

제주용암해수로 숙성된 병풀 추출물의 항염 및 보습 효과

이지선* · 명철환** · 이지은** · 조미래*** · 김홍석*** · 이나영*** · 우희동**** · 유재은**** · 조해† · 황재성**†

*에이비지노쓰아시아 (주) 글로벌 디스커버리 연구개발 아시아 이노베이션 센터

**경희대학교 생명공학원

***㈜두래 기술연구소

****한국암웨이 (주) 연구개발부

(2019년 11월 11일 접수, 2019년 11월 30일 수정, 2019년 12월 3일 채택)

Anti-Inflammatory and Moisturizing Effect of *Centella* Extracts Fermented in Jeju Lava Water

Jeesun Lee*, Cheol Hwan Myung**, Ji Eun Lee**, Mi-Rae Jo***, Hong-Suk Kim***, Na-Young Lee***,
Heedong Woo****, Jaceun You****, Hae Jo†, and Jae Sung Hwang**†

*ABG North Asia Ltd / Global Discovery R&D Asia Innovation Center, 28F ASEM Tower,
517 Yeongdong-daero, Gangnam-gu, Seoul 06164, Korea

**Department of Genetic Engineering & Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University

***DURAE Corporation/ Research & Development Center

****Amway Korea Ltd/ Research & Development

(Received November 11, 2019; Revised November 30, 2019; Accepted December 3, 2019)

요약: 병풀의 잎과 줄기는 오랜 기간 궤양, 건선과 같은 피부질환 치료를 위한 약재로 사용되어왔으며, 병풀의 유효성분인 asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, madecassic acid와 같은 triterpenoids는 피부 항염 및 피부 광 노화 개선 등의 효능이 밝혀져 있다. 본 연구의 목적은 인체에 유익한 미네랄을 많이 함유하고 있는 제주용암해수로 병풀을 숙성한 뒤 추출하여 피부 항염 및 보습 효능을 확인하는 것이다. 제주용암해수로 병풀을 숙성한 뒤 추출물을 HPLC에 분석하였을 때 triterpenoids의 농도가 더 증가하는 것을 관찰하였다. 숙성한 병풀 추출물의 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성과 PM10 혹은 UV에 의해 유도된 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인들의 발현을 확인하였다. 실험 결과, 숙성한 병풀 추출물이 NO와 IL-6, IL-8, TNF- α 의 발현을 저해하였고 숙성하지 않은 군에 비해 숙성한 군에서 억제 효능이 더 높은 것을 확인하였다. 또한, 피부 보습 효능을 확인하기 위해 HaCaT 세포에서 HA의 합성을 확인한 결과 숙성하지 않은 군에서는 효능이 없는 것에 반해 숙성한 군에서 농도 의존적으로 HA 생성이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 제주용암해수로 숙성한 병풀 추출물은 항염과 보습에 유효한 소재임을 확인하였고 숙성하지 않은 병풀 추출물보다 효능이 우수할 것으로 판단된다.

Abstract: The leaves and stems of *Centella asiatica* have a long history of their usage as a medicine for the treatment of skin diseases such as ulcers and psoriasis, especially in Asia. Triterpenoids, the active components of *Centella asiatica* including asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid, have shown to inhibit skin inflammation as well as improve skin photoaging. The main objective of this study is to investigate whether the *Centella asiatica* ripened

† 조 해 (e-mail: hae@amway.com)

† 황재성 (e-mail: jshwang@khu.ac.kr)

call: 031-201-5638

with lava seawater which is rich in minerals known to be beneficial to human body can provide anti-inflammatory and moisturizing effects to skin. HPLC analysis showed that the concentration of triterpenoids increased further after ripening *Centella asiatica* with lava seawater. In order to confirm the inflammatory efficacy of the extract of the ripened *Centella asiatica*, the production of NO in LPS-activated RAW 264.7 cells and the expression of inflammatory cytokines in PM10 or UVB-induced HaCaT cells were observed. We found that the extract of the ripened *Centella asiatica* inhibited the expression of NO, IL-6, IL-8, and TNF- α and had higher inhibitory effect compared to the extract of the non-ripened *Centella asiatica*. In order to confirm the skin moisturizing effect, we investigated the synthesis of HA in HaCaT cells. The result showed HA production was enhanced in a concentration-dependent manner from the ripened group, while there was no efficacy from the non-ripened group. Taken together, it is concluded that the extract of the *Centella asiatica* ripened with lava seawater was effective in anti-inflammation and moisturization.

Keywords: *Centella asiatica*, lava sea water fermentation, *Centella* extract, anti-inflammatory, moisturizing agent

1. 서 론

Gotu kola 혹은 Asiatic pennywort로도 불리는 병풀(*Centella asiatica*)은 미나리아과(Umbelliferae)에 속한 다년생 포복성 초본으로 국내에서는 제주도 및 남부 지방의 섬이나 인도, 스리랑카, 남아프리카 등의 습지에서 서식하는 식물이다[1]. 병풀의 잎과 줄기는 오랜 기간 동양에서 약용 식물로 사용되어 왔고[2], 19세기에 루푸스, 확장성 궤양, 습진, 건선과 같은 피부질환의 치료에 도움이 되는 것으로 인도 약전에 기록되었다[3]. 병풀의 유효성분은 asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, madecassic acid를 포함하는 pentacyclic triterpenes으로[4], 이들 성분은 피부 세포의 콜라겐 형성 효능과 항산화 활성[5], 피부 노화 억제 효능[6], 항염 효능[7], 피부 광노화 개선[8], 상처 치유 효과[9] 등의 효능이 뛰어난 것으로 보고되어 있으며 국내에서 상처치료 연고제로 사용되고 있다. 그 뿐만 아니라 신경 안정과[10], 항우울[11], 면역기능 향상[12]에 관한 효능도 알려져 있다.

