

병풀의 추출용매에 따른 항균, 항염증 활성 및 피부 미백효능 등의 분석

구영민 · 길영숙 · 신승미 · 이동열 · 정원민 · 고건희 · 양기정 · 김윤희 · 이신우

Analysis of antibacterial, anti-inflammatory, and skin-whitening effect of *Centella asiatica* (L.) Urban

Young-Min Goo · Young Sook Kil · Seung Mi Sin · Dong Yeol Lee · Won Min Jeong · Keunhee Ko · Ki jeung Yang · Yun-Hee Kim · Shin-Woo Lee

Received: 21 May 2018 / Revised: 20 June 2018 / Accepted: 22 June 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The imports of *Centella asiatica* L. Urban are increasing year-by-year due to the fact that its extract is a raw material used for skin wounds and in cosmetics. However, studies on the cultivation and identification of native *C. asiatica* species in Korea have been extremely rare. Therefore, this study was conducted in order to investigate the physiological and functional activity of Korean native *C. asiatica* plant cultivated in Hapcheon, Gyeongsangnam-do, Korea. As a result, the highest antibacterial and anti-inflammatory activities were examined with methanol extract while skin-whitening and wrinkle improvement were examined with water extract. Seven bacterium and one fungus were treated with 50% methanol extracts of *C. asiatica* and most of the bacterium showed similar or low levels of antibacterial activity compared to the control group of Omiza (*Schisandra chinensis*) extract, except for *Streptococcus pyogenes*, which

showed higher antimicrobial activity than that of Omiza extract. However, neither *C. asiatica* and Omiza extracts showed antimicrobial activity against the fungus, *C. albicans*. The results of anti-inflammatory effect analyses with Raw 264.7 cells confirmed that the treatment of methanol extract reduced the level of NO by 50% or more compared to the control group. In addition, the water extract showed the highest reduction of melanin content of up to 20% more than the control group when examined with B16F10 cell line, indicating a significant skin-whitening effect. Furthermore, we were able to show the significant skin wrinkle improvement caused by *C. asiatica* extract with NHDF cell as an indicator, but strong cytotoxicity was also observed, suggesting that further studies are necessary.

Keywords *C. asiatica*, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, skin whitening effect, skin wrinkle improvement

†These authors contributed equally to this work.

Y.-M. Goo[†] (✉) · Y. S. Kil · S. M. Sin · D. Y. Lee · W. M. Jeong · K. H. Ko · K. J. Yang
경남한방약초연구소
(Gyeongnam Oriental Medicinal Herb Institute, Sancheong, 52215, Korea)
e-mail: dudals1109@naver.com

Y.-H. Kim
국립경상대학교 생물교육과 (농업생명과학연구원)
(Department of Biology Education, College of Education, IALS, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea)

S.-W. Lee[†] (✉)
국립경남과학기술대학교 생명과학대학 농학·한약자원학부
(Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam National University of Science & Technology, Jinju, 52725, Korea)
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

서론

병풀(*Centella asiatica* L. Urban)은 인도양의 열대지방이 원산지로서 *Centella* 속에는 약 50종이 알려져 있으며 가장 흔하게 발견되는 것이 *C. asiatica*종으로 인도, 스리랑카, 아프리카, 중국 등의 습지에서 서식하는 것으로 알려져 있다(Verma et al. 1999; al. 2003). 병풀은 항산화활성(Pittella et al. 2009; Ariffin et al. 2011), 항균활성(Zaidan et al. 2005; Taemchuay et al. 2009; Bibi et al. 2011; Lalitha et al. 2013; Idris and Nadzir 2017), 중금속에 의한 산화스트레스 완화 효능(Flora와 Gupta 2007),

다양한 암에 대한 항암효과(Babykutty et al. 2009), 신경 안정 효능(Krishnamurthy et al. 2009; Orhan 2012), 면역 활성 증진(Keon et al. 2008; Ha et al. 2009) 등에 관한 다양한 생리활성기능에 관한 연구가 보고되었다. 뿐만 아니라 콜라겐 합성 효능(Kim 2010; Hashim et al. 2011), 항염증 및 두피홍반 개선효과(Jo et al. 2014), 입술주름개선효과(Suh et al. 2007), 각질형성 세포증식(Kim 과 Kim, 1995), 피부 재생(Bylka et al. 2014) 등 피부미용에 탁월한 효능을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다(Bylka et al. 2013). 또한 최근에는 노인들의 물리적인 활동성과 삶의 질에 미치는 영향에 관한 연구보고(Mato et al. 2011)와 함께 항우울증(Ceremuga et al. 2015), 치매와 기억력증진(Rao et al. 2005; Kumar et al. 2009) 등에 관한 효능도 알려지고 있다.

