

Centella asiatica and Asiaticoside Regulate H₂O₂-induced Cellular Inflammation via Mitochondrial Respiration and the TLR4 Pathway

Juree Ji¹, Young sun Nam² and Sang Mo Kang^{3*}

¹CIVASAN, 3F, 25, Dosan-daero 81-gil, Gangnam-gu, Seoul 06011, Korea

²605-306 Yeongnam 224, Jungsimsanggaro Siheung-si Gyeonggi-do 15065, Korea

³Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Neuundong-ro 120, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea

Received September 21, 2020 / Revised January 19, 2021 / Accepted January 28, 2021

This study determined the effects of *Centella asiatica* leaf on H₂O₂ induced cell cycle arrest, mitochondrial activity, and proinflammatory cytokine production in human dermal fibroblast (HDF) cells. We used an 80% methanol extract of *C. asiatica*, its ethyl acetate fraction, and asiaticoside, the major constituent of *C. asiatica*. The *C. asiatica* extract, its ethyl acetate fraction, and asiaticoside attenuated G1 cell cycle-arrest and the apoptotic effect caused by H₂O₂-induced oxidative stress. The cells treated with *C. asiatica* extract, its ethyl acetate fraction, and asiaticoside secreted lower levels of TNF- α and IL-6. The antioxidant effect of asiaticoside was higher than that of *C. asiatica* extract and its ethyl acetate fraction. Treatment with *C. asiatica* extract, its ethyl acetate fraction, and asiaticoside also increased the mitochondrial membrane potential and restored normal mitochondrial morphology. Following H₂O₂ stress induction, cells treated with *C. asiatica* extract, its ethyl acetate fraction, and asiaticoside showed increased mitochondrial oxygen consumption rates and decreases in the TLR4-MyD88-TRAF6-p65 pathway activity. These findings suggest that *C. asiatica* extract, its ethyl acetate fraction, and asiaticoside have antioxidant and anti-inflammatory effects, as well as the ability to control the mitochondrial activities of HDF cells.

Key words : Anti-inflammation, anti-oxidant, asiaticoside, *Centella asiatica*, p65

서 론

미토콘드리아의 구조가 1950년 밝혀지면서 미토콘드리아의 특정 구성과 소기관에 따른 세포의 기능활성에 대한 연구가 이루어졌다. 미토콘드리아는 이중막 구조로 진핵생물 기원의 외부 막을 갖고 있으며, 막에는 콜레스테롤이 없고 박테리아의 전형적인 요소인 카디오리핀의 존재를 특징으로 하는 내부 막으로 구분된다 [22]. 내부 막은 매트릭스의 형태로 돌출되고 호흡의 연쇄 복합체를 수용하는 크리스타 불리는 특징적인 주름으로 구성되며 [8], 이온에 대해 불투과성을 갖고 전자수송사슬이 양성자 구배를 활발하게 형성할 수 있게 한다. 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)는 내부 막을 가로지르는 전기 화학적 구배에 의해 생성된 전위차에 의해 변화된다 [17]. 산화적 인산화를 통해 미토콘드리아는 에너지 대사를 통해 세포에 공급하고, 호흡사슬 복합체 I 및 III에서 세포 반응성 산소종(ROS)이 생성되며, NADH 및 유비퀴논으로부터 유도된 전자

는 산소 또는 다른 전자 수용체와 직접 반응하여 라디칼을 생성한다 [41]. ROS는 호흡 과정의 부산물이며 지질, 단백질 및 DNA와 반응하여 산화 손상을 일으켜 다양한 질병을 유발시킨다.

세포는 적절한 신호 전달을 위해 ROS의 양을 조절하는데, 미토콘드리아에서 발생하는 ROS와 같은 문제를 해결하고자 복잡한 항산화 시스템을 발전시켜왔다. 미토콘드리아에서 발생된 ROS (mROS)는 활성산소($O_2\cdot$) 형태로 생성되고, 이는 반응성이 높고 철-황 클러스터를 함유하는 단백질을 손상시키고 비활성화시킨다 [5]. 활성산소를 제한하기 위해 세포질, 미토콘드리아 매트릭스 또는 세포 외 환경의 SOD 단백질은 활성산소종을 과산화수소(H_2O_2)로 빠르게 변환하여 활성산소의 레벨을 매우 낮게 유지한다 [25]. 그러나, 비정상적인 과산화수소의 축적 또한 철 또는 구리 이온(Fe^{2+}/Cu^{2+})이 존재하는 경우 유해한 하이드록실라디칼($OH\cdot$)로 생성될 수 있기 때문에 해로울 수 있다 [15]. 따라서, 세포는 과산화수소(H_2O_2)를 물로 변화시켜 과산화수소를 제어하는 과산화물소거(peroxidase) 시스템을 갖고 있으나, 과도하게 발생된 산화적 스트레스는 조절하지 못하고 세포에 데미지를 주게 된다 [35]. 특히, ROS에 의해 발생된 염증은 미토콘드리아 손상을 야기하여 아포토시스(apoptosis) 유발 촉진 신호로 작용하며 [26], 세포 사멸에 있어 하나의 지표로 이용될 수 있다 [28].

톨 유사 수용체(Toll-like receptor, TLR)는 선천적 면역 반

*Corresponding author

Tel : +82-70-4685-8839, Fax : +82-0504-399-1645

E-mail : jureeya@civasan.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

응의 개시에 관여하는 패턴 인식 수용체로, TLR4는 lipopolysaccharide (박테리아 기원의 지질다당류) 또는 ROS와 같은 작용제에 의해 활성화될 수 있는 TLR 패밀리의 주요 구성원이다. TLR4는 세포 표면 상에 위치하며 막 관통 신호 전달을 매개하며[29], TLR4-MyD88-IKK β -NF κ B-p65 신호전달을 통해 세균 및 염증에 대한 대식세포(macrophage)의 활성화와 같은 면역작용과 일산화질소(nitric oxide)와 같은 물질에 의한 세포의 외상을 발생시킬 때 작동한다[4, 18, 23]. TLR4 신호의 매개는 A mitogen-activated protein kinase (MAPK) 또는 ROS를 내부에 자극시켜 염증성 사이토카인을 유발시키고, 오토파지(autophagy)를 유도한다[40].

병풀(*Centella asiatica*)은 적설초, 코투콜라, 호랑이풀 등으로 불리며 국내에서는제주도와 남부도서 지방의 저습지에서 자생한다. 세계적으로는 아프리카의 마데카르섬, 인도, 스리랑카, 인도네시아 등지에 분포하며, 녹색 잎과 줄기를 약용으로 사용하고, 상처 시 치유효과가 뛰어나 다양한 의학적인 연구로 그 기능이 보고되고 있다[32]. 병풀에 포함된 단일물질은 아시아티코사이드(asiaticoside), 아시아틱산(asiatic acid), 마데카식산(madecassic acid), 마데카소사이드(madecassoside), 퀘세틴(quercetin), 및 이소퀘세틴(isoquercetin)이 확인되었고[1, 12, 21], 병풀 추출물 및 분획물로부터 항산화, 세포 증식, 항암 활성화, 세포 독성, 미토콘드리아 및 면역염증 억제 등의 효과가 발표되었다[6, 10, 25, 27, 36]. 아시아티코사이드의 연구는 PI3K/Akt/NF- κ B 신호를 조절할 수 있는 것으로 보고된 바 있으며[38], TGF β receptor I kinase (T β RI kinase)의존형 Smad signaling를 조절하여 콜라겐 I 재생에 영향을 주는 보고가 있다[19]. 또한, 저산소증 유발 폐고혈압에서 내피세포에 대한 산화질소 매개신호를 활성화하고 apoptosis를 예방한다고 보고하였다[33]. 병풀 추출물의 항산화 작용 및 미토콘드리아 조절에 관한 연구는 이미 밝혀진 바 있으나, 병풀 추출물 내 대표물질에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 병풀 추출물, 분획물(아시아티코사이드를 포함한 분획물) 및 아시아티코사이드로부터 ROS 자극 시 세포의 데미지를 조절하는 영향을 TLR4신호전달 체계를 통해 분석하여 염증완화 매커니즘을 확인하고자 하며, 병풀이 갖는 항산화 매커니즘에 아시아티코사이드가 대표적 물질임을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

병풀은 신선약초에서 판매하는 제주 서귀포에서 채취한 건조시료를 사용하였다. 병풀 잎 건조물을 분쇄하여 813.2 g을 48시간 80% 메탄올 1 l에 추출하였다. 병풀 추출물은 여과지(Advantech, circles 300 mm, Japan)에 여과 후 45℃에서 감압 농축 및 동결건조하였다. 건조 추출분말(191 g)을 3차 증류수

에 섞어 *n*-hexane (47.88 g), ethyl acetate (62.49 g), *n*-butanol (54.15 g) 및 water (24.87 g)을 얻어 농축 및 동결건조 후 실험에 이용하였다. 아시아티코사이드는 Sigma-Aldrich에서 구매하여 실험에 이용하였다.

