천식 및 알레르기 제 31 권 제 3 호
Vol. 31, No. 3, Sep., 2011

□원 저□

마치현(*Portulaca oleracea L.*) 추출물의 항염 및 항소양 작용: LPS 처리로 염증을 유도한 Raw264.7세포와 각질형성세포, NC/Nga 마우스, Hairless 마우스에 대한 결과

[1]중앙대학교 의과대학 피부과학교실, [2]아모레퍼시픽 R&D센터

임윤영[1] · 김형미[1] · 박원석[2] · 김정환[2] · 신홍주[2] · 김명남[1] · 김범준[1]

Anti-inflammatory and Anti-pruritic Effects of *Portulaca oleracea L.* Extract Using *In Vitro* and *In Vivo* Inflammation Model: LPS-treated Raw264.7 Cells, Keratinocytes, NC/Nga Mice and Hairless SKH-1 Mice

Yun Young Lim[1], Hyeong Mi Kim[1], Won-Seok Park[2], Jeong Hwan Kim[2], Hong Ju Shin[2], Myeong Nam Kim[1] and Beom Joon Kim[1]

[1]Department of Dermatology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, [2]AmorePacific R&D Center, Yongin, Korea

Background: *Portulaca oleracea L.* is known to have detoxification and antibacterial effects. Inflammatory responses in LPS-treated Raw264.7 cells include the secretions of NO, PGE2 and numerous cytokines. Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disease. This study was performed to identify the antiinflammatory or anti-pruritic effects of *Portulaca oleracea L.* extract in LPS-treated Raw264.7 cells and keratinocytes and the skin of NC/Nga mice with atopic dermatitis, as well as hairless mice with pruritus.
Methods: After the treatment of different concentrations for *Portulaca oleracea L.* extract in LPS-treated Raw264.7 cells and keratinocytes, the levels of NO, PGE2 and proinflammatory cytokines were measured in the media. Skin tissues of all Nc/Nga mice were subjected to H&E staining and toluidine blue staining. An antipruritic effect was defined as the number of scratching behaviors of the hairless SKH-1 mice treated with compound 48/80.
Results: LPS- and IFN-γ-treated Raw264.7 cells decreased NO and PGE2 productions compared to non-treated Raw264.7 cells. H&E or toluidine blue staining revealed that the thicknesses of the epidermis and dermis were reduced in NC/Nga mice with atopic dermatitis treated with *Portulaca oleracea L.* extract. However, Itching behaviors in hairless mice treated with *Portulaca oleracea L.* extract were not decreased compared to non-treated hairless mice.
Conclusion: The results of this study suggest that *Portulaca oleracea L.* extract could be a new therapeutic agent for atopic dermatitis. **(Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2011;31:199-206)**

Key words: *Portulaca oleracea L.*, Atopic dermatitis, Pruritus

서 론

염증반응(inflammatory response)은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적인 변화가 가해질 때, 이에 대해 방어할 수 있도록 다양한 작용기전을 통해 빠르게 활성화되는 숙주의 방어작용으로써,[1)] 대식세포(macrophage)에 의해서 유도되는 면역반응 중에서 가장 중요한 반응이다.[2)] 염증반응 시에는 Nitrite (NO), prostaglandins E2 (PGE2), Tumor necrosis factor-α (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1β (IL-1β)와 같은 다양한 염증유도(pro-inflammatory) 사이토카인 등의 염증성 매개물질들이 생성된다. 이렇게 생성된 염증성 매개물질들은 주변세포의 면역기능을 활성화시키는 중요한 역할을 한다.

구체적으로 살펴보면, NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관 확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있으며, 3종류의 NOS (neuronal NO synthase (nNOS), endothelial NO synthase (eNOS), inducible NO synthase (iNOS))에 의해 합성된다. 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다.[3)] 그리고 iNOS는 일부 세포에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ),

이 논문은 중앙대학교 생명의약연구원(중앙대학교 의과대학 임상 특별지원 연구과제)의 지원을 받아 수행된 연구임.
책임저자 : 김범준, 서울시 동작구 흑석동 224-1
중앙대학교병원 피부과, 우: 156-755
Tel: 02) 6299-1525, Fax: 02) 823-1049
E-mail: beomjoon@unitel.co.kr
투고일: 2010년 9월 24일, 심사일: 2011년 7월 18일
게재확정일: 2011년 8월 10일

다양한 염증유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다. 이 중에서 LPS는 Raw264.7세포와 같은 대식세포 또는 단핵세포에서 염증유도(pro-inflammatory) 사이토카인도 유도하는 것으로 알려져 있다.[4] 또 다른 염증성 매개물질인 PGE2는 Cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 arachidonic acid로부터 생성되는 물질로써, 염증반응과 면역반응 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.[5]

마치현(*Portulaca oleracea L.*)은 쇠비름과에 속하는 1년생 초본으로, 오행초, 쇠비름 등으로 불리기도 한다. 마치현은 노아드레날린(L-noradrenaline), 도파민(dopamine), α-리놀레산(α-linoleic acid), flavonoids, alkaloid, 여러 종류의 유기산 등이 함유되어 있다고 알려져 있다.[6] 이러한 성분들을 함유한 마치현 추출물은 창상 치유,[7] 항염,[8-10] 항산화,[11,12] 항비만,[13] 항저산소증,[14] 항바이러스[15] 등에 효과가 있다고 보고되었다. 이러한 마치현 추출물의 여러 가지 효과들에 대한 구체적인 분석을 위해 성분 분석에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다.[16,17] 하지만, 이러한 효과들에 대한 분자적인 기전연구는 아직 미흡하다.

