15.44	16.11	21.28	20.04
Total phenolics (mg/g)	182.2±0.71	179.9±0.92	178.5±5.86	150.8±5.14	137±2.39	143.5±4.53	105.7±0.01
Total flavonoids (mg/g)	23.05±0.36	18.66±2.66	9.2±0.36	11.41±0.47	11.35±1.51	17.2±0.18	7.67±0.36

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

A standard compound was catechin for total phenolic compounds assay.

A standard compound was quercetin for total phenolics assay.

### 2. DPPH 라디칼 포착 효능 측정

DPPH법은 안정한 자유라디칼인 DPPH가 수소공여체(H-donor)와 반응하는 능력을 바탕으로 측정하는 방법이다. DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 변색되므로 항산화 효능을 측정할 때 많이 이용된다. 柿葉 추출물들의 DPPH 라디칼 포착 효능은 Table 2와 같이 나타났다. 柿葉 추출물의 SC<sub>50</sub>값이 5월부터 11월까지 각각 13.39±0.21, 19.35±3.29, 24.22±0.12, 22.14±1.93, 28.56±2.64, 26.51±0.12 그리고 41.14±0.18 µg/ml으로 5월 柿葉 추출물이 가장 높은 DPPH 라디칼 포착 효능을 나타냈다. 양성대조군으로는 항산화 활성이 우수한 녹차 카테킨중 하나인 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였으며, SC<sub>50</sub>값은 4.4±0.4 µg/ml로 나타났다. 가장 높은 DPPH 라디칼 포착 효능을 나타낸 5월 柿葉 추출물이 EGCG보다 약 3배 떨어지는 효능을 나타냈다. 하지만 柿葉 추출물이 정제된 단일물질이 아니라는 것을 감안하면 우수한 DPPH 라디칼 포착 효능을 가지는 것으로 사료된다. 또한 柿葉의 추출물들이 총 페놀성 화합물 함량에 비례하여 DPPH 라디칼 포착 효능이 증가하는 결과를 보였다. 이는 페놀성 화합물의 함량에 비례하여 DPPH 라디칼 포착 효능이 증가한다고 보고

된 연구들과 동일한 결과를 보였다<sup>43</sup>.

### 3. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 효능 실험

SOD 유사활성 효능 측정은 xanthine과 xanthine oxidase를 반응시킨 후 생성되는 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 양을 nitroblue tetrazolium(NBT)으로 발색하는 능력을 바탕으로 측정하는 방법이다. 시기별 柿葉 추출물의 SOD 유사활성 효능은 Table 2와 같이 나타났다. 柿葉 추출물의 SC<sub>50</sub>값이 5월부터 11월까지 각각 40.59±0.4, 40.52±2.32, 39.58±1.38, 42.5±3.41, 48.9±0.26, 60.2±2.68 그리고 80.87±2.96 µg/ml으로 柿葉의 채취시기가 지날수록 효능이 떨어지는 것으로 나타났다. 양성대조군인 EGCG의 SC<sub>50</sub>값은 5.8±0.2 µg/ml로 나타났으며, 가장 높은 SOD 유사활성 효능을 가지는 5월~7월 柿葉 추출물이 EGCG보다 약 7배 떨어지는 효능을 나타냈다. 하지만 柿葉 추출물이 정제된 단일물질이 아니라는 것을 감안할 때 비교적 우수한 SOD 유사활성 효능을 가지는 것으로 사료된다. 또한 SOD 유사활성 효능 역시 柿葉 추출물들의 총 페놀성 화합물 함량에 비례하여 증가되는 결과를 확인하였다.

Table 2. DPPH Radical Scavenging Effects and SOD-like activities of Persimmon Leaves Extracts (May~Nov).