세포배양 및 세포 독성분석

HDF (ATCC; Manassas, VA, USA) 세포주에서 Cyto-X (LPS solution, Daejeon, Korea)시약을 이용하여 세포의 독성 테스트를 하였다. 세포를 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) 배지에 FGF b (5 ng/ml, Sigma - Aldrich, St Louis, MO, USA), ascorbic acid (50 mg/ml, Sigma - Aldrich), Insulin (50 mg/ml, Sigma - Aldrich)이 추가하였다. 96 well plate (SPL Life Science Co, Phcheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 1×10^4 세포수로 12시간 배양한 뒤 병풀 추출물, 분획물을 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 또한, 아시아티코사이드는 1, 10 및 100 μ M의 농도로 처리하여 세포독성을 확인하였다. 배양 24시간 후 각 well에 1/10 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 후 호일로 감싸 4시간 배양기에 처리하였다. Wallac Victor2 plate reader (Perkin Elmer Corp., Nerwalk, CT)로 450 nm 흡광도에서 측정하여 수치화 하였다.

세포주기 측정

세포는 24 well plate (SPL Life Science Co.)에 1×10^4 세포수로 배양 후, 병풀 추출물(20 μ g/ml), 분획물(13 μ g/ml) 및 아시아티코사이드(100 μ M) 처리 후 24시간 배양하였다. 세포를 70% ethanol에 고정한 뒤 원심분리하여 PBS로 세척한 후 PI 용액에 30분 incubation하며 세포를 염색하였다. Accuri C6 유세포 분석기(BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 cell cycle을 분석하여 G1 및 SubG-1 (apoptosis) population을 측정하였다.

미토콘드리아 막포텐셜 측정

미토콘드리아 막포텐셜 측정 형광프로브 JC-1을 사용하여 미토콘드리아 막포텐셜(Ψ_m)을 측정하였다. 24 well plate (SPL Life Science Co.)에 2×10^5 세포수로 배양 후 병풀 추출물(20 μ g/ml), 분획물(13 μ g/ml) 및 아시아티코사이드(100 μ M) 처리하였다. 세포를 1 μ g/ml의 농도로 JC-1 (Molecular Probes, Invitrogen)과 함께 37℃에서 30분 동안 배양한 뒤 적색 및 녹색 형광을 Accuri C6 유세포 분석기(BD Biosciences, Seoul, Korea)로 측정하였다. FL1시그널 중 10^3 이상의 형광값을 기준 수치로 계산하였고, FL2 시그널 중 10^4 이상의 형광값을 기준 수치로 계산하여 분석하였다. 기준값은 Con 시그널을 기준으로 잡았다.

세포내 과산화물 측정

세포내 과산화물을 측정하기 위해 DCF-DA를 사용하였다. 24

well plate (SPL Life Science Co.)에 2×10^5 세포수로 배양 후 병풀 추출물(20 $\mu\text{g/ml}$), 분획물(13 $\mu\text{g/ml}$) 및 아시아티코사이드(100 μM) 처리하였다. 액체질소에 보관된 DCF-DA를 20 μM 의 농도로 처리한 뒤 37°C에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척 후 Trypsin/EDTA로 세포를 떼어 Accuri C6 유세포 분석기(BD Biosciences, Seoul, Korea)로 측정하였다. FL1시그널 중 10^3 이상의 형광값을 기준수치로 계산하여 분석하였다. 기준값은 Con 시그널을 기준으로 잡았다.

미토콘드리아 미토콘드리아 모양 측정

pEGFR-mito-roGFP (미토콘드리아 환원·산화 녹색형광측정용 DNA)를 사용하여 미토콘드리아 활성 산소종(ROS) 생성을 탐지했다. 세포를 TurboFect 시약(Thermo Scientific)을 사용하여 pEGFR-mito-roGFP DNA로 형질 감염시켰다. Live cell imaging dish (Eppendorf, Hamburg, Germany) 상에서 24시간 후, 세포를 DMSO, 10 μM H₂O₂, 병풀 추출물(20 $\mu\text{g/ml}$), 분획물(13 $\mu\text{g/ml}$) 및 아시아티코사이드(100 μM)을 동시에 처리 후 3 시간 동안 반응시켰다. roGFP의 강도 및 세포 내 위치를 관찰하기 위해, 배양된 세포를 3시간 동안 동일하게 처리 후 세포를 PBS로 2회 세척하고, DAPI를 함유하는 배지로 교환하였다. 30분 뒤 PBS로 2회 세척 후 배지로 교체 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 710; Carl Zeiss, Inc.)을 사용하여 이미지를 얻었다(Excitation wavelength 488 nm, emission wavelength 530 nm).

TNF- α 와 IL-6 ELISA 측정

세포 내 TNF- α 와 IL-6 함량은 ELISA Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. HDF세포주를 35 mm 세포배양 접시에 8×10^4 세포수로 12시간 배양한 뒤 세포를 DMSO, 10 μM H₂O₂ 또는 병풀 추출물(20 $\mu\text{g/ml}$), 분획물(13 $\mu\text{g/ml}$) 및 아시아티코사이드(100 μM)을 동시에 처리 후 24시간 뒤 세포를 수집하였다. NP-40으로 균질화시켜 2분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 Kit에 포함된 방법으로 각 well에 20 μL 씩 분주하여 섞은 후 30분간 실온에 방치하였다. ELISA 측정은 Wallac Victor2 plate reader를 이용하여 optical density를 측정하였다.

산소 소비율(Oxygen consumption rate, OCR) 측정

2×10^4 개의 HDF세포를 XF analyzer (Seahorse Bioscience, USA)용 plate에 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA) 이 포함된 M199/EBSS medium을 사용하여 배양하였다. 세포의 산소소비율(Oxygen consumption rate, OCR)을 측정하기 전에, bicarbonate-free medium으로 교체한 뒤, CO₂없는 세포배양기에서 1시간 배양하였다. 20분 동안 세포의 basal level의 OCR 값을 측정한 뒤 세포를 DMSO, 10 μM H₂O₂ 또는 병풀 추출물(20 $\mu\text{g/ml}$), 분획물(13 $\mu\text{g/ml}$) 및 아시아티코사이드

(100 μM)을 동시에 처리 후 1시간 동안 OCR의 변화를 측정하였고, 후에 0.5 μM oligomycin, 1 μM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), 1 μM rotenone, 1 $\mu\text{g/ml}$ antimycin A 등의 4가지 호흡 사슬 억제제를 순서대로 처리하면서, 다시 OCR 변화량을 측정하였다. 각 분석은 3회 반복으로 측정하였다.