이번 연구에서는 마치현의 항염 효과에 대한 분자생물학적 기전을 연구하기 위해, 마치현 추출물을 macrophage/monocyte 세포주인 Raw264.7세포에 처리한 후 세포 수준에서의 항염효과를 확인하고, 실질적으로 아토피피부염에 대한 염증 억제반응과 가려움증 억제반응을 확인하기 위해 NC/Nga 마우스와 Hairless SKH-1 마우스를 이용한 동물실험을 진행하여 그 효과를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 재료

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 WellGENE Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. LPS, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Griess reagent, Sodium Nitrite, Dimethyl sulfoxide (DMSO), compound 48/80 (C48/80)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PGE_2 ELISA Kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

2. 항염효과 확인을 위한 RAW264.7세포의 배양

RAW264.7세포는 Penicillin/streptomycin 100 unit/mL과 10% FBS이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다. Raw264.7세포를 1×10^6/mL 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 serum free 배지로 교환한 후, LPS 100 ng/mL와 IFN-γ 10 ng/mL를 처리한 후, 바로 마치현 추출물을 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

3. RAW264.7세포에서의 NO 생성 저해능 측정

마치현 추출물을 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리한 Raw264.7세포의 iNOS에 의한 NO의 생성은 배양액 중에 존재하는 nitrite (NO2-)의 양을 Griess reagent을 사용하여 NO를 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양 상층액과 Griess reagent를 1 : 1로 혼합하여 넣고 상온에서 5분 동안 반응시킨 후, ELISA microplate reader (SoftMax Pro5; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Raw264.7세포에서의 PGE2 생성 저해능 측정

마치현 추출물을 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리한 Raw264.7세포로부터 생성되는 PGE2를 PGE_2 ELISA kit로 측정하여 확인하였다. PGE2 standard는 0, 39, 78, 156, 312, 625, 1,250, 2,500 pg/mL의 농도를 이용하였고, 실험군과 대조군은 calibrator buffer를 이용하여 1/3로 희석하여 사용하였다. 준비된 standard와 실험군과 대조군을 96 well plate에 150 μL씩 분주하고, PGE2 mouse monoclonal antibody를 50 μL씩 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 1시간 동안 반응 후, PGE2 conjugate 50 μL를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응하고, Wash buffer 400 μL를 이용하여 4번 세척하였다. Substrate solution 200 μL를 첨가하여 빛을 차단한 후, 상온에서 30분 동안 반응하고 stop solution 50 μL를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Raw264.7세포에서의 세포독성 측정

마치현 추출물을 각 농도에 따라 처리하고 세포 배양 24시간이 지난 후 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 MTT 환원에 의해 생성된 formazan을 ELISA microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Raw264.7세포와 각질형성세포에서의 염증유도 사이토카인 측정

Raw264.7세포를 LPS와 IFN-γ로써 염증반응을 유도하고 표피를 구성하는 주된 세포인 각질형성세포는 LPS와 PGSA로 염증반응을 유도하여 염증유도 사이토카인의 생성 정도를 확인하였다. LPS와 IFN-γ에 의해 유도된 Raw264.7세포와 LPS와 PGSA에 의해 유도된 각질형성세포에서의 염증유도 사이토카인 측정은 Beadlyte® mouse Multi-Cytokine Detection

System (Millipore, St.Charles, MO, USA)을 이용한 Luminex 200 system (Luminex, Austin, TX, USA)을 통해서 확인하였다. MiraiBio® (MiraiBio, Alameda, CA, USA)의 MasterPlex CT™과 MasterPlex QT™ software programs으로 Median Fluorescent Intensity (MFI)과 calculate 농도를 모아서 이용하였다. 이 시스템을 6가지의 mouse 사이토카인을 확인하기 위해 이용하였다. 사이토카인 종류는 IFN-γ (6.9～5,000 pg/mL), IL-1α (8.2～6,000 pg/mL), IL-4 (8.2～6,000 pg/mL), IL-6 (9.6～7,000 pg/mL), IL-8 (6.9～5,000 pg/mL), TNF-α (6.9～5,000 pg/mL)였다. 모든 reagents와 protocols은 이 시스템에서 제공되는 것으로 사용하였다. Dilution factor 3으로 연속적으로 희석한 7가지의 standards를 이용하여 MasterPlex QT™에서 5-parameters로 standard curve를 작성하였다.

7. NC/Nga 마우스와 Hairless SKH-1 마우스를 이용한 동물실험

5주령의 수컷 NC/Nga 마우스(SLC Japan, Shizuoka, Japan)는 중앙실험동물(서울, 대한민국)에서, 7～9주령의 암컷 Hairless SKH-1 마우스는 오리엔트바이오(성남, 대한민국)에서 각각 구입하였다. 온도 23±3°C, 습도 55±15%, 오후 8시부터 오전 8시까지 빛을 통제한 상태에서 안정화하고, 사육기간 동안 동물실의 온도와 습도, 조명시간은 컴퓨터 시스템을 이용하여 자동으로 유지되게 하였다. 그리고 사료는 2～3 g/day, 물은 20 mL/day로 급여하였고, 사육상자에서 검역 및 순화기간에는 5마리/사육상자, 도포 및 관찰기간에는 3마리/사육상자 이하로 사육하였다. 이러한 기본적 필요조건을 준수하여 동물실험을 진행하였다.

