

Lipopolysaccharide로 유도된 RAW 264.7 cells에서 동규자 오일의 항염증 효과

오성화¹ · 최수연¹ · 이상화² · 김동석³ · 박성민^{1*}

¹㈜뉴메디온 기술연구소, ²서원대학교 친환경 바이오 소재 및 식품 센터, ³서원대학교 외식산업학과

The Anti-inflammatory Effects of *Malva verticillata* L. Oil Induced by Lipopolysaccharide with RAW 264.7 cells

Seong-Hwa Oh¹, Soo-Yeon Choi¹, Sang-Hwa Lee², Dong-Seok Kim³ and Sung-Min Park^{1*}

¹R&D Center, NewMedion Corporation, Wolgok-Ri, Cheongwon-Gun 363-792, Korea

²Department of Food Service Industry, and Bio Organic Material and Food Center,
Seowon University, Cheongju-city 361-742, Korea

³Department of Food Service Industry, Seowon University, Cheongju-city 361-742, Korea

Abstract – Atopic dermatitis (AD) were caused by localized hypersensitivity reaction to an allergen. Therefore, to reduce inflammatory response of AD had been developed that natural extracts and oils with anti-inflammatory activities. This study were investigated that anti-inflammatory effects of *Malva verticillata* L. oil induced by LPS with RAW 264.7 cells. We measured to production of NO and expression of COX-2, iNOS, TNF- α by RT-PCR. The *Malva verticillata* L. oil had decreased the production of NO ($p < 0.05$) and the mRNA level of iNOS in concentration dose dependent manner. In conclusion, this study have shown here may be of help to understand the action mechanism of the anti-inflammatory and we hope that *Malva verticillata* L. oil used in skin diseases such as AD.

Key words – *Malva verticillata* L., Natural oil, Anti-inflammatory, iNOS, Nitric Oxide

현재 지구상에는 약 80,000여 개의 화학물질들이 상업적으로 사용되고 있고, 사용량과 그 수가 날로 증가 하고 있는 추세이다. 이러한 화학물질의 사용증가로 인해 삶의 질이 많이 향상 되었으나, 이로 인해 아토피와 같은 면역 및 알레르기성 질환관련 환자의 수가 날로 증가하고 있는 실정이다. 이와 관련하여 화학물질의 사용을 배제하거나 함량을 조절하려는 움직임이 있으나 이 또한 쉽지 않은 게 현실이다. 많은 연구자들이 면역학적인 문제에 항히스타민제, 스테로이드제와 같은 항염 관련물질을 치료제로 사용 하고 있으나, 반복적으로 사용하였을 때 내성의 문제점, 피부의 부작용 등의 문제점들이 보고 되고 있다.^{1,2)}

면역학적 질환들의 대부분은 어린이들에게서 소양감과 건조증 등의 아토피 병변으로 발생하는데, 특히 심한 소양감으로 인해 병변을 반복적으로 긁게 하여 찰상과 태선화 등의 2차 오염을 일으키면서 질환을 더 악화시키게 된다.³⁾

일반적으로 아토피 질환의 원인은 T림프구의 면역학적 이상이나 백혈구의 비면역학적 이상으로 추정되어진다.⁴⁾

면역학적 반응으로 T림프구 외에 대식세포 역시 관여한다. 대식세포(macrophage)는 병원체에 반응을 하여 염증반응이 일으키는데, Tumor necrotic factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 전염증성 cytokine (pro-inflammatory cytokine)을 생성한다. 또는 Inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되는 Nitric oxide (NO)와 Cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 생성되는 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증유발인자들이 생성된다.⁵⁻⁸⁾

LPS에 의한 자극으로 대식세포에서 분비되는 다량의 TNF- α 는 대식세포와 호중구를 활성화시켜 산화제, 단백질 분해 효소, IL-1 및 IL-6등을 분비하게 하며, 혈관 내피세포의 투과성을 증가시켜 부종을 조장하고 항응고 작용을 일으키는 문제점이 보고되어 있다.⁹⁻¹³⁾