총단백질 발현분석

HDF세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 10 $\mu\text{g/ml}$ 병풀 세포를 DMSO, 10 μM H₂O₂ 또는 병풀 추출물(20 $\mu\text{g/ml}$), 분획물(13 $\mu\text{g/ml}$) 및 아시아티코사이드(100 μM)을 동시에 처리 후 24시간 뒤 세포를 수집하였다. RIPA lysis buffer (GenDEPOT, USA)에 phosphatase inhibitor cocktail과 protease inhibitor cocktail을 1x로 섞어 얼음에 1시간 동안 lysis 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, CA)를 이용하여 정량 후 10~25 μg 의 단백질을 SDS-PAGE method를 이용하여 전기영동하였다. PVDF membrane으로 transfer된 단백질을 PBS-T에 희석한 5% skim milk (LPS solution, Daejeon, Korea)에 1시간 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각각 1:1,000의 농도로 12시간 냉장실에 처리하였다. 3회 PBS-T로 세척한 뒤 2차 항체를 각각 1:5,000의 농도로 실온에서 처리 후 다시 3회 PBS-T로 세척하였다. Amersham ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare)를 이용하여 X-ray film 발색으로 측정하였다. 항체는 anti-TLR4 (Cell Signaling, Beverly, MA), anti-p-p65, anti-p65, anti- β -actin (Santa Cruze, Dallas, TX, USA), anti-TRAF6 및 anti-MyD88 (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하였다.

통계분석

모든 생리활성 실험은 3회 반복 실험을 통해 수치화 하였으며, 통계분석은 one-way ANOVA로 신뢰구간 $p < 0.05$ 로 검정을 실시하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드의 세포독성 및 세포주기

HDF 세포주는 인간진피섬유아세포로 피부에서 발생하는 다양한 산화적 스트레스를 연구할 때 이용한다. 피부에 대한 연구시 표피와 진피에 분포하는 HaCaT 세포와 HDF 세포를 이용하여 항산화효과에 대한 연구를 진행하며, 본 연구에서는 HDF 세포를 이용하여 병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드의 세포독성을 확인하고 안전성을 확인

하고자 하였다. 세포독성 측정의 오차를 줄이기 위해 tetrazolium salt를 이용하는 WST계열의 Cyto-X 시약을 이용하여 세포독성을 확인한 결과 H_2O_2 를 처리한 세포를 제외한 모든 세포에서 독성을 나타내지 않았고, H_2O_2 에 의해 $40.2 \pm 2.1\%$ 세포 사멸이 유도된 반면 병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드를 동시 처리시 모두 세포독성을 회복하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B). 아시아티코사이드 및 병풀 추출물에 대한 화상, TNF- α 및 TLR4/NF- κ B 관련 염증 등과 같은 상처 치유효에 대한 연구들이 보고되었다[7, 14, 29, 36]. 본문의 결과에서도 H_2O_2 에 의해 발생한 데미지에도 회복효과가

나타났고 이는 다른 연구의 결과와 같았다.

HDF 세포주에서 G1 정체기(세포주기 멈춤상태)를 관찰했을 때 병풀 추출물은 H_2O_2 를 처리한 대조군 대비 차이를 보이지 않았고($p=ns$), 에틸아세테이트 분획물은 H_2O_2 를 처리한 대조군 대비 $51.13 \pm 1.02\%$ 로 1.25% 감소하였으며($p<0.01$), 아시아티코사이드는 H_2O_2 를 처리한 대조군 대비 $43.55 \pm 1.54\%$ 로 3.5% 감소하였다($p<0.001$). 아시아티코사이드는 H_2O_2 를 처리하지 않은 대조군 수치까지 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 1A and C). 또한, 아포토시스 (Sub-G1)도 병풀 추출물 및 에틸아세테이트 분획물은 H_2O_2 를 처리한 대조군 대비 차이를 보이

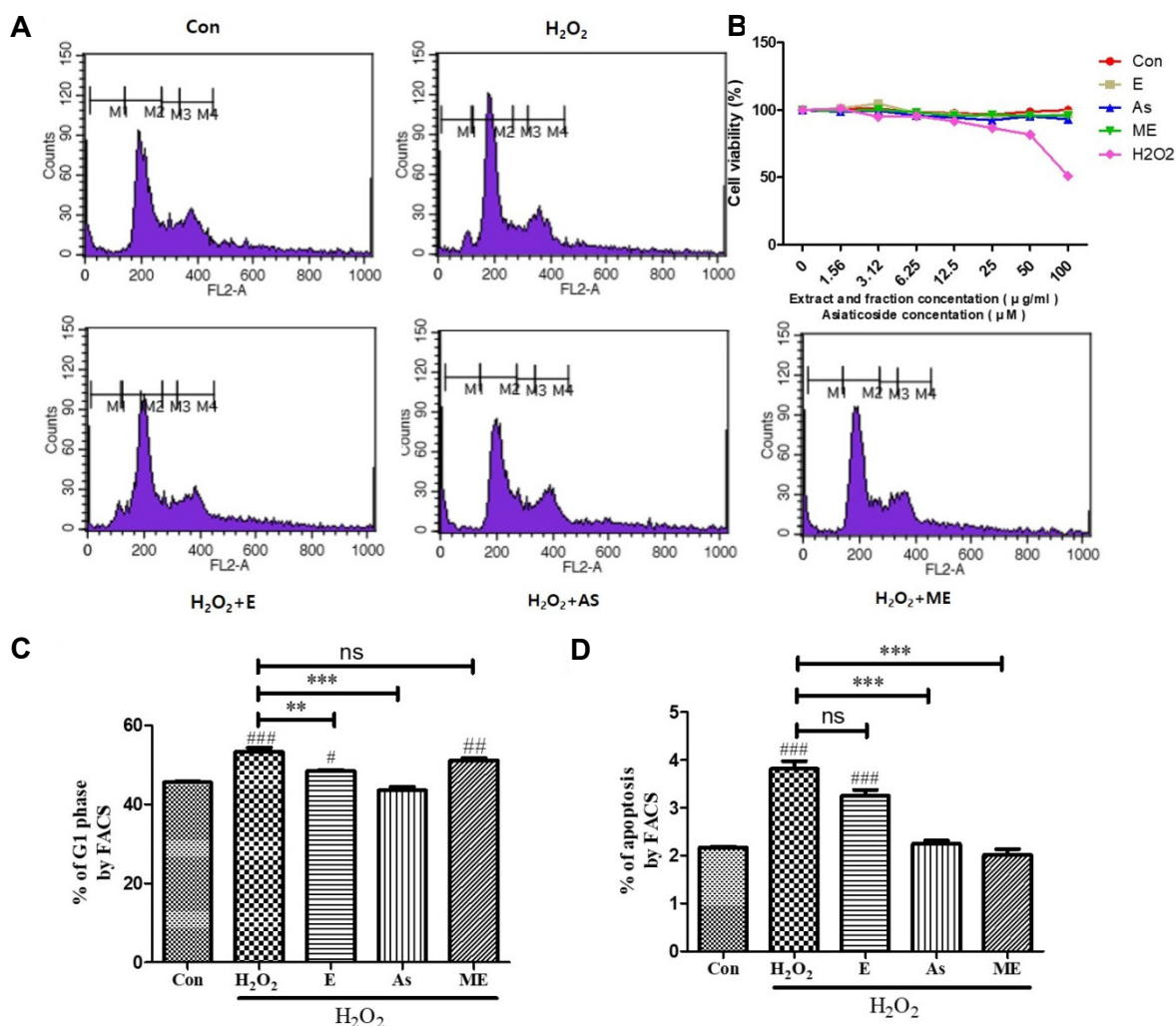


Fig. 1. *Centella asiatica* extract, ethyl acetate fraction and asiaticoside leads to cell cycle recovery from oxidative in HDF cells. (A) Flow cytometric analysis of cell cycle distribution in *Centella asiatica* extract (20 μ g/ml), ethyl acetate fraction (13 μ g/ml) and asiaticoside (100 μ M). HDF cells were collected and fixed with 70% ethanol for 30 min at 4°C, then subjected to FACS after propidium iodide (PI, 5 μ g/ml) staining. The area parameter histogram was used to determine the percentage of cells in apoptosis (M1), G1 (M2), S (M3), G2/M (M4) phases. (B) Results of cell viability assay different concentrations of *Centella asiatica* extract, ethyl acetate fraction and asiaticoside on HDF cells. (C) The percentage of G1 (M2) phase by FACS analysis of cell cycle distribution. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups (D) The percentage of apoptosis (M1) phase by FACS analysis of cell cycle distribution. (E) ethyl acetate fraction, (AS) asiaticoside, (ME) 80% Methanol extract. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups. # $p<0.05$ versus control; ## $p<0.01$ versus control; ### $p<0.001$ versus control; ** $p<0.01$ versus H_2O_2 -treated cells, *** $p<0.001$ versus H_2O_2 -treated cells.