국내에서도 Kim 등(2002)의 국내자생 병풀에 대한 재배시기별 triterpene glycosides 함량 비교 연구 등과 함께 일부 효능에 관한 연구결과가 보고되고 있으나 아직은 극히 미진한 수준에 있다. 뿐만 아니라 국내 (주)동국제약의 주력상품중의 하나인 ‘마테카솔’ 연고의 주성분인 “병풀 추출물(센텔라아시아티카정량추출물)”이 사용되는 등의 수요에 따라 해마다 외국에서 수입물량은 증가하는 추세에 있다. 따라서 경남한방약초연구소에서는 국내의 제약업체 또는 한약도매상 등과의 계약재배를 통하여 수요와 공급에 대한 예측이 가능하고 수입대체 효과가 뛰어나며 다양한 종류의 안정적인 약용작물의 시스템 구축의 일환으로 본 연구에서는 국내 제주지역에서 자생하는 병풀을 경남 합천에서 재배하고 있는 농가에서 채취하여 병풀추출물의 항균성 및 항염증과 함께 피부의 미백효능과 주름개선효능에 관한 기초연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 시약

병풀 시료는 2017년 여름에 경남 합천군 소재 농가에서 수확한 잎을 세척 후 40°C에서 열풍 건조한 후 믹서기에 곱게 갈

아서 칭량한 후 10배의 추출용액을 넣고 30분간 초음파추출한 후에 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상층액을 0.45 µm 주사기필터로 여과 후 농축시켜 분석에 사용하였다. 항염증효과 및 미백효과시험 등을 위한 세포실험에 사용한 시약은 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, USA), penicillin, streptomycin (Gibco, USA), PBS (Gibco, USA)와 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) (Sigma Aldrich, USA)를 사용했고 세포생존율을 확인하기 위한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay] 분석용 시약은 Promega (USA)에서 구입하여 사용하였으며 흡광도 측정을 위한 다채널분광광도계는 SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA) 그리고 생리활성 확인을 위한 세포배양은 CO₂ incubator (NU-4750G, NUAIRE)를 이용하였다.

항균활성시험

항균활성을 조사하기 위하여 사용한 균주는 한국미생물보존센터에서 분양받아 연구소에 보관중인 *Bacillus cereus* 등 총 8종의 공시한 균주(Table 1)를 사용하였으며 국내 연구결과(Lee et al. 2001; Yoo et al. 2018) 에서 항균활성이 확인된 오미자를 대조군으로 정하여 비교하였고, 각 시료의 추출은 100%, 70%, 50% 메탄올과 에탄올을 넣고 초음파 처리하여 사용하였고 병풀, 오미자 그리고 병풀과 오미자의 혼합추출물은 4:1 과 3:2의 비율로 하여 예비실험을 한 후 최종 실험은 50% 메탄올에 4:1로 혼합한 시료를 사용하였다. *Bacillus cereus* 등 총 8종의 공시한 균주(Table 1)를 액체배지(YMB 21 g/L, TSB 30 g/L)에 37°C, 24시간 배양한 후 2회 계대배양을 거쳐 600 nm에서 흡광도를 측정하여 OD값이 0.3 ~ 0.5에 해당하는 배양액을 각각의 고체배지에 200 µl씩 도말한 다음 paper disc를 올려 농도별(10⁵, 5×10⁴, 10⁴, 5×10³ ug/mL)로 희석시킨 추출물을 각 30 µl씩 점적한 후 건조시킨 다음 37°C에서 12~36시간 배양하여 디스크 주위에 생기는 생육 저해 직경의 크기(mm)로 활성을 측정하였고 대조군은 추출한 용매를 점적하여 조사하였다.

Table 1 List of microorganisms for antimicrobial activity test and culture condition

Microorganisms	Temperature (°C)	Media	ATCC no.
<i>Bacillus cereus</i>	37	YMB	11778
<i>Candida albicans</i>	37	YMB	10231
<i>Escherichia coli</i>	37	YMB	27553
<i>Propionibacterium acnes</i>	37	TSB	6919
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	YMB	25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37	TSB	12228
<i>Streptococcus pyogenes</i>	37	TSB	19615
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	37	YMB	17802

항염증효능 분석

항염증 효능을 분석하기 위하여 전술한 바와 같이 건조 후 전처리한 병풀 시료일정량을 칭량한 후 10배의 메탄올(100%), 에탄올(20%) 그리고 물을 이용하여 초음파 추출한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45 μm 주사기 필터로 여과한 다음 농축하여 사용하였다. 오미자와 병풀 및 오미자의 혼합물은 메탄올(100%)을 사용하여 추출한 후 대조구로 사용하였다.

주어진 추출물시료에 대한 세포독성을 조사하기 위한 마우스대식세포(Raw 264.7, KCLB 40071)의 배양 조건은 penicillin과 streptomycin을 각각 100 unit/ml 그리고 10% FBS가 함유된 DMEM배지에서 5%의 CO₂하에 37°C로 하였으며 2일 간격으로 계대 배양하였다. Raw 264.7세포의 농도를 2×10^5 cells/ml로 조정하여 96 well plate에 분주하고 추출물을 농도별(312.5, 625, 1250, 2500 ppm)로 처리하여 24시간을 배양시킨 후에 MTT 시약을 첨가하여 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 4시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항염증 효능분석은 (Jo et al, 2014)의 분석방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. Nitric oxide (NO) 및 전염증성 사이토카인 생성량에 대한 억제효과를 알아보기 위해 Nitrite 농도를 Griess 반응법을 기반으로 분석하여 NO 생성 지표로 사용하였으며, 배양세포의 상등액 100 μl 와 sodium nitrite 표준액 (0-10 μM)을 동일한 용량의 Griess 용액 0.1% (w/v) N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride와 5% HCl용액으로 1% (w/v) sulfanilamide을 제조한 용액과 1:1로 혼합한 후 20분간 실온에 방치 후 Multimicroplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