최근에 많은 연구자들이 아토피 개선의 목적으로 소양감 개선이나 염증 개선, 부종 억제 및 피부 보습 등에 초점을

*교신저자 (E-mail): moon@newmedion.com
(Tel): +82-43-238-4400

맞춰 연구를 진행하고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾

우선, 피부보습의 문제점을 해결하기 위해 히알루론산, 베타-글루칸, 세라마이드 및 콘드로이친 설페이트와 같은 보습제를 이용하거나 천연오일을 이용하는 연구가 진행되어 왔다. 염증 문제를 해결하기 위해 항염효과를 갖는 천연물과 천연오일에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 특히, 아로마 에센셜 오일의 항염효과에 대해 많은 연구가 진행되었는데, 지구상에 약 300여종의 오일이 인체에 사용 가능한 것으로 알려져 있다. 어떠한 천연오일들이 효과가 있는지 구체적인 연구가 진행되지는 못하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 따라서 천연오일에 대한 연구는 피부 보습과 항염효과를 동시에 해결할 수 있기 때문에 많은 관심이 집중되고 있는 실정이다.

한편 본 연구에 사용된 동규자(*Malva verticillata* L.)는 아욱과에 속한 1년생 풀인 아욱의 종자로, 맛이 달고 찬 성질이며 단백질과 지방이 많다. 장을 부드럽게 하여 배변활동에 도움을 주며 모유를 잘 나오도록 하는 효능이 있다.^{20,21)} 한방에서 동규자는 분비나 배설을 원활하게 하는 약재로 사용한다. 최근의 연구에 따르면 동규자의 잎인 동규엽에는 항염성분이 있으며 면역기능증강효능 및 저혈당증 해소 등에 대한 효과도 보고된 바 있다.^{22,23)} 그러나 동규자 오일에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 동규자를 이용하여 천연 오일을 비화학적 방법으로 추출하여 오일(M.V. oil)을 제조하였고, 이에 대한 항염효능 평가를 실시함으로써 아토피 및 피부염의 증상완화에 도움을 주는 오일을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 – Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (PS), phosphate buffered saline (PBS)는 WelGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였고, Ham's Nutrient Mixture F-12 (F-12), Trypsin-EDTA는 Gibco (BRL, Rockville, MD)에서 구입하였다. Trypan blue는 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Trizol은 invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO), MeOH, EtOH, chloroform, isopropanol, Agarose, Ethidiumbromide (EtBr), Tris은 DAEJUNG (Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다.

동규자오일(M.V. oil) 추출 – 시료는 건조된 동규자(아욱의 종자, *Malva verticillata* L.), 500 g을 초고압 장치(TFS-10L, TOYO KOATSU Co., LTD, Tokyo, Japan)를 이용하여 최적 조건으로 선택한 60°C, 100 MPa의 압력을 이용하여 24시간 동안 전 처리한 후, 착유기(Oil LOVE, NATIONAL ENG CO., LRD, Seoul, Korea)로 착유하여 400 mesh에 여과하였다.

오일의 산가 변화 측정 – 산가는 AOCS 방법(AOCS Official Method Cd 3a-63)을 참고하여 측정하였다.²¹⁾

유지시료 5 ml에 50 ml의 유기용매를 넣은 후 충분히 용해시키고, 2~3방울의 지시약 1% phenolphthalein 용액을 첨가하여 0.1 N-KOH 용액으로 적정하였다. 옅은 분홍색을 띠는 지점을 종말점으로 하였다.

세포 배양 – 생쥐대식세포(mouse macrophage, RAW 264.7)을 사용 하였다. RAW 264.7 cells는 ACTT (Manassas, VA)에서 구매하여 10% FBS가 첨가된 DMEM을 이용하여 배양하였다. 배양된 세포는 phosphate buffer saline 완충 용액(0.1 M PBS, pH 7.4)을 이용하여 3회 세척하였다. Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 culture dish 바닥에서 완전히 떼어내었다. 10% FBS가 첨가된 배지 10 ml에 세포 부유액을 약 10 µl를 취하여 동량의 trypan blue와 혼합한 후 약 10 µl를 취하여 Hemocytometer에 200배의 배율로 세포 수를 계수하였다. 세포 수는 보통 10회를 반복하여 헤아린 다음 평균값으로 계산하였다. 각 세포들은 37°C, 5% CO₂, full humidity 조건으로 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정 – RAW 264.7 cells를 5×10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 안정화 시켰다. M.V. oil을 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm의 농도로 각각 처리하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용해 세포 독성의 유무를 확인 하기 위해 24시간 뒤에 MTT solution을 처리하였다. 2시간 뒤에 시료를 제거한 후, DMSO 150 µl를 각 well 마다 첨가하여 형성된 formazan을 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정, 분석하였다.

