

병풀의 초음파 추출 시 용매에 따른 면역활성 증진 효과

권민철* · 한재건* · 하지혜* · 오성호* · 김 영* · 정향숙* · 최근표** · 황 백*** · 이현용****†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **강원도립대학 식품가공제과제빵과,
전남대학교 생물학과, *강원대학교 생명공학연구소

Immuno-Regulatory Effect on *Centella asiatica* L. Urban Extraction Solvent Associated with Ultrasonification Process

Min Chul Kwon*, Jae Gun Han*, Ji Hye Ha*, Sung Ho Oh*, Ling Jin*, Hyang Suk Jeong*,
Geun Pyo Choi**, Baik Hwang***, and Hyeon Yong Lee****†

*College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon Natl. Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

**Department of Food Processing & Bakery, Gangwon Provincial Univ., Gangneung 210-804, Korea.

***Department of Biology, Chonnam Natl. Univ., Kwangju 520-830, Korea.

****Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon Natl. Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to investigate the increasing of immune activities from *Centella asiatica* L. Urban by several solvent extraction with ultrasonification process. Ethanol extracts at 60 °C and associated with ultrasofication showed more 15% yield than normal 100 °C water extracts. And ethanol extracts showed higher yield than water extraction at each process. It can be concluded that yield due to polarity of compound in *C. asiatica* from HPLC peak. All of extracts from *C. asiatica* revealed lower cytotoxicity than 32%. The ethanol extracts with ultrasofication showed higher promotion on human B and T cell growth, about 10% compared to the control. The secretion of IL-6 and TNF-a was also enhanced as 4.86×10^{-4} pg/cell and 5.73×10^{-4} pg/cell each, by the addition ethanol extracts with ultrasonification to T cell. NK cell activation was improved up to 10% higher than the control, through adding the samples. It can be concluded that the ethanol extracts from *C. asiatica* has higher immune activities followed by ultrasonification process, possibly, by higher yield than conventional extraction process.

Key Words : *Centella asiatica* L. Urban, Immune Activity, Solvent, Extraction, Ultrasonification

서 론

병풀 (*Centella asiatica* L. Urban)은 산형과에 속하는 다년생 포복성 초본으로 주로 고온 다습한 곳에서 자생하기 때문에 아프리카의 madagascar섬, 인도양의 해안지역, 인도 남방 및 malaysia 지역 등에 분포한다 (Hausen, 1993). 우리나라에는 제주도과 남부 도서지방의 저습지에 군생한다. 병풀의 주요성분으로서 α -amyrin-ursolic acid group에 속하는 pentacyclic triterpene glycoside인 asiaticoside와 madecassoside는 오래 전부터 피부 상처나 만성 궤양 등의 치료에 사용되어 왔다 (Bonte et al., 1993). 또한 이 물질은 *Mycobacterium leprae*의 waxy capsule을 용해하여 나병 치료에도 사용되었는데 (Vogel et al., 1990), 특히 asiaticoside는 항박테리아 및 항곰팡이 성질을 가지고 있으며, 상처, 위궤양, 다양

한 피부질환, 정신질환, 결핵, 정맥질환, 치매 등에 대해 치료 효과가 있는 것으로 조사되었다. (Kim et al., 2002). 최근에는 병풀의 asiaticoside에서 유도된 유도체들이 β -amyloid로 유도되는 세포 죽음으로부터 세포를 보호한다는 연구가 보고되었다 (Inhee et al., 1999). 이처럼 병풀은 식용, 피부치료제, 상처치료제, 기억력 증강제 및 강장제 등 다양한 용도에 이용되고 있으며, 국내에서도 의약품, 화장품, 기능성 식품 등의 분야에서 병풀을 사용하고 있지만 주요 서식지역이 열대에서 아열대 지방으로 국한되고 국내에서는 남부지방에 소량 자생하고 있어 상업용 원료를 국외로부터 전량 수입에 의존하는 실정이다 (Baek, 1997). 이처럼 병풀에 있어 주요성분의 중요성은 널리 인식되어 왔음에도 불구하고, 자생지나 재배 관련 연구는 물론 함량 및 활성 기작 등에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received March 25, 2008 / Revised July 28, 2008 / Accepted September 14, 2008

병풀의 수용성 추출물에는 일반적으로 asiaticoside 40%, madecassic acid 30%와 asiatic acid 30%가 주성분으로 함유되어 있으며, 이 물질들은 피부조직의 재생력을 갖는 약물로 콜라겐 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있고, 현재 임상에서 상처 치료 목적의 연고제로 사용되고 있다 (Paek *et al.*, 1996).