NC/Nga 마우스를 이용한 아토피피부염에 대한 항염 실험은 3가지 실험군(정상대조군, 아토피피부염 유발군, 아토피피부염을 유발한 후 마치현 추출물을 도포한 군)으로 나눠서 각각 3마리의 마우스로 진행하였다. 마우스의 등 쪽, 귓바퀴 윗부분까지 최대한 제모기로 제모하고, 제모크림을 이용하여 털은 완벽히 제거하였다. 정상대조군을 제외한 실험군에 아토피피부염 유발연고를 편편한 스틱을 이용하여 100 mg을 등쪽, 귓바퀴 부분에 균일하게 도포하였다. 아토피피부염 유발연고(Biostir, Hiroshima, Japan)는 House Dust Mite (HDM) 알레르기 유발 항원의 주요 종이고, 집먼지진드기인 *Dermatophagoides farinae*의 추출물을 함유하고 있다. 이 아토피피부염 유발연고를 NC/Nga mice의 등 쪽에 도포하면 아토피피부염 유사병변이 나타나는데, 이 병변에서의 dermatitis scores, 조직학적 그리고 면역학적 parameter를 평가하였을 때, 아토피피부염 병변과 거의 유사한 결과를 확인하였다.[18,19] 피부의 지방성분 제거 및 각질층 파괴를 위하여 4% SDS (100 μL)를 분무하고, 2～3시간 동안 완전히 건조한 후 아토피피부염 유발연고(100 μg)를 주 2회 3주 동안 도포하였다. 3주 후, 마치현 추출물 도포하는 군에만 마치현 추출물을 3차 증류수에 녹여 200 ppm (200 μg/mL)농도로써 100 μL씩 하루에 1번, 일주일간 도포하였다. 도포를 하고 나서 일주일 후에, 피부조직을 생검하여 파라핀블록을 만들어 절단한 후, epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/eosinophil과 그 외 다른 세포와의 부종을 식별하는 H&E staining과 피부조직 내의 Mast cell을 확인할 수 있는 Toludine blue staining을 통해 아토피피부염 치료효과를 확인하였다.

그리고 가려움증에 대한 항가려움증 효과 실험은 아토피피부염과 관련된 반응인 anaphylactic shock을 일으켜 가려움증을 유발시키고 mast cell degranulating agent로도 알려져 있는 compound 48/80 (C48/80) 물질을 이용하였다.[20,21] 털이 없기 때문에 가려움증에 대한 움직임을 잘 관찰할 수 있는 Hairless SKH-1 마우스를 이용하여 4가지의 실험군(대조군, 가려움증을 유발하는 C48/80만 처리한 군, 피부염 치료제인 타클로리무스(제품명: 프로토픽; 후지사와제약, 후지사와, 일본) 0.03%를 도포한 군, 마치현 추출물을 도포한 군)으로 나눠 각각 6마리의 마우스로 진행하였다. 실험에 사용하는 타클로리무스는 비스테로이드성 피부염 치료제로써, 0.03%와 0.1%의 농도의 크림 형태로 사용하고 있다. 피부에 바르고 난 후, 화끈거리거나 가려움증이 발생할 수 있는 단점이 있지만, 국소적인 피부 염증을 효과적으로 치료하는 데는 매우 좋다. C48/80을 처리하기 전에, 마치현 추출물(1%)을 도포하는 군에서는 1% 마치현 추출물(200 μL)을, 타클로리무스(0.03%)를 도포하는 군에서는 크림 형태의 0.03% 타클로리무스를 Hairless SKH-1 마우스의 등 부위에 하루에 2번씩 5일 동안 도포하였다. 5일 째, 마치현 추출물과 타클로리무스를 도포한 지 3시간 정도 지나서 C48/80 (20 μg/0.2 mL)을 Hairless 마우스의 복강에 주사한 후,[22,23] 즉시 가려움증 정도를 마우스의 움직임으로 확인할 수 있는 observation cage (11 cm in diameter, MicroAct, Neuroscience, Tokyo, Japan)로 각각 옮겼다. 케이지 안에서 마우스의 다리에 설치한 magnet의 움직임으로 가려움증의 정도 여부를 확인하였다. 케이지에 옮긴 후, 각 group에 대해 이 움직임의 횟수를 1시간 동안 계산하여 가려움증에 대한 효과를 확인하였다.[24]

8. 통계적 검증

세포 실험과 동물실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 mean±SD를 그래프를 나타내었으며 Student's *t*-test를 시행하여 $P<0.05$ 미만의 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 마치현 추출물의 Raw264.7세포에 대한 세포독성

Raw264.7세포에 여러 농도의 마치현 추출물에 LPS와 IFN-γ를 동시에 처리하여 24시간 배양한 후, MTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 확인한 결과, 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1A). 이를 통해, Raw264.7세포에서 마치현 추출물에 의해 억제되는 NO는 세포의 사멸에 의한 것이 아님을 확인하였다.

2. 마치현 추출물의 Raw264.7세포의 NO와 PGE2 생성에 대한 저해 효과

마치현 추출물은 LPS와 IFN-γ에 의해 유도된 Raw264.7세포의 NO 생성을 농도 의존적으로 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). LPS와 IFN-γ를 처리한 Raw264.7세포에 마치현 추출물을 처리하였을 때, PGE2는 농도에 따라 유의하게 감소되었다(Fig. 1C). 이러한 감소는 마치현 추출물의 농도에 따른 NO의 생성 억제 정도와 비슷한 양상이었다.

