

## 마치현 에탄올 추출물의 항균, 항산화 효과

곽정심 · 김춘득<sup>†</sup>

남부대학교 향장 미용학과  
(2018년 7월 25일 접수: 2018년 9월 20일 수정: 2018년 9월 28일 채택)

### Anti-microbial, Anti-oxidant Effect of *Portulacae Herba* ethanol Extract

Jeong Sim Gwak · Chun-Dug Kim<sup>†</sup>

Department of Cosmetology Science, Nambu University, 23 advanced Jungang-ro,  
Gwangsan-gu, Gwangju, 62271, Korea

(Received July 25, 2018; Revised September 20, 2018; Accepted September 28, 2018)

**요약** : 마치현 추출물에 대한 생리활성 소재로서 응용 가능성을 확인하고자 하였다. 마치현 추출물의 측정 결과, 플라보노이드, 폴리페놀 함량과 DPPH radical 소거능을 확인하였으며, 세포실험 결과 HaCaT, RAW 264.7, RBL-2H3 세포에서 유의한 세포독성은 나타나지 않았으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포는 마치현 에탄올 100 µg/mL 농도에서 83% 보호효과가 확인되었다. RAW 264.7 세포에 대한 마치현 추출물의 항염 효과를 확인 결과 저농도에서도 nitric oxide 생성이 억제되었으며, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* 균에서도 마치현 추출물의 농도 의존적으로 항균 활성이 확인되었다. 본 연구는 마치현 추출물의 항산화, 항염증 및 항균 효과를 가지는 생리 활성 물질로서 활용 가능성을 확인하였다.

**주제어** : 마치현, 항산화, 항염, 항균, 생리활성

**Abstract** : The purpose of that was to investigate the potential of *P. Herba* extracts as phytonutrient active ingredients. In order to elucidate the *P. Herba* ethanol extracts were examined DPPH radical scavenging activity, NO production, protective effects against oxidative stress in HaCaT cells, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity, anti-allergic effects, and inhibition of  $\beta$ -hexosaminidase expression. The antioxidative activity of the *P. Herba* extracts was compared, and the antioxidative activity of the ethanol extract was found to be superior. No significant cytotoxicity was observed in HaCaT, RAW 264.7, and RBL-2H3 cells. The protective effect of the extracts against oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was examined in HaCaT cells, and it was found to be 83% This concentration refers to which extract ethanol at 100 µg/mL. The anti-inflammatory activity of the extracts was examined in RAW 264.7 cells, and NO production was suppressed even at low concentrations. In addition, the concentration-dependent

---

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: kobhs@naver.com)

antimicrobial activities of the extracts were demonstrated in several bacterial strains, such as those of *S.aureus*, *S.epidermidis* and *P. acnes*. Based on the findings from this study, *Portulacae Herba* extracts could be used as physiological active substance that possess antioxidative, anti-inflammatory, and antimicrobial properties.

*Keywords* : *Portulacae Herba*, anti-oxidat, anti-inflammation, anti-bacterial, phytonutrient

## 1. 서론

염증은 피부손상 및 노화의 주요 원인이며, 체내 세포 조직에 어떠한 기질적 변화로 조직 재생이나 회복을 위한 방어적 반응으로 활성산소종(reactive oxygen species)의 일종인 nitric oxide (NO)는 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되어 각종 생리 및 병리적 과정에 있어 중요한 역할을 한다<sup>1)</sup>. 또한 히스타민은 mast cell에서 합성 저장되고 염증반응에 영향을 끼치며,  $\beta$ -hexosaminidase는 mast cell 내에 존재하는 효소로 탈 과립에 의해 누출되는 히스타민의 양과 비례하며 항 알레르기 효과의 지표로서 이용되고 있다<sup>2)</sup>. 생리적 스트레스나 화장품의 남용 등 생활 속의 합성물질들은 사람에 따라 유해한 영향을 미칠 수 있어 피부 자극이나 안정성의 문제로 인체에 무해한 천연물질 소재에 관한 연구가 다양하게 진행 중이다<sup>3)</sup>. 따라서 항산화물질은 다양한 자극에 대한 생체조직 방어반응의 하나로 염증 매개물질 분비를 통해 류마티스 관절염, 패혈증과 같은 염증질환을 일으키기도 한다. 또한 피부 상재균은 *S. aureus*, *P. acnes* 가 있으며 지루성 피부 염증을 유발하는 효모균 등이 있는데, 여드름균인 *P. acnes*는 지방분해효소(lipase)를 분비하여 피지를 지질분해하고 모낭벽을 자극하는 것으로 알려져 있다. 이러한 항염증 효과<sup>4)</sup>, 항산화, 생리활성, 항염효능<sup>5)</sup> 등은 *S. aureus*가 화농성 감염을 유발하며 아토피 환자 중 90%에서 발견되고 있다<sup>6)</sup>. 천연식물인 마치현(*Portulaca oleracea*)은 한해살이풀로 진액이 많이 함유되어 상처치유, 피부 진정, 상피세포의 생리기능 등을 정상적으로 유지시켜 궤양이나 피부건조와 비타민A 결핍증, 안구건조증, 야맹증 등에 민간요법으로 사용되어왔는데, 본 연구에서는 마치현 추출물의 생리활성과 RAW 264.7 세포에서의 항염증, 항산화, 항균 효과를 확인함으로써 생리활성물질로서의 활성효능을 알아보려고 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 배양