	Picking month (persimmon leaves extract)							EGCG
	5	6	7	8	9	10	11	
DPPH free radical 50% scavenging activity concentration (µg/ml)	13.4±0.2	19.4±3.3	24.2±0.1	22.1±1.9	28.6±2.6	26.5±0.1	41.1±0.2	4.4±0.4
Superoxide anion radical 50% scavenging activity concentration (µg/ml, SC <sub>50</sub> )	40.6±0.4	40.5±2.3	39.6±1.4	42.5±3.4	48.9±0.3	60.2±2.7	80.9±3	5.8±0.2

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

#### 4. Collagenase type I 저해 활성 실험

세포 외 기질의 주요 구성 성분인 collagen type I 은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 매트릭스 구조 단백질이다. Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합 조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포의 접착 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등이 알려져 있다<sup>44-46</sup>. 이러한 collagen을 손상시켜 피부조직의 불균형을 초래하여 피부 염증이나 피부 노화를 일으키는 collagenase type I (MMP-1)의 저해 효능을 통해 柿葉 추출물의 피부보호 효과를 측정하였다. 이는 collagenase type I 이 아미노산 서열 Pro와 Gly 사이를 결합을 분해하는 성질을 이용하여 유사 펩타이드(4-Phenylazobenzoxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg)를 기질로 삼아 발색시키는 방법을 이용하였다. 이전 실험들에서 가장 높은 효과를 보인 5월 柿葉 추출물을 선택하여

실험을 진행하였으며, 柿葉 추출물의 collagenase type I 의 억제효과는 Table 3과 같이 나타났다. 柿葉 추출물의 collagenase type I 의 IC<sub>50</sub>값은 326.71±4.6 µg/ml으로 나타났다. 양성대조군으로 플라보노이드 계열의 물질인 quercetin을 사용하였다. Quercetin의 collagenase type I IC<sub>50</sub>값은 32.98±5.19 µg/ml으로 나타났으며, 柿葉 추출물이 quercetin보다 약 10배 떨어지는 효능을 보였다. 하지만 quercetin이 플라보노이드 계열 중 collagenase 억제 효능이 높다고 알려진 물질임을 감안할 때 柿葉 추출물은 collagenase type I 저해에 상당한 효과를 가지는 것으로 사료된다. 따라서 柿葉 추출물은 아토피성 피부염 발생 시 피부장벽의 파괴를 일으키는 초기 염증인자인 collagenase type I 을 효과적으로 저해하여 피부 상태의 개선 또는 증상을 완화 시키는 유용한 효과를 가질 것으로 사료된다.

Table 3. Collagenase Type I Inhibiting Effects of Persimmon Leaves Extract (May) and Quercetin.

Collagenase type I inhibition assay			
Quercetin concentration (µg/ml)	Inhibition (%)	Persimmon leave extract concentration (µg/ml, May)	Inhibition (%)
3.13	11.75±0.66	125	30.20±1.34
6.25	26.92±2.07	250	43.58±1.82
12.5	35.40±4.05	500	66.18±0.94
25	51.22±4.81	1000	85.53±2.29
50	61.17±2.66	2000	98.73±0.94

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

#### 5. DNCB로 유발된 아토피성 피부염 억제 효과

알레르기 피부염 중의 하나인 아토피성 피부염은 주로 면역학적 기전에 의해서 발생하는 피부 질환이다. 柿葉 추출물의 항아토피성 피부염 효과는 피부에서 인위적으로 아토피성 피부염을 유발하는 hapten을 형성하는 물질로 알려진 DNCB를 이용하여 실험하였다. 柿葉 추출물의 항아토피성 피부염 효과는 1% DNCB 도포, 증류수 또는 시료들 경구 투여 그리고 0.2% DNCB 도포를 각 일주일씩 실시하는 방법으로 실험하였다. AOO군 마우스들의 등 피부에는 어떠한 병변이나 증상도 나타나지 않았으나(Figure 1A), 음성대조군의 등 피부에서는 紅斑, 浮腫, 脫毛 등의 다양한 아토피 증상이 뚜렷하게 나타났으며(Figure 1B), promethazine hydrochloride(1 mg/kg body wight)을 투여한 양성대조군 마우스들의 등 피부에서는 음성대조군 마우스들에 비교하면 紅斑, 浮腫, 脫毛 등의 증상

