

병풀 추출물의 식용 나노입자화를 통한 면역 활성 증진

하지혜* · 권민철* · 김 영* · 김승섭* · 정명훈* · 황 백*** · 이현웅***†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **강원대학교 생명공학연구소, ***전남대학교 생물학과

Enhancement of Immuno-modulatory of *Centella asiatica* L. Urban with Edible Polymer through Nano-encapsulation Process

Ji Hye Ha*, Min Chul Kwon*, Young Kim*, Seung Seop Jeong*, Myoung Hoon Jeong*, Baik Hwang***, and Hyeon Yong Lee***†

*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

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

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

ABSTRACT : Phosphatidylcholine was used to encapsulate aqueous extracts of *Centella asiatica*, and its biological activity was compared with another aqueous extracts. Nanoparticle of *C. asiatica* was made by encapsulation to w/o type spherical liposome which of aqueous extracts seized with oil phase as 78.2 nm average diameter. Cytotoxicity of the nanoparticle was measured on human skin fibroblast cells, CCD-986sk, and showed lower cytotoxicity on 1.0 mg/ml of highest concentration as 28% than that of another extracts. The nanoparticle showed the highest promotion of human B and T cell growth up to 138% and 135%, respectively, compared to the control. and the NK cell growth was promoted up to 8% higher than the control in proportion to secretion of IL-6 and TNF- α from immune cell growth. Also nanoparticle showed highest inhibition activity of hyaluronidase on 1.0 mg/ml of highest concentration as 60.5%. It seems that because of enhanced biological application of aqueous extracts on cell through nano-encapsulation process.

Key Words : *Centella asiatica* L. Urban, Nanoparticle, Immune Activity

서 언

병풀 (*Centella asiatica* L. Urban)은 산형과에 속하는 포복성 다년생 초본으로 아프리카의 Madagascar섬이 원산지이나 인도양의 해안지역, 서남아시아 및 중남미 등지의 고온 다습한 곳에 폭넓게 자생하고 있다 (Hausen, 1993). 병풀은 인도 및 아시아 지역의 전통요법을 통해 오래전부터 약용으로 이용되어 왔으며 (Brinkhaus *et al.*, 2000), 주요성분인 asiaticoside와 madecassoside는 α -amyrin-ursolic acid group에 속하는 pentacyclic triterpene glycoside로 피부 상처 및 만성 궤양 치료 활성 등을 나타낸다 (Bonte *et al.*, 1993). 또한 이들 물질은 *Mycobacterium leprae*의 waxy capsule을 용해하기 때문에 나병 치료에도 사용되었는데 (Vogel *et al.*, 1990), 그중에서도 특히 asiaticoside는 항박테리아 및 항균 활성을 가지고 있어 피부 상처, 위궤양은 물론 다양한 피부질환, 정신질환, 결핵, 정맥질환, 치매 등의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져

있다 (Kim *et al.*, 2002). 최근 병풀 유래 asiaticoside로부터 유도된 유도체들이 β -amyloid 유도를 통해 유발되는 세포 피사를 저해한다고 보고되고 있으며 (Inhee *et al.*, 1999), 또한 병풀의 수용성 추출물에는 일반적으로 초본 내 주요성분인 asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid가 각각 40%, 30%, 30%의 비율로 함유되는데 이 물질들은 피부조직의 재생력을 갖는 물질들로 콜라겐 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 실제로 임상에서는 상처 치료 목적의 연고제를 구성하는 주성분으로 사용되고 있다 (Kim *et al.*, 2002). 이와 같이 병풀은 피부치료제, 상처치료제, 기억력 증강제 및 강장제 등 다양하게 이용되고 있는 약용식물로서 국내에서도 의약품, 기능성 화장품 소재로 사용하기 위한 수요가 증가하고 있으나, 주요 서식지역이 열대 및 아열대 지방에 국한되고 국내에서는 재배 및 채취에 어려움이 있어 상용 원료는 전량 국외로부터의 수입에 의존하고 있는 실정이다. 이러한 요인으로 인해 병풀 및 그 주요성분에 대한 효용이 널리 인식되어 왔음에

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received 2009 June 2 / Revised 2009 July 31 / Accepted 2009 August 4

도 이의 효율적인 활용 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 피부 면역 및 생체면역 증강에 높은 활성이 기대되는 병풀 수용성 추출물을 효율적으로 활용하기 위한 나노입자화 공정을 수행하고, 이에 따른 면역증진 활성을 탐색함으로써 병풀 추출물의 면역 기작 구명은 물론 체내에서 수용성 물질의 생체활용성 증진이 가능한 공정을 모색하고자 실험을 진행하였다.

생체 내 물질 송달과 관련한 연구는 투여 약물을 표적부위에 선택적, 효율적으로 수송시켜 원하는 시간동안 작용하도록 하여 최대의 치료 효과를 발현하도록 하고 다른 부위나 조직으로는 약물의 송달을 최소화시켜 부작용을 저감할 수 있는 약물 수송방법을 개발하는데 있다. 나노기술은 나노미터(10^{-9} m) 수준을 제어하는 기술로 DDS (drug delivery system)의 적용을 통해 특정 부위에 선택적 송달이 가능하기 때문에 최근, 질병치료의 첨단 기술로 각광받고 있다. 나노기술은 유효 성분의 지속시간을 늘려 줄 뿐만 아니라 나노 소재화된 성분이 원하는 시간에 원하는 장소에서 작용하도록 조절이 가능해 상업적 이용 면에서도 점차 증가하는 추세이다 (Mainardes *et al.*, 2004; Heurtault *et al.*, 2003; Sharma and Sharma, 1997).