RT-PCR을 이용한 염증 유전자 확인 – RAW 264.7 cells를 3×10⁵ cells/well의 농도로 35 mm culture dish에 접종하였다. 10 µg/ml의 농도로 LPS를 처리하고 동시에 M.V. oil를 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm의 농도로 처리하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고, Trizol을 이용해 RNA isolation 하였다(the manufacturer's instruction을 참고). RNA isolation 후 충분히 건조시키고 diethylpyrocarbonate (DEPC) treated water로 re-dissolve하였다. BioRad iScript cDNA Synthesis Kits (Hercules, CA)를 이용해 cDNA를 합성하였다. Primer는 NCB에서 확인 후 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 주문 제작하였고, Table I에 나타내었다. Taq-polymerase (Geneall, Seoul, Korea)로 유전자증폭을 실시하였고, denaturation 95°C, elongation 72°C에서 진행하였다. 생산물은 2% agarose gel에서 전기영동 하였고, EtBr로 염색하여 GelDoc (Vilber Lourmat, France and Delta2d, Decodon, Germany)확인하였다.

자료 분석 및 통계처리 – 각각의 실험은 통계를 위해서 3번 이상 수행하였고, Graphpad prism으로 통계분석 하였다.

Table I. Primer sequence of inflammatory gene

Gene		Sequence	Length	Product size (bp)	NCBI ID
TNF- α	forward	3'- TACCTTGCTACTCCCAGGTTCTCTTC -5'	27	302	NM_013693.2
	reverse	3'- AGAGCAATGACTCCAAAGTAGACCTG -5'	26		
iNOS	forward	3'- TAGTTTCCAGAAGCAGAATGTGACC -5'	25	284	NM_010927.3
	reverse	3'- CCAAGACTCTAAATCGGATCTCTCTC -5'	26		
GAPDH	forward	3'- TCAAGCTCATTTCCTGGTATGACA -5'	20	223	NM_008084.2
	reverse	3'- TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTAC -5'	20		

결과 및 고찰

오일의 산가 변화 – 오일은 열이 가해지거나 공기에 노출 또는 시간이 오래 지나면 자연스럽게 산화된다. 이것을 산패(rancidity)라고 하는데 이는 불포화 지방산의 이중결합이 끊어지면서 생기는 현상으로 alcohol, hyperoxide, free fatty acid, carbonyl 및 thiobarbituric acid가 형성 되면서, 불쾌한 냄새와 맛이 난다. 산패된 오일의 지방 성분인 hyperoxide는 생체 내에서 DNA의 손상을 유발 시키며, 노화를 촉진하고, 활성산소를 발생시켜 암이나 백혈병, 심장병, 동맥경화, 고혈압이나 아토피성 피부염을 일으키며 각종 면역계 질환의 원인이 된다. 따라서 산가 변화는 오일의 안정도에 매우 중요한 요인이다.²²⁾

오일의 산가 변화에 대한 측정 결과 M.V. oil은 0.03이하로 기준에 알려진 olive oil(산가 1이하)과 비교하였을 때 매우 우수한 산가를 확인하여 안정성이 매우 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

세포 독성 – MTT assay를 통한 M.V. oil의 농도에 따른 세포 독성을 확인한 결과 최대 250 ppm 농도까지 세포 독성이 일어나지 않았음을 확인하였다. 이로써 M.V. oil은 세포에 매우 안전한 것으로 여겨진다.

