大韓本草學會誌 제30권 제6호(2015년 11월)
Kor. J. Herbol. 2015 ; 30(6) : 33-38

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2015.30.6.33.

LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 염증반응에서 마치현(馬齒莧) 70% 에탄올 추출물의 항염증 효과

서상완*

호남대학교 한방바이오학과

The anti-inflammatory effect of *Portulaca oleracea* 70% EtOH Extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells

Sang-Wan Seo*

Department of Oriental Medicine and Biotechnology, Honam University

ABSTRACT

Objectives : *Portulaca oleracea* (PO) have been used as a traditional medicine to treat inflammatory diseases in Korea. However, the anti-inflammatory effect of PO ethanol extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation is not well-known. Therefore, this study was performed to identify the anti-inflammatory effect of PO on LPS induced inflammatory.

Methods : Identification of PO was conducted by comparison with purified standards by HPLC. To measure out the cytotoxicity of PO, author performed the MTT assay. To evaluate the anti-inflammatory effects of PO, author examined the inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin, (IL)-1β and IL-6) on RAW 264.7 cells. Author also examined molecular mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-B (NF-κB) activation by western blot.

Results : Three major components (peaks 1, 2, 3) were detected in both varieties and peak 1 was characterized as caffeic acid, peak 2 as p-coumaric acid, and peak 3 as ferulic acid by comparison of chromatographic properties with authentic standards. Extract from PO itself did not have any cytotoxic effect in RAW 264.7 cells. PO inhibited LPS-induced productions of inflammatory mediators such as NO and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7cells. In addition, PO inhibited the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK) and NF-κB activation in RAW 264.7 cells.

Conclusions : Above experiment data can be an important indicator for the identification of PO and this study suggest that treatment of PO could reduce the LPS-induced inflammation. Thereby, PO could be used as a protective agent against inflammation.

Key words : Lipopolysaccharide (LPS), *Portulaca oleracea* (PO), Inflammation, mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

서 론

염증은 다양한 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로 작용할 뿐만 아니라, 수많은 병리 생리학적인 조건에서 중요한 역할을 한다. 염증이 진행되는 동안 대식세포의 활성화가 과도하게 일어나게 되면 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유도함으로써, 류마티스 관절염, 죽상 동맥경화증, 패혈증과 같은 질환을 일으키기도 한다[1-3].

그람 음성균의 외막성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포의 감염초기에 반응하고 숙주 방어에 중추적인 역할을

*Corresponding author : Sang-Wan Seo. Department of Oriental Medicine and Biotechnology, Honam University
· Tel : +82-62-940-5442 · Fax : +82-62-940-5196 · E-mail : ssw@honam.ac.kr
· Received : 19 October 2015 · Revised : 13 November 2015 · Accepted : 16 November 2015

하나, 과도한 LPS 자극은 대식세포에서 tumor necrosis factor −α (TNF−α), interleukin (IL)−1β 및 IL−6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시키며, nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2)등의 염증매개물질을 분비시킨다[3,4]. NO는 대식세포가 활성화되면 inducible NO synthase (iNOS)로부터 생산되며 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할도 하지만, 과도한 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으키는 것으로 알려져 있다[5]. Cytokine의 분비는 신호전달경로에서 extracellular signal−regulated kinase1/2 (ERK1/2), p38 kinases (p38),c−Jun NH2−terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen−activated protein kinases (MARKs)와 nuclear factor kappa B (NF−κB)에 의해 조절되어 인산화가 활성화가 일어나게 된다[6]. NF−κB는 활성화 되면 결합해 있던 inhibitory kappa B α(Iκ−Bα)가 분해되면서 세포질에서 핵내로 이동하여 cytokine 발현을 촉진시키는 전사인자로서 작용한다[7,8].

馬齒莧은 쇠비름과 (Portulacaceae)에 속한 쇠비름 *Portulaca oleracea* L.의 전초이다. 馬齒莧은 淸熱解毒, 凉血止血, 止痢, 消腫의 효능이 있어 熱毒瀉痢, 熱痳, 尿閉, 赤白帶下, 崩漏, 痔血, 瘡瘍痈疖丹毒의 증상을 치료하는데 상용되고 있다. 馬齒莧의 약리작용으로는 자궁평활근수축작용, 장관연동운동촉진작용, 항균작용, 항진균작용, 항산화작용, 항염작용 등이 보고되었다[9−11]. 이와 같이 최근 馬齒莧에 대한 다양한 생리학적, 약리학적 연구가 보고 되었으나 馬齒莧에서의 지표 물질은 없으며 성분도 많이 알려지지 않았다. 또한 최적화된 농도의 에탄올 추출물에서 LPS로 유도한 RAW 264.7 cell에서 항염증반응과 그 기전에 대한 연구는 진행되지 않았다.