3. 마치현 추출물의 Raw264.7세포와 각질형성세포의 염증유도 사이토카인의 생성에 대한 저해 효과

LPS와 IFN-γ로 처리한 Raw264.7세포와 LPS와 PGSA로 처리한 각질형성세포에서 염증유도 사이토카인인 IFN-γ, IL-1α, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α의 생성이 증가되었고, 각각의 세포주에 마치현 추출물을 농도별로 처리하였을 때는 농도 의존적으로 IFN-γ, IL-1α, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α 모두에서 생성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2).

4. Hairless SKH-1 마우스를 이용한 마치현 추출물의 가려움증 억제 효과 확인

마치현 추출물의 가려움증 억제 효과를 조사하기 위하여 Hairless SKH-1 마우스를 대조군, C48/80으로 가려움증만 유발한 군, 가려움증 치료제인 타클로리무스(0.03%)를 처리한 군, 마치현 추출물(1%)을 처리한 군으로 나누어 실험을 진행하였다. Cage 안에서 마우스의 팔다리에 설치한 magnet의 움

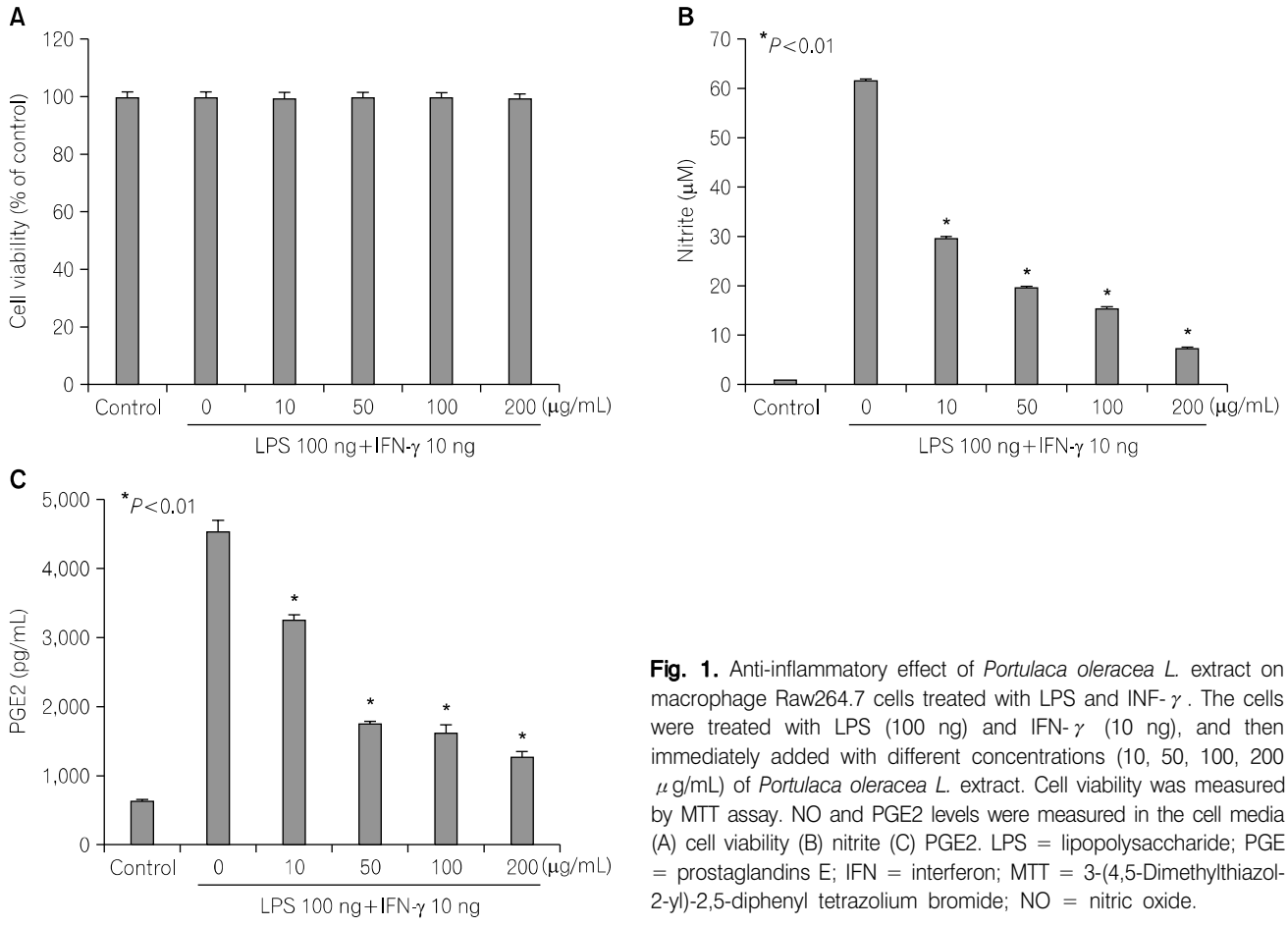
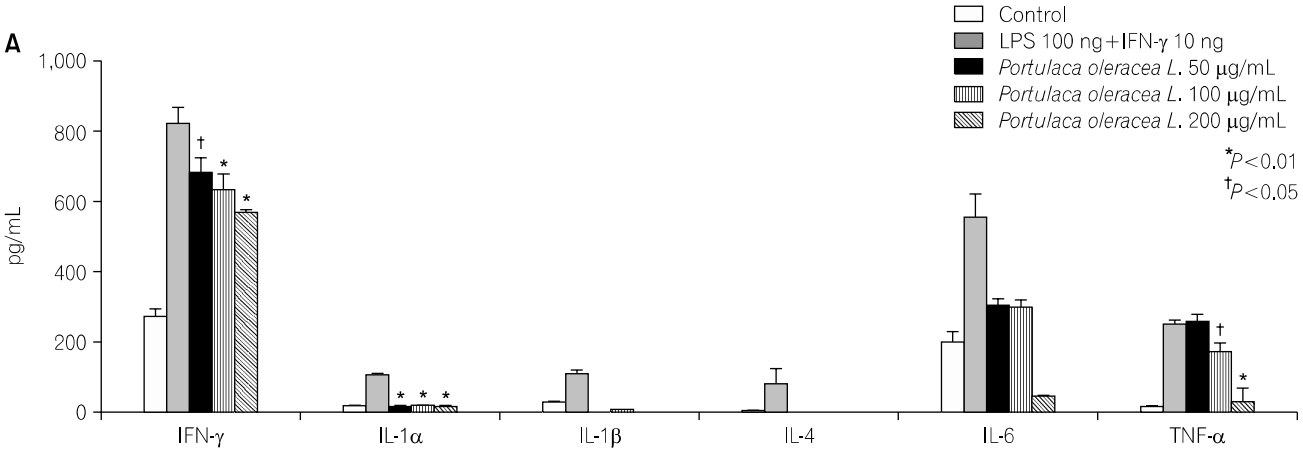
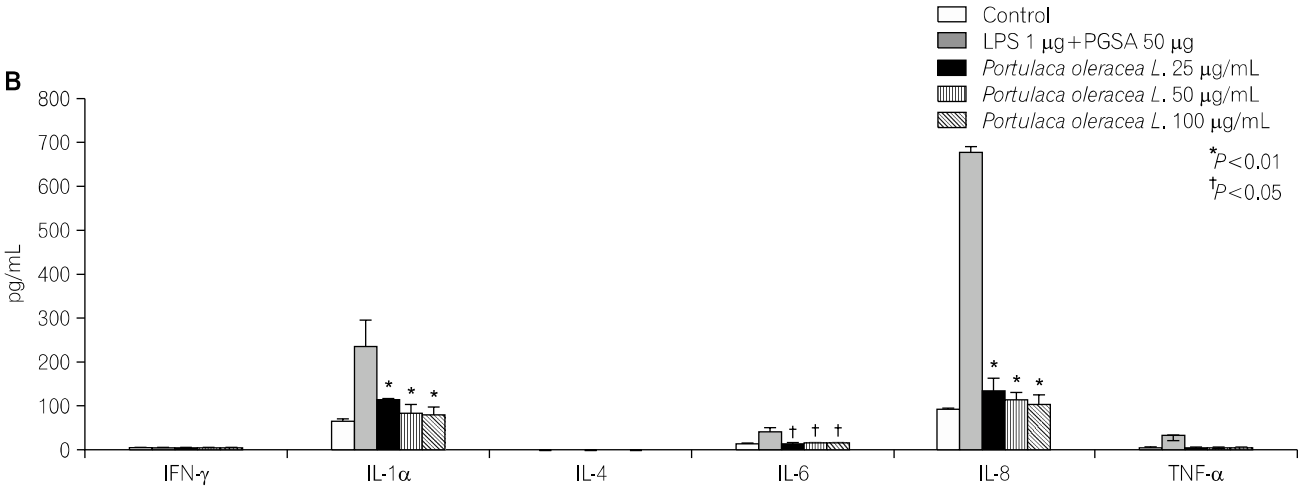