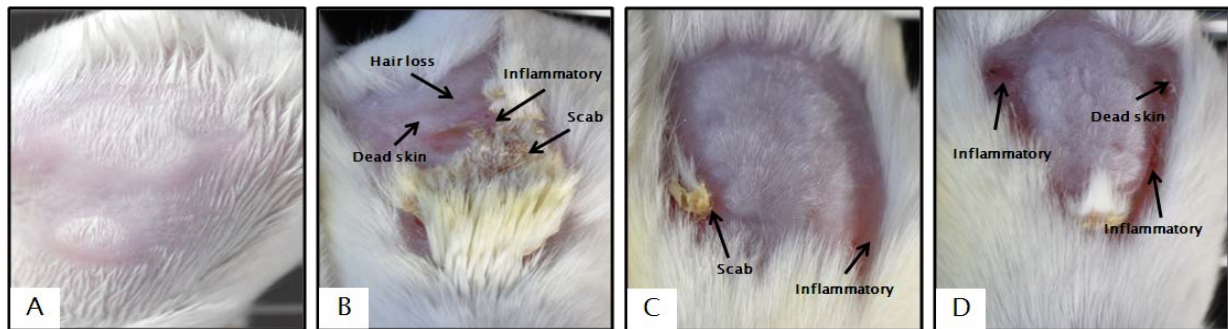
이 확연히 억제된 것을 확인하였다(Figure 1D). 柿葉 추출물 50 mg/kg body weight을 투여한 시료군 마우스의 등 피부 역시 음성대조군 마우스들 보다 紅斑, 浮腫, 脫毛 등의 증상이 확연히 억제된 것이 확인되어졌으며(Figure 1C), 또 10명의 전문 연구원들이 각 군의 등 피부를 비교 관찰한 결과(Table 4) 시료군의 등 피부에서 양성대조군의 등 피부보다 紅斑, 浮腫, 脫毛 등의 증상이 더 개선된 것으로 관찰되었다. 피부 병변의 개선은 아토피성 피부염 치료의 중요한 지표 중의 하나로서, 柿葉 추출물을 투여한 마우스의 피부 상태가 음성대조군의 피부 상태보다 확실히 호전된 것을 육안으로 볼 수 있었으며, 柿葉 추출물을 투여한 마우스의 피부 상태가 시중에 널리 이용되는 항염증제인 promethazine hydrochloride을 투여한 양성대조군의 피부 상태보다 더욱 호전된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 비추어 볼 때 柿葉 추출물이 우수한 항아토피성 피부염 효과를 가지는 것으로 사료된다.

Table 4. Inhibitory Effect of Persimmon Leaves (May) Extract Administrated Orally with Applied Topically Against DNCB-induced Atopic Dermatitis in Balb/c mice (gross finding).

	Hair loss	Inflammation	Total
AOO-treated group	5	5	10
Negative control group	1	1,2	2
Persimmon leave extract group (50 mg/kg body weight, May)	3,2	3,9	7,1
Promethazine hydrochloride group (1 mg/kg body weight)	2,9	3,4	6,3

Dorsal skin of mouse was evaluated ten people by the score and averaged the score.  
Severe symptom ~ No symptom (1 ~ 5 point)

Fig 1. Effects of Persimmon Leaves (May) Extract Administrated Orally with Applied Topically Against DNCB-induced Atopic Dermatitis in Balb/c mice.