제주용암해수는 바닷물이 화산 암반층에 의해 자연 여과된 지하수로 칼슘, 마그네슘, 게르마늄, 셀레늄 등 다량의 유익한 미네랄을 함유하고 있다[13]. 이에 따라 용암해수의 산업적 활용 가치가 높게 평가되고 있으며 음료, 식품, 화장품, 스파 등 다양한 활용 방안에 대한 연구가 진행되고 있다. 제주용암해수의 피부 효능에 대한 보고는 각질 형성 세포를 이용한 실험에서 제주용암해수가 피부 구조를 구성하는 단백질들의 발현을 증가시켜 피부 장벽기능을 강화하고 피부의 수분 이동 채널에 관여하는 유전자와 수용체의 발현을 증가시켜 피부 보습을 향상시키는 것으로 보고되어 있다[14].

유해 환경에 노출된 피부세포는 interleukins (ILs)과

tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 여러 cytokines을 분비하여 염증반응을 촉진시키고 염증을 유발하는 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 발현시켜 nitric oxide (NO)를 생성하게 된다. NO는 세포 신호 전달과 면역학적 방어에 중요한 역할을 하는데 다량의 NO 생성 시 피부 염증을 더 악화시키는 것으로 알려져 있다[15,16]. 한편, hyaluronic acid (HA)는 고분자 화합물로 피부의 탄력성을 유지시키고 표피의 수분 증발을 억제하는 역할을 한다. 이에 따라 피부 탄력과 보습을 증가시키기 위해 피부 내의 HA를 증가시키려는 연구가 수행되고 있다[17].

따라서 본 연구에서는 독성이 없고 친환경적인 제주용암해수로 병풀을 숙성한 뒤 유효성분을 추출하였고, 피부의 염증 지표와 HA 합성을 측정하여 숙성된 병풀 추출물에 의한 피부 항염 및 보습 효과를 검증하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용된 병풀 (*Centella asiatica* L. Urban)은 충북 충주시 소재의 센텔라병풀농원에서 구입하여 사용하였다. 제주용암해수는 제주테크노파크 용암해수 센터에서 구입하였고 경도는 500으로 맞추어 사용하였다. 병풀 대비 20배의 경도를 500으로 맞춘 제주용암해수를 넣고, 밀봉한 다음, 70 °C에서 7일간 숙성을 진행하였다. 숙성된 병풀은 정제수로 세척하여 염분을 제거한 다음 열풍 건조를 진행하고, 본 실험에 이용하였다.

2.2. 용암해수 고온 숙성 병풀 추출물의 조제

고온 숙성한 병풀은 10배의 70% 에탄올을 이용하여 70

℃에서 5 h 동안 교반 추출을 진행하였다. 추출액을 filter paper (공극도, 1 μm)를 통해 여과하여 고형물을 제거하고, 추출액을 회전식 감압기 (EYELA, Rotary evaporator, Japan)를 이용하여 농축시켰다. 이를 동결 건조하여 용암해수 고온 숙성 병풀 70% 에탄올 추출물 파우더를 제조하고 실험에 사용하였다. 용암해수 고온 숙성 병풀 70% 에탄올 추출물의 성분 및 효능을 비교하고자, 대조군으로 병풀 대비 10(??)의 70% 에탄올을 이용하여 70℃에서 5 h 교반 추출을 통해 최종 9.85% 수율의 병풀 70% 에탄올 추출물을 수득하여 수득률을 비교하였다.

Table 1. Extraction efficacy of *Centella asiatica*

	병풀 70% 에탄올 추출물	용암해수 고온숙성 7일차 70% 에탄올 추출물
수율(%)	9.85%	6.40%

2.3. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

분석에 사용된 HPLC 기기는 Waters 2695/2998 (HPLC-PDA)이며, 컬럼은 Mightysil C₁₈, 250 × 4.6 mm를 사용하였다. Table 2과 같은 조건으로 기올기 용리하였으며 검출 파장은 206 nm에서 검출하였다. 시험 용액은 0.45 μm로 여과하여 사용하였다. 표준시약(madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, asiatic acid)는 Sigma Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다.

Table 2. Analysis condition of HPLC

Items	Conditions	
Instrument	Waters 2695/2998 (HPLC-PDA)	
	Solvent A: Water	
	Solvent B: Acetonitrile	
	Time (min) Solvent A (%) Solvent B (%)	
	0 80 20	
Mobile phase	Gradient	15 65 35
		30 35 65
		35 20 80
		40 20 80
		45 80 20
		55 80 20
Column	Mightysil C ₁₈ , 250×4.6 mm	
Colum temperature	40℃	
Flow rate	1.0 mL/min	
Injection volume	10 μL	
Detection	PDA Detector (206 nm)	

2.4. 미세먼지(PM10) 제조

미세먼지는 경기보건환경연구원에서 필터지를 공급받아 추출물을 제조하여 실험하였다. 잘게 자른 필터지를 비이커에 담고 정제수를 가하여 마그네틱 바로 교반하면서 12 h 동안 추출한 후 추출액을 회수하고 남은 필터에 새로운 용매를 가하여 1 h 동안 초음파로 2차 추출한다. 1, 2차 추출액을 모아서 농축한 후 100배 희석된 상태로 *in vitro* 시험에 사용하였다.