이에 본 연구는 馬齒莧에서 생리활성 물질 및 지표 물질의 마커로 사용할 수 있는 성분을 찾고자 HPLC를 통하여 성분을 탐색하였으며, 馬齒莧 에탄올 추출물의 RAW 264.7 대식세포에서 항염증작용 및 기전을 밝히고자 LPS로 염증을 유도하여 염증 매개물질인 NO, 전 염증성 cytokine의 발현을 조사하였고, 이에 따른 기전을 조사하기 위해 MAPKs과 NF−κB의 활성화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 馬齒莧(PO)은 옴니허브(영천, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 馬齒莧 추출물을 얻기 위하여 馬齒莧 100 g을 70% 에탄올 500 ml로 2시간 동안 가열 환류추출하고 여과한 다음 여액을 감압 농축하여, 馬齒莧 70% 에탄올 추출물 15.25g (수득률: 15.25%)을 얻었다.

2) 시약

馬齒莧 추출물의 성분분석에 사용한 caffeic acid, p−coumaric acid 및 ferulic acid 성분은 ChromaDex사 (ChromaDex®, Inc., USA)로부터 구입하여 사용하였다. Acetonitrile은 HPLC 급 용매 (J. T Baker®,Nederland)를 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, penicillin−streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 시약 중 Chloroform, TRI−zol, Sodium dodesylsulfate(SDS), Acrylamide, Tris−HCL, LPS 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 anti−phospho−ERK1/2, anti−phospho−p38, anti−phospho−JNK는 Cell Signaling (MA, USA)사에서 구입하였고, Anti−Iκ−Bα는 Santa Cruz (CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 세포배양을 위해 10% Fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin− streptomycin을 첨가한 RPMI−1640 배지를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

2. 방법

1) HPLC를 이용한 馬齒莧의 성분분석

馬齒莧(3.5g)에 70% EtOH 35mL를 가하여 수욕 상에서 2시간씩 3회 환류 추출하여 여과 후 농축한 70% EtOH추출물을 얻었다(Fig. 1). HPLC 조건은 column은 LunaC_{18}(250 × 4.6mm, 5㎛, Shiseido Co.)이며 유속은 1mL/min, column온도는 30℃, 시료 주입량은 20㎕로 UV 322nm에서 실험하였다(Table. 1). 馬齒莧 성분 정량 분석에는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technolgies, USA)을 사용하였다.

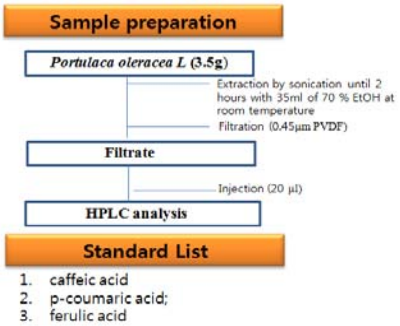

Fig. 1. Manufacturing process of crude PO by extraction

Table 1. HPLC condition for analysis of PO

HPLC condition		
Device	Agilent 1200 series with autosampler	
Column	Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	
Detection	UV 322 nm	
Mobille Phase	Solvent A : 0.1% Formic acid in Water	
	Solvent B: MeOH	
Elution condition	Time	B%
	0	10
	50	100
	55	100
	60	10
	65	10
Flow rate	1.0ml/min	
Column temp.	30℃	
Injection Vol.	20 µL	

2) MTT 분석

RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2×10^5/㎖의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 PO (0.05, 0.1 그리고 0.2 mg/㎖)를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/㎖의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로서 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, spectrophotometer (MD, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로서 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다.

[즉, viability(%) = 100 × (absorbance of treated sample) / (absorbance of control)]

3) 일산화질소(Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphtylethylendiamide)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 PO를 처리하였다. LPS (500 ng/㎖)로 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액(100 ㎕)을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 ㎕의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer (MD, USA)로 540 ㎚에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

4) Cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) 측정

LPS (500 ng/㎖)로 RAW 264.7 세포에 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위하여, LPS를 자극하기 전 PO 추출물(0.05, 0.1 그리고 0.2 mg/㎖)을 1시간동안 전처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질은 세포 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen (CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for TNF-α, IL-1β, IL-6를 구입하여 시행하였다.

5) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 ㎜ culture dish에 5×10^6cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 PO (0.2 mg/㎖)를 전처리 하고 LPS (500 ng/㎖)로 자극하여 0, 15, 30, 60분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 cell을 획득하여 원심분리 (5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ㎖ + phosphotase inhibitor 10 ㎕ + protase inhibitor 10 ㎕)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 10 % SDS-PAGE에 전기영동 한 후 맴브레인에 옮기고 나서 5 % skim milk로 2 시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 NF-kB를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다. 단백질 밴드 확인 및 정량은 LAS 4,000 image analyzer (Fugifilm life science, Japan) 기기를 이용하였다.

6) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± S.D. 로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램의 one way ANOVA에 준하였고, *p*-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 馬齒莧 에탄올 추출물에서 특정 성분 확인

馬齒莧의 성분 중 항염증 효능에 관여할 것으로 예상되는 활성물질을 탐색한 결과 caffeic acid, p-coumaric acid 및 ferulic acid를 확인하였다(Fig. 2).

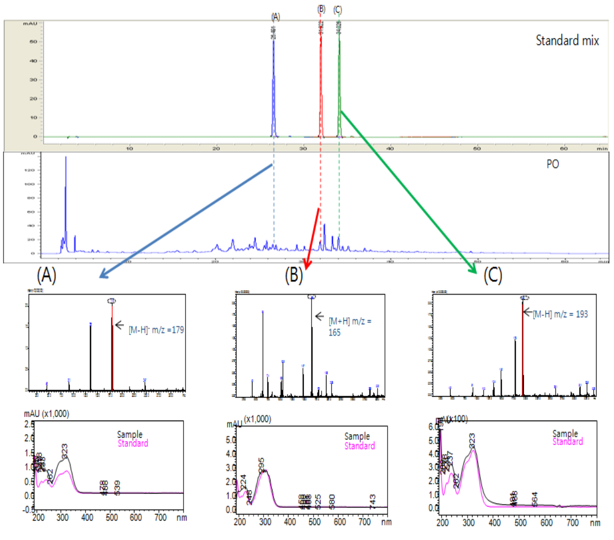

Fig. 2. HPLC chromatogram of the dried ethanol extracts from PO. (A); caffeic acid
(B); p-coumaric acid, (C); ferulic acid.

2. 馬齒莧 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

PO 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지를 검사하기 위해서 RAW 264.7 세포에 PO 추출물을 처리하여 MTT 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 PO는 0.05-0.2mg/㎖ 농도에서 90%이상의 생존율을 보이며, 세포 독성에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다. 이에 0.05-0.2mg/㎖를 이 연구의 유효 농도로 설정하였다(Fig. 3).

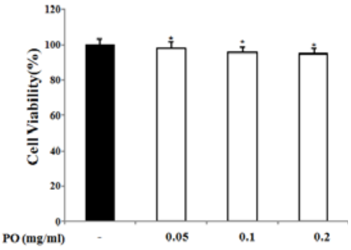

Fig. 3. Effect PO extract on cytotoxity in RAW 264.7 cells RAW 264.7 cells were incubated with PO extract as indicated concentration. After 24h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. The values are represented as means ± S.D. of three independent experiments. *$P < 0.05$ vs saline.

3. LPS로 유도한 馬齒莧 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

PO 추출물이 염증에서의 NO의 생성에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 그리스 시약 반응을 통한 세포 상층액의 NO 생성을 측정한 결과 PO 전 처리군에서 LPS로 유도한 NO 생성을 억제하였다(Fig. 4).

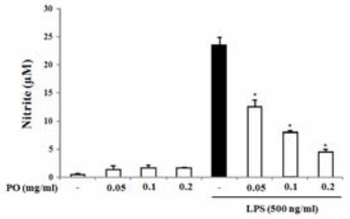

Fig. 4. Effect of PO extracts on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 0.05, 0.1 and 0.2 (mg/ml) of PO extract and LPS (500ng/ml) for 24 h. The amount of NO in supernatant was measured using Griess reagent. *$P < 0.05$: significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

4. LPS로 유도한 馬齒莧 추출물이 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성에 미치는 영향

LPS로 유도한 전염증성 cytokine의 생성에 대한 PO 추출물의 효과를 조사하기 위해, ELISA를 이용하여 측정하였다. PO 추출물을 1시간 전처리 한 후 LPS로 자극하였다. 24시간 후 전염증성 cytokine의 발현을 측정한 결과, PO 처리군은 TNF-α, IL-1β 및 IL-6생성을 억제하였다(Fig. 5).