하지만 지금까지의 나노 연구가 합성 화합물 및 지용성 물질을 이용한 제형 개발 연구에만 집중되어 있어, 화합물의 최대 원천이자 활용가치가 높은 약용식물로부터의 수용성 천연 소재 활용 연구는 이루어지지 못한 것이 사실이다 (Seo *et al.*, 2004). 따라서 높은 생리활성이 기대되는 천연물 소재로부터 가장 일반적인 추출을 통해 유용성분을 얻고, 이에 나노기술을 접목시킴으로써 생체활용성 증진이 가능한 BT-NT fusion 연구의 기초자료로 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 병풀 (*Centella asiatica* L. urban) 초본은 2007년 3월 제주도에서 채취한 것을 전남대학교 생물학과로부터 지원받아 사용하였다. 시료는 음건하여 각각 10배의 증류수와 에탄올을 이용하여 각각 100°C와 60°C에서 24시간 동안 추출하였으며, 얻어진 추출물 중 절반은 다시 각각의 추출 온도에서 초음파 발생기를 이용하여 60 kHz의 초음파를 30분간 병행하였다. 각 시료를 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 나노입자 제조 및 특성분석

기존 병풀 연구를 통해 병풀의 최적 추출용매가 에탄올임을 감안하여 병풀 나노입자는 60°C 병풀 에탄올 추출물을 이용하여 제조하였다. 분말시료 50 mg을 1.0 mg/ml의 농도로 증류수

에 녹이고, phosphatidylcholine 5 mg은 diethyleter 소량에 녹였다가 회전증발기를 이용 건조하여 박막상태로 만들어 제조된 병풀 수용액을 첨가해 수화시켜 준 다음, 초음파분산기 (VCX-500, Sonics & Materials Inc., CT, USA)를 이용하여 상온에서 20분 동안 균질화시켜 수용성 추출물 나노입자를 제조하였다. 이를 통해 제조된 나노입자의 크기 및 모양을 확인하기 위해 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 관찰하였다. 나노입자는 음성 염색방법으로 염색하였으며, 0.1% phosphotungstic acid (pH 6.8) 용액과 나노입자의 부피비가 1:1이 되도록 하여 1시간 동안 염색 시킨 후 formvar and carbon film coated copper grid 위에 얇게 올려 24시간 동안 건조시켜 수분을 모두 제거한 뒤 EF-TEM, 120 kV에서 나노입자의 형상을 관찰하였다. 입자 분포 및 특성 분석은 DLS (Brookhaven Instrument Co.) 및 TEM의 image analyzing (Image analyzer, image pro-plus1)를 이용하여 확인하였는데, 측정을 위해 나노입자는 농도를 0.03%로 희석하여 입자간 상호작용 효과를 제거한 뒤에 측정하였다.

3. 세포주 및 세포 생육 배지

병풀 시료의 세포독성은 병풀이 피부 외용제의 소재로 다양하게 사용되는 것을 감안하여 인간 피부 섬유아세포인 CCD-986sk를 이용하여 검증하였으며, 면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T세포 (Jurkat, ATTC, USA), B세포 (Raji, ATTC, USA)와 자가사멸세포인 NK세포를 이용하여 검증하였다. 실험에 사용된 피부 섬유아세포와 면역세포는 각각 DMEM 배지와 RPMI 1640 배지에 10% FBS (heating-inactivated fetal bovine serum)를 첨가시켜 배양하였고, NK 세포 (NK-92MI, ATCC, USA)는 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum을 첨가시켜 배양하였다.

세포배양에 사용된 DMEM, RPMI 1640 및 α -MEM 배지는 Gibco사 (USA)로부터 구입하였고, Hepes buffer는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco사의 FBS과 horse serum을 이용하였으며, gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 세포염색을 위한 sulforhodamine B (SRB)와 MTT를 비롯한 나머지 시약들은 Sigma사로부터 analyzed guaranteed 또는 reagent grade로 구입하여 실험에 사용하였다.

4. 피부 섬유아세포 세포독성 측정

병풀 시료의 세포독성은 인간 섬유 아세포인 CCD-986sk를 이용하여 세포 단백질 염색하고 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법인 SRB assay (Doll & Peto, 1983)로 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 96 well

plate의 각 well에 100 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37 $^{\circ}$ C 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상층액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100 μ l 를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온 (1~30 $^{\circ}$ C)에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB 용액을 100 μ l 씩 첨가하고 상온 (15~25 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm 에서 microplate reader (Molecular Devices, THERMO max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. 면역세포 생육 증진 효과

면역 증강 효과는 시료 첨가를 통한 면역세포의 생육도 확인을 통해 측정하였으며, 면역세포는 인간 유래 면역 T 세포와 B 세포를 이용하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였으며, 면역세포의 증식율은 다음과 같은 방법을 통해 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용한 MTT assay를 변형하여 실시하였다. 면역세포를 2 \times 10⁴ cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후 각 well의 70~80% confluence 배양시점에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액(5 μ g/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 10 μ l acid-isopropanol (0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader로 565 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

6. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1.0~2.0 \times 10⁴ cells/ml 의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 8일 동안 다시 배양 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)하였다. 원심분리를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 에서 흡광도 측정을 통해 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

7. NK세포의 면역증진 효과

NK세포는 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10-4M 2-mercaptoethanol,

12.5% FBS와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2 \times 10⁷ cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다. 인간 면역 B세포와 T 세포를 T-25 flask에 배양하면서 시료 투여를 통한 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK세포를 24 well plate에 4~5 \times 10⁴ cells/ml로 900 μ l 씩 분주하고 24시간 후 각각의 면역세포 상층액을 각 plate에 100 μ l 씩 투여하고 배양 48시간 후 6일 동안 cell counter (제조사명 기재)를 이용, 생세포수를 계산하여 NK세포의 활성도를 측정하였다 (Yueran *et al.*, 2003; Cecilia 2002).