Fig. 1. Anti-inflammatory effect of *Portulaca oleracea L.* extract on macrophage Raw264.7 cells treated with LPS and INF-γ. The cells were treated with LPS (100 ng) and IFN-γ (10 ng), and then immediately added with different concentrations (10, 50, 100, 200 μg/mL) of *Portulaca oleracea L.* extract. Cell viability was measured by MTT assay. NO and PGE2 levels were measured in the cell media (A) cell viability (B) nitrite (C) PGE2. LPS = lipopolysaccharide; PGE = prostaglandins E; IFN = interferon; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NO = nitric oxide.



	IFN-γ	IL-1α	IL-1β	IL-4	IL-6	TNF-α
Control	276±19.66	20.37±0.13	28.4±4.10	4.14±2.36	204.25±25.56	18±0.06
LPS 100 ng+IFN-γ 10 ng	823.5±45.04	108.9±0.60	111.5±11.26	81.1±47.94	557.1±68.29	250.8±13.01
Portulaca oleracea L. 50 μg/mL	684.5±38.89	18.8±0.20	2.29±0.93	0.14±0.00	304.5±21.92	260.5±20.51
Portulaca oleracea L. 100 μg/mL	635±42.43	19.25±0.59	6.84±0.52	0.05±0.01	299.5±20.51	177±21.21
Portulaca oleracea L. 200 μg/mL	570.5±7.07	17.24±0.19	2.95±0.00	0.04±0.02	46.5±0.42	32.45±39.60



	IFN-γ	IL-1α	IL-4	IL-6	IL-8	TNF-α
Control	3.04±0.13	65.73±5.95	0.28±0.27	11.7±0.07	93.51±0.71	3.96±0.18
LPS 1 μg+PGSA 50 μg	3.28±0.27	236.31±59.46	1.44±0.82	39.84±14.46	681.49±12.06	33.39±0.05
Portulaca oleracea L. 25 μg/mL	2.94±1.87	114.37±1.87	0.28±0.00	13.78±0.93	134.46±27.83	4.38±0.21
Portulaca oleracea L. 50 μg/mL	3.04±0.13	85.78±18.65	1.15±0.13	14.56±1.50	112.94±19.95	4.11±0.22
Portulaca oleracea L. 100 μg/mL	2.94±0.00	81.21±16.10	0.04±0.00	14.31±3.62	102.63±22.67	4.27±0.01

