

마치현 70% 에탄올 추출물의 Heme Oxygenase-1 발현을 통한 산화적 스트레스에 대한 사람각질형성세포 보호 효과

서승희¹ · 정길생^{2*}

¹동신대학교, 뷰티미용학과, ²계명대학교 약학대학

The Cytoprotective Action of *Portulaca oleracea* 70% EtOH Extracts via the Heme Oxygenase-1 on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress in Human Keratinocyte HaCaT Cells

Seung-Hee Seo¹ and Gil-Saeng Jeong^{2*}

¹Department of Cosmetology, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Korea

²College of Pharmacy, Keimyung University, Dae-gu 704-701, Korea

Abstract – Keratinocytes are first barrier against outer challenges on skin. However, it is still largely unknown about effective protectors against ultraviolet B (UVB), and oxidative stress in human keratinocyte, HaCaT cells. Inducible heme oxygenase (HO)-1 acts against oxidants that are thought to play a role in the pathogenesis of skin disorders. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effect of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in human keratinocytes, HaCaT cells. *P. oleracea* 70% EtOH extracts showed the potent protective effects on H₂O₂-induced toxicity by induced the expression of HO-1 in human keratinocyte, HaCaT cells. Furthermore, *P. oleracea* 70 % EtOH extracts caused the nuclear accumulation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in human keratinocytes, HaCaT cells. In addition, we found that treatment with c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125) reduced *P. oleracea* 70% EtOH extracts-induced HO-1 expression, and JNK inhibitor (SP600125) also inhibited protective effects by *P. oleracea* 70% EtOH extracts. Therefore, these results suggest that *P. oleracea* 70 % EtOH extracts increases cellular resistance to H₂O₂-induced oxidative injury in human keratinocyte, HaCaT cells, presumably through JNK pathway-Nrf2-dependent HO-1 expression.

Key words – *Portulaca oleracea*, Keratinocyte, Oxidative stress, Heme oxygenase-1, Cytoprotection

마치현(*Portulaca oleracea* L.)은 쇠비름과에 속하는 1년 생 초본으로, 오행초(五行草), 장명채(長命采), 마치채(馬齒采), 쇠비름 등으로 불리기도 한다. 주로 길가, 텃밭 등에서 자생하며, 줄기는 갈적색이고 가지가 많이 갈라져 땅위로 비스듬히 퍼지면서 자라는 식물이다. 마치현은 식용하거나 민간요법에서는 충독, 사독 등의 각종 독소 성분에 대한 해독제로도 사용되었다.¹⁾ 성분으로 L-noradrenaline, dopamine, dopa 등을 포함하고 있으며, 그 외 organic acid, glutamic acid, aspartic acid, alanine 등을 함유한다고 알려져 있다.^{2,3)} 마치현 추출물은 창상 치유,⁴⁾ 항염,⁵⁾ 항산화,⁶⁾ 항비만,⁷⁾ 항바이러스⁸⁾ 등에 효과가 있다고 보고되었다. 그러나 마치현을 이용하여 사람각질형성세포에서 산화적 스

트레스로 유도한 손상에 대한 효과를 탐색한 문헌은 없었다.

각질형성세포(keratinocytes)는 피부 표피에 해당하며, 자외선을 비롯한 외부 자극에 직접적으로 노출되게 된다.⁹⁾ 이러한 지속적인 자외선과 같은 외부 자극의 노출을 통해 산화적 스트레스(oxidative stress)가 발생하게 되며 이는 피부가 노화되는 가장 큰 원인으로 알려져 있다. 자외선으로 유도된 활성산소종(ROS)은 피부의 광산화적 손상을 일으켜 피부노화를 가속화시킨다. ROS란 큰 산화력을 갖는 산소종으로서 superoxide anion radical, hydroxyl radical과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide, singlet oxygen과 같은 비 라디칼 종 그리고 이들이 생체 성분과 반응하여 생성된 peroxy radical, alkoxy radical 등이 포함된다. 이러한 활성산소종은 스트레스와 같은 환경적 요인에 의해 생체 내 수가 증가하며, 큰 반응성으로 인하여 생체내