8. Hyaluronidase 활성 저해 효과

Hyaluronidase 억제효과는 Rooster Comb.에서 형성된 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정하여 활성을 판단하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase (7,900 unit/mL) 50 μ L에 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL가 되도록 하여 20 μ L씩 가하고, 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl₂ 200 μ L를 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C 수욕상에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 DMSO (dimethyl sulfoxide) 용액을 넣고 수욕상에서 20분간 배양하였다. Ca²⁺로 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12 mg/5mL) 250 μ L를 첨가하여 다시 수욕 상에서 40분간 배양하였다. 배양 후 0.4 N NaOH 용액 100 μ L와 0.4 M potassium tetraborate 100 μ L를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethyl aminobenzaldehyde 용액 (p-dimethyl amino-benzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 mL 및 10 N HCl 50 mL 혼합액) 3.28 mL를 반응 혼합물에 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 수욕 상에서 20분간 배양하고 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition (\%)} = \frac{[(\text{ODc} - \text{ODs}) / \text{ODc}] \times 100}{\text{ODc : Optical density of control, ODs : Optical density of samples}}$$

9. 나노입자의 공초점레이저현미경 분석

병풀 나노입자의 면역 증진 활성이 세포수준에서의 활용도 증가에 따른 것으로 사료되므로 생체 내에서 어느 정도 활용도 증진을 나타내는지 알아보기와 나노입자화 공정을 통해 병풀 수용성 추출물과 형광물질이 함께 포집되어 있는 나노입자와 형광물질이 결합된 일반 추출물을 세포에 첨가하고 공초점 레이저 현미경을 이용하여 세포수준에서 병과성을 비교 관찰하였다. 면역증진 활성이 기대되므로 생체활용도는 인간 면역 세포인 B 세포를 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였으며, 현미경 관찰을 위해서 측정 1시간 전에

$5 \times 10^4 \sim 10^6$ cell/ml 농도의 세포에 0.5 ppm의 형광물질 (FITC)이 결합된 추출물을 투여한 후, 공초점레이저 현미경을 이용하여 시간 경과에 따른 병풀 수용성 추출물의 세포 침투 정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 나노입자의 특성분석

나노입자화 공정을 통해 제조된 나노입자는 병풀의 수용성 추출물을 유상이 포집하는 w/o 형식의 리포솜으로 형성되었으며 이는 TEM 촬영을 통해 확인하였다. 또한 DLS 및 image analyzer를 이용하여 측정한 결과 제조된 나노입자는 50~

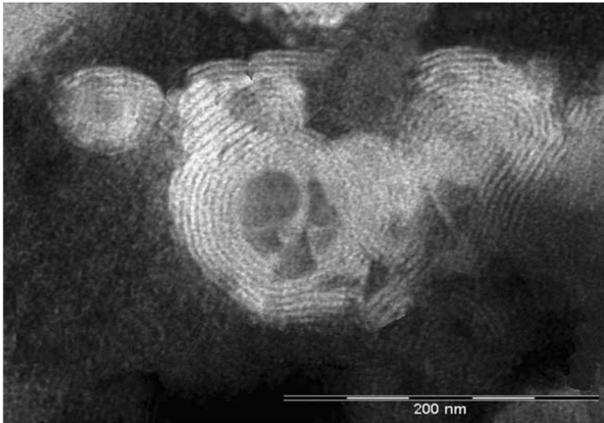


Fig. 1. Microphotograph of transmission electron microscopy of *Centella asiatica* nanoparticles.

800 nm의 크기 범위에서 형성된 것을 확인하였다. Fig. 1은 TEM을 이용하여 촬영한 병풀 수용성 나노입자로 50~200 nm 정도의 크기를 가진 구형의 입자임을 알 수 있다. Fig. 2는 DLS 분석을 통해 얻은 결과로 형성된 입자들이 평균 78.2 nm의 직경을 가지고 고르게 분포되어 있는 것을 확인할 수 있다. 입자 직경 100 nm 이하에서는 입자가 Stoke's law을 따르지 않으므로 중력의 영향을 받지 않고 현탁액 상태에서 안정적인 것으로 사료된다. Fig. 3은 전자현미경을 통해 촬영된 병풀 수용성 추출물 나노입자를 image analyzer를 이용하여 측정한 입자 크기 분포로, 전체 나노입자의 70% 이상이 200 nm 이하의 크기로 균일하게 형성되었음을 확인할 수 있다. 일반적으로 나노입자는 200 nm 이하의 크기에서 세포 투과성이 높은 것으로 알려져 있어 병풀 수용성 추출물 나노입자도 체내에서 높은 투과성 및 생체활용성을 보일 것으로 기대된다.