따라서 본 연구에서는 조직재생 등을 통하여 생체면역에 높은 활성이 기대되는 병풀 추출물의 추출조건 및 용매에 따른 면역 활성을 탐색함으로써 병풀의 면역 기작 구명은 물론 면역제재로 사용을 위한 최적 추출 조건을 확립하고자 실험 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 병풀 (*Centella asiatica* L. Urban)은 2007년 4월에 제주도에서 채취한 것을 전남대학교 생물학과로부터 지원받아 사용하였다. 시료는 음건하여 각각 10배의 증류수와 에탄올을 이용하여 각각 100°C와 60°C에서 24시간동안 추출하였으며, 초본류에 적용하여 생리활성의 증진이 가능한 것으로 보고된 초음파 병행 추출 연구 (Kwon *et al.*, 2007)에 사용된 초음파 추출 방법을 변형하여, 각 추출물을 다시 각각의 추출온도에서 초음파 발생기로 30분간 60 kHz의 초음파를 병행하여 초음파 병행 추출물을 수득하였다. 각 시료들은 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻어 수율을 측정하고 실험에 사용하였다.

2. 병풀 추출물의 HPLC 분석

각 추출공정을 통한 병풀 시료의 성분 차이를 알아보기와 천연물의 일반성분 분석에 통상적으로 사용되는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC; High-Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 병풀의 주요 활성물질로 알려져 있는 asiaticoside 및 각 추출공정을 통한 병풀 추출물의 peak를 얻고 상호 비교 분석을 시도하였다.

시료의 분석을 위해 100°C 물 및 60°C 에탄올 추출물과 60°C 에탄올 추출 후 초음파를 병행한 추출물의 시료를 HPLC 분석용 water에 녹여 각각 100 ppm의 농도로 조제하고 0.2 µm syringe filter로 여과하여 injection volume 20 µl로 측정하였다. HPLC 기기는 BIO-TEK instrument (Italy)사 HPLC 500 series의 BIO-TEK 522 controller Pump와 BIO-TEK HPLC 535 UV Detector (214 nm)를 사용하였고, Column은 Alltech사의 Prevail C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm)을 사용하였다. 이동상은 물과 메탄올 (50:50, v/v)의 혼합용액을 사용하였고, 유속은 0.40 ml/min 으로 흘려주었으며, asiaticoside standard는 Chromadex (USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

3. 세포주 및 세포 생육 배지

면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat, ATTC, USA)과 B cell (Raji, ATTC, USA)을 이용하여 검증하였다. 실험에 사용된 면역세포는 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK cell은 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium (α-MEM)은 GIBCO (USA)사로부터 구입하였고, HEPES buffer는 SIGMA (USA)사에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 GIBCO사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 세포염색을 위한 sulforhodamine B (SRB)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

4. 인간 정상세포 세포독성 측정

병풀 유래 성분은 피부치료에 효능이 입증되어 시판 피부의 용제 등의 핵심 물질로 사용되고 있다. 따라서 피부면역 제제로 활성이 기대되는 병풀 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 인간 정상 섬유아세포인 CCD-986sk를 이용하여 세포독성을 측정하였다. 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 mosmann 방법을 변형하여 실시하였다. CCD-986sk 세포를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후 각 well의 70~80% confluence 배양시점에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액(5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 10 µl acid-iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 면역세포 생육 증진 효과

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Kim *et al.*, 2005).

6. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF-α의 정량을 Chemicon (USA)사의

IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 $1.0\sim 2.0 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C , 5% CO_2)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 g/l 로 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 다시 배양 (37°C , 5% CO_2)하였다. 원심분리기를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 450 nm 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

7. Natural Killer cell(NK cell)의 면역증진 효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10-4M 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24well plate에 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 $900 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 24시간 후 T세포의 상층액을 각 plate에 $100 \mu\text{l}$ 씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 이용하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다 (Yueran *et al.*, 2003; Cecilia, 2002).