*교신저자(E-mail): gsjeong@kmu.ac.kr
(Tel): +82-53-580-6649

의 불포화 지방산 및 지질 단백질, 막 지질을 산화시켜 세포 손상 및 DNA 산화와 같은 생체 구성 성분의 손상을 야기한다.^{10,11)} 따라서 산화적 스트레스로부터 각질형성세포를 보호하고 노화를 지연시키기 위해서는 체내 항산화 방어 시스템을 향상시키는 것이 매우 중요하다.¹²⁾

이러한 산화적 스트레스와 피부 손상에 대한 보호 메커니즘을 밝히려는 많은 연구가 진행되고 있으며 그 중 각광 받고 있는 것이 heme oxygenase(HO)-1과 관련된 메커니즘이다.¹³⁾ HO-1은 heme catabolism의 속도결정단계에 작용하는 효소로서, 반응산물로 carbon monoxide(CO), biliverdin, free ion(Fe^{2+})을 생성한다.¹⁴⁾ HO-1은 다양한 종류의 세포에서 ultraviolet radiation, 과산화수소, cytokine, 저산소 상태, glutathione(GSH)소모 등에 의해 유도되며, 이는 일종의 stress에 대한 세포방어 메커니즘으로 생각할 수 있다. HO-1은 생성물들과 함께 세포사멸 억제, 항염 증 및 항산화 작용을 갖는 것으로 알려져 다양한 질병 치료의 타겟으로 큰 주목을 받고 있다.¹⁵⁾ 따라서, 본 연구에서는 마치현 70%에 탄을 추출물을 이용하여 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)로 유발되는 산화적 스트레스에 대한 추출물의 세포보호 효과를 알아보고, 그 작용기전으로 HO-1 단백질 발현과의 연관성에 관한 연구를 수행 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 제조 - 본 실험에 사용한 마치현은 2015년 옴니허브(경북 영천) 제품으로 구입 하여 사용하였다. 마치현 50 g을 70% 에탄올 500 ml로 2시간 동안 가열 환류추출하고 여과한 다음 여액을 감압농축하여, 마치현 70% 에탄올 추출물 6.86 g(수득률: 13.7%)을 얻었다.

시약 및 기기 - DMEM 배지와 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. L-glutamate, Trolox와 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다.

HaCaT 세포배양 - 본 실험에 사용된 HaCaT 세포는 Addexbio(San Diego, California, USA)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. HaCaT 세포는 형질 전환된 각질형성세포로 사람 피부의 정상 각질형성세포와 형태 및 반응 양식이 동일하면서 계대배양이 제한되지 않아 유지하기가 편한 장점이 있다. 각질형성세포주인 HaCaT 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (GibcoBRL,

Braunschweig, Germany)배지를 사용하여 5% CO_2 , 37°C 세포 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 독성 분석 - HaCaT cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 24시간 배양 후 5 mg/ml의 농도로 MTT 용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO 200 μ l를 첨가 함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96well plate에 loading한 후, 생성물을 DMSO로 녹여 생성된 크리스탈의 양을 spectrometer(molecular devices, CA, USA) 기기를 사용하여, 최대 세포 생존율을 반영하는 파장인 흡광도 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정하였다.

Western Blot Analysis - 세포를 60 mm dish에 3×10^5 cells/well 농도로 24시간 배양한후 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 Nitrocellulose membrane(NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무지방유가 포함된 신선한 blocking buffer(0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 blocking한후 HO-1, Nrf2 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 안티바디(Anti-mouse, Anti-rabbit IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 NC membrane위에 부어서 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 Actin antibody를 이용하여 Actin을 측정한다.

핵과 세포질 분획 - 세포에 protease inhibitor cocktail I 과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가한 PER-mammalian protein extraction buffer를 첨가하여 균질화하고 4°C에서 15,000×g로 원심분리 하였다. 10분간 원심분리 후 상등액을 세포질 분획으로 사용하기 위하여 -80°C에서 저장하였다. 나머지 침전물은 PBS로 세척한 후 RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA), 1 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM Na_3VO_4 , protease inhibitors]를 첨가하고 4°C에서 15분간 혼합한 후 4°C, 16,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후의 과정은 앞에서 설명한 western blotting 방법을 이용하였다.