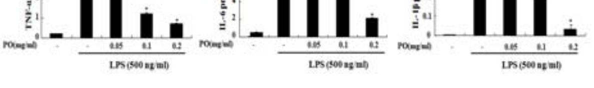

Fig. 5. Effect of PO extract on the production of TNF-α, IL-1β and IL-6 on RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with PO extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. *$P < 0.05$: significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

5. 馬齒莧 추출물이 MAPKs 및 NF-κB의 활성에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포들은 다양한 신호전달물질에 의해 cytokine들을 분비하게 되는데, 대표적인 경로로 MAPKs와 NF-κB가 있다. PO 추출물 0.2 mg/ml의 농도로 전 처리한 후 LPS를 시간대별로 자극하였다. 이를 분석한 결과 PO 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 ERK1/2와 JNK의 인산화는 억제 하였지만 p38은 인산화를 억제하지 못하였다. 그리고 NF-κB의 활성화 지표인 Iκ-Bα의 분해를 조사한 결과, PO 추출물이 LPS에 의한 Iκ-Bα의 분해를 억제할 수 있었다(Fig. 6).

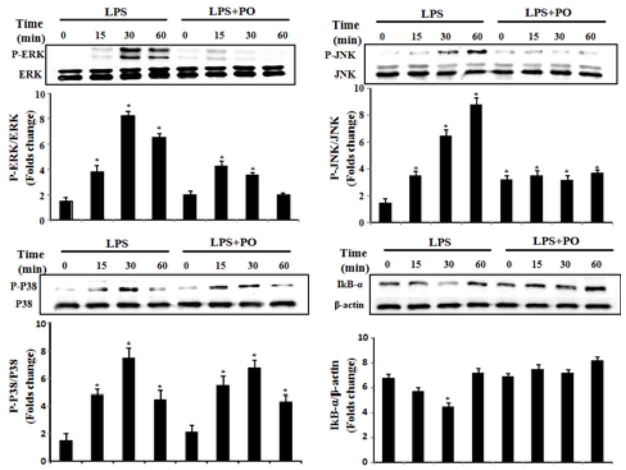

Fig. 6. Effect of PO extract on MAPKs activation and Iκ-Bα degradation in LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cell were pretreated with PO (0.2 ㎎/㎖) for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/㎖) for indicated time. Detail methods were described in Materials and Methods. Representative western blots of at least three separate experiments are shown. Each value represents the mean ± S.D. of three experiments. *$P < 0.05$ vs. control. LPS was used as the positive control.

고 찰

馬齒莧은 清熱解毒과 凉血, 通淋에 效能이 있는 약물로서 오랫동안 熱毒瘡瘍, 崩漏下血, 濕熱瀉痢 등의 병을 치료하는 것으로 사용되고 있다[12]. 馬齒莧이 기재되어 있는 고대문헌을 살펴보면 《本草綱目》에 "諸腫瘻疣目, 搗揩之. …… 治女人赤白下.", 《本草備要》에서는 "酸寒散血. 解毒. 祛風. 殺蟲. 治諸淋疳痢." 기록되어 있고, 또한, 《東醫寶鑑》에서도 병의 증상에 따른 치료법과 치료처방들이 수록되어 있다[13,14]. 최근에는 실험 연구를 통해 馬齒莧의 효능을 입증할 수 있는 논문들이 다수 보고되어지고 있는데, 그러한 연구 결과들에 의하면 항위궤양 작용, 창상 치유, 항염, 항산화 등에 효과가 있다고 보고 되었다[15-18]. 이와 같은 약리작용에 대한 연구를 미루어 볼 때 馬齒莧은 염증성 면역반응에서도 유효한 효과를 나타낼 것으로 사료되어 본 실험의 약물로 선택하였다. 馬齒莧에 관한 문헌적, 약리학적으로는 여러 연구들이 진행되었지만 RAW 264.7 cell에서 에탄올 추출물의 항염증 효과에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없어 이에 본 연구에서는 馬齒莧

70% 추출물에서 생리활성물질을 탐색하고 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 염증매개물질들의 생성증가에 미치는 영향을 조사하며, 그의 따른 기전을 밝혀냄으로써 馬齒莧의 항염증 효과를 살펴 보고자 하였다.