2.5. 세포 배양

인간 유래 각질세포(human keratinocyte)는 을지대 이창석 교수로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 (ATCC, Rockville, USA)과 HaCaT cell을 배양접시의 바닥에 접종한 후, 페니실린(100 IU/mL) (Welgene, Republic of Korea), 스트렙토마이신(100 μg/mL) (Welgene, Republic of Korea), 10% fetal bovine serum (FBS) (Welgene, Republic of Korea)를 함유하는 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Welgene, Republic of Korea) 배지를 넣고 37 ℃, 5% CO₂ 세포 배양기 내에서 배양하였다.

2.6. 세포 독성 평가

96 well plates에 human keratinocyte인 HaCaT cell과 mouse macrophage cell인 RAW 264.7 cell을 각각 1.5 × 10⁴ cells/well, 2.4 × 10⁴ cells/well 각각 분주하여, 37 ℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 24 h 후, 시료를 농도별로 처리하여 다시 24 h 동안 배양하였다. 그 후, 세포에 WST-1 solution (EZ-cytox, EZ-3000, Republic of Korea)을 처리하여 반응시키고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader에서 450 nm 흡광도로 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{시료 처리 군} / \text{대조군}) * 100$$

2.7. NO 생성량 측정

RAW 264.7 cell을 96 well plate에 2.4 x 10⁴ cells/well씩 분주한 후, 37 ℃, 5% CO₂세포 배양기에서 배양하였다. 24 h 후, LPS와 시료를 농도별로 처리하고 다시 24 h 동안 배양하였다. Griess reagent는 5% phosphoric acid에 sulfanilamide를 1% 농도로 용해 한 A 시약과 naphthylethylenediamine를 정제수에 0.1% 농도로 용해한 B시약을 동량 혼합하여 사용하였다. 세포 배양액과 griess reagent를 1 : 1로 반응시킨

다음 그 결과를 ELISA reader로 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite 표준 곡선을 이용하여 측정하였고, NO의 양은 세포의 단백질 정량을 통해 결과값을 계산하였다.

2.8. Hyaluronic Acid (HA) 생성량 측정

HaCaT cell을 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well로 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 24 h 후, 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 그 후, 상층액을 취하여 human hyaluronan ELISA Kit DY3614 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 를 사용하여 실험을 진행한 뒤 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. HA의 양은 세포의 단백질 양으로 보정하여 평가하였다.

2.9. IL-6, TNF- α 생성량 측정

HaCaT cell을 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 PM10과 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 IL-6, TNF- α ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 실험을 진행한 뒤 그 결과를 ELISA reader로 450 nm 흡광도에서 측정하였다. IL-6, TNF- α 생성량은 세포의 단백질 양을 대비하여 평가하였다.

2.10. IL-8 생성량 측정

HaCaT cell을 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well로 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. UVB (Ultraviolet) 20 mJ/cm² 를 조사하고 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 IL-8 ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 를 이용하여 실험을 진행한 뒤 그 결과를 ELISA reader로 450 nm 흡광도에서 측정하였다. IL-8 생성량은 세포의 단백질 양을 대비하여 평가하였다.

2.11 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 \pm 표준편차로 나타내며, 각 실험군과의 평균의 차이는 t-test로 분석하여, p-value 값이 대조군과 비교하여 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 병풀의 유효성분 4종 확인

병풀의 주된 효능은 피부 면역 및 생체면역 증강에 높은 활성을 보이는 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, asiatic acid와 같은 triterpenes에 의한 것이다(Figure 1). 숙성은 자체의 효소 또는 외적환경(온도, 습도, 시간, 공간)의 종합적인 작용에 의하여 성분이 분해가 되는 것을 의미한다. 본 연구에서는 추출과정에서 숙성과정에 의한 triterpenes의 추출량과 활성효능을 평가하고자 하였다.

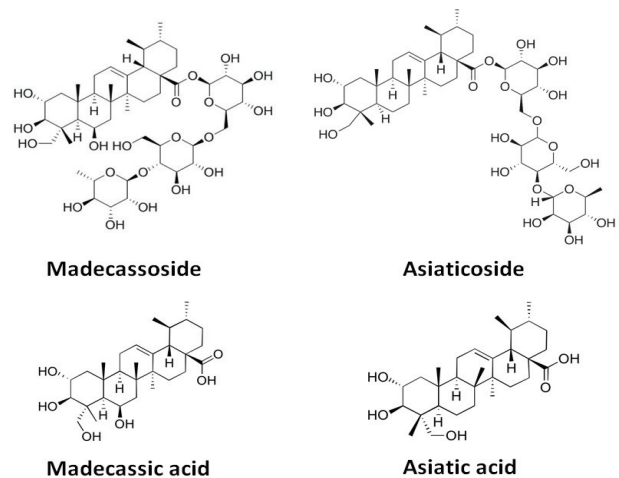
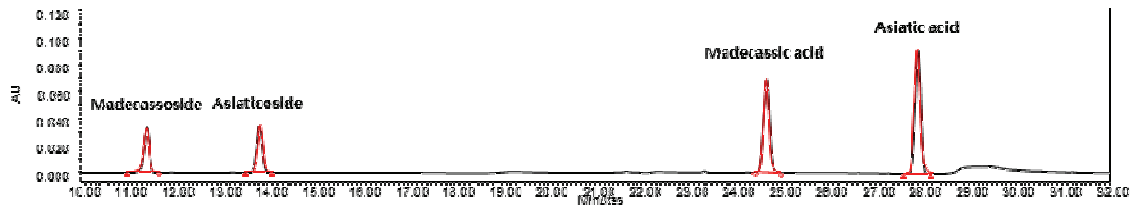