통계처리 - 본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으

며, 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준($p < 0.05$)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

활성산소종(ROS, reactive oxygen species)은 반응성이 높아 세포 구성성분인 단백질, 지질, 당 DNA등을 비가역적, 비 선택적으로 공격하여 파괴하고, 암을 유발하기도 하며, 체내에 발생한 활성 산소종은 산화적 스트레스를 유발하여 세포 손상을 야기 시킨다. 특히나 피부세포의 손상을 통한 노화의 주요한 원인으로 알려지고 있다. 이러한 활성산소를 제거하기 위하여 현대의학과 미용시장에서 집중 타겟이 되

고 있는 노화를 지연시키고 개선시키기는 합성 항산화제들이 많이 사용되고 있지만 합성 항산화제는 독성 작용과 부작용을 일으키는 것으로 알려지면서 천연에서 그 대체 소재를 찾는 연구가 활발하게 이뤄지고 있다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 마치현 70% 에탄올 추출물의 사람각질형성세포 HaCaT에서 H₂O₂로 유발한 세포 독성에 대한 보호 효과를 살펴보고 그 작용 기전에 대해서 알아보려고 하였다.

먼저 사람각질형성세포 HaCaT에서 마치현 70% 에탄올 추출물의 세포 독성과 H₂O₂로 유발한 세포 독성에 대한 결과를 살펴 보았다. Fig. 1에서와 같이 사람각질형성세포 HaCaT에서 마치현 70% 에탄올 추출물은 48시간 동안 200 µg/ml까지 독성이 보이지 않았으며, 이후 모든 실험은 200 µg/ml을 최고 농도로 실험을 진행하였다. 또한, H₂O₂로 유발한 세포 독성은 12시간 동안 처리한 결과에서 0.2 mM

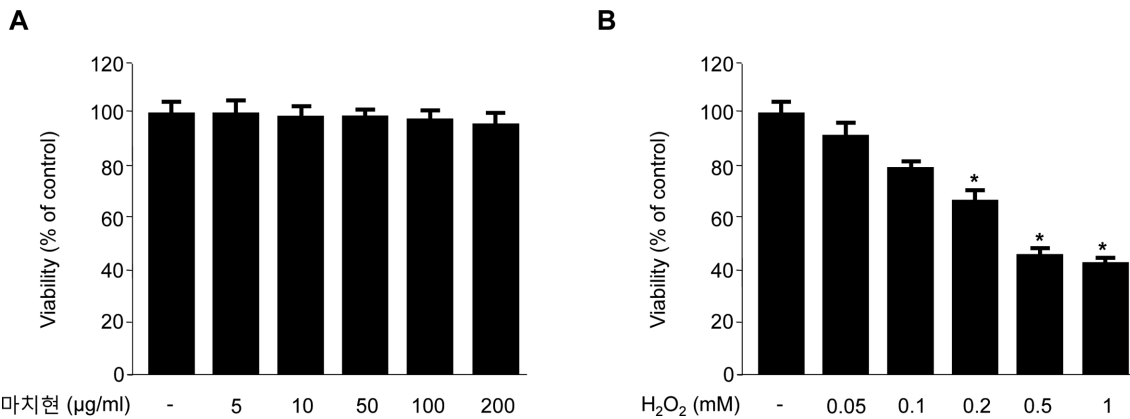


Fig. 1. The cell viability of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts (A) and H₂O₂ (B) in HaCaT cells. The cell viability was assessed after 48 h (A) or 12 h (B) incubation period with indicated-concentrations of the *P. oleracea* 70% EtOH extracts (A) and H₂O₂ (B). Each value represents the mean±S.D. of three experiments. * $P < 0.05$ vs. control