지 않았으며, 아시아티코사이드는 1.5% 감소하였다($p<0.001$). 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드 처리시 정상세포 수치까지 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 1A, Fig. 1D).

병풀 추출물은 미토콘드리아 신호를 조절하고 산화를 조절하는 작용으로 알려져 있다[10]. 또한 항산화제를 통해 염증성 사이토카인을 조절하여 제2당뇨병에 효과를 보이며[26], 알츠하이머와 같은 산화적 스트레스에 의해 유도된 질병을 조절할 수 있음이 보고된 바 있다[9]. 병풀 추출물에 함유된 단일물질은 항염증, 항괴양, 항지질과산화 및 자유라디칼 소거 기능을 갖는 다양한 페놀계 화합물이 존재하는 것으로 알려져 있다[1]. 특히, 본 실험에 이용한 아시아티코사이드는 HDF 세포에서 세포의 증식 및 콜라겐합성에 영향을 주고, 상처치유에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[3, 39]. 세포의 성장 및 상처치유에서 아시아티코사이드는 125 μ M 이용 시 HDF세포에서 PDGF의 농도가 대조군 대비 높은 농도로 확인된 바 있다[2]. PDGF는 치유 속도를 향상시키는 데 중요한 과립 조직의 형성을 증가시킬 수 있기 때문에 세포의 성장 및 상처치유에 긍정적인 영향을 보인 것으로 보고되었다[3].

병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드의 염증성 사이토카인 억제

아시아티코사이드는 염증이 유도된 쥐에서 TNF- α 와 IL-6의 조절이 확인된 바 있고[13], H_2O_2 로 유도된 HDF 세포에서 병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드가 염증성 사이토카인의 감소에 미치는 영향을 확인하였다.

Fig. 2A에서 나타난 바와 같이 HDF 세포주에서 H_2O_2 로 유도된 대조군에서는 TNF- α 가 4배가량 증가하였는데, 병풀 추출물에서는 H_2O_2 로 유도된 대조군 대비 통계적 차이를 보

이지 않았고, 에틸아세테이트 분획물은 70.0 pg/ml 감소하였으며($p<0.001$), 아시아티코사이드는 119.3 pg/ml 감소하였다($p<0.001$). 아시아티코사이드는 정상세포의 수치로 회복되는 것을 확인하였다. Fig. 2B에서는 H_2O_2 로 유도된 대조군에서는 IL-6가 2.2배가량 증가하였는데, 병풀 추출물에서는 H_2O_2 로 유도된 대조군 대비 33.6 pg/ml 감소하였으며($p<0.001$), 에틸아세테이트 분획물은 50.0 pg/ml 감소하였고($p<0.001$), 아시아티코사이드는 64.0 pg/ml 감소하였다($p<0.001$). 아시아티코사이드는 IL-6 또한 TNF- α 와 동일하게 정상세포의 수치로 회복되는 것을 확인하였다.

사람의 피부는 지속적으로 환경 영향에 노출로 인한 노화 과정이 발생하면서 탄력성 상실, 거칠기 및 건조성 증가, 불규칙한 색소 침착, 햇볕, 피부 노화 촉진, 주름 및 여러 가지 부작용이 발생한다. 전통의학에서는 식물 이차 대사 산물로 노화 방지, 주름 개선, 항산화제, 항염증제, 상처 치유, 피부 미백 및 항암 활성과 같은 잠재적인 연구를 진행해왔고, 외부 작용에 의한 염증 억제작용은 피부의 노화를 억제하는 영향을 미친다[24]. 피부에서 섬유세포는 상처 치유에서의 재생, 및 표피의 동종 이식의 유지는 기본 결합 조직인 진피와의 상피 상호작용에 영향을 준다. 콜라겐 겔은 상처가 발생되거나 유사한 세포 외 매트릭스 성분을 생성함으로써 매트릭스를 재구성하는 섬유모세포를 함유한다. 섬유모세포에 의해 생성된 파라크린 작용 인자는 외부의 자극에 의해 유도된 문제를 해결하는 역할을 한다[30]. 따라서, 병풀 내 아시아티코사이드는 세포 내 염증성 사이토카인을 조절하고 세포의 정상화시키는 것을 알 수 있었고, 이 같은 현상은 피부세포에 항산화 효과를 발휘할 수 있을 것으로 판단된다.

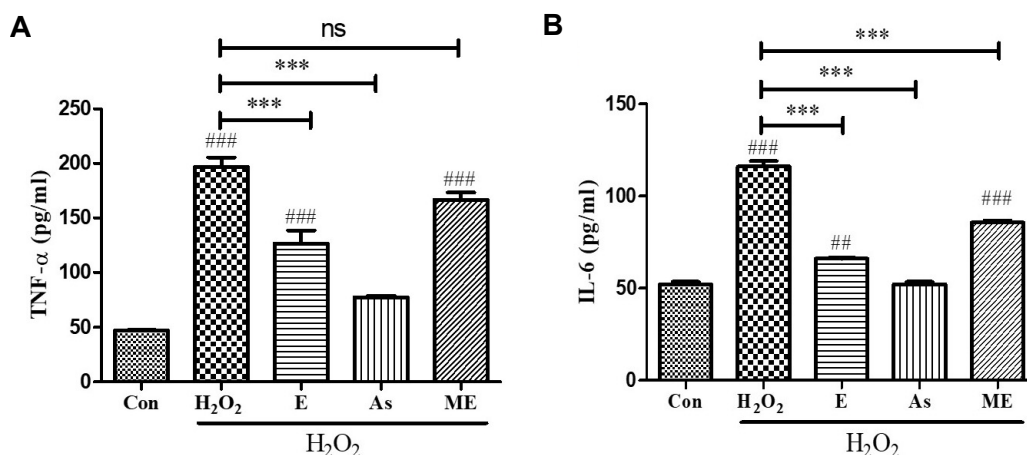


Fig. 2. Effects of *Centella asiatica* extract, ethyl acetate fraction and asiaticoside on TNF- α and IL-6 cytokine secretion in H_2O_2 -induced HDF cells. (A) TNF- α and (B) IL-6 protein levels were detected by ELISA. HDF cells were treated with *Centella asiatica* extract (20 μ g/ml), ethyl acetate fraction (13 μ g/ml) and asiaticoside (100 μ M). The experiment was carried out according to the manual. Error bars represent averages \pm SD from at least five independent groups. (E) ethyl acetate fraction, (AS) asiaticoside, (ME) 80% Methanol extract. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups. ### $p<0.001$ versus control; *** $p<0.001$ versus H_2O_2 -treated cells.