건조된 마치현(생약 협동조합, Korea)은 10 g 을 70% 에탄올 (Duksan Pure Chemicals, Korea) 1 L를 이용하여, 환류 냉각 추출기 (WHM, 21303, DH, Korea)로 70°C 조건에서 24 h 동안 추출하였고, 마치현 추출액은 여과지 (Whatman filter paper No. 2; GE Healthcare Life Sciences, USA)를 사용하였다. 감압농축기 (EYELA N-1000; Tokyo Rikakikai, Japan)를 이용하여 에탄올을 제거 후 동결건조(FD5508; IlshinBioBase, Korea)하여 냉동 보관하여 사용하였으며 추출물의 수율은 19.8% 확인하였다. 시약은 RAW 264.7(DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA), RBL-2H3 세포는 Minimum Essential Media (MEM; Gibco™), Griess reagent, fetal bovine serum (FBS; Gibco™), streptomycin/penicillin(HyClone™, GE Healthcare Life Sciences), lipopolysaccharide (LPS), DPPH, ascorbic acid, Griess reagent, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich USA)등을 구입하여 사용하였다.

본 실험에서 HaCaT 세포, 마우스의 RAW 264.7 대식세포, RBL-2H3 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하였다. HaCaT 세포와 RAW 264.7 대식세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA), RBL-2H3 세포는 Minimum Essential Media (MEM; Gibco™)에 각각 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco™)과 1% streptomycin/penicillin (HyClone™, GE Healthcare Life Sciences)을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub>로 조정된 incubator에서 배양하였다.

## 2.2. 항산화 활성 측정 방법

총 폴리페놀 함량은 Folin & Denis (1915)7) 방법을 사용하여 마치현 추출물 (1 mg/mL)을 각 농도 별로 희석한 후 시료 50  $\mu$ L에 증류수 650  $\mu$ L를 넣은 후 Folin-Denis phenol reagent (Sigma-Aldrich, USA) 50  $\mu$ L를 혼합하여 3 min 동안 실온에서 반응시킨 후 10% sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Sigma-Aldrich USA) 포화 용액을 100  $\mu$ L을 첨가하고, 최종 볼륨을 1 mL로 맞추기 위하여 증류수 150  $\mu$ L를 넣어 혼합시켰다. 37°C water bath (HB-205WM, HANBAEK Scientific Technology, Korea)에서 1 h 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devies, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일조건으로 3회 반복하여 평균값을 측정하였고 표준물질은 tannic acid (Sigma-Aldrich USA)를 이용하였다. 또한 총 플라보노이드 함량 측정은 Davis8) 등의 방법으로 마치현 추출물 0.1 g에 methanol (B&J Brand, USA) 10mL을 가하여 70°C에서 30 min 동안 추출한 후 1 mg/mL로 희석하여 사용하였다. 검액 100  $\mu$ L에 1 mL의 diethylene glycol (DEG; B&J Brand)를 첨가하고, 1N sodium hydroxide (NaOH; Sigma-Aldrich) 100  $\mu$ L을 넣어 잘 혼합시켜 37°C water bath에서 1 h 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devies)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 naringin (Sigma-Aldrich USA) 농도를 0-300  $\mu$ g/mL이 되도록 하였고 동일조건으로 3회 반복하여 평균값을 측정하였다. 이와 함께 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH; Sigma-Aldrich) radical 항산화활성은 Blois (1958)9)의 방법을 사용하였다. 마치현 추출물(15.5-500  $\mu$ g/mL)을 농도 별로 96Well plate에 1 mM DPPH 용액 90  $\mu$ L와 시료 10  $\mu$ L를 혼합하여 각각 100  $\mu$ L씩 취하여 혼합한 후 30 min 암 상태에서 반응 후 잔존 radical 농도를 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일조건으로 3회 반복으로 평균값을 측정하였으며 양성 대조군으로 butylated hydroxytoluene (BHT; Sigma-Aldrich USA), L-ascorbic acid (vitamin C; Sigma-Aldrich USA)를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거 활성(\%)} = \frac{100 - \text{첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}} \times 100$$