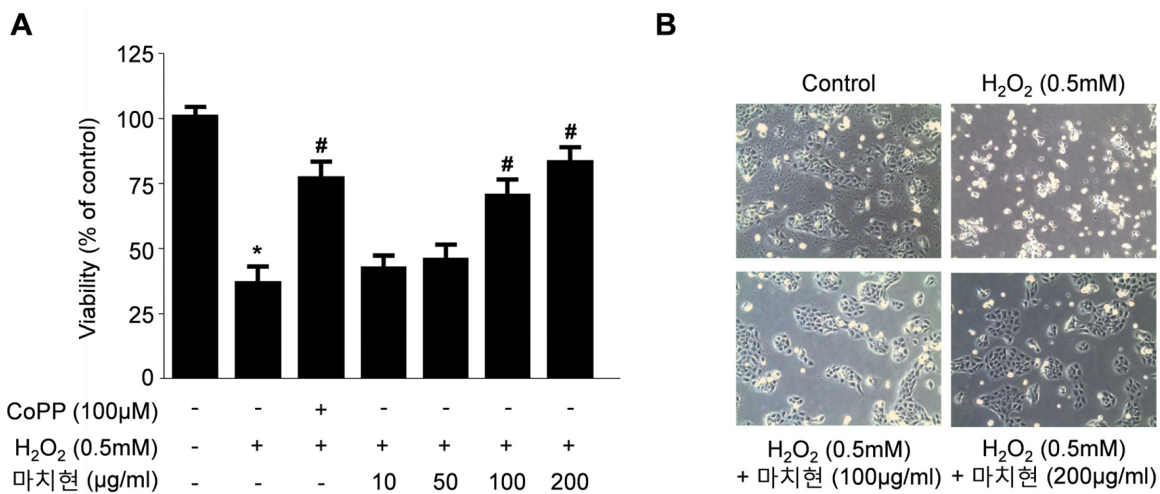


Fig. 2. Effects of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts on H₂O₂-induced oxidative toxicity in HaCaT cells. Cells were pre-treated for 3h with *P. oleracea* 70% EtOH extracts, and then incubated for 12 h with H₂O₂ (0.5 mM). Each value represents the mean±S.D. of three experiments. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. only treated H₂O₂.

부터 1 mM까지 세포 생존률 감소하였으며, 본 연구에서는 0.5 mM로 독성을 처리 하여 모든 실험을 진행 하였다(Fig. 1). 산화적 스트레스(oxidative stress)로부터 각질형성세포를 보호하고 노화를 지연시키기 위해서는 체내 항산화 방어 시스템을 향상시키는 것이 매우 중요하다.¹²⁾ 따라서, 다음으로 마치현 70% 에탄올 추출물의 H₂O₂로 유발한 세포 독성으로부터 사람각질형성세포 HaCaT 보호 효과를 살펴 보았다(Fig. 2). 그 결과 마치현 70% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 H₂O₂로 유발한 세포 독성으로부터 사람각질형성세포 HaCaT 보호하는 효과가 우수하였다. 양성 대조군으로 CoPP를 사용 하였다. 또한, 세포 손상 억제 효과를 측정 한 현미경 활용 세포 모습에서도 마치현 70% 에탄올 추출물 처리 군에서 확실한 사람각질형성세포 HaCaT 손상 억제 현상이 나타났다. 이로써 사람각질형성세포 HaCaT에서 마치현 70% 에탄올 추출물은 산화적 손상에 의한 세포 보호 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 한편, 산화적 손상에 대한 중요한 생체 내 작용 단백질인 HO-1 발현과의 상관관계를 알아보고자 실험을 진행 하였다. 마치현 70% 에탄올 추출물은 사람각질형성세포 HaCaT에서 농도 의존적으로 HO-1 단백질 발현을 증가 시켰으며, 이는 HO-1 발현이 세포보호와 관련 있을 수 있다는 점을 시사하여 HO-1 발현의 상위 기전을 알아 보고자 하였다.