염증 반응이 일어나게 되면 과량의 NO, PGE2등의 염증매개인자들이 생성된다. NO는 NO 합성효소에 의해 L-아르기닌으로부터 NO를 생산한다[19]. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 과량의 NO를 생성하게 되어 대식세포의 종양, 박테리아 파괴능력과 같은 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[20-22]. 염증을 나타내는 중요한 지표인 전염증성 사이토카인으로 알려진 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성은 또 다른 다양한 염증매개체들의 유도, 면역반응의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 馬齒莧을 전처리한 후 LPS를 처리한 군에서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성을 단백질 단계 수준에서 유의성 있게 억제하는 효과를 보였다.

LPS와 같은 자극으로 인해 염증반응이 시작되면 세포내 신호전달에 관여하는 MAPKs은 활성화가 일어나 핵안으로 이동하여 활성인자를 인산화하고 cytokine 생성에 관여한다[23]. 현재까지 잘 알려진 MAPK로는 ERK 1/2, p38, JNK이 있다[24,25]. NF-κB는 염증 반응, 면역 반응 등에 다양한 유전자 발현에 관여하는 전사 인자이다. 정상적으로는 NF-κB는 세포질에서 inhibitory kappaB (IκB)단백질과 결합되어 있다. NF-κB가 LPS에 의해 자극을 받게 되면, Iκ-Bα가 인산화 되고, NF-κB와 분해가 되면서 NF-κB는 핵내로 이동하여 COX-2, iNOS, cytokine등 여러 염증성 매개체의 유전자 발현을 유도한다[26]. 그리하여 NF-κB 활성은 Iκ-Bα의 분해를 통해 알아낼 수 있다. 따라서 LPS를 통해 염증 반응이 일어나면 Iκ-Bα의 분해가 시작되고 Iκ-Bα의 분해를 막으면 NF-κB의 활성도 억제된다고 볼 수 있다. 馬齒莧 추출물은 본 연구에서 LPS로 유도된 ERK1/2, JNK의 인산화와 Iκ-Bα의 분해를 억제 하였다. 그러나 p38의 인산화는 억제하지 못하였다. 따라서 馬齒莧은 이 MAPK family인 ERK1/2와 JNK의 신호전달 억제와 Iκ-Bα 분해를 억제하여 대식세포에서 항염증 작용을 한다고 생각된다. 또한 MAPKs이나 NF-κB의 활성 조절이 될 경우 급, 만성 염증질환의 치료에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

한편 馬齒莧 에탄올 추출물의 어떠한 성분이 염증에 효과가 있는지를 확인한 결과 3가지 성분을 탐색할 수 있었다. 첫째, 저자는 Caffeic acid를 확인하였는데 Caffeic acid는 벌꿀의 프로폴리스에서 유래된 페놀 항산화물질 (phenolic antioxidant)로서 항암과 항염증 성질을 가진다고 알려져 있다[27]. 둘째, 저자는 p-coumaric acid 성분을 확인하였는데 p-coumaric acid는 항바이러스 및 항암에 효과가 있다고 알려져 있다[28]. 마지막으로 저자는 ferulic acid를 확인하였는데 ferulic acid는 항염 및 항암 효과가 증명된 바 있다[29]. 따라서 馬齒莧의 항염증 효과는 저자가 밝힌 3가지 성분들에 의해서 나타난 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 馬齒莧은 ERK1/2와 JNK의 인산화를 억제하고 NF-κB의 활성 억제를 통해 NO와 전염증성 cytokine의 생산을 억제함을 확인 할 수 있었다. 이러한 馬齒莧의 뛰어난 항염증효과는 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로 馬齒莧에서 추출한 3가지 성분이 항염증 효과에 관여하는지 분획을 통하여 in vitro 및 *in vivo* 실험들도 함께 이루어져 항염증 작용에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 馬齒莧 70% 에탄올 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 馬齒莧 70% 에탄올 추출물에서 caffeic acid, p-coumaric acid 및 ferulic acid를 확인 하였다.

2. 馬齒莧 70% 에탄올 추출물은 세포독성을 거의 나타내지 않았다.

3. 馬齒莧 70% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 NO를 억제하였다.

4. 馬齒莧 70% 에탄올 추출물은 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 염증성 cytokine의 생성을 단백질 수준에서 억제하였다.