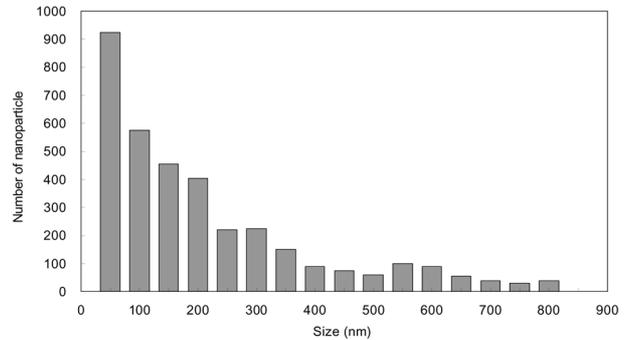


Fig. 3. The size distribution of *Centella asiatica* nanoparticles by image analysis.

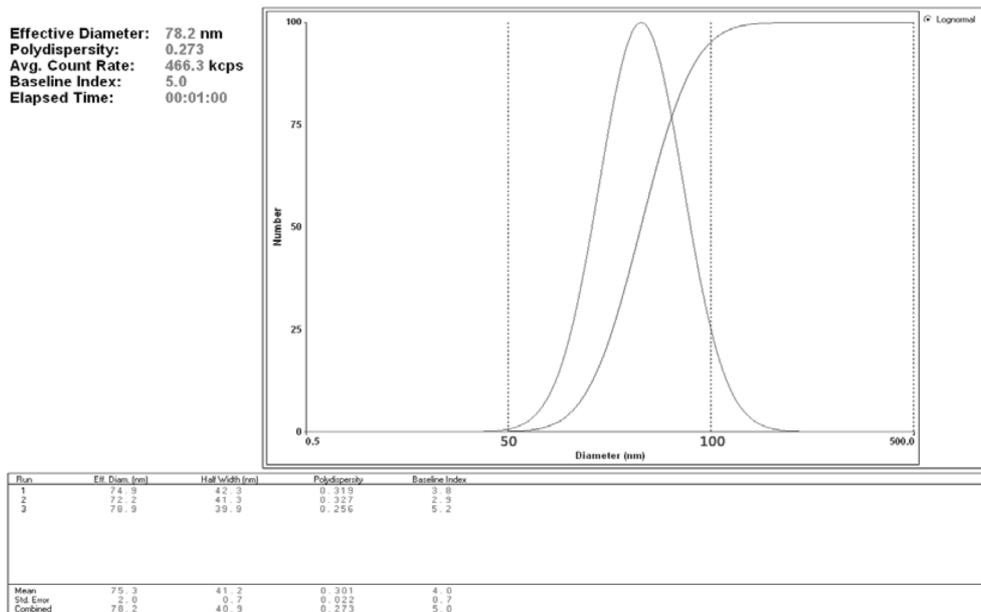


Fig. 2. The particle size analysis of *Centella asiatica* nanoparticles by dynamic light scattering.

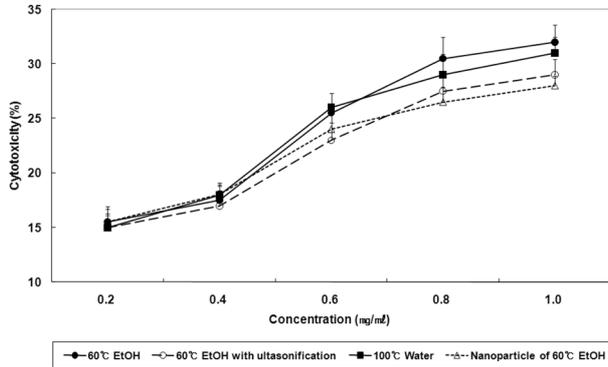


Fig. 4. Cytotoxicity of *Centella asiatica* extracts and nanosample on human skin fibroblast, CCD-986sk.

2. 피부 섬유아세포 세포독성

Fig. 4는 인간 정상 섬유아세포인 CCD-986sk에 대한 병풀 추출물의 세포독성을 SRB assay로 측정하여 나타낸 것이다. 세포독성은 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 세포독성이 병행하지 않은 것에 비해 5~9% 수준에서 감소된 수치를 보였다. 반면 병풀 나노입자는 저농도에서는 다른 시료들과 큰 차이를 보이지 않았으나 농도에 따른 증가폭이 점차 감소하여 최대 투여농도인 1.0 mg/ml에서는 28%로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 이는 리포솜 제조시 일반적인 포집율이 70% 가량을 고려하면 나노리포솜이 수용성 추출물을 포집하는 과정에서 일정량의 손실이 일어났거나 입자화되어 있는 추출성분이 영향을 끼치지 않았기 때문인 것으로 사료된다. 결과를 통해 최대 투여농도인 1.0 mg/ml에서도 모든 조건의 추출물이 정상세포의 생존율을 68% 이상으로 유지시킴에 따라 병풀 추출물이 인간 정상 섬유아세포에 대해 유의할만한 독성을 나타내지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

3. 면역세포 생육 증진 효과

면역증진 효과의 확인을 위해 인간 면역체계에서 중요한 역할을 담당하는 면역 B세포와 T세포의 생육도를 측정하여 생육 촉진 효과를 비교하였다. Fig. 5의 (A)는 시간경과에 따른 B세포의 생육곡선으로 시료첨가 시점을 기준으로 6일째 최고 생육도를 나타내었다. 결과로부터 시료첨가를 통해 평균적으로 100°C 물 추출물이 3%, 60°C 에탄올 추출물이 11%, 나노입자가 14%의 생육증진활성을 나타낸 것을 확인하였다. (B)는 시간경과에 따른 T세포의 생육도를 나타낸 것으로 역시 시료첨가 시점을 기준으로 6일째 최고 생육도를 나타내며 B세포의 생육도와 유사한 모습을 나타내었다. 대부분의 조건에서 첨가군이 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었으며 최대 35%까지 T