미백효능분석

미백효능분석을 위한 시료의 추출용매 및 추출 방법은 항염증효능 분석과 동일하게 하였으며 세포생존율 분석은 흑색 종세포(B16F10, KCLB 80008)세포를 사용하였으며 동 세포의 배양조건도 항염증효능분석에서 사용한 Raw 264.7세포의 배양조건과 동일하였다.

미백효능분석은 멜라닌 색소 생합성율의 비교분석법으로 기존에 보고된(Choi et al. 2016)의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. B16F10 세포주를 배양하여 well당 4×10^4 cells의 농도로 분주하고 24시간을 배양 후 추출물을 각 농도별(125, 250, 500, 1000 ppm)로 처리한 다음 1시간 배양한 다음 α -MSH (100 nM)를 처리하였다. 이후 48시간을 배양하여 well plate를 PBS로 세척한 후 각 well에 1N NaOH 용액 400 μl 를 첨가하고 60°C에서 1시간 동안 용해한 후 Microplate Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군시료는 α -MSH 처리과정을 제외하고 동일하게 처리하였다.

주름개선효능 분석

주름개선효능 분석은 (주)바이오스펙트럼 연구소에 의뢰하였으며, 실험에 사용한 세포인 Human dermal fibroblast (NHDF, PCS-201-012)의 세포독성은 EZ-Cytox 용액을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. EZ-Cytox의 기질인 WST (water soluble tetrazolium salt)가 살아있는 세포의 dehydrogenase와 반응하여 오렌지색의 수용성 formazan을 생성하는 기작을 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하기 위하여 NHDF를 4×10^4 cells/well로 배양한 다음 병풀의 메탄올추출물을 농도별(62.5, 125, 250, 500, 1000 ppm)로 48시간 처리한 후 EZ-Cytox 용액을 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 30분 동안 반응시킨 뒤 450 nm에서 ELISA reader로 배양액의 흡광도를 측정하였다.

주름개선효능은 콜라겐을 분해하는 효소인 콜라게네이스의 활성 정도를 측정하는 방법으로 콜라게네이스에 대한 항체를 이용하는 분석법으로, 콜라게네이스중 하나인 MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1)을 활성화시키는 물질로는 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. NHDF 세포(4×10^4 cells/well)를 37°C, 5% CO₂조건에서 배양한 후 병풀 추출물을 농도별(100, 200, 400 ppm)로 처리하여 24시간 반응시킨 후 PMA를 10 nM 농도로 처리하고 다시 24시간 배양한 다음 100 μl 세포배지에 100 μl 의 assay diluent RD1-52를 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 washing buffer용액으로 세척한 다음 Pro-MMP-1 conjugate solution을 200 μl 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 후 다시 세척하였다. 마지막으로 substrate soluble solution (TMB)을 200 μl 넣고 빛을 차단하여 상온에서 20분 반응시킨 뒤 50 μl stop solution을 넣은 후 450/570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

항균활성

병풀의 항균활성은 Table 1에 공시된 7종의 세균과 1종(*C. albicans*)의 곰팡이에 대하여 디스크 확산법으로 조사하였다. 병풀의 잎과 엽병 조직을 함께 마쇄한 시료와 오미자 및 병풀과 오미자 혼합물을 재료 및 방법에서 기술한 방법대로 다양한 농도의 메탄올 및 에탄올로 추출하여 예비실험을 수행한 결과 50% 메탄올 추출물에서 일부 균주에 대한 항균효과를 볼 수 있었으며 다른 처리군의 경우에는 항균효능이 없거나 아주 낮은 것으로 조사되어 50% 메탄올 처리구에 대한 측정결과를 요약하여 Figure 1에 제시하였다. Table 1에서 공시한 균주에 대하여 병풀, 오미자 그리고 병풀 및 오미자 혼합 추출 시료(4 : 1)를 희석하여 농도가 150, 300, 1500, 3000 ppm에 해당하는 시료를 각각 30 μl /disc씩 점적하여 실험한