현재 많은 연구에 의하면 HO-1 단백질의 발현에 대한 메커니즘 중 nuclear factor-E2-related factor 2(Nrf2)의 핵 내 전사가 가장 직접적인 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Nrf2는 redox-sensitive transcription factor로써 다양한 항산화 효소 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. Nrf2는 보통 세포질 내에서 Keap1과 inactive complex를 이루어 존재하

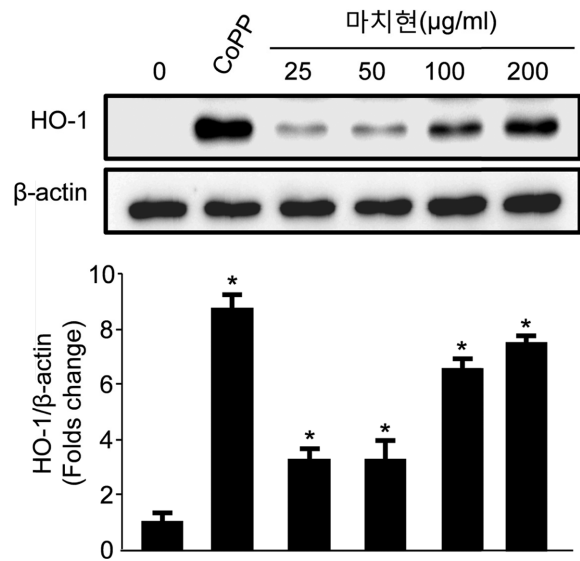


Fig. 3. Effects of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts on HO-1 protein expression in HaCaT cells. Cells were incubated with indicated concentrations of *P. oleracea* 70% EtOH extracts for 12 h. Western blot analyses of protein expression were performed as described in the ‘Materials and Methods’ section. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. **P*<0.05 vs. control. CoPP was used as the positive control.

고 있지만, 활성화되는 경우 핵 속으로 이동하여 ARE (Antioxidant Response Element)에 결합 함으로서 HO-1과 같은 항산화 효소들의 발현을 증가시키며, 이들 유전자의 발현을 조절하고 단백질발현을 항진시킴으로써 산화스트레스에 대한 생체방어기구에 중심적 역할을 담당하고 있다.^{17,18)}

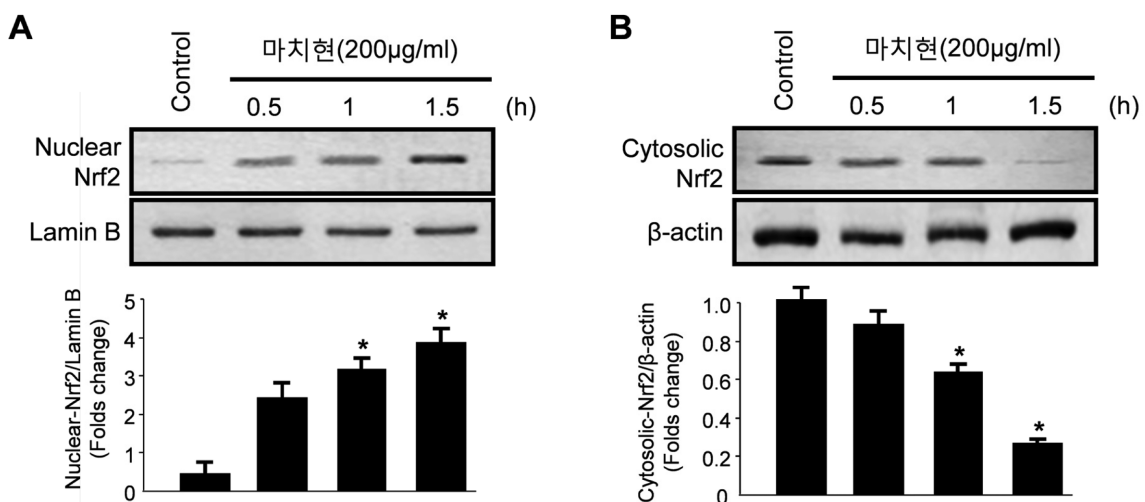


Fig. 4. Effects of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts on nuclear translocation of Nrf2 in HaCaT cells. (A, B) Cells were treated with *P. oleracea* 70% EtOH extracts for 0.5, 1, and 1.5 h. Nuclei were separated from the cytosol using PER-Mammalian Protein Extraction buffer as described in the ‘Materials and Methods’ section. Western blot analyses of protein expression were performed as described in the ‘Materials and Methods’ section. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. **P*<0.05 vs. control.