- (A) AOO-treated group : DNCB vehicle, AOO group  
 (B) DNCB-treated group : negative control group  
 (C) Oral administration (50 mg/kg body weight) with topically application (1% and 0,2%) group of persimmon leaves extract (May) : sample group  
 (D) Oral administration (1 mg/kg body weight) with topically application (1% and 0,2%) group of promethazine hydrochloride : positive control group

## 6. 혈청 내 염증 매개 물질의 수치 변화

비만세포 표면에 존재하는 IgE의 수용체인 Fcε RI에 IgE가 결합되면서 비만세포의 탈립이 유도되고 세포 내 과립에 저장되어 있던 히스타민이 체내로 유리된다. 이렇게 유리된 히스타민은 혈관확장과 근육수축을 일으켜 즉각적인 알레르기 증상을 유발한다. 또 비만세포 내에서 정상적인 생체기능에 작용하는 COX-1과 달리 염증성 자극에 의해 단기간에 유도, 발현되는 COX-2는 세포막의 인지질에 포스포라이페이스 (phospholipase) A<sub>2</sub>가 작용하여 생성된 아라키돈산 기질로 하여 대량의 프로스타글란딘류와 트롬복산류(thromboxanes)를 형성하는 과정을 촉매한다. 이와 마찬가지로 염증성 자극에 의해 단기간에 유도, 발현되는 5-LO 또한 아라키돈산을 기질로 하여 대량의 류코트리엔류를 형성하는 과정을 촉매한다. 비만세포 내에서 생성된 염증 매개 물질들이 혈액 내로 유리되면서 혈관의 이완, 조직 내 면역 세포 침윤, 가려움, 부종, 통증 등의 알레르기성 질환의 전형적인 반응이 나타나게 된다. 이러한 이유로 혈액 내의 histamine, prostaglandin E metabolite 그리고 leukotriene B<sub>4</sub>수준은 알레르기성 질환의 중요한 지표가 된다. 본 실험에서는 competitive ELISA 방식을 이용하여 대표적인 알레르기성 질환인 아토피성 피부염 마우스 모델의 혈청 내의 histamine, prostaglandin metabolite 그리고 leukotriene B<sub>4</sub>의 수치를 측정하였고, 그 결과 Table 5와 같이 나타났다. 첫 번째로 histamine 수치는 정상군인 AOO군에서 28.05±11.88 pg/ml 그리고 DNCB를 처리하여 아토피성 피부염이 유발된 음성대조군에서 52.31±16.14 pg/ml로 나타나 DNCB 처리에 의해 혈청 내

histamine농도가 확연히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 시료군과 양성대조군은 각각 48.09±15.21, 40.04±7.68 pg/ml로 나타났으며, 柿葉 추출물을 투여한 시료군의 혈청 내 histamine농도가 음성대조군보다 감소되는 결과가 나타났고 양성대조군보다는 낮은 효능이 나타났다. 두 번째로 prostaglandin E metabolite수치는 AOO군과 음성대조군에서 각각 6.5±1, 109.94±21.35 pg/ml로 나타나 DNCB 처리에 의해 혈청 내 prostaglandin E metabolite농도가 급격하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한 시료군과 양성대조군은 각각 94.56±12.52, 77.93±12.93 pg/ml로 시료군이 약 2배 낮은 효능을 보였다. 마지막으로 leukotriene B<sub>4</sub>농도는 AOO군과 음성대조군에서 각각 54.11±34.28, 140.58±42.46 pg/ml로 나타나 DNCB 처리에 의해 확연히 혈청 내 leukotriene B<sub>4</sub>농도가 급증하는 것을 확인하였다. 또 시료군과 양성대조군은 각각 80.27±34.47, 69.58±43.73 pg/ml로 시료군이 다소 낮은 효능을 보였다. 이렇게 histamine, prostaglandin E metabolite와 leukotriene B<sub>4</sub>의 혈청 내 수치 감소 효과에서 시료군은 음성대조군보다 실험한 모든 염증 매개물질들의 혈청 내 수치가 감소하였지만 양성대조군보다는 다소 낮은 감소 효과를 보였다. 하지만 양성대조군에 사용된 promethazine hydrochloride는 항히스타민제이고 柿葉 추출물이 정제되지 않은 단순 추출물이라는 것을 감안할 때 柿葉 추출물은 체내에서 충분히 histamine, prostaglandin E metabolite와 leukotriene B<sub>4</sub>의 혈청 내 수치 감소 효과를 가지는 것으로 사료된다. 또한 柿葉 추출물은 이러한 염증 매개물질들의 수치를 효과적으로 감소시켜 아토피성 피부염 증상을 억제 및 완화에 효과를 가지는 것으로 사료된다.