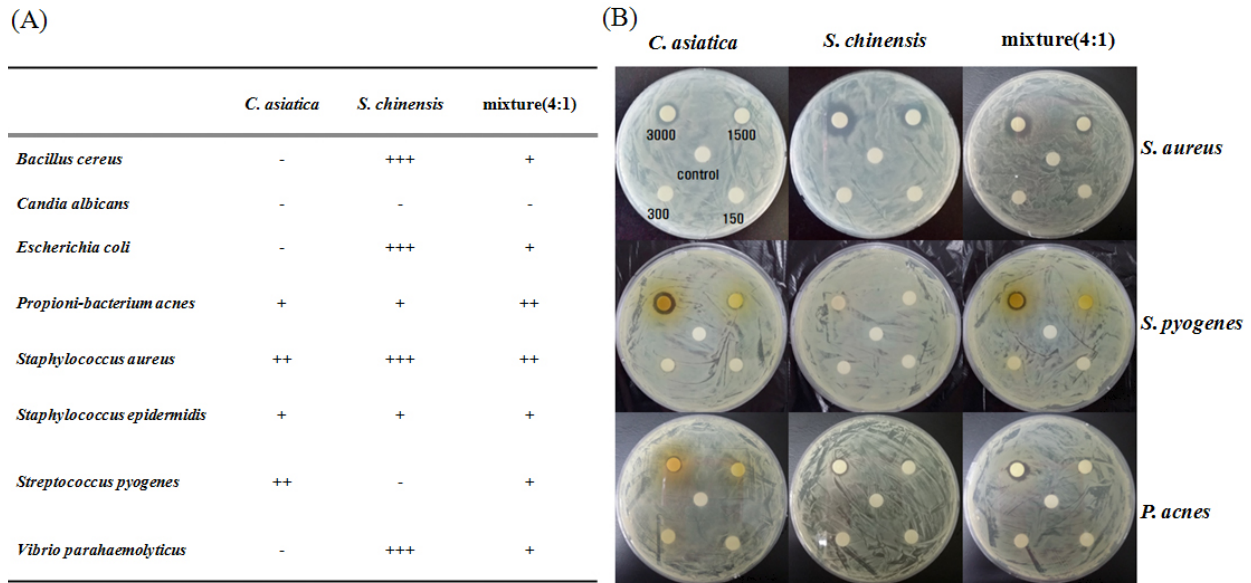


Fig. 1 Antimicrobial activity of *Centalla asiatica* extracts. Each bacterium were cultured and inoculated on solid media as described in Materials and Methods. Inhibition zone was measured after cultured upon treatment of extracts methanol, ethanol and water and the result with 50% methanol extract was presented. (A) antibacterial activity against 7 bacteria and 1 fungus species were indicated (B) An example of inhibition zone of bacterial growth by treatment of *C. asiatica* and omiza edtracts.

결과 병풀 추출물은 *Propioni-bacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*에 대하여 항균활성을 확인하였으며 특히 *S. pyogenes*의 경우에는 병풀추출물에 의한 경우에만 다소 강한 항균활성을 나타내었으며 곰팡이(*C. albicans*)의 경우에는 병풀과 오미자의 처리에 따른 항균활성은 확인하지 못하였다. 하지만 *P. acnes*와 *S. epidermidis*는 오미자 추출물과 유사한 수준이었으며 *S. aureus*에 대하여서는 병풀 추출물이 오미자에 비하여 오히려 낮은 수준의 항균력을 나타내었다. 한편 오미자추출물에 의하여 뚜렷한 항균력을 나타낸 *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*균주에 대하여 병풀 추출물은 항균력을 확인 할 수가 없었다. 특히하게도 *P. acnes*는 병풀 또는 오미자의 단일 추출물로 처리했을 때보다 병풀과 오미자 혼합추출물 (4:1)에서 상승효과를 보이는 것으로 나타나 추후 이에 대한 보다 세밀한 연구가 필요한 것으로 조사되었다.

이러한 연구결과는 Arumugam et al (2011)의 연구보고와는 일치하는 반면에 Idris와 Nadzir (2017)의 연구결과와는 다소 상반되는 것으로 나타났다. 즉 100%, 70%, 30%의 에탄올, 메탄올 그리고 물로 각각 추출한 추출물에 대하여 *Aspergillus Niger*와 *Bacillus Subtilis*에 대한 항균력을 디스크 확산법으로 조사한 결과 100%의 에탄올 추출물에서 두 균주에 대하여 가장 강한 항균력을 나타내었다고 하였다. 또한 Lalitha et al. (2013)은 단순히 물로 추출한 추출물을 사용하여 7종의 곰팡이와 4종의 세균에 대하여 합성 농약과 항생제에 비교될 만한 수준의 항균력을 나타내었다고 하였다. 한편, 조직배양

식물체를 사용한 바이오 리액트에서 대량으로 생산한 캘러스 또는 재 분화 식물조직에 대한 항균 효과에 관한 연구결과도 보고되었다(Arumugam et al. 2011; Bibi et al. 2011).

항염증효능

Raw 264.7는 세균의 감염에 의하여 숙주의 비 특이적 면역반응에 중요한 역할을 하는 세포로서 LPS와 같은 자극물질에 노출되면 산화질소(NO)를 유발하는 것으로 알려져 있으며 (Jo et al. 2014), 동 세포를 이용하여 주어진 추출물의 처리에 의하여 산화질소의 생성 정도를 측정하여 그 억제효과에 의한 상대적인 항염증효능을 조사하였다. 항염증효능의 분석을 수행하기 전에 먼저 본 연구에 사용한 병풀 또는 오미자 추출물에 대한 Raw264.7 세포에 대한 독성을 먼저 조사하기 위하여 농도별 세포생존율을 측정한 결과 메탄올, 에탄올 그리고 물 등의 용매별 추출물에 대하여 1250 ppm이하로는 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2A).