Fig. 2. Inhibitory effects on cytokine production of *Portulaca oleracea L.* extract in the media containing Raw264.7 cells and keratinocytes that were stimulated with LPS and INF-γ or with LPS and PGSA. Pro-inflammatory cytokines was measured in the media with Raw264.7 cells and keratinocytes that were stimulated by LPS and INF-γ or LPS and PGSA according to the concentration of *Portulaca oleracea L.* extract (A) Raw264.7cells (B) keratinocytes. IFN = interferon; IL = interleukin; TNF = tumor necrosis factor; LPS = lipopolysaccharide; PGSA = polyglycerol sebacate acrylate.

직임 횟수로, 가려움증의 정도 여부를 확인하였다. 움직임의 횟수변화는 대조군에서는 시간당 102±27.3, C48/80을 처리한 군은 191.36±51.1로 움직임 횟수가 증가하였다. 타클로리무스와 마치현 추출물을 각각 처리한 실험군의 움직임 횟수는 155.4±69.5, 170.2±76.1로, C48/80을 처리한 군에 비해서 움직임 횟수가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 마치현 추출물을 처리한 군의 *P* value가 0.05 이상으로 유의성 있는 결과는 아니기 때문에 가려움증 억제 효과는 없는 것으로 판단된다.

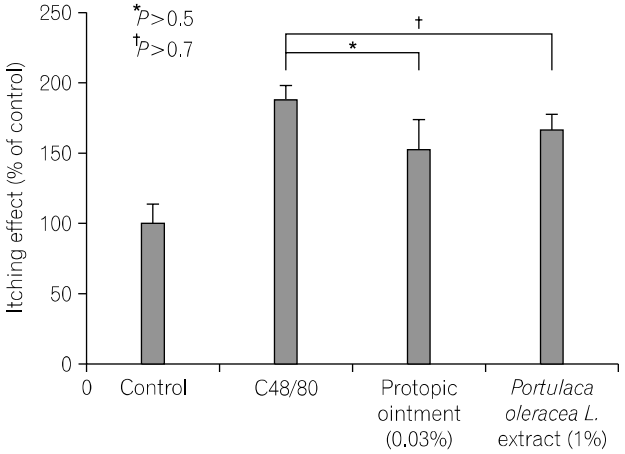


Fig. 3. Inhibitory effect of *Portulaca oleracea L.* extract on the pruritus of hairless SKH-1 mice. Measurement of itching was performed based on scratching behaviors of mice.

5. NC/Nga 마우스를 이용한 마치현 추출물의 염증 억제 효과 확인-육안적 평가와 피부조직검사(H&E staining, Toludine blue staining)

육안적으로 관찰하였을 때, NC/Nga mouse를 이용한 아토피피부염 발현이 확인되었으며, 아토피피부염 유발군과 비교하였을 때, 마치현 추출물을 도포한 군에서 등과 귀 피부에 유발된 아토피피부염의 치유는 크게 관찰되지 않았다. 좀 더 구체적인 피부조직에서의 마치현 추출물에 의한 영향을 알아보고자 Nc/Nga 마우스의 등 피부조직의 일부를 생검한 후, H&E 염색법과 Toludine blue 염색법을 실시하였다. H&E staining 결과, 정상군에 비해 아토피피부염 유발군의 표피와 진피가 두께가 증가하였고, 백혈구의 침윤도 확인되었다. 이에 비하여 마치현 추출물을 도포한 실험군은 아토피피부염 유발군과 비교하였을 때, epidermis와 dermis의 두께가 상대적으로 얇아지고 백혈구의 침윤도 줄어들어서 전체적으로 염증반응이 감소하였다.

그리고 비만세포를 확인할 수 있는 Toludine blue staining 결과, 아토피피부염 유발군에서는 대조군보다 더 많은 수의 비만세포가 확인되었다. 하지만, 마치현 추출물을 도포한 실험군에서는 아토피피부염 유발군에 비해 비만세포의 수가 크게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