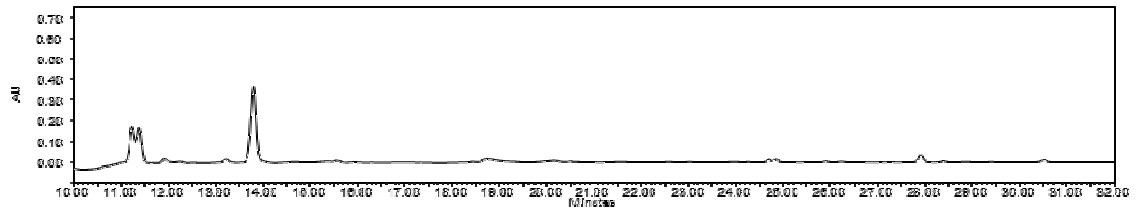
Figure 1. Structures of four major compounds from *Centella asiatica*.

3.2. 추출 조건에 따른 병풀의 활성 물질 분리 효율

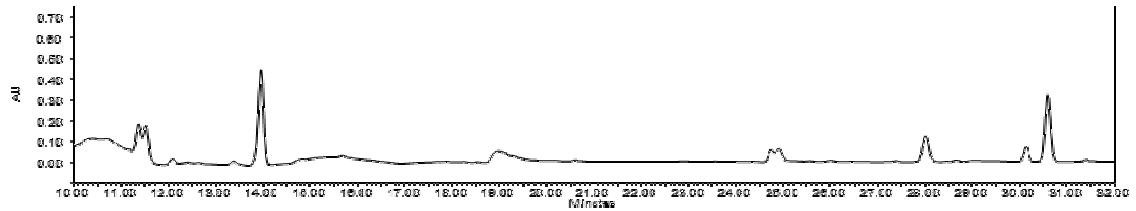
시료의 추출되는 성분과 양은 방법에 따라 추출 수율이 달라질 수 있다. 따라서, 높은 함량의 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, asiatic acid 등의 triterpenes을 추출 조건에 따른 성분 함량을 비교하고자 하였다. 병풀을 용암해수로 숙성시키고 HPLC를 이용해 분석하였다(Figure 2). 그 결과, 추출 조건에 따라 숙성과정을 거친 경우 비숙성에 대비해 madecassoside는 0.59% 감소하였으나 asiaticoside는 1.702%, madecassic acid는 0.432%, asiatic acid는 0.624%가 각각 증가하였다(Table 3). 즉, 추출과정에서 수용성 성분의 손실이 있을 것이란 판단과는 달리, 전반적인 triterpenes의 양이 증가하였다. 이는 수용성 성분의 손실이 있더라도 숙성에 의해 madecassoside와 asiaticoside의 분해작용으로 인해 madecassic acid와 asiatic acid의 생성이 일어났기 때문이라고 판단된다.



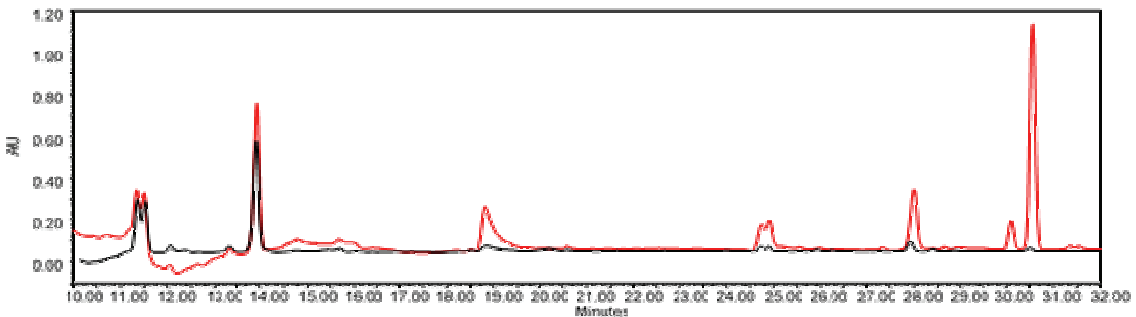
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 2. Comparison of the effective substance content of non-fermented and fermented *Centella* extracts.