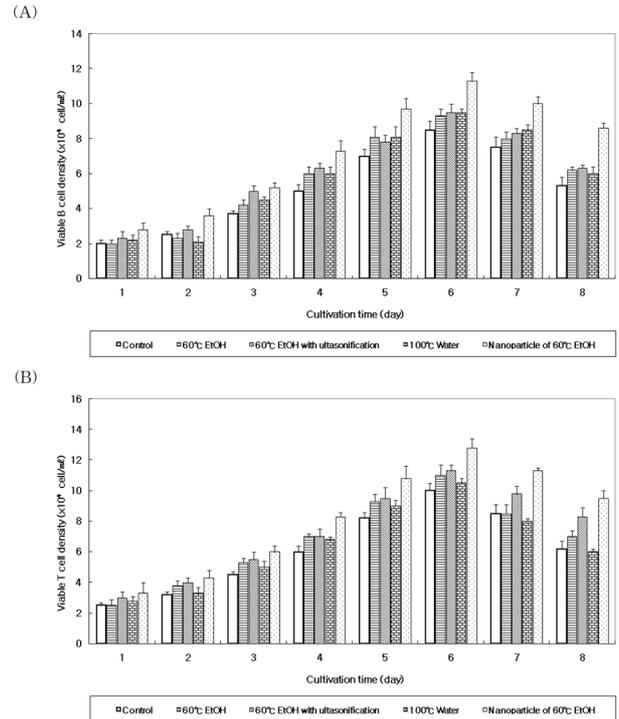


Fig. 5. The growth of human immune B and T cells by adding extracts and nanosample of *Centella asiatica*.

세포의 생육을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 세포독성 결과로부터 알 수 있는 사실로서 나노입자에 포집된 추출물 함량이 다른 추출물 시료에 비해 같거나 적다는 것을 감안하면, 병풀 면역 증진 성분의 세포 내 활용성이 나노입자화를 통해 향상되었다는 것을 확인할 수 있다. 또한 병풀 시료의 면역 증진 정도는 면역 활성을 나타내는 것으로 알려진 사철쑥의 추출물을 통한 기존 연구 (Lee *et al.*, 2004)의 20~50% 생육 증진 수준에는 미치지 못하지만 생육증진을 뚜렷이 확인할 수 있는 수치로서, 병풀에 면역세포의 생육을 증진시키는 성분이 함유되어 있으며, 초음파 추출 및 나노입자화를 통해 추가적인 활성의 증진이 가능한 것을 확인할 수 있다.

4. Cytokine 분비량 측정

Table 1은 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- α)의 분비량을 B, T 세포의 생육에서 측정된 결과를 나타낸 것이다. 각 시료에 따른 cytokine 분비량은 면역세포 생육도와 비례하는 경향을 나타내었다. 각 시료 첨가에 따른 B세포의 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면 모든 첨가군에서 대조군에 비해 높은 분비량을 나타낸 것을 확인할 수 있으며, 각 시료에 대한 B세포의 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면, 나노입자 첨가군이 6일째 각각 4.91×10^{-4} pg/cell과 5.56×10^{-4}

Table 1. Comparison of IL-6 and TNF- α secretion from human B and T cell growth by adding extracts and nanosample of *Centella asiatica*.

Condition	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 \pm 0.04	0.55 \pm 0.08	0.96 \pm 0.13	1.15 \pm 0.12
	2	0.53 \pm 0.08	0.85 \pm 0.04	1.23 \pm 0.18	1.45 \pm 0.13
	3	1.33 \pm 0.11	1.76 \pm 0.11	2.03 \pm 0.14	2.36 \pm 0.09
	4	1.86 \pm 0.10	2.42 \pm 0.13	2.56 \pm 0.16	3.02 \pm 0.08
	5	2.44 \pm 0.15	3.26 \pm 0.16	3.14 \pm 0.20	3.86 \pm 0.10
	6	3.56 \pm 0.16	4.48 \pm 0.18	4.26 \pm 0.19	5.08 \pm 0.12
60°C EtOH	1	0.30 \pm 0.13	0.63 \pm 0.18	0.82 \pm 0.14	1.25 \pm 0.15
	2	0.59 \pm 0.06	0.87 \pm 0.20	1.25 \pm 0.18	1.56 \pm 0.19
	3	1.59 \pm 0.19	1.94 \pm 0.22	2.15 \pm 0.14	2.79 \pm 0.25
	4	2.07 \pm 0.20	2.80 \pm 0.26	2.78 \pm 0.13	3.59 \pm 0.16
	5	2.89 \pm 0.21	3.47 \pm 0.20	3.55 \pm 0.16	4.28 \pm 0.18
	6	4.01 \pm 0.18	4.69 \pm 0.15	4.65 \pm 0.18	5.73 \pm 0.19
60°C EtOH with ultrasonification	1	0.25 \pm 0.12	0.65 \pm 0.04	1.04 \pm 0.04	1.42 \pm 0.13
	2	0.67 \pm 0.14	0.96 \pm 0.03	1.47 \pm 0.05	1.93 \pm 0.20
	3	1.82 \pm 0.17	2.19 \pm 0.07	2.65 \pm 0.08	3.02 \pm 0.19
	4	2.13 \pm 0.21	2.99 \pm 0.19	2.97 \pm 0.06	3.80 \pm 0.22
	5	2.94 \pm 0.22	3.68 \pm 0.18	3.79 \pm 0.12	4.57 \pm 0.20
	6	4.24 \pm 0.14	5.13 \pm 0.08	5.12 \pm 0.18	5.95 \pm 0.16
100°C Water	1	0.12 \pm 0.11	0.43 \pm 0.05	0.90 \pm 0.06	1.08 \pm 0.09
	2	0.55 \pm 0.10	0.83 \pm 0.06	1.34 \pm 0.10	1.52 \pm 0.09
	3	1.45 \pm 0.09	1.89 \pm 0.09	2.34 \pm 0.13	2.67 \pm 0.10
	4	2.08 \pm 0.17	2.66 \pm 0.09	2.85 \pm 0.17	3.48 \pm 0.15
	5	2.85 \pm 0.16	3.41 \pm 0.20	3.62 \pm 0.21	4.13 \pm 0.13
	6	3.95 \pm 0.20	4.66 \pm 0.23	4.86 \pm 0.19	5.34 \pm 0.28
Nanoparticle of 60°C EtOH	1	0.50 \pm 0.10	0.96 \pm 0.03	1.12 \pm 0.16	1.47 \pm 0.08
	2	1.03 \pm 0.18	1.27 \pm 0.06	1.64 \pm 0.14	1.77 \pm 0.16
	3	2.04 \pm 0.19	2.46 \pm 0.10	2.63 \pm 0.18	2.94 \pm 0.14
	4	2.97 \pm 0.22	3.67 \pm 0.11	3.53 \pm 0.15	4.12 \pm 0.18
	5	3.31 \pm 0.20	4.23 \pm 0.18	3.87 \pm 0.16	4.67 \pm 0.18
	6	4.91 \pm 0.20	5.56 \pm 0.22	5.43 \pm 0.10	5.97 \pm 0.09