결과 및 고찰

1. 추출 수율

병풀의 추출 수율을 Table 1에 나타내었다. 모든 조건 중 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물이 10.41%로 일반 100°C 물 추출에 비해 38% 이상 높은 추출 수율을 나타내었다. 특히 초음파 공정을 병행하지 않은 조건에서도 60°C 에탄올 추출물이 100°C 물 추출물에 비해 높은 수율을 나타냄에 따라 병풀의 수용성 물질이 물보다 에탄올에 더욱 잘 용출되어 나오는 것으로 사료된다. 이는 또한 100°C 물 추출과 60°C 에탄올 추출 모두에서 초음파 공정의 병행을 통해 15% 이상의 증진을 나타냄에 따라 초음파 공정을 통해 수율의 증진 효과가 있음을 알 수 있다. 이는 Lee 등이 보고한 사철쭉의 추출 수율인 5~15% (Lee *et al.*, 2002)를 상회하는 결과로, 기존 열수 추출에 비하여 초음파 병행 추출의 수율이 초본류의 추출에 효과적임을 알 수 있는 결과이다. 이러한 결과는 초음파의 공동효과에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문인 것으로 사료되며, 이러한 결과는 이전 연구 (Park *et al.*, 2004)를 통해 보고된바 있다. 따라서 초음파 병행 공정을 이

Table 1. The extraction yields of *C. asiatica* L. Urban according to several extraction processes.

Sample	Extraction process		Yields (% w/w)
	Temp.	Solvent	
<i>C. asiatica</i> L. Urban	60	EtOH	8.80 10.41★
	100	D. W.	7.53 8.83★

★Ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

용하면 병풀의 효율적 추출을 통한 수율 증진 및 신물질의 용출을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 병풀 추출물의 HPLC 분석

HPLC를 이용한 병풀 추출물의 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. (A)는 병풀의 주요 활성물질로 알려져 있는 asiaticoside의 standard peak로 나머지 추출물의 peak와 비교하여 각 추출공정에 따른 활성성분의 용출 정도를 확인하였다. (B)는 일반적으로 천연물의 추출에 많이 이용되는 100°C 물 추출물의 peak를 나타낸 것이고, (C)와 (D)는 각각 60°C 에 탄올 추출물과 이의 초음파 병행 추출물에 대한 분석 peak를 나타낸 것이다. 결과를 통해 각 추출 공정에 따른 용출 성분에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. (B)와 (C)의 비교를 통해 수율 측정에서와 마찬가지로 병풀의 수용성 성분이 물보다 에탄올에 많이 용출되어 나온 것을 확인할 수 있었다. 에탄올 추출물의 HPLC peak는 물 추출물에 비해 분산된 양상을 보이는데, 이를 통해 물에 녹지 않았던 병풀의 일부 성분이 에탄올에 용출되어 나온 것으로 볼 수 있으며, 이는 물과 에탄올의 극성 차이 등에 기인하는 것으로 사료된다. 물과 에탄올의 극성지수는 각각 10.2와 4.3으로 큰 차이는 아니지만 분자량 등 여러 가지 요인의 복합적인 결과가 나타난 것으로 보인다. 특히 초음파 공정을 병행한 (D) peak는 수율 측정에서와 마찬가지로 가장 높은 성분의 용출 및 다양한 성분 함량을 나타내었는데, 특징적으로 저분자 영역대의 용출이 증진된 것으로 확인할 수 있다. 이는 에탄올 용매에 따른 비극성 성분 용출 증진과 함께 초음파 공정을 통해 병풀의 수용성 성분이 변성 혹은 저분자로 잘라지기 때문인 것으로 사료된다 (Kim *et al.*, 2007). 따라서 추출공정에 따른 병풀의 유용활성 성분은 물보다는 에탄올을 용매로 이용하였을 때 보다 용이하게 용출되며 초음파 공정을 통해 수율 향상 및 신규물질의 용출을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 인간 정상세포의 독성 측정 결과