Table 5. Inhibitory effects of Persimmon Leaves Extract on the DNCB-Induced Serum Histamine, prostaglandin E metabolite, Leukotriene B<sub>4</sub> Levels Release in Balb/c Mice.

	AOO group	Negative control group	persimmon leave extract group (50 mg/kg body weight, May)	promethazine hydrochloride group (1 mg/kg body weight)
Histamine (ng/ml)	28,05±11.88	52,31±16,14	48,09±15,21	40,04±7,68
prostaglandin E etabolite (pg/ml)	6,5±1	109,94±21,35	94,56±12,52	77,93±12,93
Leukotriene B <sub>4</sub> (pg/ml)	54,11±34,28	140,58±42,46	80,27±34,47	69,58±43,73

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

## 결론

감나무(柿樹)는 쌍떡잎식물 감나무목 감나무과에 속하는 낙엽활엽 교목이다. 柿葉은 초여름의 어린잎을 따서 말렸다가 끓는 물에 우려서 차로 마시면 피부를 깨끗하게 하고 간 기능을 회복시키며 성인병을 예방하는 효능을 가진다고 동의보감에 기록되어져 있다.<sup>1)</sup> 이러한 자료들을 바탕으로 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 5월부터 11월까지 채취한 柿葉의 추출물 중 잎이 가장 왕성한 성장을 하는 5월에서 7월, 그중에서도 5월에 채취한 柿葉 추출물에서 총 페놀성 화합물과 플라보노이드 류의 함량이 가장 높게 나타났다.
2. 5월부터 11월까지의 채취한 柿葉의 추출물 중에서 5월에 채취한 柿葉 추출물에서 비교적 높은 DPPH라디칼 포착 효능과 superoxide anion radical 소거활성을 보여 항산화 활성이 우수하게 나타났다.
3. 앞선 실험을 통해 생리활성 물질들의 함량이 높고 우수한 항산화 효능을 나타낸 5월에 채취한 柿葉 추출물이 collagenase type I 저해 실험을 통하여 피부장벽 손상 방지로 인한 아토피성 피부염 증상 개선의 가능성을 입증하였다.
4. 아토피성 피부염 질환 동물모델을 통하여 5월에 채취한 柿葉 추출물이 紅斑, 浮腫, 脫毛 등의 아토피성 피부염 증상 개선 효과를 육안으로 확인하였다.
5. 아토피성 피부염 개선효과에 따른 외형적 변화 이외에 혈청 내 염증 매개물질들인 histamine, prostaglandine E metabolite 그리고 leukotriene B<sub>4</sub>의 농도가 감소되는 경향을 보였으며 이중 leukotriene B<sub>4</sub>의 농도는 다른 물질과 비교할 때 감소폭이 크게 나타나 염증 매개물질의 감소로 인한 아토피성 피부염 증상 개선의 가능성을 확인하였다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때 柿葉은 우수한 항산화 효능을 바탕으로 collagenase type I 저해 효능과 아토피성 피부염이 유발된 혈청 내에서 염증 매개 물질들의 수치를 낮췄다. 이는 柿葉의 아토피성 피부염 예방 및 개선제로서의 가능