- (A) Standard (madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, asiatic acid)
- (B) Non-fermented *Centella* extracts
- (C) Fermented *Centella* extracts
- (D) Overlay of Non-fermented *Centella* extracts (black line) and fermented *Centella* extracts (red line)

Table 3. Extraction efficiency of *Centella* in nonfermented or fermented conditions

	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid
미숙성 병풀 추출물	2.462%	6.532%	0.091%	0.187%
숙성 병풀 추출물	1.872%	8.234%	0.523%	0.811%

3.3. 숙성 병풀 추출물의 NO 생성억제 효과

NO는 병원체에 노출 시 이에 대항하기 위해 macrophage에서 iNOS로 인해 생성되는 강력한 염증 유도 물질로 알려져 있으나 과도한 NO의 발생은 오히려 산화 독성을 유발하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 숙성조건에 따른 병풀 추출물의 NO 생성 저해 활성을 알아보기 위해, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 NO 발생을 유도하였다. 양성대조군인 indometacin (INDO) 처리 시 LPS 처리군에 비해 118% 감소하였다. 비숙성 병풀 추출물의 경우 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 15%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 26%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 18% 유의하게 감소하였다. 숙성 병풀 추출물의 경우 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 23%, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 24%, $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 38%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 52%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 63% 유의하게 NO 발생을 감소시켰다 (Figure 3). 이는 숙성이 병풀의 NO 생성억제 효과를 증대시킨다는 것을 의미한다.

3.4. 숙성 병풀 추출물의 HA 생성 증가 효과

HA는 진피에서 세포의 기질(extracellular matrix)에 해당하는 여러 glycosylated protein을 연결해주고, 구조적으로 글라이코사미노글리칸을 형성하여 수분을 많이 함유할 수 있어 피부의 보습과 탄력을 유지 시킨다. 병풀 추출물이

HA의 합성을 높일 수 있는지 확인하기 위해 HaCaT cell에 병풀 추출물을 처리한 뒤, HA 생성량을 ELISA를 통해 확인하였다. 실험 결과, 양성대조군인 RA 10 μM 처리 시 224% 증가하였다. 숙성된 병풀 추출물에서만 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 76%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 182%, $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 252% HA의 발현을 증가시켰다(Figure 4). 따라서, 병풀 추출의 숙성과정이 HA의 생성에 중요하다는 것을 의미한다.

3.5. 숙성 병풀 추출물의 IL-8 생성억제 효과

미숙성 병풀 추출물과 숙성 병풀 추출물의 항염 효과를 통해, 병풀의 항염 효과에 숙성과정이 미치는 영향을 확인하고자 하였다. HaCaT cell에 UV를 조사하여 IL-8 생성을 유도한 뒤, 병풀 추출물의 숙성 여부가 IL-8의 생성억제에 미치는 영향을 ELISA를 통해 확인하였다(Figure 5). 양성대조군인 dexamethasone (Dexa) 처리 시 UV처리군에 대비하여 IL-8의 생성이 147% 감소하였고 비숙성 병풀 추출물 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 44%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시, 86% 감소하였다. 숙성 병풀 추출물 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 54%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 91%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 121% 유의하게 감소하였다. 따라서, 병풀 추출물의 IL-8 생성 감소 효과는 숙성을 통해 더욱 증대되었다.

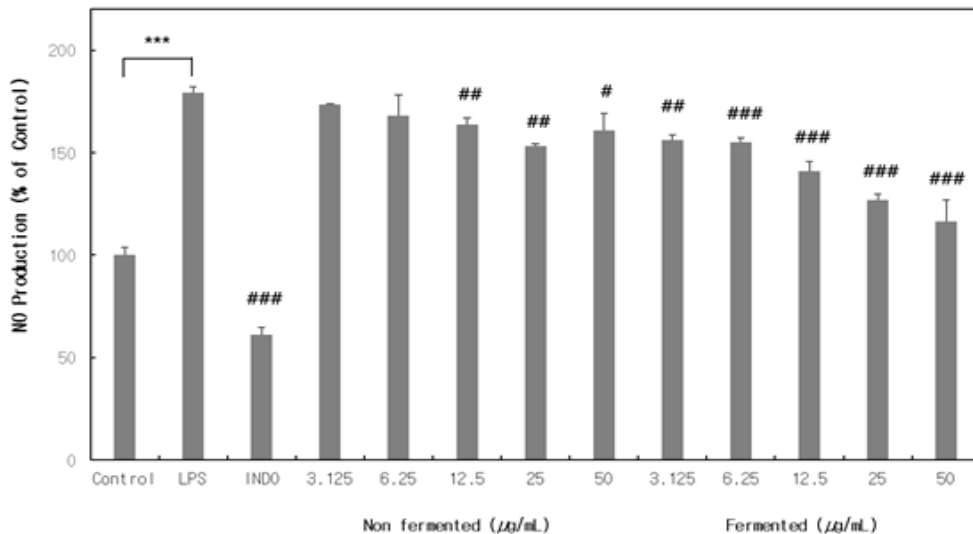


Figure 3. Inhibitory effect of *Centella* extracts on the nitric oxide production induced by LPS.

RAW 264.7 cells were treated with LPS(1 $\mu\text{g/mL}$) and *Centella* extract for 24 h. NO production was detected by Griess assay. The experiment was repeated at three times. *** $p < 0.001$ compared with non-treated cells, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with LPS treated cells.