## 2.3. 세포 생존율

MTT assay를 이용한 세포독성 측정으로 HaCaT 세포와 RAW 264.7 대식세포와 RBL-2H3 세포의 생존율 측정은 Mosmann (1983)10) 방법에 의해 실시하였다. 96well plate에 logarithmic phase에 도달한 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도가 되도록 조절하여 분주 후 24 h 배양하여 안정화를 시행하였다. 24 h 배양 후 추출물을 최종 농도 5-200  $\mu$ g/mL가 되도록 배양액에 희석하여 부착된 세포에 공급하고 24 h 동안 배양완료 후 각 well에 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, 5 mg/mL in phosphate buffered saline) 용액을 10  $\mu$ L씩 가해주고, 다시 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 의 습윤 배양기에서 4 h 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, USA) 150  $\mu$ L로 잘 녹여서 ELISA reader (BIO-RAD)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 3회 반복 실시 후 t-test를 통해 통계적 유의성을 확인하였다.

## 2.4. $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의하여 유발되는 산화적 스트레스 HaCaT 세포

$\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호를 관찰하기 위하여 O'Toole *et al.* (1996)11) 방법을 응용하여 실험하였다. 96 well plate에 HaCaT 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 조절하여 24 h 동안 배양한 후, 세포 생존율에 따라 추출물을 2 h 전 처리 후, 최종 농도가 500  $\mu$ M의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 함유한 배양액을 투여하여 24 h 동안 반응시킨 다음 MTT assay로 생존율을 측정하였다

## 2.5. 항 알레르기 활성 측정

RBL-2H3 세포를 24 well plate에 각각  $2 \times 10^5$  cells/well의 세포가 들어가도록 분주한 후, 각 well 당 25  $\mu$ g/mL의 anti-dinitrophenyl immunoglobulin E (anti-DNP IgE; Sigma-Aldrich)로 감작시키고, 5%의  $\text{CO}_2$ 배양기에서 12 h 배양했다. 세포를 40 mM NaOH (Sigma-Aldrich, USA), 1 mM calcium chloride (Sigma-Aldrich, USA), 0.1% bovine serum albumin (BSA; Gibco™), pH 7.2)로 2회 세척한 후 추출물을 농도 별(5-200  $\mu$ g/mL)로 첨가한 후 37°C에서 30 min 동안 반응시키고, 2-4-

dinitrophenyl-human serum albumin (DNP-HSA; Sigma-Aldrich) 250 ng/mL를 처리하여 30 min 동안 알레르기 반응을 유도하였다. Ice bath 에서 10 min 동안 반응 시킨 후 12,000 rpm에서 3 min 원심 분리하여 상등액만 측정하였다. 상등액 30 mL와 substrate buffer (2 mM 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, USA), 0.05 M sodium citrate (Sigma-Aldrich, USA), pH 4.5) 30 mL를 혼합한 반응 액을 1 h 동안 37 °C에서 반응시키고, 0.1 M carbonate buffer (Sigma-Aldrich, USA) 250 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고, ELISA reader (BIO-RAD)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.6. Nitrite 생성 저해능 측정

활성산소 중 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성 저해능(12)에 대한 마치현 추출물로 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고, 마치현 추출물로 실험을 진행하였다. Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 griess reagent (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 측정하였다. 96 well plate에 각 well당 1×10<sup>5</sup>cells/mL의 Raw 264.7 세포가 들어있는 부유액 100 μL를 접종하고, 24 h 배양한 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종농도가 각각 5-50 μg/mL로 되도록 시료를 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS 1 μg/mL를 처리하여 24 h 배양하였다. 세포배양 상층액 100 μL 과 동량의 griess reagent 를 가하여 96 well plate에서 암 상태에서 10 min 동안 반응시킨 후, ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>;Sigma-Aldrich,USA)와 비교하였다.