Mean values \pm S.D. from three separate experiments are shown

pg/cell을 나타내어 가장 많은 분비량을 나타내었으며, 마찬가지로 T세포의 cytokine 분비에서도 나노입자 첨가군이 6일째 각각 5.43×10^{-4} pg/cell과 5.97×10^{-4} pg/cell를 나타내며 다른 시료와 비교하여 가장 많은 cytokine 분비량을 나타내었다. 이는 해당화의 뿌리 추출물을 통한 연구 (Lee *et al.*, 2003) 등에서 보고된 면역세포 cytokine 분비와 유사한 수치로 병풀의 수용성 추출 성분이 면역세포의 생육 증진 및 cytokine 분비량 증가를 통한 면역 증진 활성을 나타내며 초음파병행 추출 및 나노입자화 공정을 통한 추가적 증진 가능성이 있음을 확인할 수 있는 결과이다.

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

NK 세포의 활성 측정은 시료를 첨가한 면역 B세포와 T세포

포의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의 변화를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성을 측정하였다. Table 2는 B세포에 추출물 시료와 나노입자 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 나타나는 NK 세포의 활성도를 조건별로 비교하여 나타낸 표이다. 6일 동안의 생육도관찰을 통해 모든 시료첨가 조건에서 대조군에 비해 증가된 수치를 확인할 수 있었다. 모든 측정기간 동안 가장 높은 활성을 나타낸 것은 나노입자로 6일째 12.0×10^4 cells/ml를 나타내어 9.8×10^4 cells/ml를 나타낸 대조군에 비해 약 22%의 활성 증가를 확인할 수 있었다. 다음으로 60°C 에탄올 추출 공정 이후에 초음파를 병행한 추출물이 11.8×10^4 cells/ml를 나타내며 나노입자와 근사한 수치를 나타내었다. Fig. 6는 T세포 생육에 따른 cytokine 분비와 그 분비물

Table 2. The growth of NK cells by adding the secretion from immune B cell growth with the extracts and nanosample of *Centella asiatica*.

Cultivation time (day)	1	2	3	4	5	6
Sample	Visible cell density ($\times 10^4$ cell/mL)					
Control	4.8 \pm 0.2	5.8 \pm 0.3	6.9 \pm 0.2	7.6 \pm 0.2	8.9 \pm 0.2	9.8 \pm 0.2
60°C EtOH	4.8 \pm 0.4	6.1 \pm 0.1	7.5 \pm 0.2	9.5 \pm 0.4	10.6 \pm 0.3	11.0 \pm 0.5
60°C EtOH with ultrasonification	5.4 \pm 0.3	6.9 \pm 0.2	8.6 \pm 0.3	10.2 \pm 0.4	11.2 \pm 0.4	11.8 \pm 0.4
100°C Water	5.0 \pm 0.3	6.0 \pm 0.2	7.0 \pm 0.4	9.4 \pm 0.3	10.2 \pm 0.3	10.0 \pm 0.3
Nanoparticle of 60°C EtOH	5.5 \pm 0.2	6.8 \pm 0.4	8.9 \pm 0.5	10.5 \pm 0.6	11.4 \pm 0.5	12.0 \pm 0.4

Mean values \pm S.D. from three separate experiments are shown

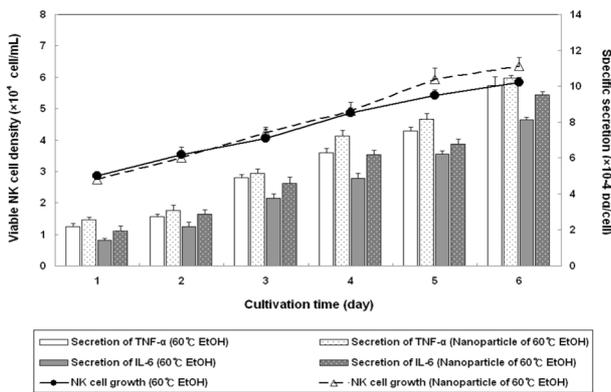


Fig. 6. The growth of NK cells (left axis) by adding the secretions from immune T cell growth (right axis) through adding extracts and nanosample of *Centella asiatica*.