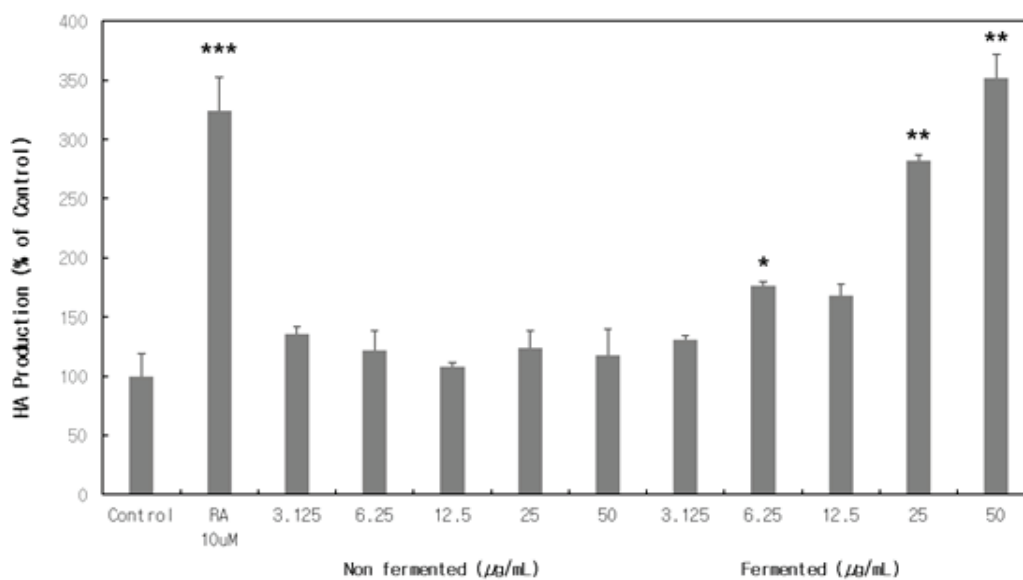


Figure 4. Hyaluronic acid release of *Centella* extracts in HaCaT cells.

HaCaT cells were treated retinoic acid, non- or fermented *Centella* extracts for 24 h. Absorbance was measured at 450 nm. The experiment was repeated at three times. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with non-treated cells.

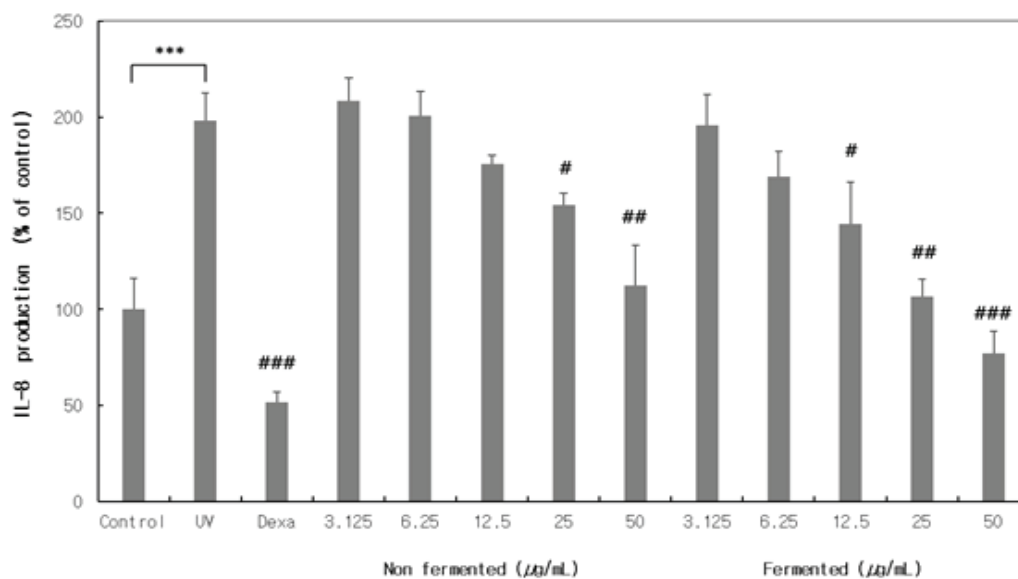


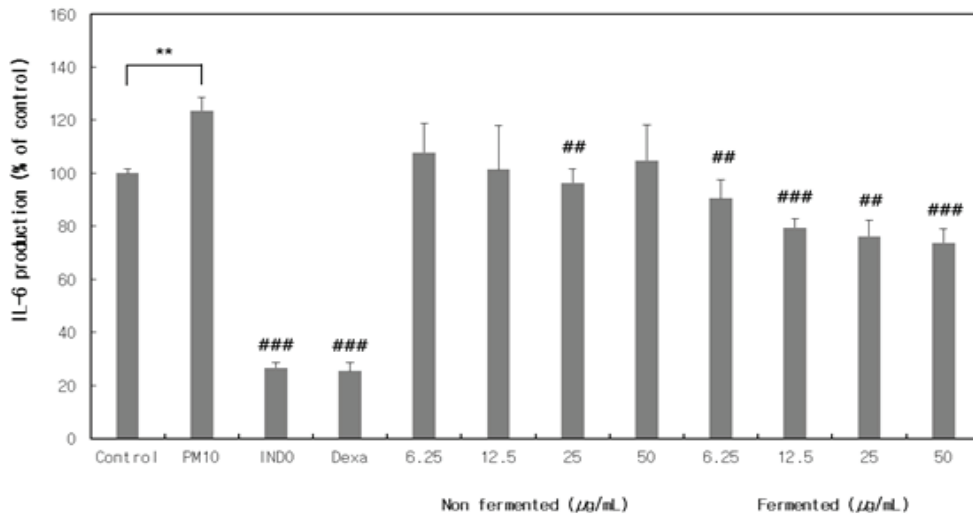
Figure 5. Inhibitory effects of *Centella* extracts on IL-8 production in HaCaT cells.