NO생성저해능(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

## 2.7. 균주 배양

항균 실험에 사용한 균주는 피부 상재균 중 염증을 유발하는 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes*를 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Korea)에서 구입하여 계대 배양하여 사용하였다. 균주 배양을 위한 배지는 *S.*

*aureus*와 *S. epidermidis*는 각각 nutrient broth (Becton, Dickinson and Company, USA)를 사용하였으며 *P. acnes*의 배지는 reinforced clostridial broth (Becton, Dickinson and Company)를 사용하였다. 마치현 추출물의 항균 활성은 실험균주를 대상으로 disc diffusion assay 으로 측정하였다. 평판배지에 배양된 각 균주를 100 μL씩 도말하였고, 마치현 추출물을 각각 0.5, 1, 5, 10 mg/mL 농도로 40 μL씩 paper disc (diameter 8 mm; Toyo Roshi kaisha, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤, 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 배양 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)의 직경(mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다. 모든 실험 결과는 동일조건으로 3회 이상 반복하여 평균값으로 모든 실험 결과는 평균±표준편차(mean±standard deviation, M±SD)로 표기하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 ANOVA 분석을 적용하였으며 p<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 항산화 측정결과

DPPH 라디칼은 안정한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 항산화력을 검증하는데 사용되는 물질이다. 마치현의 DPPH radical 소거 활성은 추출물의 항산화 활성을 측정 할 수 있으며(13). DPPH가 517 nm에서 특이적인 흡수 band를 갖는 비교적 안정한 free radical의 특성을 이용한다. 마치현 에탄올 추출물을 농도별 (15.5-500 μg/mL)로 DPPH 용액에 첨가하여 free radical 소거 활성 능력을 측정 결과, 마치현 추출물은 소거능이 확인되었다(Figure 1). 대조군으로 사용한 L- ascorbic acid (Sigma-Aldrich,USA)는 62.5%의 농도에서 92%의 라디칼 소거활성이 나타났으며, 마치현 추출물 농도에서 62.5%에서 45.1%로 확인되었다.

Phenolic hydroxyl (OH)기는 단백질과 결합하는 성질을 가지며 항산화 및 항균 효과 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있는데, 총 폴리페놀 함량이 증가할수록 생리활성이 증가하는 것으로 보고되었다(14,15). 총 페놀 함량을 측정하기 위해 마치현 추출물의10-50 μg/mL의 농도로 실험하였다. Tannic acid를 표준물질

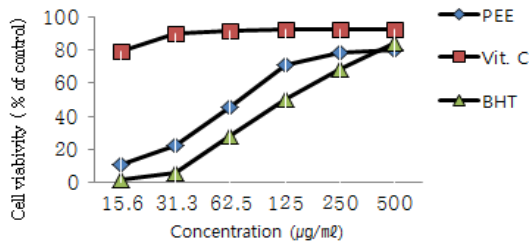


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of the *P. Herba* extracts.

DPPH radical scavenging assays were conducted to investigate the anti-oxidant effects of PEE at different concentrations, respectively. Vit C and BHT were used as comparative material. The concentration-dependent free radical scavenging activity of the PEE was confirmed. Results are expressed as  $M \pm S.D.$  of three independent experiments; \*represents  $p < 0.05$  compared with control, PEE: *P. Herba* 70% ethanol extract; PWE: *P. Herba* water extract;

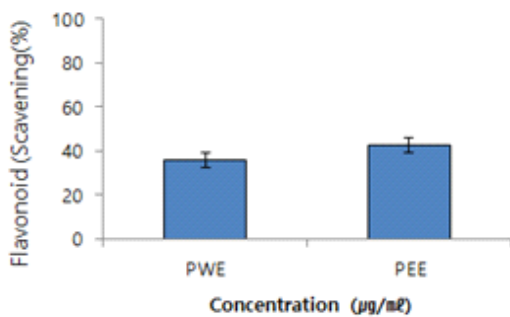


Fig. 2. Change of total flavonoid of *P. Herba* extract.

The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments Change of total polyphenol of *Psidium guajava* leaf extract. PWE: Water, PEE: ethanol. \*represents  $p < 0.05$  compared with control, PEE: *P. Herba* 70% ethanol extract; PWE: *P. Herba* water extract;

로 환산하여 마치현 추출물의 1 mg/mL의 총 페놀의 함량은 89.46, 131.00  $\mu\text{g/mL}$ 이었으며 농도 의존적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 또한 마치현 추출물의 총 플라보노이드는 Naringin를 표준물질로 사용하였고, 마치현 추출물의 1 mg/mL의 총 플라보노이드의 함량은 84.94, 113.27  $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며 농도 의존적으로 증가하는 양상을 나타내었다(Figure 2. 3).

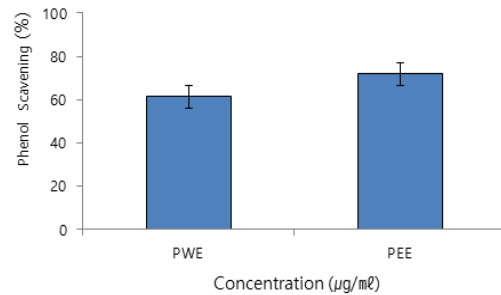


Fig. 3. Change of total Phenol of *P. Herba* extract.