마치현 70% 에탄올 추출물을 200 µg/ml 처리하여 시간 별로 측정된 결과 Nrf2가 핵내로 전사 되면서 nuclear의 Nrf2가 증가하는 반면 cytosol의 Nrf2가 현저히 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 4). 기존의 연구결과와 마찬가지로 마치현 70% 에탄올 추출물은 Nrf2의 핵내전사를 통하여 HO-1 단백질의 발현을 조절하는 것을 실험을 통하여 확인하였다.

산화적 스트레스를 포함한 다른 여러 스트레스 요인들은 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 전달계를 자극하는데, MAPK 전달계는 세포 외부로부터의 자극을 세포 내로 전달하여 세포 내 반응을 유도하는데 중요한 역할을 하며 세포 성장, 증식, 분화 및 세포 사멸 등 다양한 경로 조절에 관여하는 경로로 알려져 있다. MAPK 전달계는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 세가지 family로 구성된다.¹⁹⁻²¹⁾ 여러 연구들에 의하면 MAPK 경로 역시 HO-1의 발현에 직접적으로 관여하는 것으로 밝혀졌다.^{22,23)} 따라서, 마치현 70% 에탄올 추출물의 MAPK 경로에 대한 실험을 진행하였다.

JNK 억제제인 SP600125, ERK 억제제인 PD98059, p38 억제제인 SB203580를 2시간 전처리 한 후 마치현 70% 에탄올 추출물을 200 µg/ml 처리하여 12시간 후 HO-1 발현을 살펴 본 결과 JNK 억제제인 SP600125를 처리한 군에서 HO-1 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인 하였다(Fig. 5). 이 결과는 마치현 70% 에탄올 추출물의 HO-1 발현이 JNK MAPK 경로를 의존하여 발생한다는 것을 뒷받침하는 결과이다. 또한, HO-1 발현과 JNK MAPK 경로가 마치현 70% 에탄올 추출물의 산화적 사람각질형성세포 HaCaT 손상에 미치는 영향을 살펴 보고자 하였다(Fig. 6). 먼저, HO 활성화

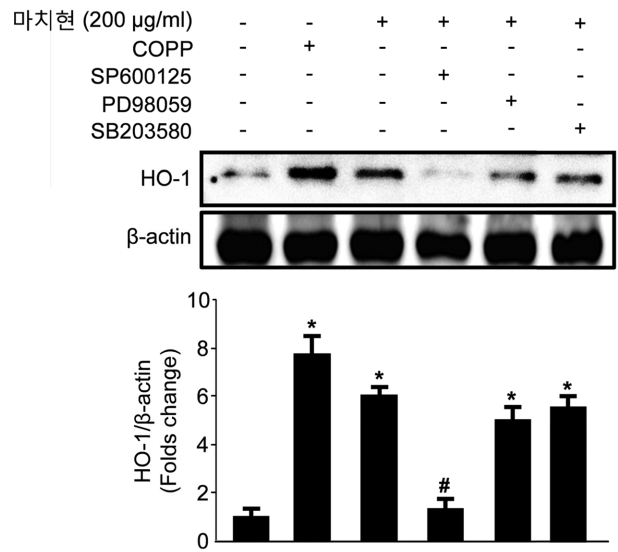


Fig. 5. Effects of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts-induced HO-1 expression through the MAPKs pathways in HaCaT cells. Cells were pretreated for 2 h with the specific inhibitor PD98059 (40 µM), SP600125 (25 µM) and SB203580 (20 µM), and then treated with *P. oleracea* 70% EtOH extracts for 12 h. Western blot analyses of protein expression were performed as described in the ‘Materials and Methods’ section. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. **P*<0.05 vs. control; #*P*<0.05 vs. only treated *P. oleracea* 70% EtOH extracts. CoPP was used as the positive control.