병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드의 미토콘드리아 기능 조절 및 ROS 감소

병풀 및 아시아티코사이드는 Bcl-2/Bax를 조절하고, 미토콘드리아 기능장애를 억제하는 것이 뇌세포와 간세포를 통해 연구된 바 있다[16, 34]. 이 같은 미토콘드리아 의존형 항산화 활성 및 미토콘드리아 기능조절이 피부세포에도 작용하는지 확인하기 위해 ROS 생성, 미토콘드리아 막포텐셜 및 미토콘드리아 산소소비율 (OCR)을 측정하였다. Fig. 3A는 JC-1을 이용하여 미토콘드리아 막 활성도를 측정하는 방법으로 Q1~4의 4가지 사분면 중 Q2 분면에서 보여지는 세포의 변화를 이용하여 막 활성도를 측정하는 방법이다. 이 같은 결과를 Fig. 3B를 통해 수치화 하였으며, H_2O_2 유도 세포에서는 비활성화 시그널인 녹색형광이 높게 측정되어 미토콘드리아의 막 활성이 낮은 반면, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드 처리군에서 미토콘드리아 막 활성이 2~3배 H_2O_2 유도 세포군 대비 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 아시아티코사이드 처리군에서는 정산군과 차이를 보이지 않고 막 활성도를 회복하였다. 아시아티코사이드 처리 시 미토콘드리아 막포텐셜이 증가되는 과정 및 ROS의 감소, 호흡의 회복은 아시아티코사이드에 의한 결과임을 확인할 수 있었고, H_2O_2 로 유도된 산화적 문제

는 미토콘드리아 호흡의 감소와 TCA 회로억제, 당분해성 활동의 증가와 같은 현상이 증가된다[31]. ROS의 감소는 Fig. 4B에서 측정된 DCF-DA를 통해서 다시 확인하였으며, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드 처리군에서 45% 이상의 ROS 감소율을 확인하였다.

Fig. 4A는 미토콘드리아의 모양을 확인한 것으로 미토콘드리아의 성장도를 이미지화시키는 형광을 보이는 DNA를 세포에 주입하여 미토콘드리아 성장상태를 확인하였다. 미토콘드리아의 모양도 H_2O_2 유도 세포군 대비 에틸아세테이트 분획물과 아시아티코사이드 처리군에서 회복되는 것을 확인하였고, 특히, 아시아티코사이드 처리군은 정산군과 유사한 미토콘드리아 성장을 보였다. 이는 미토콘드리아의 호흡과 관련된 내용으로 세포호흡을 측정하기 위해 Fig. 4C에 나타났다. 세포호흡량의 변화를 측정한 것으로 oligomycin 약물을 투입하기 전 20분까지는 기저호흡(basal OCR) 영역으로 정상호흡을 하는 구간이고, oligomycin은 F0/F1 complex를 저해시켜 단백질 농도기울기를 통한 ATP 합성을 막는 역할을 하며, oligomycin 투여 후 40분까지 ATP연결호흡(ATP-Linked OCR)의 구간이다. FCCP는 이오노모아(ionophore)로 세포막을 지나 이온을 운반하는 물질로 양성자(proton, 수소원자)를 막관

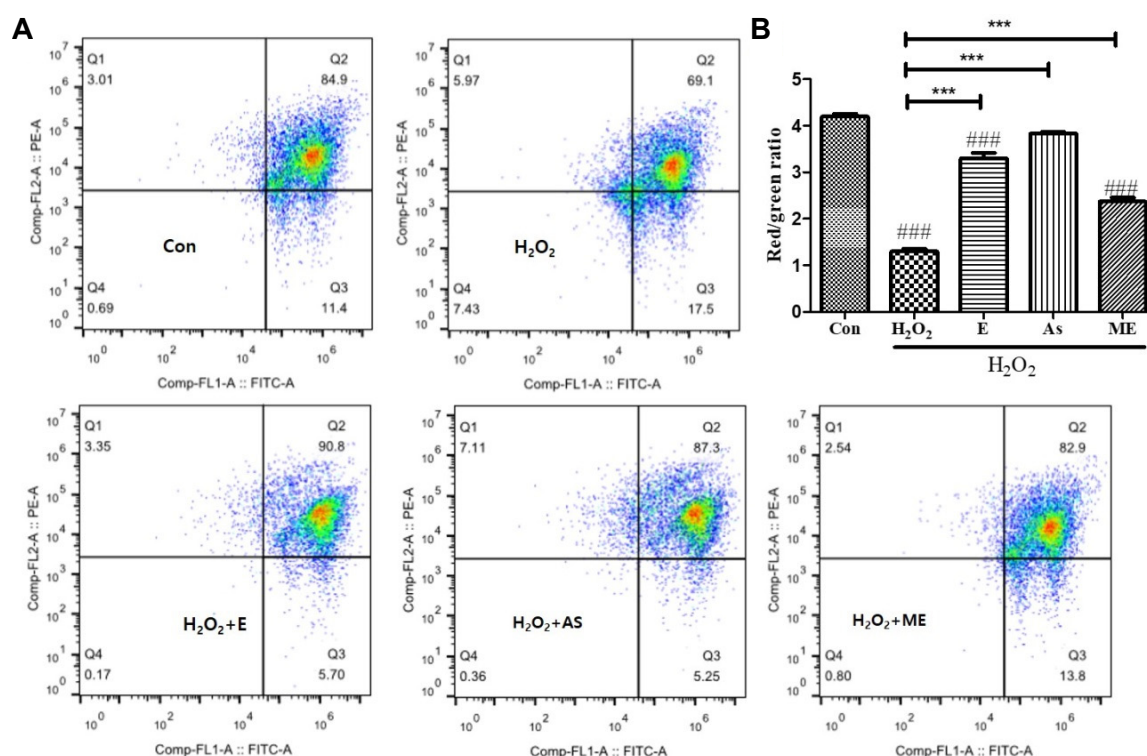


Fig. 3. Effect of *Centella asiatica* extract, ethyl acetate fraction and asiaticoside on H_2O_2 -induced loss of mitochondrial membrane potential in HDF cells. (A) Scatter diagram of JC-1 staining, as measured by flow cytometry HDF cells were treated *Centella asiatica* extract (20 μ g/ml), ethyl acetate fraction (13 μ g/ml) and asiaticoside (100 μ M). (B) Quantitative analysis of the Q2 ratio of fluorescence intensity (Red : FL2, $>10^3$ intensity / Green : FL1, $>10^4$ intensity). (E) ethyl acetate fraction, (AS) asiaticoside, (ME) 80% Methanol extract. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups. ### $p < 0.001$ versus control; *** $p < 0.001$ versus H_2O_2 -treated cells.