The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*represents  $p < 0.05$  compared with control, PEE, *P. Herba* 70% ethanol extract; PWE, *P. Herba* water extract;

### 3.2. 마치현 추출물의 HaCaT 세포에 미치는 영향

세포 생존율은 마치현 추출물을 HaCaT 세포에서 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마치현 추출물을 5-200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고, 24 h 배양하여 MTT assay를 진행한 결과 마치현 추출물 5-200  $\mu\text{g/mL}$  농도범위에서 90% 이상의 생존율을 나타냈으며, 마치현 추출물 200  $\mu\text{g/mL}$  농도 범위에서 세포독성을 보이지 않았다. 따라서 마치현 추출물 5-200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 HaCaT 세포주 측정 시 세포 사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 분석되었다(Figure 4).

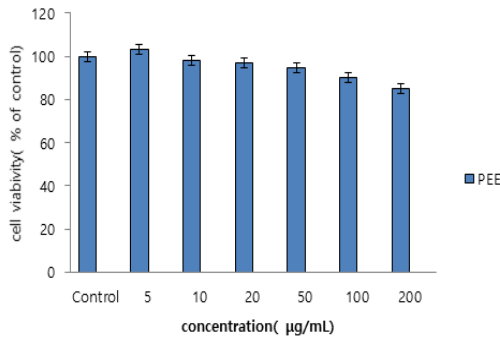


Fig. 4. Effects of the *P. Herba* extracts on the cell viability of HaCaT cells.

Cells were incubated with *P. Herba* extracts for 24 h and cell viability was measured by MTT assay. In the result, cell viability was 90% or higher up decreased by 3% at 100 µg/mL. \*represents  $p < 0.05$  iation ( $M \pm S.D.$ ) of the three independent experiments compared with control. PEE: 70% ethanol extract MTT; thiazolyl blue tetrazolium bromide.

$H_2O_2$ 는 산화적 스트레스를 유발시키는 물질로서 *in vitro* 실험에서 독성 유발 물질로 자주 이용된다(16). HaCaT 세포에  $H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유발시켜 마치현 에탄올 추출물에 대한 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 처리하지 않은 실험군은 100% 세포 생존율을 나타냈다. 마치현 추출물의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 높게 나타났으며, 마치현 에탄올 추출물의 경우 5-100 µg/mL의 농도에서 각각 50.22, 57.53, 65.14, 68.11, 83.19% 생존율을 나타내어 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다, 100 µg/mL에서는 약 83%의 세포 보호 효과가 확인되었다. (Figure 5).

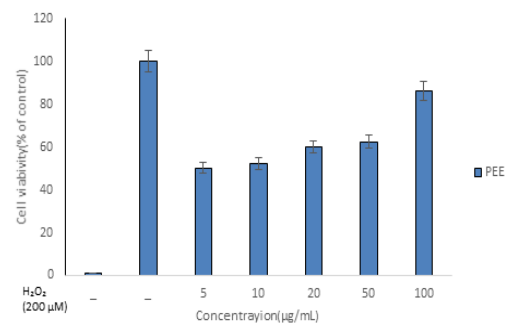


Fig. 5. Protective effect of the *P. Herba* extracts against oxidative stress induced by  $H_2O_2$  in HaCaT cells.

Cells were incubated with *P. Herba* extracts for 2 h followed by treatment with 200 µM  $H_2O_2$  for 24 h and cell viability was measured by MTT assay. Results are represented as  $M \pm S.D.$  of the three independent experiments. \*represents  $p < 0.05$  compared with control. PEE: *P. Herba* 70% ethanol extract.

### 3.3. 마치현 추출물의 항 알레르기 활성

비만세포는 천식, 비염, 아토피 피부염 등의 알레르기 질환 발생에 중요한 역할을 한다(17). RBL-2H3 세포의 생존율에 마치현 에탄올 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였으며, 항원과 항체가 비만세포에 반응하여 세포내에서 외부로 분비되는 히스타민(histamine), 프로스타글란딘(prostaglandin) 등의 과립의 양을 측정하여 항 알레르기 효과를 확인하기 위한 방법이다(18). 이의 결과 마치현 에탄올 추출물 20 µg/mL 이하에서는 유의할만한 세포독성을 보이지 않았으며(Figure 6). 마치현 에탄올 추출물 5-50 µg/mL 농도에서  $\beta$ -hexosaminidase 분비 측정 시 세포 사멸에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