피부 면역제재로 활성이 기대되는 병풀 추출물의 세포독성을 인간 섬유 아세포인 CCD-986sk를 이용하여 SRB방법으로

병풀의 면역활성 증진

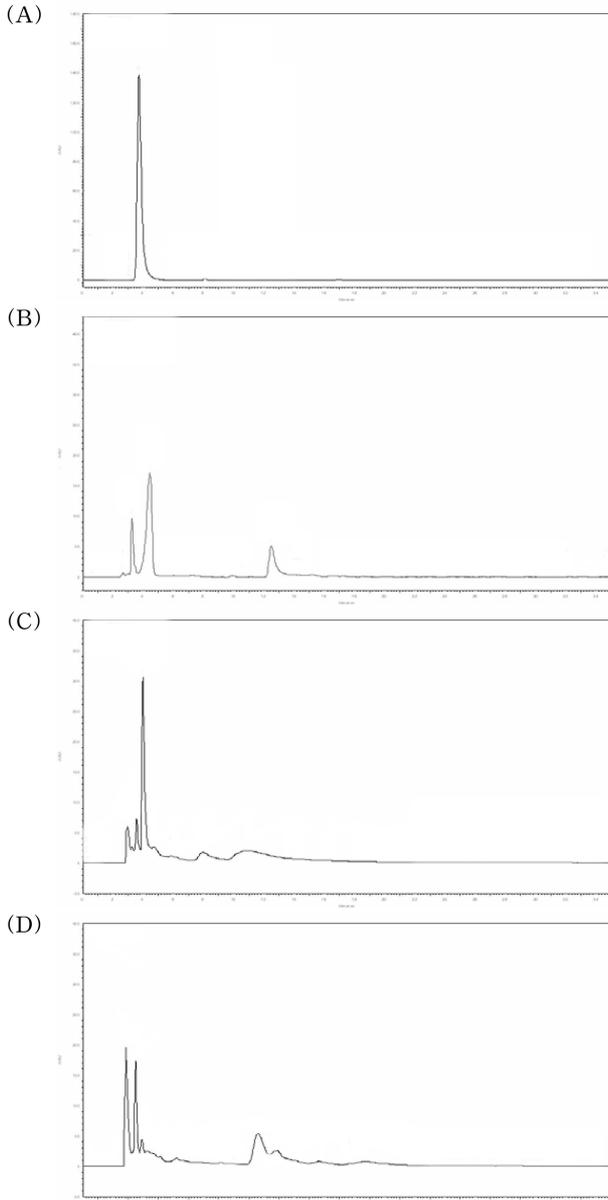
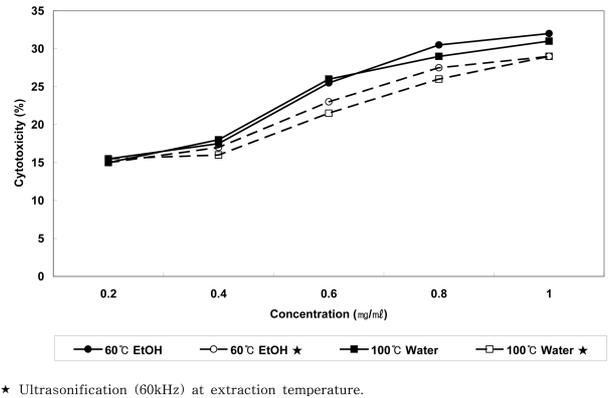


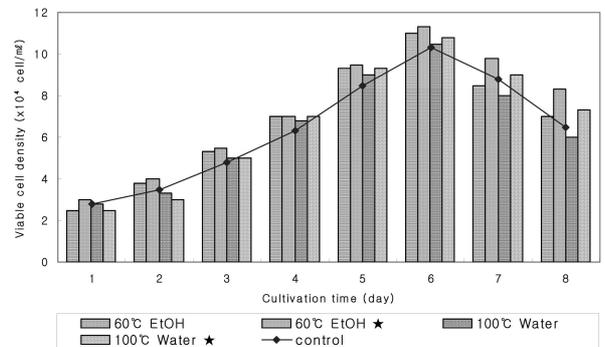
Fig. 1. Comparison of HPLC peak of the extracts of *C. asiatica* L. Urban from different extraction conditions (A; standard of asiaticoside, B; 100°C water extracts, C; 60°C ethanol extracts, D: 60°C ethanol extracts with ultrasonification 60 kHz for 30 min).