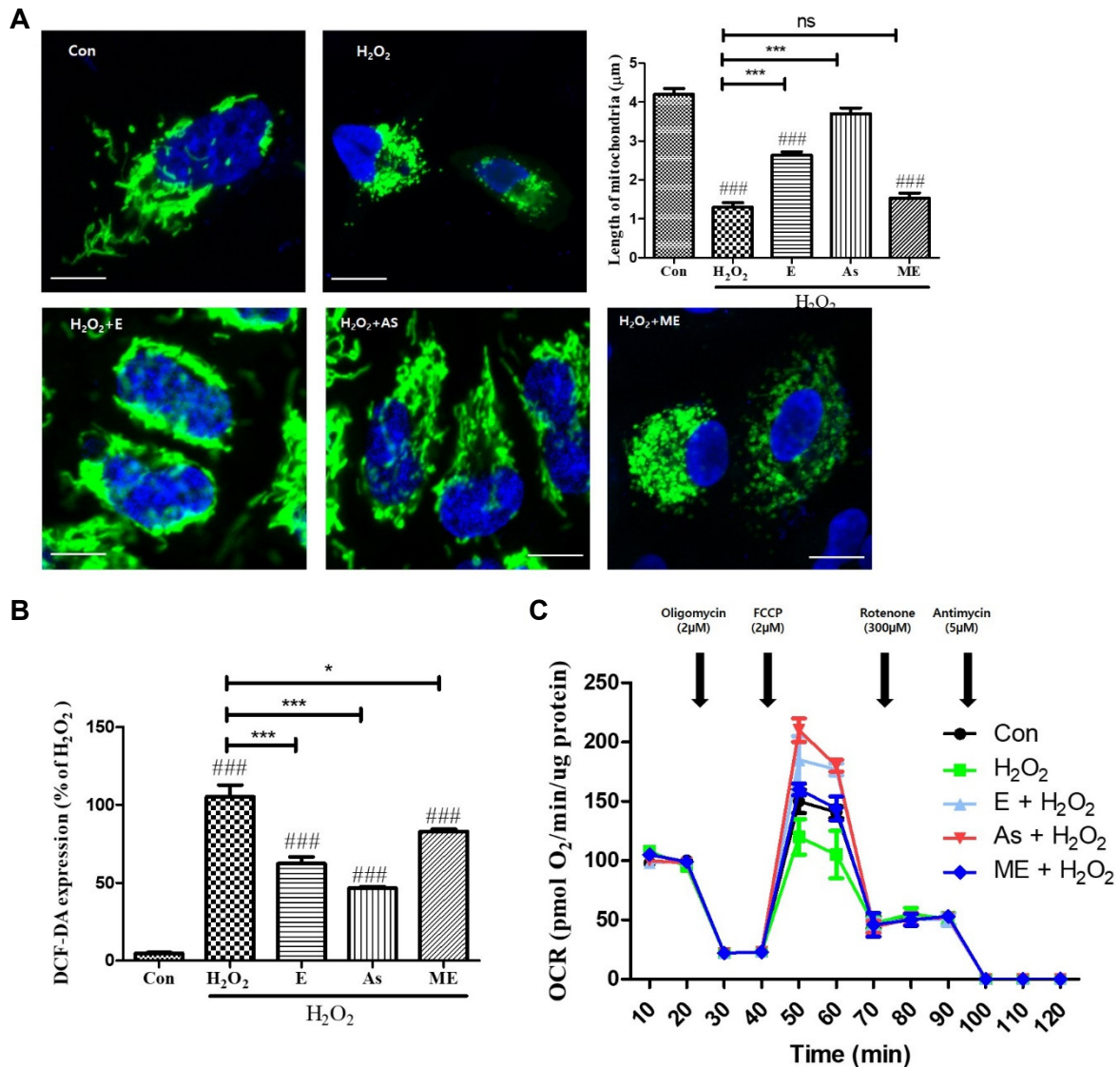


Fig. 4. Effects of *Centella asiatica* extract, ethyl acetate fraction and asiaticoside on intracellular ROS and mitochondrial oxygen consumption rate in HDF cells. (A) Representative images of mito-YFP signal intensity are shown in HDF cells. HDF cells were treated *Centella asiatica* extract (20 $\mu g/ml$), ethyl acetate fraction (13 $\mu g/ml$) and asiaticoside (100 μM). Scale bar, 50 μm . (B) Determination of cellular ROS by DCF-DA assay. Histograms were generated to show cells stained with DCF-DA in comparison to the H_2O_2 treated control (Expression of FL1 $>10^3$ intensity). (C) Oxygen consumption rate (OCR) measurements of HDF cells mitochondria provided with oligomycin (0.5 μM), FCCP (1 μM) and antimycin A (1 μM) were subsequently added as indicated (arrows). (E) ethyl acetate fraction, (AS) asiaticoside, (ME) 80% Methanol extract. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups. ### p <0.001 versus control; * p <0.05 versus H_2O_2 -treated cells, *** p <0.001 versus H_2O_2 -treated cells.

통시켜 이동하는 언커플러(uncoupler)로서 FCCP투여 후 60 분까지 최대호흡(maximal OCR) 영역으로 기저호흡 영역을 초과하는 최대호흡 예비용량임을 알 수 있다. 로테논(rotenone)은 복합체 I을 저해하면 $FADH_2$ 로부터 양성자를 얻는 복합체 II를 통해 어느 정도의 양성자 펌프가 가능하기 때문에 기본 산소소모량이 존재하지만 NADH가 포화되어 $FADH_2$ 생성 역시 막히게 된다[20]. 이 과정에서 antimycin을 처리하면 복합체 III를 억제하여 호흡이 완전히 중지된다. 즉, 미토콘드리아

아에서 포도당이 가지고 있던 양성자와 전자는 NAD, FAD에게 전달되어 $NADH_2$, $FADH_2$ 를 생성하는데, $NADH_2$, $FADH_2$ 는 미토콘드리아 내막의 전자 전달계에 전자를 공급하여 양성자 농도차를 유발함으로써 다량의 ATP를 생산하게 된다[11]. 이 과정을 실험적으로 확인하여 미토콘드리아에서 발생하는 호흡을 분석하고자 하였다.

기저호흡 구간은 101.18 ± 12.88 pmole/min로 나타났으며, oligomycin 투여 후 23.15 ± 0.98 pmole/min로 낮아졌고,

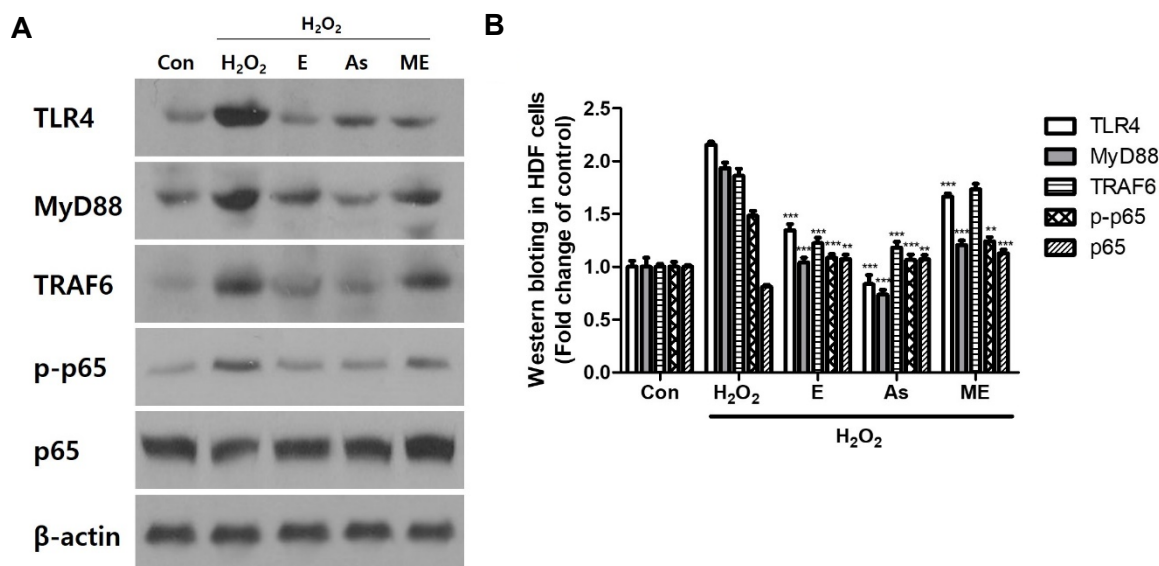


Fig. 5. Effects of *Centella asiatica* extract, ethyl acetate fraction and asiaticoside mediated expression levels of TLR4-MyD88-TRAF6-p65 proteins in H₂O₂-induced HDF cells. (A) Protein expression level was analyzed by western blotting with indicated antibodies. HDF cells were treated *Centella asiatica* extract (20 µg/ml), ethyl acetate fraction (13 µg/ml) and asiaticoside (100 µM). (B) Quantitative analysis of expression was scanned and analyzed using Image J software. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups. (E) ethyl acetate fraction, (AS) asiaticoside, (ME) 80% Methanol extract. Error bars represent averages \pm SD from at least three independent groups. ** p <0.01 versus H₂O₂-treated cells, *** p <0.001 versus H₂O₂-treated cells.