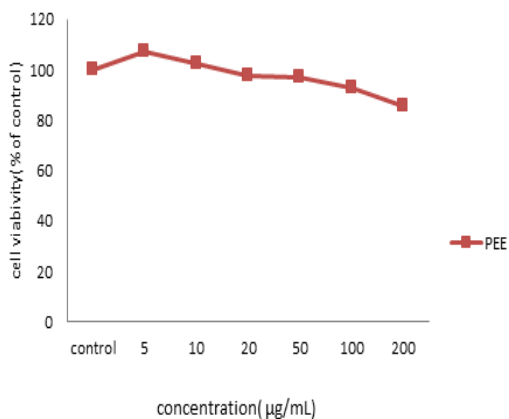


Fig. 6. Effects of the *P. Herba* extracts on the cell viability of RBL-2H3 cells. Cells were incubated with *P. Herba* for 24 h and cell viability was measured by MTT assay. In the result, cell viability was 90% or higher up at concentrations. Results are represented as M±S.D. of the three independent experiments. PEE, *P. Herba* 70% ethanol extract; Control, untreated group; MTT; thiazolyl blue tetrazolium bromide

본 연구에서는 세포 외로 분비된  $\beta$ -hexosaminidase 분비량을 측정하여 마치현 추출물의 항 알레르기 효능을 확인하였다. 에탄올 추출물의 처리 농도는 세포 생존율 측정 결과에 따라 세포에 영향을 미치지 않는 농도인 5-50  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였다. Anti-DNP IgE와 HSA에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 분비된 탈과립의 양을 100%로 보았을 때 에탄올 추출물을 5-50  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때 항원과 항체에 의해 활성화된 세포를 기준으로 마치현 추출물은 50, 43, 35, 32,27% 억제율을 나타내었다. 마치현 추출물의 농도가 높아질수록  $\beta$ -hexosaminidase 방출에 대한 억제효과도 향상되었다(Figure 7).

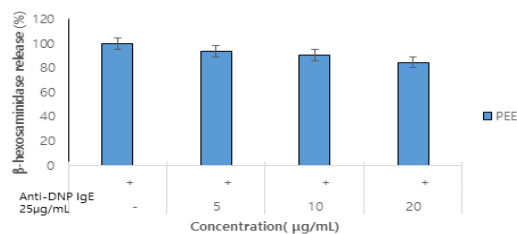


Fig. 7. Inhibitory effects of *P. Herba* extracts on the  $\beta$ -hexosaminidase release in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells.

$\beta$ -Hexosaminidase release in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells was measured to investigate the inhibition effects of *P. Herba* extracts at different concentrations, respectively. Results are represented as M±S.D. of the three independent experiments. \*represents  $p < 0.05$  compared with control. PEE: *P. Herba* 70% ethanol extract.

### 3.4. 마치현 추출물의 항염 효과

마치현 추출물을 각각 1-200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 Raw 264.7 세포에 처리하여 MTT assay를 진행한 결과(Figure 6), 마치현 추출물은 50  $\mu\text{g/mL}$  이하 농도범위에서 90% 이상의 생존율이 확인되었으므로 마치현 추출물 50  $\mu\text{g/mL}$  농도 범위에서 유의할만한 세포독성을 나타나지 않았다. 마치현 추출물은 20  $\mu\text{g/mL}$ 에서 2.47% 감소하였고, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 6.31%의 NO 생성 억제율을 나타내었다. 따라서 마치현 에탄올 추출물 1-200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제함으로써 항염증 효과가 세포사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

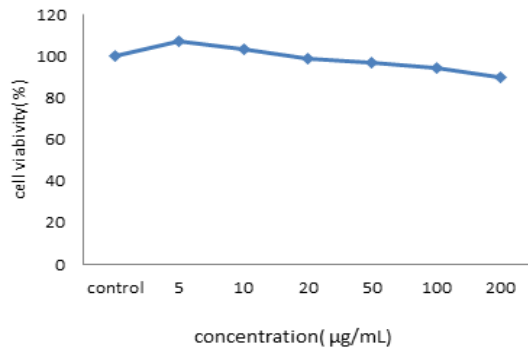


Fig. 8. Effects of *P. Herba* extracts on the cell viability of RAW 264.7 cells.

Cells were incubated with *P. Herba* extracts 1–200 µg/mL for 24 h. Results are represented as M±S. D. of the three independent experiments. \*represents p < 0.05 compared with control. PEE: 70% ethanol extraction; Control, untreated group.

활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성억제 저해능 19)에 대한 마치현 추출물의 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주어 실험하였다. 마치현 추출물의 처리 농도는 세포 생존을 측정 결과에 따라 세포에 영향을 미치지 않는 농도인 1–100 µg/mL로 처리하였다. LPS (1 µg/mL) 처리 후 NO의 생성량은 약 20배 이상 증가되었다. 생성된 NO 양은 griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 측정하였으며, 마치현 에탄올 추출물은 1, 50 100 µg/mL로 측정되어 농도 의존적이고 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제함으로써 항염증 효과가 있음을 확인하였다(Figure 9).