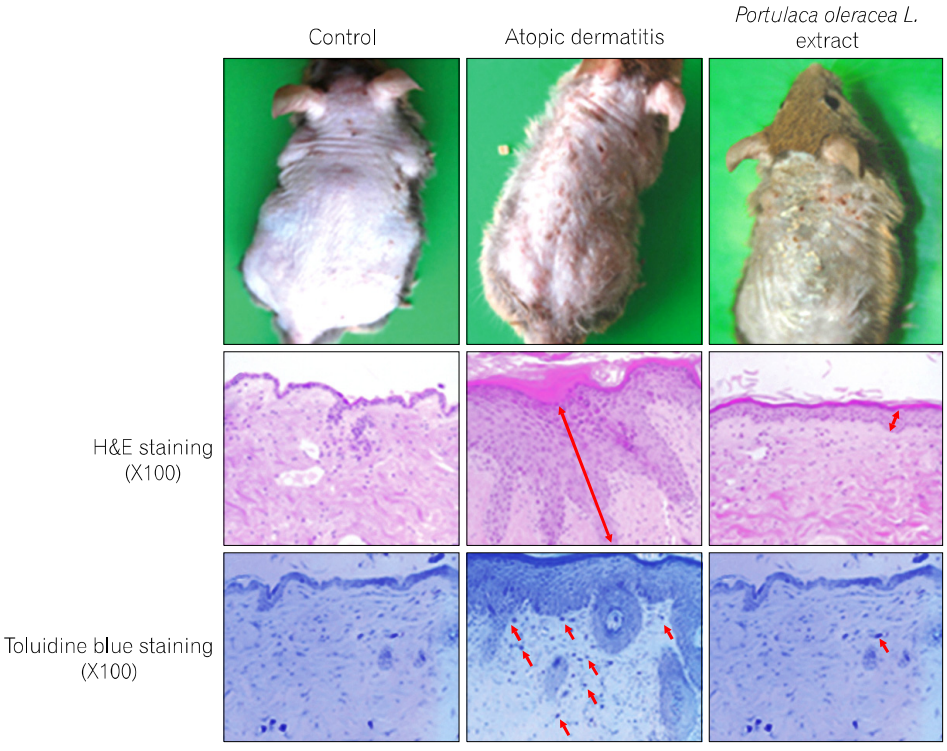


Fig. 4. Histopathologic findings in the skin of NC/Nga mice: Normal control, atopic dermatitis, atopic dermatitis treated with *Portulaca oleracea L.* extract. Skin samples biopsized from NC/Nga mice with atopic dermatitis or from NC/Nga mice with atopic dermatitis treated with *Portulaca oleracea L.* extract were stained with H&E and Toluidine blue.

고 찰

LPS와 IFN-γ에 의한 macrophage/monocyte 세포주인 Raw264.7 세포의 활성은 TLR-4 (toll-like receptor-4)의 발현으로 시작되어, NF-κB를 통해 염증유도의 단계적 과정을 활성화한다. 이런 과정을 통해서 NO와 PGE2의 생성을 유도하고, 염증유도 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-10 그리고 IL-6을 비롯한 다양한 사이토카인을 분비시킨다. 이들 염증유도 사이토카인은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다.[25,26] 하지만, 과도한 염증반응은 아토피피부염과 같은 질환을 일으킨다.[27] 이러한 Raw264.7세포에서의 염증반응이 마치현 추출물을 처리하였을 때는 농도가 증가함에 따라 NO와 PGE2 생성이 감소하는 것을 확인하였고, 세포독성은 보이지 않았다. 또 다른 염증 매개 물질인 사이토카인(IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, TNF-α)의 생성도 또한 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인되었다. 위와 같은 사이토카인의 감소 경향은 각질형성세포에서도 확인되었다. TNF-α와 같은 다기능성 사이토카인은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며,[28] 암 촉진 과정에서 일어나는 피부염증에서 중요한 역할을 한다.[29-31] 이러한 결과는 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 여러 가지 사이토카인의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성 저해에 기인하는 PGE2의 생성 억제를 통해 염증유도인자의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 가능성이 높다.[32,33] 좀 더 구체적인 연구를 위해서는 마치현 추출물에 대한 NO와 PGE2 생성 억제 효과에 대한 분자적인 연구로써, 그와 관련된 iNOS와 COX-2, NF-κB에 대한 분석이 필요하다.[34-36]

이러한 Raw264.7세포와 각질형성세포에서의 마치현 추출물의 항염 결과를 토대로 실질적인 아토피피부염과 소양감에서의 염증과 가려움증 억제 효과를 확인하기 NC/Nga 마우스에는 아토피피부염을, Hairless SKH-1 마우스에는 소양감을 일으킨 후, 마치현 추출물을 도포하여 그 효과를 확인하였다. 마치현 추출물의 NC/Nga 마우스에서의 아토피피부염 효과 실험에서는 마치현 추출물을 통해서 피부조직에서 아토피피부염으로 인해 일어나는 epidermis와 dermis의 부종을 억제시키고, 가려움증을 유발하는 비만세포의 감소로써 아토피피부염의 억제 효과가 있을 것이라 예상한다. 추가적으로, Hairless SKH-1 마우스에 소양감을 유도하여 마치현 추출물에 대한 가려움증 억제 효과를 확인한 실험에서는 현재 사용되고 있는 치료제인 타클로리무스보다는 낮은 억제효과지만, C48/80에 의해 소양감만 유도된 실험군에 비해 유도된 소양감에 마치현 추출물을 도포한 실험군에서 가려움증이 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 유의성 있는 결과가 아니고, 감소 정도도 또한 미비하기 때문에 가려움증 억제 효과는 거의 없는 것으로 확인되었다. 이후에, 도포하는 마치현 추출물의 농도를 증가시키는 등의 추가적인 실험을 통해 가려움증에 대한 억제 효과 확인이 필요하다. 이번 실험에서 확인된 아토피피부염의 억제 효과에 작용하는 마치현 추출물 구성 성분 분석과 조직학적, 분자생물학적인 추가적인 실험도 또한 필요하다.

결 론

이번 결과로는 구체적으로 마치현 추출물의 어떤 성분이 항염과 항가려움증에 작용하는지는 알 수 없지만, 마치현 추출물을 이용한 아토피피부염과 소양감을 치료할 수 있는 약제의 개발 가능성을 제시하고 있다.