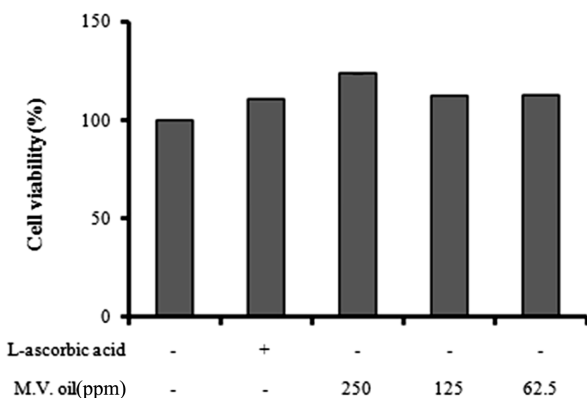
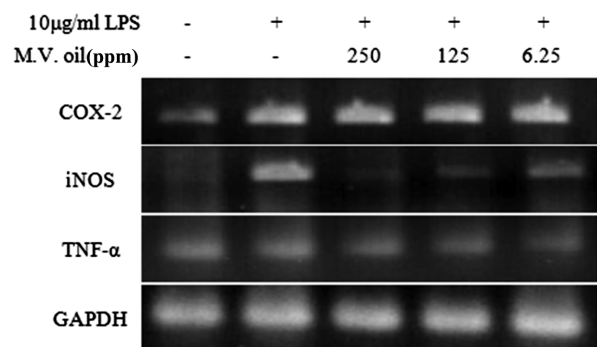


Fig. 1. Cells cytotoxicity of M.V. oils in RAW 264.7 cells. The cells were evaluated toxicity of M.V. oil at dependant of concentration.

RT-PCR을 이용한 염증 사이토카인 발현 억제 효과 – 외부의 요인으로 인해 염증반응을 일으키는 면역글로불린 외에 대식세포 역시 면역에 있어서 중요한 세포이다. 내독소인 LPS에 의해 염증 반응을 일으키는데 이를 이용하여 세포단계에서 항염증 실험을 실시한다. 생쥐의 대식세포인 RAW 264.7 cells에 내독소인 LPS를 10 μ g/ml 농도로 처리하여 염증매커니즘을 유도 시켜 염증매개 사이토카인인 TNF- α 와 iNOS의 발현을 증가 시키고, 각 농도의 M.V. oil

A



B

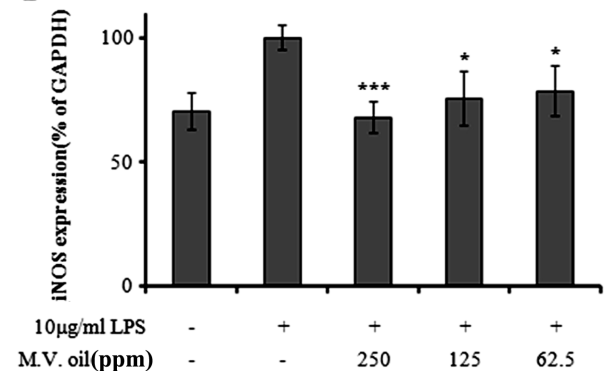


Fig. 2. M.V. oils were evaluated to expressed pro-inflammatory cytokine by RT-PCR. The result were demonstrated expression of pro-inflammatory cytokines with M.V. oil. The images were presented that PCR products were performed gel-electrophoresis (A). The graph was quantified band of iNOS cytokine expression (B). (* p <0.05, *** p <0.005, compared to LPS)

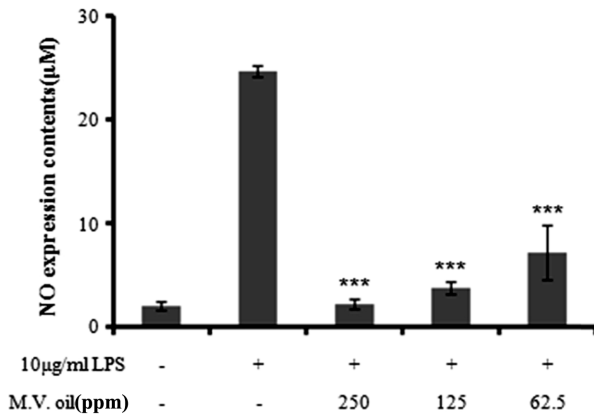


Fig. 3. M.V. oils were measured NO expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were induced NO contents by LPS. NO contents were evaluated by Greiss agents and measured absorbance at 405 nm. (***) $p < 0.005$, compared to LPS)

을 처리하여 사이토카인이 억제되는 정도를 확인하였다.