성을 시사하는 것으로 사료되며 예방 의학적인 측면을 강화하기 위하여 柿葉에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 청도 감클리스트사업단의 실험에 필요한 원료 및 연구 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Heo J. appendix of Donguibogam(동의보감 부록), Seoul : Yeo-Kang, 1994 : 276.
2. Joung SY, Lee SJ, Sung NJ, Jo JS and Kang SK. The chemical composition of persimmon(Diospyros kaki, Thumb) leaf tea. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1995 ; 24 : 720.
3. Kameda K, Takaku T, Okada H and Kimura Y. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of Persimmon on angiotension-converting enzyme activity. J Natural Products. 1978 ; 50 : 680.
4. Lee JH, Lee SR. Some physiological activity of phenolic substances in plant foods, J Korean Soc Food Sci Nutr. 1994 ; 26 : 310.
5. Kang WW, Kim GT, Park PS, Park MA and Choi SW. Antioxidative properties of persimmon leaves. Foods and Biotechnolory. 1996 ; 5 : 48.
6. Bae SM, Park KJ, Shin DJ, Hwang YI and Lee SC. Preparation and characterization of jochung with sweet persimmons. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 2001 ; 44 : 88-91.
7. Bae SM, Park KJ, Kim JM, Shin DJ, Hwang YI and Lee SC. Preparation and characterization of sweet persimmons wine. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 2001 ; 45 : 66-70.
8. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, & Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen Elderly

- study. *Lancet*, 1993 ; 342 : 1007–1011.
9. Stoner GD, & Mykhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents, *J. cell. Bio. Chem* 1995 ; 22 : 169–180.
  10. Vijaya K, Ananthan S, & Nalini R. Antibacterial effect of theaflavin, Polyphenon 60 (camellia sinensis) and *Euphorbia hirta* in shigella spp, *J. Ethnopharmacil*, 1995 ; 49 : 115–118.
  11. Patterson R, Dykewicz MS, Grammer LC, Greenberger PA, Lawrence ID, Walker CL, Wong S, Zeiss CR. Classification of immediate-type, life-threatening allergic or pseudoallergic reactions, *Chest*, 1990 ; 98 : 257–259.
  12. Gomes JC, Di Stasi LC, Sgarbosa F, Barata LE. Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchietia salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994 ; 103 : 188–193.
  13. Ando A, Martin TR, Galli SJ. Effects of chronic treatment with the c-kit ligand, stem cell factor, on immunoglobulin E-dependent anaphylaxis in mice. Genetically mast cell-deficient Sl/Sld mice acquire anaphylactic responsiveness, but the congenic normal mice do not exhibit augmented responses, *J Clin Invest*, 1993 ; 92 : 1639–1649.
  14. Lee YM, Kim DK, Kim SH, Shin TY, Kim HM. Antianaphylactic activity of *Poncirus trifoliata* fruit extract, *J Ethnopharmacol*, 1996 ; 54 : 77–84.
  15. Martin TR, Ando A, Takeishi T, Katona IM, Drazen JM, Galli SJ. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice, *J Immunol*, 1993 ; 151 : 367–376.
  16. Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene, *Cell*, 1993 ; 75 : 969–976.
  17. Kim HM, Hirota S, Chung HT, Ohno S, Osada S, Shin T, Ko KI, Kim JB, Kitamura Y, Nomura S. Differential expression of protein kinase C genes in cultured mast cells derived from normal and mast cell-deficient mice and mast cell lines, *Int Arch Allergy Immunol*, 1994 ; 105 : 258–263.
  18. Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds : V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver, *Planta Med*, 1984 ; 50 : 473–477.
  19. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Komori A, Sueoka E, Sueoka N, Kozu T, Sakai Y. Japanese green tea as a cancer preventive in humans, *Nutr Rev*, 1996 ; 54 : S67–70.
  20. Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL. Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols : a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity, *Biochemistry*, 1987 ; 26 : 7064–7072.
  21. Nakatsuka M, Osawa Y. Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets, *Biochem Biophys Res Commun*, 1983 ; 200 : 1630–1640.
  22. Neichi T, Koshihara Y, Murota S. Inhibitory effect of esculetin on 5-lipoxygenase and leukotriene biosynthesis, *Biochim Biophys Acta*, 1983 ; 753 : 130–132.
  23. Sekiya K, Okuda H, Arichi S. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin, *Biochim Biophys Acta*, 1982 ; 713 : 68–72.
  24. Nam KW, Je KG, Han HJ, Kang SK and Mar WC. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom, *Arch Pharm Res*, 2003 ; 26 : 383–388.
  25. John JC. Glucocorticoids, *Encyclo. Immunol*, London, Academic Press Inc, 1992 : 616–617.
  26. Tachibana T, Toda KI, Furukawa F, Taniguchi S and Imamura S. Histamine metabolism in delayed type hypersensitivity comparative analysis with cellular infiltrates, *Arch. Dermatol. Res*, 1990 ; 282 : 217–222.
  27. Chio KU and Paek DM. Asthma and air pollution in Korea, *Korean J. Epidemiology*, 1995 ; 17 : 64–75.
  28. Sator PG, Schmidt JB, Honnigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis, *J Am Acad dermatol*, 2003 ; 48 : 352–8.
  29. Middleton E, Kandaswami C and Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells : Implications for inflammation, heart diseases and cancer, *Pharmacol. Rev*, 2000 ; 52 : 673–751.
  30. Kim HP, Son KH, Chang HW and Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms, *J. Pharmacol. Sci*, 2004 ; 96 : 229–245.
  31. Gutfinger T. Polyphenol in olive oils, *JAOCS*, 1981 ; 58 : 966–972.
  32. Kim EJ, Lee HJ, Kim HJ, Nam HS, Lee MK, Kim HY, Lee JH, Kang YS, Lee JO, Kim HY. Comparison of colorimetric methods for the