측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 최대 투여농도인 1.0 mg/ml에서 60°C 에탄올 추출물이 32%로 가장 높은 값을 나타내었다. 용매조건별로는 큰 차이를 보이지 않았으나 초음파를 병행한 추출물의 독성이 병행하지 않은 것에 비해 5~9% 감소된 수치를 보임에 따라 초음파 병행을 통해 세포독성을 저감시킬 수 있는 것으로 사료된다. 또한 이는 초음파 병행



★ Ultrasonification (60kHz) at extraction temperature.

Fig. 2. Cytotoxicity of extracts under several conditions from *C. asiatica* L. Urban against the human skin fibroblast cell line (CCD-986sk).



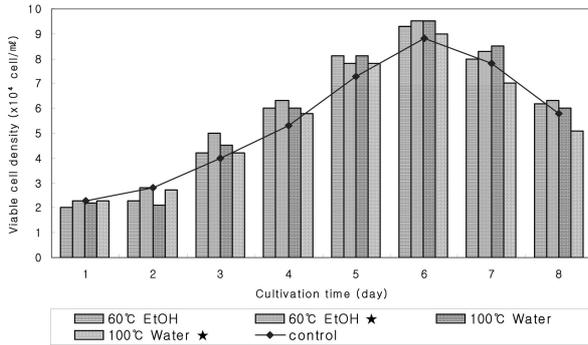
★ Ultrasonification (60kHz) at extraction temperature.

Fig. 3. The growth of human B cell "Raji" in adding extracts under several conditions from *C. asiatica* L. Urban.

공정을 통한 공동현상으로 추출물 내 독성성분의 변성 및 파괴가 일어나기 때문인 것으로 사료된다. 특히, 결과를 통해 최대 투여농도인 1.0 mg/ml에서도 모든 조건의 추출물이 정상세포의 생존율을 68% 이상으로 유지시키는 것으로 확인하였는데, 이는 식용으로도 널리 사용되는 사철쭉 추출물이 나타낸 세포독성 수치 (Kim *et al.*, 2005)와 비슷한 결과로 병풀 추출물이 인간 정상 섬유아세포에 대하여 안전성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

4. 면역세포 생육 증진 효과

면역증진 효과의 확인을 위해 인간 면역체계에서 중요한 역할을 담당하는 면역 B세포와 T세포를 이용하여 시료 첨가에 따른 생육도를 측정하고 생육 촉진 효과를 비교하였다. Fig. 3는 시간경과에 따른 B세포의 생육곡선으로 시료첨가 시점을 기준으로 6일째 최고 생육도를 나타내었다. 모든 시료가 대수기인 3~6일째 대조군에 비해 증가된 생육도를 나타내었으며 특히 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물은 6일째 가장 높



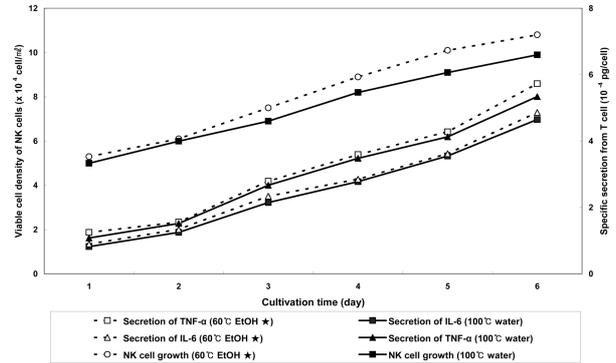
* Ultrasonification (60kHz) at extraction temperature.

Fig. 4. The growth of human T cell "Jurkat" in adding extracts under several conditions from *C. asiatica* L. Urban.