Raw 264.7세포를 이용하여 용매별로 추출한 병풀, 오미자 그리고 병풀과 오미자 혼합물의 처리에 따른 산화질소 생성 정도를 조사한 결과 에탄올과 물로서 추출한 시료에서는 뚜렷한 감소효과를 보이지 않았으나 메탄올 추출물을 처리한 결과 1250 ppm에서는 15.1 uM, 625 ppm에서 13.1 uM로 산화질소의 생성정도가 50% 이상 감소하였음을 확인하여 뚜렷한 항염증효능이 있는 것으로 조사되었다(Fig. 2B).

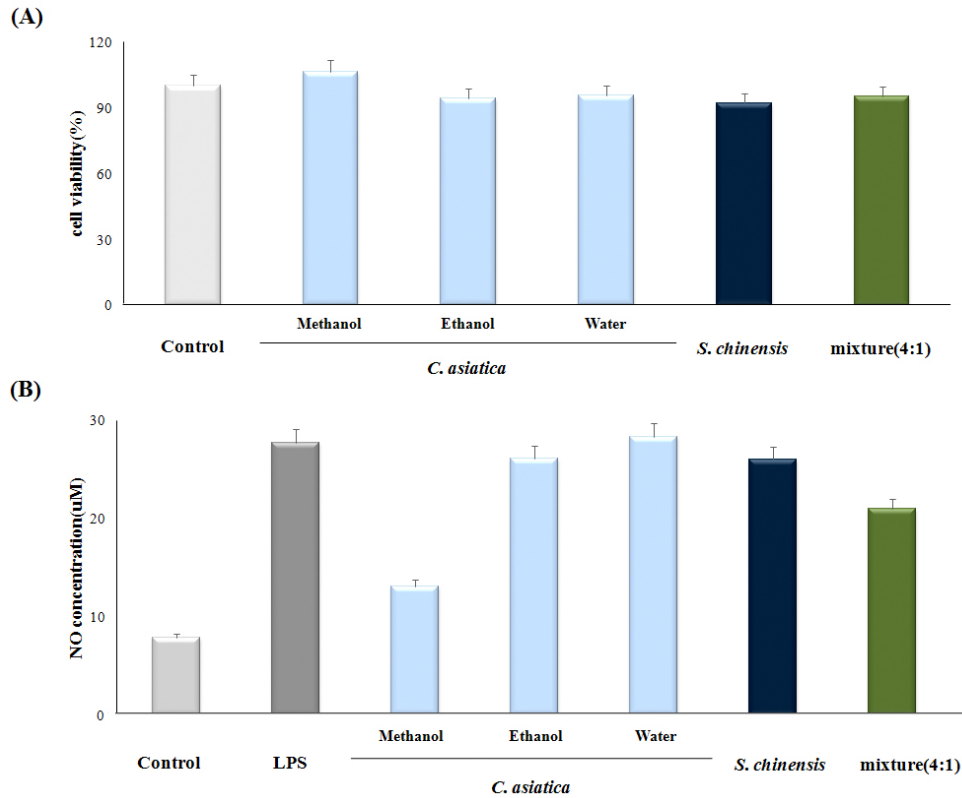


Fig. 2 The anti-inflammatory activity of *C. asiatica* and omiza extracts as a control. The level of NO was measured upon treatment with *C. asiatica* and omiza (*Schisandro chinensis*) extracts by methanol, ethanol and water on Raw 264.7 cell and cytotoxicity was measured as described in Materials and Methods. (A), cytotoxicity of *C. asiatica* extract against Raw 264.7 cell; (B), the level of NO concentration upon treatment of each extracts as indicated

미백효능

미백효능을 분석하기 위하여 악성 흑색종 세포주인 B16F10를 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 배양하여 α-MSH 호르몬 (100 nM)을 처리하여 멜라닌 세포의 증식을 유도하고 tyrosinase를 비롯한 멜라닌 합성 관련 효소들의 발현이 촉진되어 멜라닌의 색소가 생성되는 과정에 병풀 추출물의 처리에 따른 상대적인 멜라닌 색소 생성 억제효과를 조사한 결과, 물로서 추출한 병풀 추출물이 대조구에 비하여 약 20%에 근접한 멜라닌 색소농도의 감소율을 나타내어 가장 뚜렷한 억제효과를 나타내었으며, 메탄올 추출물은 약 5%, 에탄올 추출물은 약 10%의 감소효과를 나타내었다(Fig. 3B). 한편 MTT assay를 통해 세포생존율을 측정된 결과, 병풀과 오미자의 혼합추출물을 1000 ppm까지 처리하였을 경우에 세포의 생존율이 약 85%로 조사되어 약간의 세포독성을 나타낸 것으로 보였으나(Fig. 3A), 그 이하의 농도 즉 125, 250, 500 ppm에서는 모든 농도와 추출물에서 세포 독성이 없음을 확인하였으며 병풀 또는 오미자 단독 추출물의 경우에는 1000 ppm 농도를 처리하였을 경우에도 거의 독성이 없는 것으로 조사되었다.

