

## 병풍 추출물이 첨가된 음료 시제품의 장내 면역조절 효과와 지표물질

김연숙 · 신현영\* · 구자평\*\* · 하은지\*\* · 정원비\*\* · 정미연\*\*\* · †유광원\*\*\*\*

한국교통대학교 식품영양학전공 대학원생, \*고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,  
\*\*한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, \*\*\*(주)참선진녹즙 연구소장, \*\*\*\*한국교통대학교 식품영양학전공 교수

### Intestinal Immunomodulatory Effect and Marker Compound of *Centella asiatica* Extracts-Added Beverage Prototype

Yeon Suk Kim, Hyun Young Shin\*, Ja Pyeong Koo\*\*, Eun Ji Ha\*\*,  
Won Bi Jeong\*\*, Mi Yeun Joung\*\*\* and †Kwang-Won Yu\*\*\*\*

Graduate School Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

\*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical & Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

\*\*Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

\*\*\*Food R&D Center Director, Corporation ChamSunJin Green Juice, Jincheon 27865, Korea

\*\*\*\*Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

#### Abstract

To produce an intestinal immunomodulatory beverage containing *Centella asiatica* extract (CAE), three types of CAE-added beverage prototypes were prepared, and their immunomodulatory activities and marker compounds were analyzed. As a result of the cytotoxicity assessment, all the beverages did not show significant toxicity compared to the control group. Next, the immunomodulatory activities of the beverage prototype were evaluated using the inflammatory model of IL-1 $\beta$ -induced intestinal epithelial cell line. All the samples significantly reduced the production of IL-6, IL-8, and MCP-1 in a CAE concentration-dependent manner. In addition, CAE-added beverages inhibited NO, IL-6, and IL-12 production in LPS-induced RAW 264.7 cells. When the major triterpenoids, as marker compounds for the production of CAE-added beverages, were analyzed by HPLC-DAD, only asiaticoside was detected beyond the limit of quantification, while madecassoside, madecassic acid, and asiatic acid were not detected. The amounts of asiaticoside in CAE-added beverage prototypes were confirmed in No. 1 (19.39  $\mu\text{g/mL}$ ), 2 (19.25  $\mu\text{g/mL}$ ), and 3 (19.98  $\mu\text{g/mL}$ ). In conclusion, the results of this study suggested that CAE-added beverage prototypes induced immunomodulatory effects in the intestinal inflammatory cell line models and asiaticoside could be used as a marker compound for CAE-added beverage production.

Key words: *Centella asiatica*, beverage prototype, intestinal immunomodulatory effect, marker compound

#### 서론

인체의 장관은 소화, 흡수, 배설 등의 기본적인 기능과 점막 장벽 기능 및 대식세포, 수지상세포와 장 상피세포 등이 장 점막 주변에 다량 분포되어, 면역 글로불린 분비 등의 면역학적 기능을 수행하여 우리 몸 면역체계의 핵심적인 역할을

을 하는 것으로 알려져 있다(Tlaskalova-Hogenova 등 2005; Han 등 2008). 그러나 장관은 혐기성 세균 및 내독소 등으로 인해 장관 벽에 손상이 쉽게 유도되고, 그로 인해 손상된 세포 간 치밀결합(tight junction)의 기능이 저하되어 장 투과성이 증가됨으로써(Han 등 2013), 위장 및 전신 염증 장애를 초래하여 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD), 음

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

식 알레르기, 소아 지방변증 등이 유발되는 것으로 알려져 있다(Farhadi 등 2003). 염증성 장 질환은 크론병과 궤양성 대장염을 포함하는 만성 염증성 질환으로, 설사, 복통, 빈혈, 체중 감소 등의 증상을 유발한다고 알려져 있다(Pithadia & Jain 2011). 특히, 이러한 염증성 장 질환의 발병은 식습관의 서구화를 비롯하여 과도한 면역반응, 스트레스 및 장내 미생물 변화 등의 다양한 이유로 인해 장 점막의 면역체계가 변화하고 장 점막을 공격하는 병적인 염증반응에 의해 증가하고 있는 실정이며(Nam 등 2022), 발생원인은 정확히 규명되지 않았으나 유전/환경적 영향이나 장내 미생물 등이 원인으로 지목되고 있다(Kim 등 2020). Ha 등(2019)에 따르면 국내 염증성 장 질환 환자 수는 연평균 궤양성 대장염 3%, 크론병 5%로 꾸준히 증가하는 추세이며, 과거 궤양성 대장염의 유병률이 크론병보다 높은 것으로 나타났지만 그 차이가 점차 줄어들고 있어, 궤양성 대장염 대비 크론병의 발생률이 더 크게 증가하고 있는 것으로 나타났다. 향후에도 지속적으로 염증성 장질환의 발병이 증가할 것으로 판단되며, 이를 예방하고 개선하기 위한 소재의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