은 11.3×10^4 cell/ml 를 나타내며 대조군에 비해 9.7% 이상 증진된 생육도를 보여주었다. Fig. 4는 시간경과에 따른 T세포의 생육도를 나타낸 것으로 역시 시료첨가 시점을 기준으로 6일째 최고 생육도를 나타내었으며 B세포의 생육도와 유사한 모습을 나타내었다. 마찬가지로 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물이 6일째 최고 9.5×10^4 cells/ml 를 나타내며 측정기간 동안 대체적으로 높은 생육도를 나타내었다. 이는 면역증진 활성을 가지는 것으로 알려진 황칠나무 잎의 추출물 첨가를 통한 연구 (Lee *et al.*, 2002)에서 나타난 22~27%의 생육 증진에는 미치지 못하는 결과이나 낮은 농도에서도 유의적인 수치를 나타내는 것으로 보아 고농도에서는 가시적인 면역증강 효과를 나타낼 것이 기대되며 낮은 세포독성을 가지는 것으로 고려하면 인간의 면역증진 측면에서 효과적임을 확인하였다.

5. Cytokine 분비량 측정

Table 2는 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- α)의 분비량을 B, T cell에서 측정된 결과를 나타낸 것이다. 각 시료에 따른 cytokine 분비량은 면역세포 생육도와 유의적인 값을 나타내었다. 각 시료 첨가에 따른 B세포의 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면 모든 첨가군에서 대조군에 비해 높은 분비량을 나타낸 것을 확인할 수 있으며, 그 중에서 초음파 병행 60°C 에탄올 추출물이 6일째 각각 4.16×10^{-4} pg/cell과 4.74×10^{-4} pg/cell를 보이며 가장 많은 분비량을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 T세포의 cytokine 분비에서도 초음파 병행 60°C 에탄올 추출물이 6일째 각각 4.86×10^{-4} pg/cell과 5.73×10^{-4} pg/cell을 나타내며 다른 시료와 비교하여 대체로 많은 cytokine 분비량을 나타내었다. 생육도 측정에서와 마찬가지로 대조군에 비해 시료첨가가 높은 cytokine 분비량을 나타내었으며, 초음파 병행 60°C 에탄올 추출물, 초음파병행 100°C 물 추출물의 순으로 많은 cytokine의



* Ultrasonification (60kHz) at extraction temperature.

Fig. 5. The growth of NK cells (left axis) by adding the secretion from T cell growth (right axis) with the extracts from *C. asiatica* L. Urban.

분비를 나타내었다. 이는 해당화의 뿌리 추출물을 통한 연구 (Lee *et al.*, 2003) 등에서 보고된 면역세포 cytokine 분비와 유사한 수치로 병풀 추출물이 면역세포의 생육 증진 및 cytokine 분비량 증가를 통한 면역 활성 증진에 가능성이 있으며 나노입자화 공정을 통해 추가적인 증진 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

6. Natural Killer cell(NK cell)의 면역증진 효과

NK 세포의 활성 측정은 시료를 첨가한 면역 T세포의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의 변화를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성을 측정하였다. Table 3은 T세포에 각 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 나타나는 NK 세포의 활성도를 조건별로 비교하여 나타낸 표이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 모든 시료첨가 조건에서 대조군과 비교하여 증가된 생육도를 확인할 수 있었다. 가장 높은 활성을 나타낸 것은 60°C 에탄올 추출물로 6일째 10.8×10^4 cells/ml 를 나타내어 9.8×10^4 cells/ml 를 나타낸 대조군에 비해 약 10%의 활성 증가를 확인할 수 있었다. 다음으로 60°C 에탄올 추출물이 10.2×10^4 cells/ml 를 나타내며 모든 기간에서 증가된 활성을 나타내었다. Fig. 5는 T세포 생육에 따른 cytokine 분비와 NK세포의 생육 간의 관계를 나타낸 것으로 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물과 100°C 물 추출물을 비교한 그래프이다. 시료 첨가에 따른 T세포의 cytokine 분비량과 NK세포의 생육 모두 100°C 물 추출물에 비해 초음파를 병행한 60°C 물 추출물이 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 시료 첨가를 통한 면역세포의 생육 및 cytokine 분비와 이를 통한 NK세포의 생육이 모두 비례관계에 있음을 확인할 수 있다.