5. 馬齒莧 70% 에탄올 추출물은 ERK1/2, JNK의 인산화를 억제하였고, 또한 Iκ-Bα의 분해 를 억제하였다.

이와 같은 결과로 보아 馬齒莧 70% 에탄올 추출물은 RAW 264.7 세포에 작용하여 NO 의 생성, TNF-α, IL-1β, IL-6의 생산을 억제하였으며, MAPKs 중 ERK1/2, JNK의 인산화와 Iκ-Bα의 분해를 억제하였다. 결과적으로 馬齒莧 70% 에탄올 추출물은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 염증을 차단하는 항염증 효과를 가지고 있다고 볼 수 있으며 3가지 성분이 약리 활성물질을 나타낼 것으로 사료된다.

References

1. Behrens EM. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? Autoimmun Rev. 2008 ; 7 : 305-8.
2. Lopez-Bojorquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Teran G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. Arch Med Res. 2004 ; 35 : 465-79.
3. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med. 1996 ; 211 : 24-32.
4. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. Kor J Herbol. 2009 ; 24 : 39-47.
5 Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide : physiology pathology and clinical relevance. Eur J

Clin Ivest. 1991 ; 21 : 361-74.
6. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. Int Immunopharmacol. 2002 ; 2 : 603-30.
7. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. Curr Opin Microbiol. 2004 ; 7 : 25-32.
8. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. Biochem J. 2004 ; 382 : 393-409.
9. Zhang XJ, Ji YB, Qu Z, Xia J, Wang L. Experimental studies on antibiotic functions of Portulaca oleracea L. in vitro. Chin J Microecol. 2002 ; 14 : 277-80.
10. Sakai N, Inada K, Okamoto M, Shizuri Y, Fukuyama Y. Portuloside A, a monoterpene glucoside from Portulaca oleracea. Phytochemistry. 1996 ; 42 : 1625-8.
11. Changquan L, Liwei D, Hailiang X, Min L, Wanyin W, Lin J. Ethanol extract of Portulaca oleracea L. protects against hypoxia-induced neuro damage through modulating endogenous erythropoietin expression. J Nutr Biochem. 2014 ; 23 : 385-91.
12. Hu LF, Xu XY, Wang BQ. Research and utilization situation of Portulaca Oleracea L in China. Pract J Med Pharm. 2003 ; 20 : 315-6.
13. Xiang L, Xing D, Wang W, Wang R, Ding Y, Du L. Alkaloids from Portulaca oleracea L. Phytochemistry. 2005 ; 66 : 2595-601.
14. Liu LX, Howe P, Zhou YF, Xu ZQ, Hocart C, Zhang R. Fatty acids and b-carotene in Australian purslane (Portulaca oleracea) varieties. J Chromatogr A. 2000 ; 893 : 207-13.
15. Karimi G, Hosseinzadeh H, Ettehad N. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of Portulaca olerracea L. extracts in mice. Phytother Res. 2004 ; 18 : 484-7.
16. 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.
17. Kim CH. The inhibitory effects of Portulaca oleracea L. on HCl-ethanol induced gastritis in rats. Kor J Herbol. 2009 ; 24 : 41-7.
18. Lim YY, Quaha EPL. Antioxidant properties of different cultivars of Portulaca oleracea. Food Chem. 2007 ; 103 : 734-40.
19. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. J Infect Dis. 1999 ; 179 : 939-44.
20. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991 ; 43 : 109-42.
21. MaCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JI, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J Exp Med. 1993 ; 178 : 749-54.
22. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Michell A. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. J Environ Pathol Tox Oncol. 2002 ; 21 : 93-101.
23. Oh CH translation. simple immunology. Seoul : Seoul medical korea. 2006 : 161-200.
24. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. Trends Biochem Sci. 2000 ; 25 : 7-9.
25. Celec P. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine the nest generation. Biomed Pharmacother. 2004 ; 58 : 365-71.
26. Gang A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. Leukemia. 2002 ; 16 : 1053-68.
27. Frenkel K, Wei H, Bhimani R et al. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. Cancer Res. 1993 ; 53 : 1255-61.
28. Ferguson LR, Zhu ST, Harris PJ. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. Mol Nutr Food Res. 2005 ; 49 : 585-93.
29. Kang JR, Lee JY, Whang WK. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of elscholtziae splendense. J Kor Soc Cosm. 2007 ; 13 : 163-70.