첨가를 통한 NK세포의 생육 간의 관계를 나타낸 것으로 60°C 에탄올 추출물과 나노입자를 비교한 그래프이다. 시료 첨가에 따른 T세포의 cytokine 분비량과 NK세포의 생육 모두 나노입자의 수치가 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. 특히 cytokine의 분비량과 그에 해당하는 NK세포의 생육도가 비례하는 경향을 나타냄에 따라 면역세포 생육 시 분비되는 물질이 NK 세포의 growth factor로 작용하며 이들이 모두 비례 상관 관계에 있음을 알 수 있다.

6. Hyaluronidase 활성 저해 효과

병풀의 수용성 추출물 나노입자가 면역 증진을 위한 공정으로 사용될 수 있음을 위의 결과를 통해 확인하고 기존의 알려진 활성 및 제독화 공정에도 적용이 가능한지 확인하고자 병풀의 알려진 활성 중 하나인 피부보호 효과와 연관이 있는 hyaluronidase 억제 활성을 확인하였다. Hyaluronidase는 피부 보습 및 탄력 유지에 기여하는 hyaluronic acid의 분해효소로 피부면역에 관련된 것으로 알려져 있다. 따라서 hyaluronidase의 효과적인 제어를 통해 피부 면역 증진 효과를 얻을 수 있다. 병풀 시료의 hyaluronidase 억제 효과를 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 결과를 통해 모든 시료조건에서 hyaluronidase가 억제되는 것을 확인할 수 있으며, 저해 수준은 농도에 비

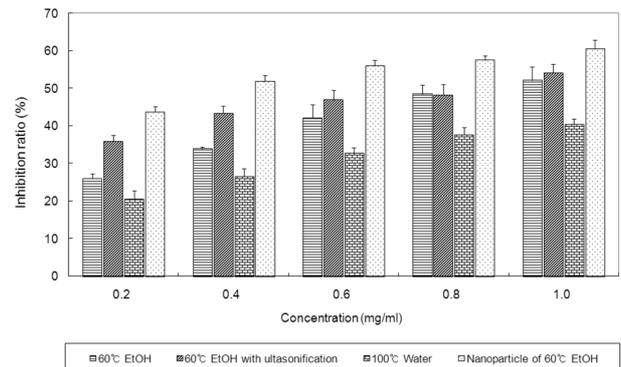


Fig. 7. Hyaluronidase inhibitory activity of *Centella asiatica* extracts and nanosample.

례하여 증가하는 경향을 나타내었으며, 실험을 통해서도 시료에 따라 20~60%의 저해 활성을 나타내었다. 가장 높은 활성을 나타낸 것은 병풀 나노입자로 최대 시료 투여농도인 1.0 mg/ml에서 60.5%까지 hyaluronidase 저해 활성을 나타내었다.

7. 나노입자의 공초점레이저 현미경 분석 결과

본 연구에서 수행된 결과들을 통해 병풀 추출물은 면역 활성을 나타내는 유용성분을 함유하고 있으며, 나노입자화 공정을 통해 활성의 증진이 가능함을 확인하고 이들이 세포수준에서 어떤 기작으로 발생하는지 알아보려고 공초점레이저 현미경을 이용한 촬영을 실시하고 Fig. 8에 나타내었다. (a)는 시료의 첨가 없이 세포를 촬영한 것이다. (b)는 형광물질이 결합된 추출물을 투여했을 때 세포의 촬영 사진으로 형광물질이 세포 밖에서만 관찰될 뿐 안으로 침투하지 못한 것으로 볼 수 있다. 이는 세포막의 주요 구성성분이 소수성인 인지질로 구성되어 있어 수용성 물질이 단독으로 침투하지 못하기 때문인 것으로 사료된다. 반면, (c)는 형광물질이 결합된 추출물을 유상으로 나노입자화는 형광물을 투여했을 때의 모습으로 세포 내로 형광물질이 결합된 추출물이 침투한 것을 확인할 수 있다. 이는 수용성물질이 단독으로 침투하지 못하는 세포막을 유상으로 포집된 나노입자가 침투할 수 있음을 보여주는 것으로 수용성물질이 나노입자화를 통해 생체활용성을 증진할 수 있음을 증명하는 결과이다.