이상의 결과를 통해 병풀은 면역활성을 나타내는 성분을 함유하고 있으며 초음파병행 추출공정을 통해 유효성분의 면역 활성 증진 효과를 기대할 수 있음을 확인하였다. 이는 초음파

병풀의 면역활성 증진

Table 2. Comparison of IL-6, TNF- α secretion from human B, T cell growth in adding the extracts under several extraction conditions from *C. asiatica* L. Urban.

Extraction Condition of Sample	Cultivation time (Day)	Specific secretion from B cell (10^{-4} pg/cell)		Specific secretion from T cell (10^{-4} pg/cell)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
Control	1	0.26	0.55	0.96	1.15
	2	0.53	0.85	1.23	1.45
	3	1.33	1.76	2.03	2.36
	4	1.86	2.42	2.56	3.02
	5	2.44	3.26	3.14	3.86
	6	3.56	4.48	4.26	5.08
60°C EtOH	1	0.12	0.43	1.00	1.23
	2	0.55	0.83	1.29	1.47
	3	1.45	1.89	2.29	2.54
	4	2.08	2.66	2.77	3.40
	5	2.85	3.41	3.59	4.07
	6	3.95	4.66	4.71	5.29
60°C EtOH	1	0.20	0.48	0.90	1.25
	2	0.64	0.92	1.34	1.56
	3	1.64	2.07	2.34	2.79
	4	2.15	2.88	2.85	3.59
	5	2.92	3.53	3.62	4.28
	6	4.16	4.74	4.86	5.73
100°C Water	1	0.25	0.65	0.82	1.08
	2	0.67	0.96	1.25	1.52
	3	1.82	2.19	2.15	2.67
	4	2.13	2.99	2.78	3.48
	5	2.94	3.68	3.55	4.13
	6	4.24	5.13	4.65	5.34
100°C Water	1	0.30	0.63	0.95	1.03
	2	0.59	0.87	1.37	1.43
	3	1.59	1.94	2.52	2.49
	4	2.07	2.80	2.83	3.26
	5	2.89	3.47	3.64	4.01
	6	4.01	4.69	4.94	5.26

★ Ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

Table 3. The growth of NK cells by adding the secretion from T cell growth with the extracts from *C. asiatica* L. Urban.

Cultivation time (day)	1	2	3	4	5	6
Sample	Visible cell density ($\times 10^4$ cell/ml)					
Control	4.8	5.8	6.9	7.6	8.9	9.8
60°C EtOH	5.0	6.2	7.1	8.5	9.5	10.2
60°C EtOH	5.3	6.1	7.5	8.9	10.1	10.8
100°C Water	5.0	6.0	6.9	8.2	9.1	9.9
100°C Water	4.9	5.7	7.0	8.4	9.4	10.0

★ Ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

병행 공정을 통한 공동현상에 의한 높은 압력으로 세포 내부 조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문에 사료된다 (Kim *et al.*, 2001).

본 연구에서 수행된 결과들을 통해 병풀 추출물은 면역 활성을 나타내는 유용성분을 함유하고 있으며, 초음파 병행 공정을 통해 활성의 증진이 가능함을 확인하였다. 하지만 본 연