Fig. 2에서는 M.V. oil을 각 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm의 농도로 처리하여, 각각 RNA를 추출하여 mRNA 수준에서 COX-2, iNOS, TNF- α 의 발현량을 RT-PCR로 비교하였다. 모든 실험 군은 house keep gene인 GAPDH로 비교 정량한 결과 동규자의 iNOS 발현을 현저하게 억제했음을 확인할 수 있었다. 밴드의 정량을 수행한 결과 250 ppm 농도의 M.V. oil에서 LPS에 의해서 유도된 iNOS 발현을 control에 비해 약 32%의 억제율을 확인 하였다. 반면 염증 관련 사이토카인인 COX-2와 TNF- α 의 발현량의 차이는 없었다. M.V. oil은 COX-2와 TNF- α 의 발현을 조절하지는 못하나 iNOS의 발현량을 조절함으로써 염증반응에 관여하여 항염효능을 지니는 것으로 사료된다.

M.V. oil의 Nitric Oxide 발현 억제 효과 – RAW 264.7 cells은 mouse의 대식세포로서 내독소인 LPS의 처리 후 일차적인 반응으로 NO를 생성하게 된다. NO를 생성함으로써 염증의 다음 반응들이 순차적으로 일어나게 된다. NO의 생성을 유도시킨 후 M.V. oil을 처리하여 NO의 생성량을 측정하였다. Fig. 3에서 10 µg/ml LPS만 처리하였을 때의 NO의 양에 비해 M.V. oil을 같이 처리하였을 때 125 ppm의 농도일 때 NO가 최대 91.13%까지 저해 효과가 있는 것으로 확인 하였다.

결 론

동규자는 아욱의 종자로 오일에 대한 효능연구, 특히 항염효과에 대한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구에서, M.V. oil을 초고압으로 전처리하여 착유한 것으로 250 ppm 농도까지 세포의 독성이 나타나지 않았으며, 염증을 유발하는 사이토카인 중 iNOS의 발현량을 mRNA level에서 약 32%

억제시켰으며, NO의 발현량을 91.13%까지 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. M.V. oil은 염증을 유발하는 다양한 사이토카인중 NO와 iNOS을 조절하는 메커니즘으로 항염 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 M.V. oil은 항염 효과를 갖는 천연오일로 염증성 피부질환에 사용할 만한 소재로 여겨진다.

사 사

본 연구의 산업통상자원부의 서원대학교 친환경 바이오 소재 및 식품 지역혁신센터(RIC) 2012년 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Ha, J. S., Jung, H. J., Byun, H. J., Yoon, C. S., Kim, Y. H., Oh, I. B., Lee, J. H. and Ha, K. C. (2011) Evaluation of Atopy and Its Possible Association with Indoor Bioaerosol Concentrations and Other Factors at the Residence of Children. *J. Environ Health Sci.* **37**: 406-417.
- Ponvert, C. (2012) Allergic and non-allergic hypersensitivity to non-opioid analgesics, antipyretics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children: epidemiology, clinical aspects, pathophysiology, diagnosis and prevention. *Arch. Pediatr.* **19**: 556-560.
- Hunziker, T. (1997) Atopic dermatitis. *Schweiz Med Wochenschr.* **127**: 390-394.
- Hanifin, J. M. and Chan, S. (1988) Biochemical and immunologic mechanisms in atopic dermatitis: new targets for emerging therapies. *J. Am. Acad. Dermatol.* **41**: 72-77.
- Han, S. and Lee, J. H. (2013) Capillarisin inhibits iNOS, COX-2 expression, and proinflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophages via the suppression of ERK, JNK, and NF-kappaB activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **35**: 34-42.
- Neuman, M. G. and Nanau, R. M. (2011) *In vitro* anti-inflammatory effects of hyaluronic acid in ethanol-induced damage in skin cells. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **14**: 425-437.
- Shao, D. Z. and Lin, M. (2008) Platonin inhibits LPS-induced NF-kappaB by preventing activation of Akt and IKKbeta in human PBMC. *Inflamm. Res.* **57**: 601-606.
- Song, C. and Zhang, Y. (2013) Acute and subacute IL-1beta administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J. Neuroinflammation* **10**: 59.
- Tsai, M. L. and Lin, C. C. (2011) Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Biosci Biotechnol. Biochem.* **75**: 1977-1983.
- Yoon, W. J. and Kim, S. S. (2009) Abies koreana essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and LPS-