억제제인 SnPP를 2시간 전처리 한 후 마치현 70% 에탄올 추출물을 처리 후 H₂O₂로 12시간 산화적 손상을 준 결과 마치현 70% 에탄올 추출물의 세포 보호 효과가 SnPP 전처

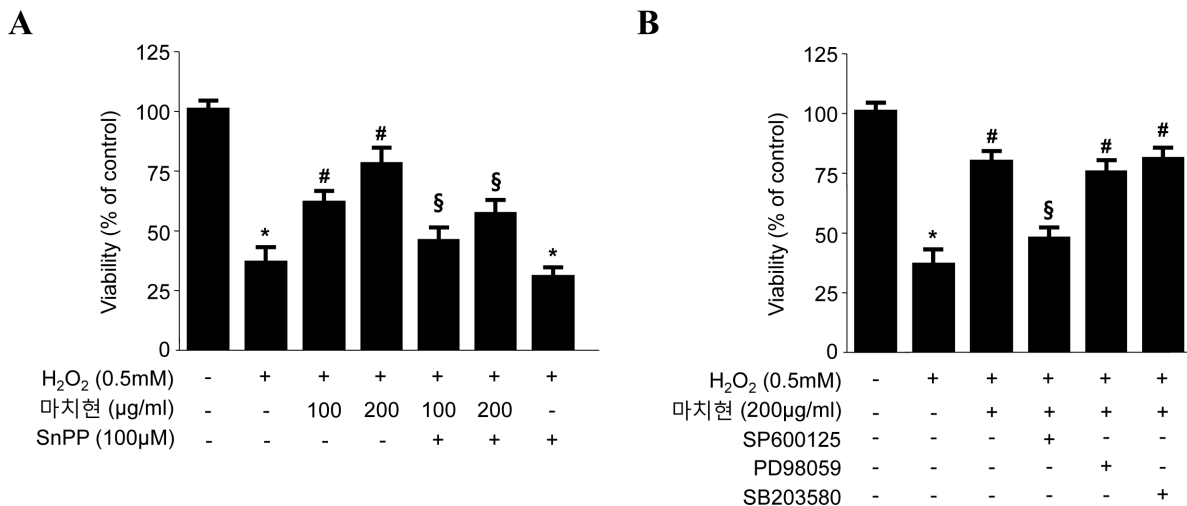


Fig. 6. Effects of HO-1 expression and JNK activation by *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts on H₂O₂-induced toxicity in HaCaT cells. Cells were pretreated for 2 h with the specific inhibitor SnPP (100 µM) or SP600125 (25 µM), and then treated with *P. oleracea* 70% EtOH for 12 h. After then, cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 12 h. Each bar represents the mean±S.D. of three independent experiments. Each value represents the mean±S.D. of three experiments. **P*<0.05 vs. control; #*P*<0.05 vs. only treated H₂O₂; §*P*<0.05 vs. *P. oleracea* 70% EtOH extracts treated with H₂O₂.

리 군에서 현저하게 억제 되는 것을 확인 하였다(Fig. 6A). JNK 억제제인 SP600125, ERK 억제제인 PD98059, p38 억제제인 SB203580를 2시간 전처리 한 후 마치현 70% 에탄올 추출물을 200 µg/ml 처리하여 H₂O₂로 12시간 산화적 손상을 준 결과에서는 JNK 억제제인 SP600125를 전처리 한 군에서만 마치현 70% 에탄올 추출물의 세포 보호 효과가 현저하게 억제 되는 것을 확인 하였다(Fig. 6B). 이러한 결과는 마치현 70% 에탄올 추출물의 세포 보호 효과가 HO-1 발현과 JNK MAPK 경로를 통해서 이뤄 짐을 확인할 수 있는 결과였다(Fig. 6).

결 론

본 연구에서는 마치현 70% 에탄올 추출물의 사람각질형성세포 HaCaT에서 H₂O₂로 유발한 세포 독성에 대한 보호 효과를 살펴 보고 그 작용 기전에 대해서 알아보고자 하였다. 그 결과 마치현 70% 에탄올 추출물은 H₂O₂로 유발한 사람각질형성세포 HaCaT 손상을 현저하게 억제하는 효과를 나타냈으며, 그 작용 기전으로는 Nrf2 핵 내 전사와 JNK MAPK 경로를 통한 HO-1 단백질의 발현을 통해서 나타났다. 이와 같은 연구결과는 마치현 70% 에탄올 추출물이 산화적 손상으로부터 피부를 보호하는 소재로 활용 가능성을 보여주는 기초적인 실험 근거를 제시하는 것으로, 추후 유효성분과 관련된 연구가 진행되어야 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2015년 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 원천기술개발사업 지원을 받아 수행된 것임(NRF-2015M3A9A5031091).