주름개선효능

주름개선효능을 조사하기 위하여 PMA만 처리한 대조군과 병풀 추출물을 농도별(100, 200, 400 ppm)로 처리하여 조사한 결과 PMA만 처리한 대조군은 MMP-1의 함량이 약 29.0 ng/ml로 증가하였으며, 병풀추출물을 100과 200 ppm으로 전처리 후 PMA를 처리한 경우 MMP-1의 함량은 약 29.9, 29.6 29.0 ng/ml로 거의 동일한 수준이었으나 400 ppm을 처리하였을 경우에는 0.01 ng/ml로 급격하게 감소하였다(Fig. 4A). 한편 병풀 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 Human dermal fibroblast (NHDF)세포를 사용하여 EZ-CyTox시약처리에 의한 NHDF세포의 생존율을 측정된 결과, 250 ppm 농도에서는 92.3%의 세포가 생존하여 독성을 보이지 않았으나 500 ppm 농도를 처리한 경우에는 세포 생존율이 급격하게 감소하여 3.3%의 세포만 생존하였다. 이러한 결과는 병풀 추출물의 세포독성에 영향을 미치는 농도의 범위가 극히 제한적이라는 사실을 암시하여 주는 것으로 이에 대한 보다 세밀한 연구가 필요한 것으로 조사되었다(Fig. 4B).

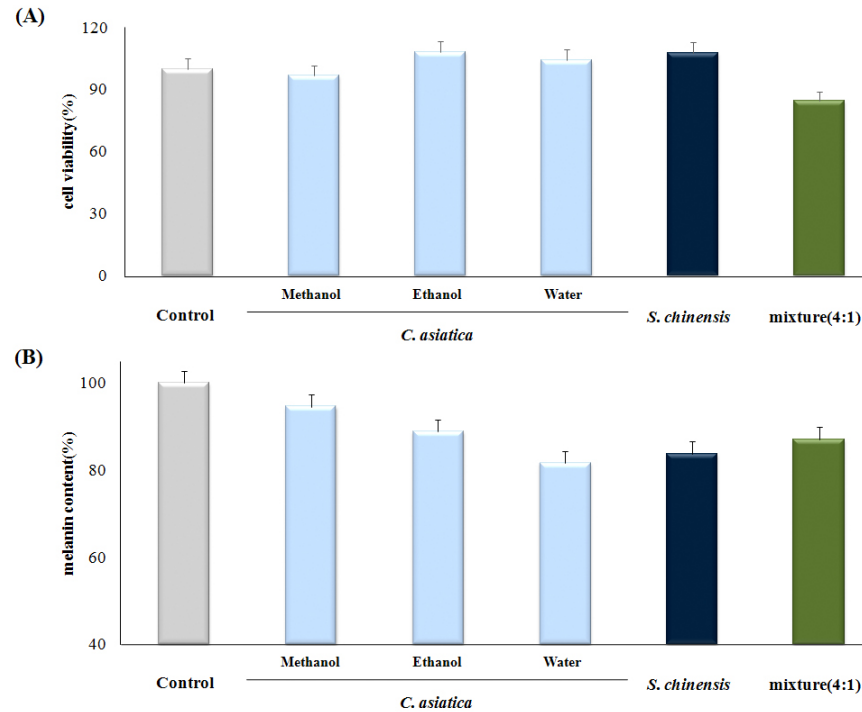


Fig. 3 The skin whitening effect of *C. asiatica* extracts based on the relative inhibition ability of melanin production upon treatment of *C. asiatica* extract by using B16F10 cell. Each extracts was treated on B16F10 cell the level of melanin concentration and cytotoxicity were measured as described in Materials and Methods