- determination of flavonoid in propolis extract product. *Korean J Food Sci Technol*, 2005 ; 37 : 918-921.
33. Yasushi S, Tsukase N, Keiko S, Hiroe Y, Hisashi Y. Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull*, 1999 ; 47 : 1369-1374.
  34. Yoo KH, Jeong JM. Antioxidative and antiallergic effect of persimmon leaf extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2009 ; 38(12) : 1691-1698.
  35. Wünsch E, and Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem*, 1963 ; 333 : 149-151.
  36. Dezan C, and Sheehan HT. *Theory and practice of histotechnology*. 2nd ed., The C.V. London, Mosby Company, 1980 : 282-283.
  37. Kwon OS. The effect of Yunkyopaedocksan-gami on allergic contact dermatitis on mice induced by DNCB. Ph.D. Dissertation, Dongguk University, 1996.
  38. Woo HS, Choe HJ, Han HS, Park JH, Son JH, An BJ, Son GM, Choe C. Isolation of polyphenol from green tea by HPLC and its physiological activities. *Korean J Food Sci Technol*, 2003 ; 35 : 1199-1203.
  39. Jang JH, Choi HS, Cheong HS, Kang OJ. A comparison of the antioxidant activity of barley leaf tea and green tea according to leaching conditions in distilled water. *Korean J Food Cookery Sci*, 2007 ; 23 : 165-172.
  40. Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997 ; 61 : 102-104.
  41. Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in oratic acid treated mice. *Korean J Life Science*, 1999 ; 9 : 89-394.
  42. Jeng YK, Kim SJ, Shin P. Changes in Antioxidants of Several Plant Leaves During Growth. *Journal of Life Science*, 2004 ; 14 : 104-109.
  43. Kwak CS, Kim SA and Lee MS. The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2005 ; 34(8) : 1143-1150.
  44. Jeroma SP, L. Gabrielle and F. Raul. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol*, 1998 ; 90 : 48-54.
  45. Fishe GJ, and Voorhees JJ. Molecular mechanism of photoaging and its prevention by retinoic acid : ultraviolet irradiation induces MAP kinase signaling transduction cascade that induce AP-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*, 1998 ; 3 : 61-68.
  46. Kapp A, Papp K, Bingham A, Holst R,F, Ortonne J,P, Potter P,C, 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 : 277-84.