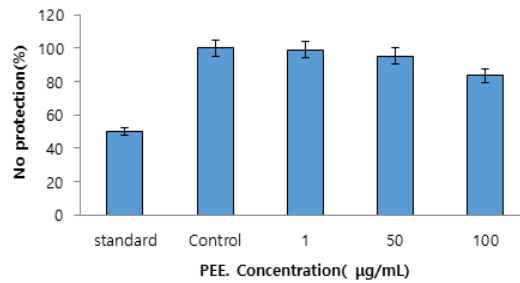


Fig. 9. Effects of *P. Herba* extracts on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Cells were treated with different concentrations of the *P. Herba* extracts for 1 h, and stimulated with or without 1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. The nitric oxide (NO) concentration in the medium was determined by griess reagent. Results are represented as M±S.D. of the three independent experiments.

### 3.5. 항균력 분석

화장품은 물과 고분자성 지질로 구성되어 세균 및 진균에 탄소원과 질소원은 미생물의 영양원으로 이용 될 수 있기 때문에 미생물에 오염되기 쉽다20). 여드름의 치료에 주로 사용되는 항생제는 오랜 기간 사용할 경우 내성이 생겨 치료효과가 떨어질 수 있다21). 따라서 피부염을 일으키는 그람양성균인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes*를 paper disc 방법으로 마치현 추출물을 농도별로 처리한 결과, *S. aureus*에서 10 mg/mL 최대농도에서 각각 14, 13 mm의 clear zone을 형성하였으며, *S. epidermidis*에서도 10 mg/mL

Table 1. Antibacterial activities and Minimum inhibitory concentrations (MIC) of ethanol extract from *Portulaca oleracea*

Bacteria	Inhibition Zone Diameter (mm)								
	10(mg/ml )		5(mg/ml )		1(mg/ml )		0.5(mg/ml )		Control
	PEE	PWE	PEE	PWE	PEE	PWE	PEE	PWE	Ethanol
<i>S. epidermidis</i>	15	14	13	11	11	11	10	10	-
<i>S. aureus</i>	15	13	14	13	12	10	10	-1)	-
<i>P. acnes</i>	16	15	14	13	13	11	10	10	-

1) No growth



최대농도에서 각각 15, 14 mm clear zone을 형성하여 높은 항균 활성을 나타내었다. *P. acnes*에서 10 mg/mL 최대 농도로 각 16,13 mm로 농도 의존적으로 clear zone을 형성하여 항균활성을 확인하였다.

#### 4. 결론

본 연구는 마치현(*Portulacae Herba*)의 활성효능을 확인하여 생리활성 소재로서 응용가능성을 검증하였다. DPPH radical 소거능을 확인결과 62.5  $\mu$ g/mL의 농도에서 45.1%의 소거능이 확인되었다. 마치현의 총 폴리페놀 함량은 131.00  $\mu$ g/mL 이고, 총 플라보노이드 측정 결과 115.27  $\mu$ g/mL 로 증가하는 양상을 나타내었다. 세포 생존을 측정은 농도에 따라 RAW 264.7, HaCaT cell 에 처리한 결과, 세포 독성이 나타나지 않았고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 마치현 추출물의 HaCaT 세포의 보호효과, 항염 효능 등은,  $\beta$ -hexosaminidase를 측정하여 항 알레르기 억제능을 확인하였으며, 마치현 추출물의 항 알레르기 효능 확인결과 최대 35% 억제율을 나타내었다.

마치현 추출물이 HaCaT 세포에 미치는 영향이 100  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서는 90% 이상의 생존율이 확인되었고, 200  $\mu$ M의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스로 세포 생존율을 측정은 HaCaT 세포의 보호 효과가 확인되었다.

Raw 264.7 세포에 독성을 미치지 않은 50  $\mu$ g/mL 이하의 농도로 NO 생성억제 측정 결과, 항염증은 50  $\mu$ g/mL에서 94.69%의 NO 생성율이 나타났으며, 마치현 추출물은 측정 농도 범위 내에서 NO 생성이 감소하였다.

또한 피부염을 일으키는 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes*를 선별하여 paper disc방법으로 측정결과, *P. acnes* 균에서 가장 우수한 항균 활성이 나타났고 사멸 효과가 확인되었다. 이상의 결과를 통해 마치현 추출물은 항 알레르기 활성 및 항염 효과, 여드름, 아토피 피부염과 관련된 균에 대한 항균 효능이 확인되어 마치현 추출물은 항산화, 항염, 항균 및 생리활성 등 활성물질로서의 가치가 있는 것으로 사료된다.