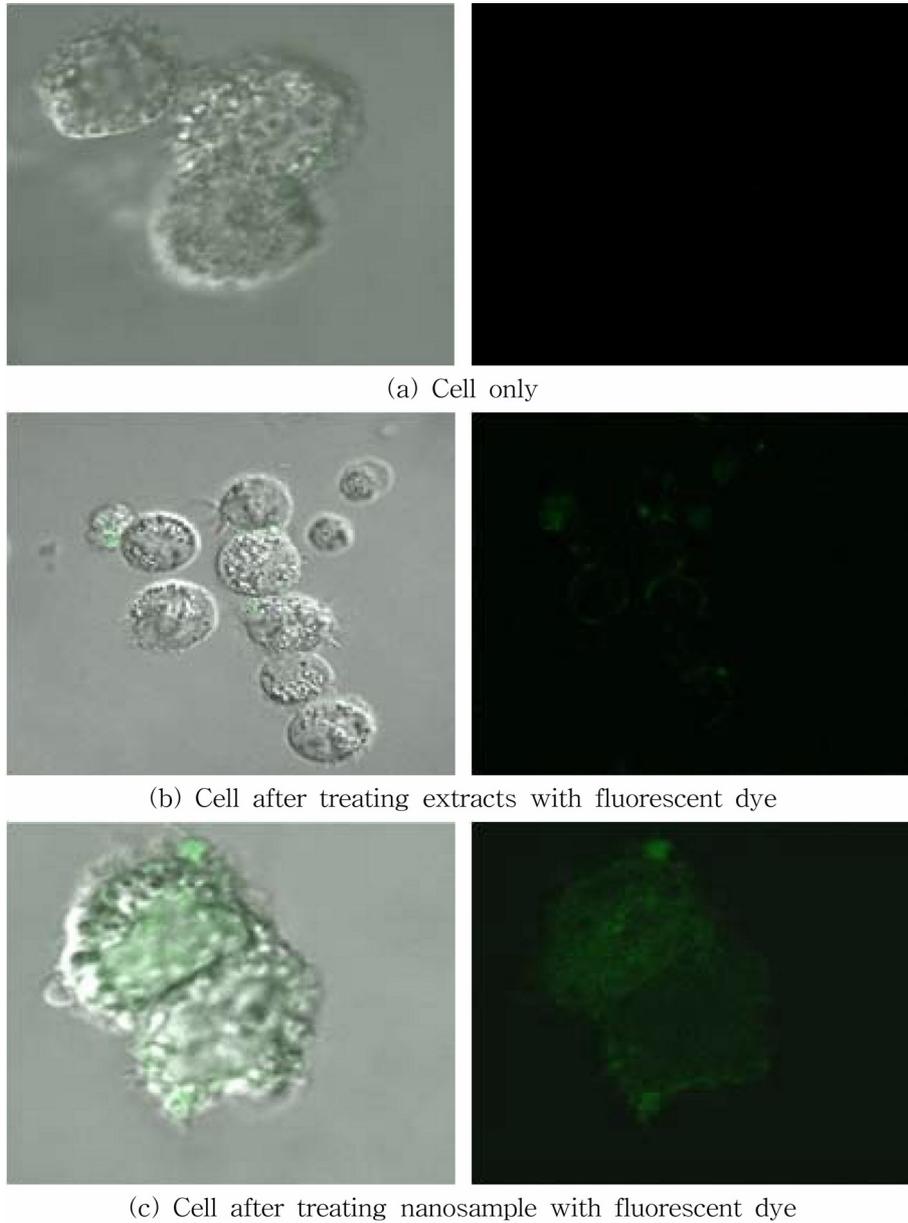


Fig. 8. Confocal microphotography of immune B cells, Raji, in adding sample of *Centella asiatica* with fluorescent dye, FITC.

감사의 글

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

LITERATURE CITED

Bonte F, Dumas M, Chaudagne C and Meybeck A. (1993). Influence of asiatic acid, madecassiac acid, and asiaticoside on

human collagen I syntheses. *Plant Medica*. 60:133-135.
Brinkhaus B, Linder M, Schuppan D and Hahn EG (2000). Chemical, pharmacological and clinical profile of the east asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*. 7:427-448.
Doll R and Peto R. (1983). The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Food and Chemical Toxicology*. 21:512-513.
Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik Ku, Park MH and Han BH. (1998) Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *The Pharmaceutical Society of Korea*. 42:296-301.

- Hausen BM.** (1993). *Centella asiatica* (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer. *Contact Dermatitis*. 29:175-179.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE and Benoit JP.** (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. 24:4283-4300.
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Jin L, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2009). Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:83-89.
- Jung IM, Shin JE, Yun SH, Huh K, Koh JY, Park HK, Jew SS and Jung MW.** (1999.) Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*. 58:417-425.
- Kim OT, Kim MY, Kim SJ, Kim YJ, Kim KS, Ahn JC, Kim SW and Hwang B.** (2002). Seasonal variations of triterpene glycosides contents in the leaf of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 10:375-378.
- Kwon MC, Han JG, Ha JH, Oh SH, Ling J, Jeong HS, Choi GP, Hwang B and Lee HY.** (2008). Immuno-regulatory effect on *Centella asiatica* L. Urban extraction solvent associated with ultrasonification process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:294-300.
- Kwon MC, Kim CH, Kim HS, Lee SH, Choi GP, Park UY, You SG and Lee HY.** (2007). Optimal extract condition for the enhancement of anticancer activities of *Artemisia princeps* Pampanini. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:233-240.
- Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY and Lee HY.** (2004). Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 12:36-42.
- Lee MK., Lee SH, Choi GP, Yu CY, Lee JH and Lee HY.** (2003). Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* Radix. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 11:13-18.
- Mainardes RM and Silva LP.** (2004). Drug delivery systems: past, present, and future. *Current Drug Targets*. 5:449-455.
- Seo DS, Kim JC, Sohn HH, Cho WG, Lee SU, Kim EY, Tae GY, Kim JD, Lee SY and Lee HY.** (2004). Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. *Journal of Colloid and Interface Science*. 273:596-603.
- Sharma A and Sharma US.** (1997). Liposomes in drug delivery : progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 154:123-140.
- Vogel HG, De Souza NJ and D'sa A.** (1990). Effects of terpenoids isolated from *centella asiatica* on granuloma tissue. *Acta Therapeutica*. 16:285-296.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G and 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.