인용문헌

1. Youk, C. S. (1989) Coloured Medicinal Plants of Korea. pp.164. Academic Press, Seoul.
2. Peng, P. C., Haynes, L. J. and Magnus, K. E. (1961) High concentration of (-)-noradrenaline in *Portulaca oleracea* L. *Nature* **191**: 1108-1110.
3. Mohamed, A. I. and Hussein, A. S. (1994) Chemical composition of purslane (*Portulaca oleracea*). *Plant Foods Hum. Nutr.* **45**: 1-9.
4. Rashed, A. N., Afifi, F. U. and Disi, A.M. (2003) 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.* **88**: 131-136.
5. Chan, K., Islama, M. W., Kamil, M., Radhakrishnana, R., Zakariaa, M. N. M. and Habibullahc, M. (2000) The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. *J. Ethnopharmacol.* **73**: 445-451.
6. Lim, Y. Y. and Quaha, E. P. L. (2007) Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chem.* **103**: 734-740.
7. Lee, M. S., Kim, C. T., Kim, C. J., Cho, Y. J. and Kim, Y. (2006) Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipolysis and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J. Nutr.* **39**: 742-747.
8. Dong, C. X., Hayashi, K., Lee, J. B. and Hayashi, T. (2010) Characterization of structures and antiviral effects of polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. *Chem. Pharm. Bull.* **58**: 507-510.
9. Halliwell, B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 531-542.
10. Kim, E. S., Kim, J. S. and Kim, G. N. (2012) Anti-oxidant Function of Genistein against H₂O₂-induced Oxidative Stress in HaCaT Keratinocytes. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**: 541-547.
11. Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M. and Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* **107**: 526-545.
12. Applegate, L. A., Noel, A., Vile, G., Frenk, E. and Tyrrell, R. M. (1995) Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. *Photochem. Photobiol.* **61**: 285-291.
13. Kundu, J., Kim, D. H., Kundu, J. K. and Chun, K. S. (2014) Thymoquinone induces heme oxygenase-1 expression in HaCaT cells via Nrf2/ARE activation: Akt and AMPK α as upstream targets. *Food Chem. Toxicol.* **65**: 18-26.
14. Lee, D. S., Jang, J. H., Ko, W., Kim, K. S., Sohn, J. H., Kang, M. S., Ahn, J. S., Kim, Y. C. and Oh, H. (2013) Penicillinolide A: a new anti-inflammatory metabolite from the marine fungus *Penicillium* sp. SF-5292. *Mar. Drugs* **11**: 4510-4526.
15. Lee, D. S., Li, B., Im, N. K., Kim, Y. C. and Jeong, G. S. (2013) 4,2',5'-trihydroxy-4'-methoxychalcone from *Dalbergia odorifera* exhibits anti-inflammatory properties by inducing heme oxygenase-1 in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **16**: 114-121.
16. Azizi, E., Lusky, A., Kushelevsky, A. P. and Schewach-Millet, M. (1988) Skin type, hair color, and freckles are predictors of decreased minimal erythema ultraviolet readiation does. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**: 32-38.
17. Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. (2003) Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**: 887-895.

18. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 313-322.
 19. Choi, B. H., Hur, E. M., Lee, J. H., Jun, D. J. and Kim, K. T. (2005) Protein kinase C delta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *J. Cell Sci.* **119**: 1329-1340.
 20. Oh, H. L., Seok, J. Y., Kwon, C. H., Kang, S. K. and Kim, Y. K. (2006) Role of MAPK in ceramide-induced cell death in primary cultured astrocytes from mouse embryonic brain. *Neurotoxicology.* **27**: 31-38.
 21. Chuang, S. M., Wang, I. C. and Yang, J. L. (2000) Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis.* **21**: 1423-1432.
 22. Elbirt, K. K., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. and Bonkovsky, H. L. (1998) Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273**: 8922-8931.
 23. Kietzmann, T., Samoylenko, A. and Immenschuh, S. (2003) Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**: 17927-17936.
- (2015. 5. 25 접수; 2015. 6. 18 심사; 2015. 6. 22 게재확정)