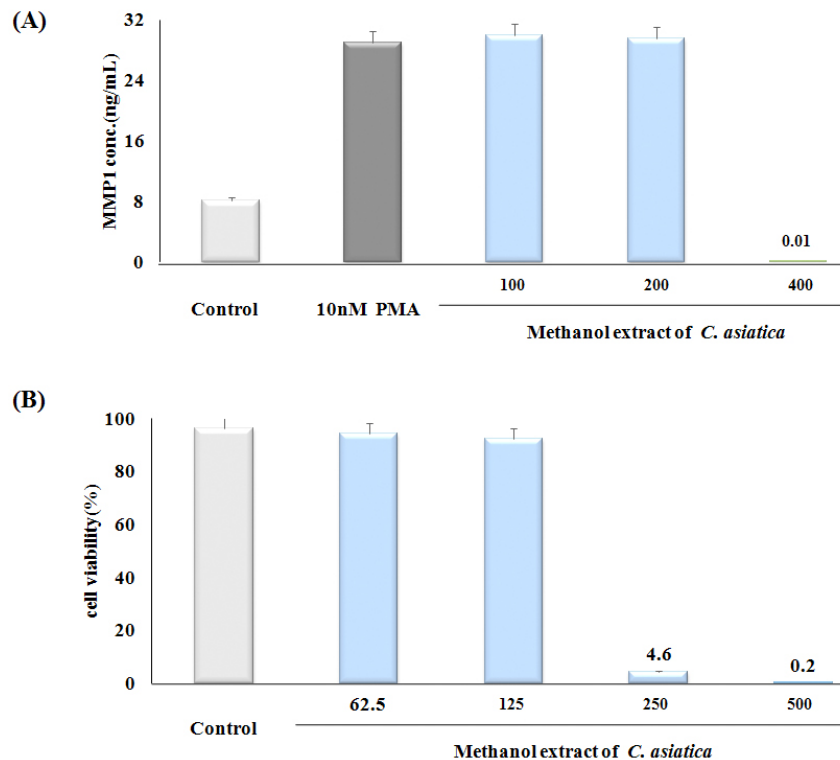


Fig. 4 The skin wrinkle improvement effect of *C. asiatica* extract based on the relative inhibition ability of collagenase activity by using NHDF cell and PMA as a substrate upon treatment of each extracts as indicated. The cytotoxicity was measured based on the survived cells after treatment of extracts by using EZ-Cytox solution

요약

병풀(*Centella asiatica* L. Urban)은 피부상처의 치료제 등의 원료로 해마다 해외 수입량은 증가하고 있으나 국내의 자생하는 *Centella asiatica*종의 조사 및 재배에 관한 연구는 극히 미진하다. 따라서 본 연구는 경상남도 함천의 농가에서 재배 중인 국내 자생종인 병풀에 대하여 항균성, 항염증 등을 조사하고, 피부의 상처 및 노화와 관련된 미백효능과 주름개선효과 등에 관한 기초 실험을 수행한 결과 항균 및 항염증 효능은 메탄올 추출물 그리고 미백효능은 물로 추출한 경우에 가장 높은 효능을 확인 할 수 있었으며 보다 상세하게 설명하면 다음과 같다. 7종의 세균과 1종의 곰팡이에 대하여 50% 메탄올로 추출한 병풀 추출물을 처리한 결과 대부분의 세균들은 대조군으로 처리한 오미자 추출물군과 비교하여 유사하거나 낮은 수준의 유의한 항균력을 나타내었으나 *S. pyogenes*은 유일하게 병풀추출물에서만 항균력을 보였다. 곰팡이인 *C. albicans*는 병풀과 오미자 모두의 처리에 대하여 항균활성을 확인 할 수가 없었다. Raw 264.7세포를 이용한 항염증효능을 조사한 결과 50%메탄올로 추출한 추출물 농도별로 처리한 결과 대조구에 비하여 50% 이상의 산화질소 생성량이 감소함을 확인 할 수 있었다. 한편 B16F10세포를 이용한 미백효능을 조사한 결과에서는 물로 추출한 추출물을 처리한 결과 대조구에 비하여 멜라닌의 농도가 약 20%까지 감소하였음을 확인하였다. NHDF세포를 이용하여 병풀추출물을 처리한 결과 주름개선효능의 지표에 해당하는 MMP-1의 급격한 감소율을 나타내는 처리농도(400 ppm)를 확인하였으나 강한 세포독성도 동시에 확인이 되어 향후 추가연구가 필요한 것으로 조사되었다.

사사

본 연구는 재단법인 경남한방약초연구소 자체과제로 수행 하였습니다.