HaCaT cells were irradiated with UV and treated with the indicated concentrations of *Centella* extracts for 24 h. IL-8 synthesis was detected by IL-8 ELISA. The experiment was repeated at three times. *** $p < 0.001$ compared with nonirradiated cells, Dexa (dexamethasone); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with UV irradiated cells.

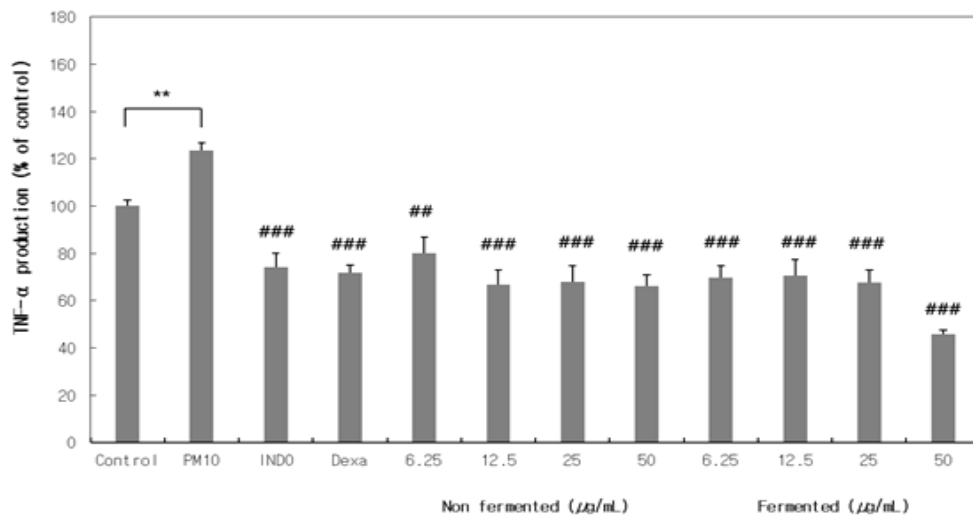
3.6. 속성 병풀 추출물의 IL-6와 TNF- α 생성억제 효과

PM10은 IL-6와 TNF- α 같은 염증성 사이토카인 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. HaCaT cell에 PM10을 처리하여 IL-6와 TNF- α 의 생성을 유도하고 병풀 추출물의 속성 여부가 염증성 cytokine의 분비를 억제하는지 ELISA를 통해 확인하였다. 실험 결과, IL-6는 PM 처리 군에 대비하여 INDO 처리 시 97%, Dexa 처리 시 98% 감소하였다. 비

속성 추출물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 27% 감소하였고 속성 추출물 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 33%, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 44%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 47%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 50% 감소하였다(Figure 6(A)). TNF- α 의 경우, PM 처리 군에 대비하여 INDO 처리 시 49%, Dexa 처리 시 52% 감소하였다. 비속성 추출물은 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 43%, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 57%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 55%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 57% 감소



(A)



(B)

Figure 6. Inhibitory effects of Centella extracts on IL-6 and TNF- α production in HaCaT cells.

HaCaT cells were exposed to PM10 and treated with the indicated concentrations of centella extracts for 24 h. IL-6 and TNF- α synthesis was detected by IL-6 ELISA. The experiment was repeated at three times. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with non-treated cells, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with PM10 treated cells. INDO (Indometacin), Dexa (dexamethasone).

하였고 숙성 추출물은 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 54%, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 53%, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 56%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 78% 감소하였다(Figure 6 (B)).

따라서, 병풀 추출물의 숙성이 IL-6와 TNF- α 의 생성억제에 더 효과적임을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 제주용암해수로 숙성시킨 병풀 추출물의 피부 염증 억제 효능 및 보습 효과를 알아보았다. 제주용암해수로 7일 동안 숙성한 뒤 병풀의 대표 성분인 asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, madecassic acid를 포함하는 pentacyclic triterpenes을 HPLC를 통해 확인하였다. 병풀 추출물의 항염증 연구를 위해 HaCaT cell에 UV와 PM10, LPS 등으로 염증반응을 유도하고 병풀 추출물을 처리하여 ELISA 실험기법을 통해서 염증 지표에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 염증반응 유도군 대비 병풀 추출물이 염증의 지표에 해당하는 NO, IL-6, IL-8, TNF- α 등을 효과적으로 억제하였으며, 무엇보다 추출시 숙성과정을 통해 그 효과가 증대되는 것을 확인하였다. 또한, HA 합성을 ELISA 실험기법을 이용하여 측정 한 결과, HA 합성량 또한 숙성조건의 실험군에서 뚜렷한 증가를 확인하였다. HPLC 결과값을 통해 유효성분인 triterpenes중 asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside의 추출 수율이 높아졌으며, Asiatic acid는 gingival fibroblast, macrophage, bronchial epithelial cell에서 항염효과가 알려져 있고[18-20], madecassic acid는 macrophage에서 anti-inflammatory effect가 알려져 있으며[21], asiaticoside 또한 gastric ulcer의 항염효과가 보고되어 있다[22]. 따라서, 숙성을 통해 증가한 유효성분이 비숙성 병풀 추출물과 비교하여 활성 차이를 나타냈을 것이라 판단된다. 본 연구를 종합하면, 병풀은 추출 시에 숙성과정을 통해 병풀의 유효 성분함량을 더 높이고 좀 더 효과적인 항염효과와 보습 및 탄력증진 효능을 가질 것으로 판단된다.