FCCP 투여 후 대조군은 153.12 \pm 11.25 pmole/min에서 147.27 \pm 17.17 pmole/min을 유지하는 반면 H₂O₂로 유도된 대조군에서는 111.05 \pm 25.65 pmole/min에서 103.33 \pm 28.05 pmole/min 까지 낮아졌다. 반면, 병풀 추출물에서는 대조군과 같이 회복되는 것을 확인하였고, 에틸아세테이트 분획물은 179.99 \pm 30.15 pmole/min에서 169.51 \pm 5.80 pmole/min으로 증가하였고(p <0.05), 아시아티코사이드는 215.89 \pm 12.18 pmole/min에서 171.00 \pm 2.35 pmole/min 증가하였다(p <0.001). 미토콘드리아 스트레스 테스트에서 기저호흡, ATP연결호흡, 최대호흡은 미토콘드리아 호흡을 표현하는 화합물 작용 메커니즘으로 직접적으로 화합물의 작용 메커니즘에 대한 분석을 제공한다고 볼 수 있다. 아시아티코사이드 처리 시 미토콘드리아 막포텐셜이 증가되는 과정 및 ROS의 감소, 호흡의 회복은 아시아티코사이드에 의한 결과임을 확인할 수 있었고, H₂O₂로 유도된 산화적 문제는 미토콘드리아 호흡의 감소와 TCA 회로억제, 당분해성 활동의 증가와 같은 현상이 증가된다[31]. 이 같은 결과는 병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드가 미토콘드리아 의존형 산화항상성 조절에 영향을 주며, H₂O₂로 유도된 산화적 문제에서 발생할 수 있는 미토콘드리아의 호흡을 정상수준으로 되돌린다는 것을 보여준다.

병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드의 염증 조절 단백질 조절 기작

TNF- α 와 IL-6을 포함한 염증유발성 사이토카인의 과도한

생성은 대식세포의 활성을 통해 신체기능의 손상을 유발한다. 특히, 염증 자극에 의해 활성화된 TLR에 의한 자극은 MyD88 TLR 어댑터에 의해 NF- κ B의 활성화를 유도하고 전 염증성 사이토카인, 케모카인 및 I형 인터페론의 생성을 자극 할 수 있는 MyD88 의존적 경로를 활성화 시킨다[37].

H₂O₂로 유도된 대조군에서 TLR4-MyD88-TRAF6의 모든 단백질이 높게 발현되었고, NF- κ B (p65 subunit)의 인산화가 증가되었으며, 병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드는 모두 H₂O₂로 유도된 대조군 대비 감소되는 것을 알 수 있었다. 특히, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드는 정상세포의 수준으로 회복되는 것을 알 수 있었다. H₂O₂로 유도된 대조군에서 TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B (p65 subunit)의 모든 단백질이 높게 발현되었고, 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드는 정상세포(Con)의 수치로 회복시켰다. H₂O₂로 유도된 염증반응에서 TNF- α 와 IL-6가 증가되고, TLR4를 자극하여 과발현을 유도하였지만, 아시아티코사이드가 포함된 병풀 추출물에서는 TNF- α 와 IL-6를 감소시키고 TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B (p65 subunit)의 발현을 조절한 것으로 보인다. 위 결과는 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드를 처리 시 더 효과적인 억제효과를 확인할 수 있었으며, 이는 아시아티코사이드의 함량에 따른 효과로 볼 수 있다. 아시아티코사이드의 항산화 및 항염증은 뇌 내피 세포 및 간세포에서 다양한 메커니즘이 연구되었다. 하지만 HDF 세포에서 H₂O₂로 유도된 미토콘드리아 기능장애 및 호

흡과 관련된 접근 및 HDF 세포를 이용한 항산화 매커니즘 실험은 뒷받침할 만한 연구가 없었다. 뇌 내피세포에서 아시아티코사이드 10~100 μM 의 농도에서 p38-MAPK 메커니즘의 억제제를 통해 척수 손상의 영향을 완화시켰고[29], 뇌내피세포에서 12 시간 동안 아시아티코사이드(25, 50 및 100 μM)의 전 처리가 세포 성장 억제 및 apoptosis를 상당히 약화시키고, A β 1-42 (50 μM)에 의해 유도된 미토콘드리아 막포텐셜을 회복시켰다는 것을 알 수 있었다[29]. 아시아티코사이드의 활성 농도는 25~100 μM 의 범위로 다양하지만 HDF 세포에서 H_2O_2 로 유도된 산화반응의 TLR4-MyD88를 억제하는 농도는 100 μM 범위였으며, 그 이하의 농도 처리시 TLR4의 감소가 낮게 나타났다(data not shown). 이 같은 현상은 신체의 조직이나 세포의 종류에 따라 세포에 적용되는 농도가 다른 것을 알 수 있으며, 세포종류의 영향을 받는 것으로 보인다. 본 연구는 H_2O_2 유도 과산화 데미지를 받은 HDF세포에서 병폴 및 병폴에 포함된 아시아티코사이드를 이용하여 산화스트레스를 억제시키는 항산화 및 미토콘드리아 데미지 조절에 대한 연구의 기초 자료를 제공하고자 하였다. 병폴의 미토콘드리아 데미지 조절 및 항산화가 뛰어났으며, 활성산소를 통한 데미지 회복에 주요한 기전을 통해 피부재생 또는 과산화 데미지 억제제를 개발하는 기초자료로 제시하고자 한다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Alqahtani, A., Tongkao-on, W., Li, K. M., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K. and Li, G. Q. 2015. Seasonal variation of triterpenes and phenolic compounds in Australian *Centella asiatica* (L.) Urb. *Phytochem. Anal.* **26**, 436-443.
- Azis, H., Taher, M., Ahmed, A., Sulaiman, W., Susanti, D., Chowdhury, S. and Zakaria, Z. 2017. *In vitro* and *in vivo* wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *S. Afr. J. Bot.* **108**, 163-174.
- Azis, H., Taher, M., Ahmed, A., Sulaiman, W., Susanti, D., Chowdhury, S. R. and Zakaria, Z. 2017. *In vitro* and *In vivo* wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *S. Afr. J. Bot.* **108**, 163-174.
- Choi, M. and Oyekan, A. 2016. Contribution of prolyl hydroxyl binding proteins (PHD) to MYD88/NF κ B pathways in Nitric Oxide deficiency-induced hypertensive renal injury. *FASEB J.* **30**, 732-737.
- Diebold, L. and Chandel, N. S. 2016. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic. Biol. Med.* **100**, 86-93.
- Fard, S. E., Tafvizi, F. and Torbati, M. B. 2018. Silver nanoparticles biosynthesised using *Centella asiatica* leaf extract: apoptosis induction in MCF-7 breast cancer cell line. *IET Nanobiotechnol.* **12**, 994-1002.
- Fong, L. Y., Ng, C. T., Zakaria, Z. A., Baharuldin, M. T. H., Arifah, A. K., Hakim, M. N. and Zuraini, A. 2015. Asiaticoside inhibits TNF- α -induced endothelial hyperpermeability of human aortic endothelial cells. *Phytother. Res.* **29**, 1501-1508.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Gray, N., Zweig, J., Kawamoto, C., Quinn, J. and Soumyanath, A. 2016. *Centella asiatica* improves synaptic plasticity and activates antioxidant and mitochondrial pathways in hippocampal neurons from an Alzheimer's disease mouse model. *Planta Med.* **82**, P966.
- Gray, N. E., Harris, C. J., Quinn, J. F. and Soumyanath, A. 2016. *Centella asiatica* modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *J. Ethnopharmacol.* **180**, 78-86.
- Gupte, R. S., Floyd, B. C., Kozicky, M., George, S., Ungvari, Z. I., Neito, V., Wolin, M. S. and Gupte, S. A. 2009. Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 219-228.
- He, L., Hong, G., Zhou, L., Zhang, J., Fang, J., He, W., Tickner, J., Han, X., Zhao, L. and Xu, J. 2019. Asiaticoside, a component of *Centella asiatica* attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis via NFATc1 and NF- κ B signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* **234**, 4267-4276.
- Hengjumrut, P. Comparative pharmacokinetic study of asiaticoside and madecassoside as the pure compounds and mixture in the standardized extract of *centella asiatica*, ECa 233 in rats Chulalongkorn University; 2016.
- Hou, Q., Li, M., Lu, Y. H., Liu, D. H. and Li, C. C. 2016. Burn wound healing properties of asiaticoside and madecassoside. *Exp. Ther. Med.* **12**, 1269-1274.
- Kashima Tanaka, M., Tsujimoto, Y. and Yamazaki, M. 2002. Quantification of hydroxyl radical generated from the Fe $^{2+}$ -H $_2$ O $_2$ and Cu $^{2+}$ -H $_2$ O $_2$ reaction systems by electron spin resonance stop and flow technique. *J. Int. Oral. Health.* **1**, 67-73.
- Kim, K., Lee, S. Y., Seo, S. K., Hwang, B. R. and Park, J. K. Water-soluble extract of asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica* and isolating method thereof. Google Patents, 2002.
- Kim, M. O., Choe, M. H., Yoon, Y. N., Ahn, J., Yoo, M., Jung, K. Y., An, S., Hwang, S. G., Oh, J. S. and Kim, J. S. 2017. Antihelminthic drug niclosamide inhibits CIP2A and reactivates tumor suppressor protein phosphatase 2A in non-small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **144**, 78-89.
- Kong, F., Ye, B., Cao, J., Cai, X., Lin, L., Huang, S., Huang, W. and Huang, Z. 2016. Curcumin represses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF- κ B and P2X7R signaling in PMA-induced macrophages. *Front. Pharmacol.* **7**, 369.
- Lee, J., Jung, E., Kim, Y., Park, J., Park, J., Hong, S., Kim, J., Hyun, C., Kim, Y. S. and Park, D. 2006. Asiaticoside in-