참 고 문 헌

1) Tizard IR. Immunology. 2nd ed. New York: Saunders; 1988. p. 423-41.
2) Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. Curr Opin Immunol. 1996;8:36-40.
3) Won SJ, Park HJ, Lee KT. Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by salidroside through the NF-κB inactivation in RAW 264.7 cells. Korean J Pharmacogn. 2008;39:110-7.
4) Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ, et al. In vitro antiinflammatory activity of the essential oil from Ligularia fischeri var. spiciformis in murine macrophage Raw 264.7 cells. Yakhak Hoeji. 2002;46:343-7.
5) Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. FEBS Lett. 2004;569:321-6.
6) Choi AJ, Jee HK, Ko BS, Kim YH, Lee SJ, Kim CJ, et al. Solubilization of Arabinogalactan by extrusion from Portulaca oleracea L. and its in vitro antioxidant activity. Food Eng Prog. 2009;13:169-75.
7) Rashed AN, Afifi FU, Disi AM. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of Portulaca oleracea L. (growing in Jordan) in Mus musculus JVI-1. J Ethnopharmacol. 2003;88:131-6.
8) Chan K, Islama MW, Kamil M, Radhakrishnana R, Zakariaa MNM, Habibullahc M, et al. The analgesic and anti-inflammatory effects of Portulaca oleracea L. subsp. sativa (Haw.) Celak J Ethnopharmacol. 2000;73:445-51.
9) Choi WS, Kim YS, Lee SH, Chai KY, Lee YH. Anti-inflammatory effects of Gelidium amansii in RAW 264.7 macrophages. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2009;23:673-7.
10) Kim CH. The inhibitory effects of Portulaca oleracea L. on HCl-ethanol induced gastritis in rats. Kor J Herbology. 2009;24:

41-7.
11) Lim YY, Quaha EPL. Antioxidant properties of different cultivars of Portulaca oleracea. Food Chem. 2007;103:734-40.
12) Wanga CQ, Yang GQ. Betacyanins from Portulaca oleracea L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. Phytomedicine. 2010;17:527-32.
13) Lee MS, Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim Y. Effects of portulaca oleracea l. extract on lipolysis and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Korean J Nutr. 2006;39: 742-7.
14) Chen CJ, Wang WY, Wang XL, Dong LW, Yue YT, Xin HL, et al. Anti-hypoxic activity of the ethanol extract from Portulaca oleracea in mice. J Ethnopharmacol. 2009;124:246-50.
15) Dong CX, Hayashi K, Lee JB, Hayashi T. Characterization of structures and antiviral effects of polysaccharides from Portulaca oleracea L. Chem Pharm Bull. 2010;58:507-10.
16) Zhu H, Wang Y, Liang H, Chen Q, Zhao P, Tao J. Identification of Portulaca oleracea L. from different sources using GC-MS and FT-IR spectroscopy. Talanta. 2010;81:129-35.
17) Elkhayat ES, Ibrahim SR, Aziz MA. Portulene, a new diterpene from Portulaca oleracea L. J Asian Nat Prod Res. 2008;10:1039-43.
18) Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, et al. A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides farinae extract in NC/Nga mice. Allergol Int. 2007;56:139-48.
19) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol. 1997;9: 461-6.
20) Lagunoff D, Benditt EP. Mast cell degranulation and histamine release observed in a new in vitro system. J Exp Med. 1960;112: 571-80.
21) Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. Proc Natl Acad Sci. 2009;106:9773-8.
22) Feldberg W, Talesnik J. Reduction of tissue histamine by compound 48/80. J Physiol. 1953;120:550-68.
23) Kim SH, Choi CH, Kim SY, Eun JS, Shin TY. Anti-allergic effects of Artemisia iwayomogi on mast cell-mediated allergy model. Exp Biol Med (Maywood). 2005;230:82-8.
24) Ikarashi Y, Yuzurihara M. Experimental anxiety induced by histaminergics in mast cell-deficient and congenitally normal mice. Pharmacol Biochem Behav. 2002;72:437-41.
25) Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate Helicobacter pylori-mediated interleukin-8 release from macrophages. Biochem J. 2002;368(Pt 1):121-9.
26) Blichmann CW, Serup J. Assessment of skin moisture. Measurement of electrical conductance, capacitance and transepidermal water loss. Acta Derm Venereol. 1988;68:284-90.
27) Leung DYM, Bonguniewciz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. J Clin Invest. 2004; 113:651-7.
28) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest. 2000;118:503-8.
29) Zenz R, Wagner EF. Jun signalling in the epidermis: from developmental defects to psoriasis and skin tumors. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38:1043-9.
30) Culig Z. Cytokine disbalance in common human cancers. Biochim Biophys Acta. 2011;1813:308-14.
31) Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. Cancers (Basel). 2010;2:436-82.
32) Kim BJ, Lim YY, Kim HM, Park EJ, Kim MN, Cho SM, et al. Effect of anti-inflammation and skin hydration of AF-343 on macrophage RAW 264.7 cells and NC/Nga mice with atopic dermatitis. Kor J Med Myol. 2010;15:61-76.
33) Kim YH, Han JK, Kim YH. Effect of Kami-kanghwalsan (KKHS) on atopic dermatitis-like skin lesions induced in Nc/Nga mouse by mite antigen stimulation. J Korean Oriental Pediatrics. 2008; 22:69-93.
34) Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res. 2001;480-481:243-68.
35) Kiemer AK, Hartung T, Huber C, Vollmar AM. Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. J Hepatol. 2003;38:289-97.
36) Cao XY, Dong M, Shen JZ, Wu BB, Wu CM, Du XD, et al. Tilmicosin and tylosin have anti-inflammatory properties via modulation of COX-2 and iNOS gene expression and production of cytokines in LPS-induced macrophages and monocytes. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:431-8.