Reference

1. K. J. Gohil, J. A. Patel, and A. K. Gajjar, Pharmacological review on *Centella asiatica*: A potential herbal cure-all, *Indian J Pharm Sci*, **72**(5), 546 (2010).
2. D. Arora, M. Kumar, and S. D. Dubey, *Centella asiatica* - A review of it's medicinal uses and pharmacological effects, *Journal of Natural remedies*, **2**(2), 143 (2002).
3. W. Bylka, P. Znajdek-Awizeń, E. Studzińska-Sroka, A. Dańczak-Pazdrowska, and M. Brzezińska, *Centella asiatica* in dermatology: An overview, *Phytother Res*, **28**(8), 1117 (2014).
4. B. Brinkhaus, M. Lindner, D. Schuppan and E. G. Hahn, Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*, *Phytomedicine*, **7**(5), 427 (2000).
5. P. Hashim, H. Sidek, M. H. Helan, A. Sabery, U. D. Palanisamy, and M. Ilham, Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*, *Molecules*, **16**(2), 1310 (2011).
6. Y. J. Kim, H. J. Cha, K. H. Nam, Y. Yoon, H. Lee, and S. An, *Centella asiatica* extracts modulate hydrogen peroxide-induced senescence in human dermal fibroblasts, *Exp. Dermatol.*, **20**(12), 998 (2011).
7. J. Wan, X. Gong, R. Jiang, Z. Zhang, and L. Zhang, Antipyretic and anti-inflammatory effects of asiaticoside in lipopolysaccharide-treated rat through up regulation of heme oxygenase-1, *Phytother Res*, **27**(8), 1136 (2013).
8. M. Haftek, S. Mac-Mary, M. L. Bitoux, P. Creidi, S. Seité, A. Rougier, and P. Humbert, Clinical, biometric and structural evaluation of the long-term effects of a topical treatment with ascorbic acid and madecassoside in photoaged human skin, *Exp. Dermatol.*, **17**(11), 946 (2008).
9. J. Somboonwong, M. Kankaisre, B. Tantisira, and M. H. Tantisira, Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: An experimental animal study, *BMC Complement Altern Med*, **12**(1), 103 (2012).
10. I. E. Orhan, *Centella asiatica* (L.) urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2012** doi:10.1155/2012/946259 (2012).

11. T. E. Ceremuga, D. Valdivieso, C. Kenner, A. Lucia, K. Lathrop, O. Stailey, H. Bailey, J. Criss, J. Linton, J. Fried, A. Taylor, G. Padron, and A. D. Johnson, 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**(2), 91 (2015).
12. J. Ha, M. Kwon, Y. Kim, S. Kim, M. Jeong, B. Hwang and H. Lee, Enhancement of immunomodulatory of *Centella asiatica* L. urban with edible polymer through nano-encapsulation process, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **17**(4), 257 (2009).
13. K. H. Bae, K. J. Kim, N. Y. Kim, and J. M. Song, *In vitro* culture of rare plant *Bletilla striata* using Jeju magma seawater, *J Plant Biotechnol.*, **39**(4), 281 (2012).
14. S. H. Lee, I. H. Bae, D. J. Min, H. J. Kim, N. H. Park, J. H. Choi, J. S. Shin, E. J. Kim, and H. K. Lee, Skin hydration effect of Jeju Lava sea water, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(4), 343 (2016).
15. M. K. Crispin, J. Fuentes-Duculan, N. Gulati, L. M. Johnson-Huang, T. Lentini, M. Sullivan-Whalen, P. Gilleaudeau, I. Cueto, M. Suárez-Fariñas, M. A. Lowes, and J. G. Krueger, Gene profiling of narrowband UVB-Induced skin injury defines cellular and molecular innate immune responses, *J. Invest. Dermatol.*, **133**(3), 692 (2013).
16. B. M. Choi, H. O. Pae, S. I. Jang, Y. M. Kim, and H. T. Chung, Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**(1), 116 (2002).
17. P. G. Sator, Skin treatments and dermatological procedures to promote youthful skin, *Clinl Interv Aging*, **1**(1), 51 (2006).
18. C. Hao, B. Wu, Z. Hou, Q. Xie, T. Liao, T. Wang, and D. Ma. Asiatic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts, *Int Immunopharmacol.*, **50**, 313 (2017).
19. K. J. Yun, J. Y. Kim, J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Jeong, H. J. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, K. Yun, and K. T. Lee. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways, *Int Immunopharmacol.*, **8**(3), 431 (2008).
20. S. M. Tsao, M. C. Yin. Antioxidative and anti-inflammatory activities of asiatic acid, glycyrrhizic acid, and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells, *J. Agric. Food Chem.*, **63**(12), 3196 (2015).
21. J. H. Won, J. S. Shin, H. J. Park, H. J. Jung, D. J. Koh, B. G. Jo, J. Y. Lee, K. Yun, and K. T. Lee. Anti-inflammatory effects of madecassic acid via the suppression of NF- κ B pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells, *Planta Med.*, **76**(3), 251 (2010).
22. J. S. Guo, C. L. Cheng, and M. W. Koo. Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in rats, *Planta Med.*, **70**(12), 1150 (2004).