- duces human collagen I synthesis through TGF β receptor I kinase (T β RI kinase)-independent Smad signaling. *Planta Med.* **72**, 324-328.
20. Lee, S., Lee, H. and Kim, K. T. 2019. Optimization of experimental conditions and measurement of oxygen consumption rate (OCR) in zebrafish embryos exposed to organophosphate flame retardants (OPFRs). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **182**, 109377.
 21. Lin, J., Jiang, H. and Ding, X. 2017. Synergistic combinations of five single drugs from *Centella asiatica* for neuronal differentiation. *Neuroreport* **28**, 23-27.
 22. Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Missiroli, S., Patergnani, S. and Poletti, F. 2012. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J. Signal Transduct.* **2012**, 329635.
 23. Meng, Z., Yan, C., Deng, Q., Gao, D. F. and Niu, X. L. 2013. Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells *in vitro* via ROS-relative TLR4-MAPK/NF-kappaB pathways. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 901-911.
 24. Mukherjee, P. K., Bahadur, S., Chaudhary, S. K., Harwansh, R. K. and Nema, N. K. Validation of Medicinal Herbs for Skin Aging. In: Evidence-Based Validation of Herbal Medicine, Elsevier, 2015, pp. 119-147.
 25. Naidoo, D. B., Chuturgoon, A. A., Phulukdaree, A., Guruprasad, K. P., Satyamoorthy, K. and Sewram, V. 2017. *Centella asiatica* modulates cancer cachexia associated inflammatory cytokines and cell death in leukaemic THP-1 cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC's). *BMC Complement Altern. Med.* **17**, 377.
 26. Oyenih, A. B., Chegou, N. N., Oguntibeju, O. O. and Masola, B. 2017. *Centella asiatica* enhances hepatic antioxidant status and regulates hepatic inflammatory cytokines in type 2 diabetic rats. *Pharm. Biol.* **55**, 1671-1678.
 27. Ren, L., Cao, Q. X., Zhai, F. R., Yang, S. Q. and Zhang, H. X. 2016. Asiatic acid exerts anticancer potential in human ovarian cancer cells via suppression of PI3K/Akt/mTOR signalling. *Pharm. Biol.* **54**, 2377-2382.
 28. Shadel, G. S. and Horvath, T. L. 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* **163**, 560-569.
 29. Song, D., Jiang, X., Liu, Y., Sun, Y., Cao, S. and Zhang, Z. 2018. Asiaticoside attenuates cell growth inhibition and apoptosis induced by A β 1-42 via inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway in human brain microvascular endothelial cells. *Front. Pharmacol.* **9**, 28.
 30. Stark, H. J., Szabowski, A., Fusenig, N. E. and Maas-Szabowski, N. 2004. Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated *in vitro* system. *Biol. Proced. Online* **6**, 55.
 31. Turrens, J. F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **17**, 3-8.
 32. Vasavi, H., Arun, A. and Rekha, P. 2016. Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **49**, 8-15.
 33. Wang, X., Cai, X., Wang, W., Jin, Y., Chen, M., Huang, X., Zhu, X. and Wang, L. 2018. Effect of asiaticoside on endothelial cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Mol. Med. Rep.* **17**, 2893-2900.
 34. Xu, C. L., Wang, Q. Z., Sun, L. M., Li, X. M., Deng, J. M., Li, L. F., Zhang, J., Xu, R. and Ma, S. P. 2012. Asiaticoside: attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **100**, 413-418.
 35. Yamasaki, H. and Grace, S. C. 1998. EPR detection of phyto-phenoxy radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system. *FEBS Lett.* **422**, 377-380.
 36. Yao, C. H., Yeh, J. Y., Chen, Y. S., Li, M. H. and Huang, C. H. 2017. Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing *Centella asiatica* extract in a rat model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 905-915.
 37. Yao, H., Hu, C., Yin, L., Tao, X., Xu, L., Qi, Y., Han, X., Xu, Y., Zhao, Y. and Wang, C. 2016. Dioscin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury via regulating TLR4/MyD88 signal pathway. *Int. Immunopharmacol.* **36**, 132-141.
 38. Yin, Z., Yu, H., Chen, S., Ma, C., Ma, X., Xu, L., Ma, Z., Qu, R. and Ma, S. 2015. Asiaticoside attenuates diabetes-induced cognition deficits by regulating PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Behav. Brain Res.* **292**, 288-299.
 39. Yuliaty, L., Mardiyati, E., Bramono, K. and Freisleben, H. J. 2015. Asiaticoside induces cell proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Univ. Med.* **34**, 96-103.
 40. Zhao, H., Zhang, M., Zhou, F., Cao, W., Bi, L., Xie, Y., Yang, Q. and Wang, S. 2016. Cinnamaldehyde ameliorates LPS-induced cardiac dysfunction via TLR4-NOX4 pathway: The regulation of autophagy and ROS production. *J. Mol. Cell Cardiol.* **101**, 11-24.
 41. Zorov, D. B., Juhaszova, M. and Sollott, S. J. 2006. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1757**, 509-517.

초록 : 병풀(*Centella asiatica*) 및 아시아티코사이드는 미토콘드리아 호흡 및 TLR4 경로를 통해 H_2O_2 유도 세포염증 조절

지주리¹ · 남영선² · 강상모^{3*}

(¹시바산, ²신경대학교 뷰티디자인학과, ³건국대학교 생물공학과)

이 연구는 인간진피섬유아(HDF)세포에서 병풀 및 아시아티코사이드가 H_2O_2 유래 세포주기 정지기, 미토콘드리아 활성 및 염증성 사이토카인에 미치는 영향을 조사하였다. 병풀 80% 메탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 병풀의 대표물질인 아시아티코사이드를 사용하였다. 병풀 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아시아티코사이드로 처리한 세포는 낮은 수준의 TNF- α 및 IL-6을 분비하였고, 아시아티코사이드의 항산화 효과는 병풀 추출물 및 에틸아세테이트 분획물보다 높았다. 아시아티코사이드 처리는 미토콘드리아의 막포텐셜을 증가시키고, 미토콘드리아를 정상으로 되돌렸다. 스트레스 유도 후 에틸아세테이트 분획물 및 아시아티코사이드에 의해 미토콘드리아 산소 소비율이 증가하였고, TLR4-MyD88-TRAF6-p65 경로가 재감소하였다. 이러한 결과는 병풀 추출물, 에틸 아세테이트 분획 및 아시아티코사이드가 HDF 세포의 미토콘드리아 활성을 조절할 뿐 아니라 항산화 및 항염증에 효과 있음을 시사한다.