#### References

1. B. H. Lee, D. S. Baik, S. U. Yun, J. M. Shin, J. H. Kim, S. Y. Yun, B. H. Kim, S. B. Kim, J. E. Shin, I. H. Song. "Peripheral nitric oxide activity in patients with liver cirrhosis". *The Korean Journal of Medicine*, Vol.73, PP251-257, (2007)
2. I. K. Hong, E. J. Kim, J. H. Seok, B. H. Kim, J. D. Jang, G. J. Joe, S. W. Choi. "Effects of *Eucommia ulmoides* Oliver extract on inhibition of  $\beta$ -hexosaminidase and keratinocyte differentiation". *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.40: PP21-28, (2014).
3. H. K. Bae, S. H. You. "Biological activity study on anti-oxidant, whitening, and anti-inflammatory effects of *Astragalus membranaceus* ethanol extracts and bioconversion extracts". Vol.15: PP489-499, (2017)
4. S. R. Park, J. W. Han, J. Y. Kang, K. J. Kil, J. H. Yoo. "Antioxidant Activities of Hot Water and Ethanol Extracts from *Portulacae Herba*", *The Korea journal of herbology* Vol.32, No.4, PP38-47, (2017)
5. S. W. Seo. "The anti-inflammatory effect of *Portulaca oleracea* 70% EtOH Extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7cells", *The Korea Journal of Herbology*. 2015. Vol.30(6). PP33-38, (2015)
6. H. J. Kim, J. Y. Bae, H. N. Jang, S. N. Park. "Comparative study on the antimicrobial activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts with various countries of origin as natural antiseptics". *Microbiology and Biotechnology Letters*, Vol.41: PP358-366, (2013)
7. O. Folin, W. Denis. "A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine". *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.22: PP305-308, (1915).

8. T. Swain, W. E. Hillis. "The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.: the quantitative analysis of phenolic constituents". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.10: PP63-68, (1959).
9. M. S. Blois. "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". *Nature*, Vol.181: PP1199-1200, (1958)
10. T. Mosmann. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, 65: PP55-63, (1983).
11. E. A. O'Toole, M. Goel, D. T. "Woodley. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. *Dermatologic Surgery*", Vol.22, PP 525-529, (1996).
12. H. J. Lee, G. J. Kang, W. J. Yoon, H. K. Kang, Y. S. Kim, S. M. Kim, E. S. Yoo. "Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW 264.7 and HaCaT cells". *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.37: PP74-80, (2006).
13. J. H. Hong. "Physiological activities of leaf and twig extracts from *Lindera obtusiloba* Blume". *Korean Journal of Food and Cookery Science*, Vol.29: PP573-580, (2013).
14. E. G. Han, J. Y. Lee, E. J. Jeong, Y. X. J in, C. K .Chung. "Antioxidative activities of water extracts from different parts of *Taraxacum officinale*". *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.39: PP1580-1586, (2010)
15. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. Yu, M. Y. Kim, S, Lee, B. H. Lee. "Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants". *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.44: PP337-342, (2012).
16. B. O. Cho, C. W. Lee, Y. So, C. H. Jin, H. S. Yook, M. W. Byun, Y. W. Jeong, J. C. Park, I. Y. Jeong. "Protective effect of radiation-induced new blackberry mutant  $\gamma$ -B201 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells". *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.46: PP384-389, (2014).
17. E. M. Jung, J. W. Kim, M. J. Park, S. S. Lee, D. H. Choi, J. Lee, E. B. Jeung. "Inhibitory effect of extracts from *Rhododendron brachycarpum* and *Abies koreana* E.H. Wilson on degranulation and cytokine expression in RBL-2H3 cells". *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, Vol.41: 551-558, (2013)
18. I. K. Hong, E. J. Kim, J. H. Seok, B. H. Kim, J. D. Jang, G. J. Joe, S. W. Choi. "Effects of *Eucommia ulmoides* Oliver extract on inhibition of  $\beta$ -hexosaminidase and keratinocyte differentiation". *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.40: PP21-28, (2014).
19. H. J. Lee, G. J. Kang, W. J. Yoon, H. K. Kang, Y. S. Kim, S. M. Kim, E. S. Yoo. "Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW 264.7 and HaCaT cells". *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.37: PP74-80, (2006).
- 20) K. H. Lee, K. H. Rhee. "Anti-inflammatory effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model". *The Korean Journal of Food and Nutrition*, 23: PP435-439, (2010).
21. M. Y. Lee, M. S. Yoo, Y. J. Whang, Y. J. Jin, M. H. Hong, Y. H. Pyo. "Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels". *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.44: PP540-544, (2012).