- induced inflammatory effects of murine macrophage. *Lipids* **44**: 471-476.
11. Yoon, W. J. and Kim, S. S. (2009) Cryptomeria japonica essential oil inhibits the growth of drug-resistant skin pathogens and LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Pol. J. Microbiol.* **58**: 61-68.
 12. Lee, D. H., Sohn, D. S., Cho, D. Y., Kim, Y. Y. and Kim, Y. H. (2010) Anti-inflammatory and Anti-oxidant Effects of Sophora flavescens Root Extraction in Lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 Cells. *Kor. J. Med. Mycol.* **15**: 39-50.
 13. Kwak, J. H. and Kim, I. H. (1974) Studies on the Anti-inflammatory Activity of Caragana chamlagu Roots. *Kor. J. Pharmacogn.* **5**: 179-184.
 14. Umezu, T. (2012) Evaluation of the effects of plant-derived essential oils on central nervous system function using discrete shuttle-type conditioned avoidance response in mice. *Phytother. Res.* **26**: 884-891.
 15. Warnke, P. H. and Becker, S. T. (2009) The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **37**: 392-397.
 16. Lim, H. S., Kim, J. H., Ha, H. K., Seo, C. S. and Shin, H. K. (2012) Comparative Study of the Anti-inflammatory Effects of Menthae Herba from Korea and China. *Kor J Pharmacogn.* **43**: 231-238.
 17. Jaenson, T. G. and Garbouli, S. (2006) Repellency of oils of lemon eucalyptus, geranium, and lavender and the mosquito repellent MyggA natural to Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. *J. Med. Entomol.* **43**: 731-736.
 18. Minaian, M. and Ghannadi, A. R. (2011) Effects of extract and essential oil of Rosmarinus officinalis L. on TNBS-induced colitis in rats. *Res. Pharm. Sci.* **6**: 13-21.
 19. Szabo, M. A. and Varga, G. Z. (2011) Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytother. Res.* **24**: 782-786.
 20. Choi, J. W., Seong, N. S. and Lee, Y. J. (2006) Effects of Malvae Semen and Abutili Semen on Anti-oxidation Activities. *The Korea Journal of Herbology* **21**: 159-170.
 21. Seo, B. I. (2012) A philological study on poisoning and side effects of Malvae Semen. *The Journal of Heahgan Oriental Medical Academy* **10**: 33-35.
 22. Tomoda, M., Asahara, H., Gonda, R. and Takada, K. (1992) Constituents of the seed of Malva verticillata. VIII. Smith degradation of MVS-VI, the major acidic polysaccharide, and anti-complementary activity of products. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2219-2221.
 23. Shimizu, N., Asahara, H., Tomoda, M., Gonda, R. and Ohara, N. (1991) Constituents of seed of Malva verticillata. VII. Structural features and reticuloendothelial system-potentiating activity of MVS-I, the major neutral polysaccharide. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 2630-2632.
 24. A.O.C.S. Cd 3a-63. (1988) Official Methods and Recommended Practicies of the American Oil Chemists' Society, 3rd Edition.
 25. Kim, W. S. and Lee, S. J. (2000) Studies on the Electrochemical Properties for Rancidity of Linoleic Acid. *Korean J. Food and Nutr.* **13**: 306-364.
- (2014. 2. 25 접수; 2014. 3. 2 심사; 2014. 3. 10 게재확정)