References

- Ariffin F, Chew SH, Bhupinder K, Karim AA, Huda N (2011) Antioxidant capacity and phenolic composition of fermented *Centella asiatica* herbal teas. *J Sci Food Agric* 91:2731-2739
- Arumugam T, Ayyanar M, Pillai YJK, Sekar T (2011) Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*. *Bangladesh J Pharmacol* 6:55-60
- Babykutty S, Padikkala J, Sathiadevan PP, Vijayakurup V, Azis TKA, Srinivas P, Gopala S (2009) Apoptosis induction of *Centella asiatica* on human breast cancer cells. *Afr J Trad CAM* 6:9-16
- Bibi Y, Zia M, Nisa S, Habib D, Waheed A, Chaudhary FM (2011) Regeneration of *Centella asiatica* plants from non-embryogenic cell lines and evaluation of antibacterial and antifungal properties of regenerated calli and plants. *J Biol Eng* 5:13-21
- Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M (2013) *Centella asiatica* in cosmetology. *Postep Derm Alergol* 1:46-49 DOI: 10.5114/pdia.2013.33378
- Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Dańczak-Pazdrowska A, Brzezińska M (2014) *Centella asiatica* in dermatology: an overview. *Phytother Res* 28:1117-1124
- Ceremuga TE, Valdivieso D, Kenner C, Lucia A, Lathrop K, Stailey O, Bailey H, Criss J, Linton J, Fried J, Taylor A, Johnson AD (2015) Evaluation of the anxiolytic and antidepressant effects of asiatic acid, a compound from Gotu Kola or *Centella asiatica*, in the Male Sprague Dawley Rat. *AANA J* 83:91-98
- Choi CH, An JE, Jeong HW (2016) Study of fermentation extract made from Ricd Bran and Dendropanax on the whitening effects in B16F10 cell line. *J Phy & Pat Kor Med* 30:301-307
- Flora SJS, Gupta R (2007) Beneficial effects of *Centella asiatica* aqueous extract against arsenic-induced oxidative stress and essential metal status in rats. *Phytother Res* 21:980-988
- Ha JH, Kwon MC, Kim Y, Jeong SS, Jeong MH, Hwang B, Lee HY (2009) Enhancement of immuno-modulatory of *Centella asiatica* L. Urban with edible polymer through nano-encapsulation process. *Kor J Med Crop Sci* 17:257-265
- Hashim P, Sidek H, Helan MHM, Sabery A, Palanisamy UD Ilham M (2011) Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules* 16:1310-1322, doi:10.3390/molecules16021310
- Idris FN, Nadzir MM (2017) Antimicrobial activity of *Centella asiatica* on *Aspergillus niger* and *Bacillus Subtilis*. *Chem Engin Trans* 56:1381-1386
- Jo CH, Kim SY, In-Sook An IS (2014) The improving effect of *Centella asiatica* extracts on erythema on scalp of aged 20-50's women. *Kor J Aesthet Cosmetol* 12:921-927
- Kil YS, Sin SM, Lee DY, Min JW, Lee SW, Kim YH, Goo YM (2018) Analysis of triterpene glycoside levels and antioxidant activity in the different shoot tissues of *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Life Sci.* submitted
- Kim HP, Kim YC (1995) Effects of titrated extract of *Centella asiatica* and epidermal growth factor on the proliferation of human epidermal keratinocyte. *J Appl Pharmacol* 3:80-84
- 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. *Kor J Med Crop Sci* 10:375-378
- Kim YJ (2010) Effects of *Centella asaitica* extracts on anti-oxidant and collagen synthesis according to extraction conditions. *J Kor Soc Cosm* 16:834-839
- Krishnamurthy R, Senut M-C, Zemke D, Min J, Frenkel MB, Greenberg EJ, Seong-Woon Yu S-W, Ahn N, Goudreau J, Kassab M, Panickar KS, Majid A (2009) Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from *Centella asiatica*, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 15:2541-2550
- Kumar A, Dogra S, Prakash A (2009) Neuroprotective effects of *Centella asiatica* against intracerebroventricular colchicine-

- induced cognitive impairment and oxidative stress. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2009:1-8 (article ID 972178), doi:10.4061/2009/972178
- Kwon MC, Han JG, Ha JH, Oh SH, Jin L, Jeong HS, Choi GP, Hwang B, Lee HY (2008) Immuno-regulatory effect on *Centella asiatica* L. Urban extraction solvent associated with ultrasonification process. *Kor J Med Crop Sci* 16:294-300
- Lee JY, Min YK, Kim HY (2001) Isolation of Antimicrobial Substance from *Schizandra chinensis* Baillon and Antimicrobial Effect. *Korean J Food Sci Technol* 33:389-394
- Lalitha V, Kiran B, Raveesha.K A (2013) Antibacterial and antifungal activity of aqueous extract of *Centella asiatica* L. against some important fungal and bacterial species. *World J Pharm Pharmacue Scie* 2:4744-4752
- Mato L, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tongun T, Piyawatkul N, Yimtae K, Thanawirattananit P, Sripanidkulchai B (2011) *Centella asiatica* improves physical performance and health-related quality of life in healthy elderly volunteer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011 (Article ID 579467):1-7, doi:10.1093/ecam/nep177
- Orhan IE (2012) *Centella asiatica* (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:1-8
- Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MTP, Barbosa NR (2009) Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *Int J Mol Sci* 10:3713-3721
- Rao MK, Rao MS, Rao GS, (2007) Treatment with *Centella asiatica* (Linn) fresh leaf extract enhances learning ability and memory retention power in rats. *Neurosciences* 12:236-241
- Schaneberg BT, Mikell JR, Bedir E, Khan IA(2003) An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Pharmazie* 58:381-384
- Suh KS, Lee JW, Cho SY, Kim ST (2007) The effect of asiaticoside on the improvement of Lip. *Kosin Medical J* 22:220-231
- Taemchuay D, Rukkhwamsuk T, Sakpuaram T, Ruangwises N (2009) Antibacterial activity of crude extracts of *Centella asiatica* against *Staphylococcus aureus* in bovine. *Mastitis-Kasetsart Veterinarians* 19:119-128
- Verma RK, Bhartariya KG, Gupta MM, Kumar S (1999) Reverse-phase high performance liquid chromatography of asiaticoside in *Centella asiatica*. *Phytochem Anal* 10:191-193
- Yoo YA, Ham HJ, Yu IS, Yook DH, Kim SJ (2018) Antimicrobial Activities of Omija Extracts Against *Bacillus cereus* and *Escherchia coli*. *J Bacteriol Virol*. 48(1):31-36
- Zaidan MR, Noor Rain A, Badru AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I (2005) In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop Biomed* 22:165-70