구의 결과에서 피부재생 등 생체면역에 높은 활성을 나타내는 병풀 추출물이 면역세포를 통한 활성 측정에서 기대만큼의 높은 면역활성을 나타내지는 못한 만큼 병풀의 생체면역 기작을 확인할 수 있는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 병풀의 초음파 추출 시 용매에 따른 면역활성 증진 효과를 탐색하고자 수행되었다, 각 추출공정의 수율 비교에서 초음파 공정을 병행한 60℃ 에탄올 추출이 일반 100℃ 물 추출에 비해 15% 높은 수율을 나타냈으며, 에탄올을 용매로 한 추출이 동일한 조건의 물 추출에 비해 모두 높은 수율을 나타냈다. 이는 용매의 극성과 용출되는 병풀 내 성분의 극성에 기인하는 것으로 사료된다. 인간 정상 섬유아세포인 CCD-986sk를 이용한 세포독성 측정을 통해 모든 병풀 추출물이 32% 이하의 세포독성을 나타냈다. 인간 면역 B, T세포의 생육도 측정에서 초음파를 병행한 60℃ 에탄올 추출물이 무첨가 대조구에 비해 10%의 증진 효과를 나타내었으며, 면역세포의 cytokine 분비량 측정에서도 IL-6, TNF- α 의 분비를 각각 4.86×10^4 pg/cell과 5.73×10^4 pg/cell로 나타내 증진 효과를 나타냈다. 또한, 초음파 병행 에탄올 시료를 첨가한 면역 T세포의 분비물에 의한 NK 세포 활성에서도 10%의 생육증진효과를 나타내었다. 이를 통해 병풀의 에탄올 추출물이 면역 활성을 가지고 있으며 초음파 공정을 통해 활성의 증진이 나타날 수 있음을 확인하였다. 이는 에탄올 용매를 통해 병풀 유용성분의 용출이 증진되고, 초음파 공정을 통해 병풀 유용성분의 수율 향상 및 유용성분의 변화, 신규물질 용출 등이 일어나기 때문인 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 기초연구지원 사업(KRF-2007-314-C00271)의 지원에 의해 얻어진 결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Baek YW** (1997) Micropropagation of *Centella asiatica* (L.) Urban by in vitro cultures and production of triterpene glycosides. PhD thesis, Chonnam University, Kwangju.
- Bonte F, Dumas M, Chaudagne C, Meybeck A** (1993) Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I syntheses. *Plant Med.* 60:133-135.
- Cecilia KL** (2002) IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296:929-936.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU** (1998) Effect of Ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji* 42(3):296-301.
- Hausen BM** (1993) *Centella asiatica* (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer. *Contact Dermatitis* 29:175-175.
- Inhee MJ, Shin JE, Yun SH, Huh K, Koh JY, Park HK, Jew SS, Jung MW** (1999) Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci. Research* 58:417-425.
- Kim CH, Kwon MC, Kim HS, Ahn JH, Choi GP, Choi YB, Ko JR, Lee HY** (2007) Enhancement of immune activities of *Kadsura japonica* Dunal. through conventional fermentation process. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 15(3):162-169.
- Kim JH, Kim DH, You JH, Kim CH, Kwon MC, Hwang B, Lee HY** (2005) Comparison of cytotoxin and immune activities between natural and tissue cultured plant in *Artemisia capillaris* Thunb. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 13(4):154-160.
- Kim JH, Kim DH, You JH, Lee HJ, Lee HJ, Lee HY** (2005) Anticancer and immune activities of the extracts from *Amorpha fruticosa* L. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 13(1):41-47.
- Kim OT, Kim MY, Kim SJ, Kim YJ, Kim KS, Ahn JC, Kim SW, Hwang B** (2002) Seasonal variations of triterpene glycosides contents in the leaf of *Centella asiatica* (L.) Urban. *J. Kor. Med. Crop Sci.* 10(5):375-378.
- Kim WI, Shung KW, Lee SB, Hong IK, Park KA** (2001) Ultrasound energy effects on solvent extraction of amaranth seed oil. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 12(3):307-311.
- Kwon MC, Kim CH, Kim HS, Lee SH, Choi GP, Park UY, You SG, Lee HY** (2007) Optimal extract condition for the enhancement of anticancer activities of *Artemisia princeps* Pampanini. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 15(4):233-240.
- Lee MK, Lee HY, Lee JH, Oh JS, Choi GP, Kim JH, Kim JD** (2002) Anticancer effect of *Sorbus commixta* Hedl Extracts. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 10(5):403-408.
- Lee MK., Lee SH, Choi GP, Yu CY, Lee JH, Lee HY** (2003) Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* Radix. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 11(1):13-18.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY** (2002) Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 10(2):109-115.
- Paek WY, Kim KS, Hwang B** (1996) Micropropagation of *Centella asiatica* through terminal bud culture. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 23(4):235-238.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY** (2004) Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capollaris* Thunb.. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 12(4):273-278.
- Vogel HG, De Souza NJ, D'SA A** (1990) Effect of terpenoids isolated from *Centella asiatica* on granuloma tissue. *Avta Therapeutica* 16:285-298.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G, Zhigang T** (2003) Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300:247-252.