적설초(積雪草) 또는 호랑이풀 등의 다양한 이름으로 불리는 병풀(*Centella asiatica*)은 미나리과(Apiaceae)의 다년생 초본식물로, 고온 다습한 곳에서 자생하며, 주로 아프리카, 인도양, 중국 등의 아시아와 국내에서는 제주도 일대, 경남 지방, 충북 충주에서 재배되는 것으로 알려져 있다(Choi 등 2020; Eom 등 2021). 병풀은 오래 전부터 민간요법, 한방 등에서 약용으로 이용되어 다양한 건강상 이점을 가지는 것으로 알려져 왔으며(Choi 등 2021), 흉터예방(Widgerow 등 2000), 피부개선 효과(Choi & Bae 2013), 신경세포 보호효과(Orhan IE 2012), 항산화 및 항염증 활성(Shin 등 2020) 등 다양한 생리활성 효과가 보고되고 있다. 현재 병풀은 주로 피부 및 상처 치유 등의 피부 관련 기능성 화장품 및 의약품의 산업적인 원료로 활용되고 있는데, 저렴한 가격으로 인해 대부분 수입 원료에 의존하고 있는 실정이다. 한편, 2014년에 발효된 나고야 의정서에 의해 천연물 및 의약품 제조에 투입되는 핵심 원료를 외국에서 수입 시 수입대금 외 별도로 제품 상품화에 따른 이익 중 일부를 로열티로 지불해야 하는 상황에 놓여있어(Park WS 2017), 최근 국내에서는 가격 경쟁

력을 갖는 병풀의 원활한 원료공급을 위해 재배방법 및 재배 환경 등을 개발 중인 것으로 알려져 있다(Shin 등 2020; Eom 등 2021; Kim 등 2023). 또한, 병풀은 항산화 효능을 포함한 피부개선 효능과 눈 건강 개선 등에 관한 다양한 연구가 이루어졌으나 장내 면역조절을 통한 염증성 장 질환 예방 및 개선 등에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 병풀을 사용하여 장 건강개선 효능을 가진 일반식품/건강기능식품의 소재로 활용하기 위해 추출 비율에 따른 병풀 추출물 함유 음료 시제품을 조제하고 장 상피세포주(Caco-2)와 대식세포주(RAW 264.7)를 이용한 장내 면역조절 효과를 검증하고, 이에 따른 지표물질을 제시하고자 하였다. 또한, 이러한 결과를 바탕으로 수입 원료를 대체하기 위한 생물소재의 국산화에 이바지하고, 다양한 시제품을 조제함으로써 병풀 추출물 함유 음료를 개발하기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 병풀 추출물 함유 음료 시제품의 제조

본 연구에서 사용된 병풀은 충북 충주의 농업회사법인 (주) 병풀농원(Chungju, Korea)에서 구입하여, (주) 참선진 녹즙(Jincheon, Korea)에서 병풀을 추출하고, 이를 첨가하여 음료를 조제하였다. 병풀 추출물은 생초를 60°C에서 열풍건조한 후 건조된 병풀을 물 1 L에 대하여 0.1, 1.0 및 2.0%의 비율(Table 1)로 넣은 후 100°C에서 15시간 동안 열수추출 및 여과(Advantec, Tokyo, Japan)를 진행하여 제조하였다. 이후 병풀 추출물 함유 음료는 55% 병풀 추출물과 음료의 맛과 향을 개선할 목적으로 20% 셀러리 착즙액 및 신선초 착즙액을 혼합하여 여과 과정을 거쳐 병풀 음료 시제품으로 조제하였다. 병풀 추출물이 함유된 음료는 제공받은 즉시 품질유지를 위해 -80°C의 초저온냉동고(Ilshin Biobase, Dongducheon, Korea)에 동결시킨 후 사용 시 해동하고 희석하여 분석에 이용되었다.

### 2. 세포주 및 배양조건

인체 유래 장 상피세포주인 Caco-2는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)에서 분양받았으며,

Table 1. Extraction conditions for preparing CAE-added beverages

CAE-added beverage		No. 1		No. 2		No. 3	
		Contents (%)	Contents (g)	Contents (%)	Contents (g)	Contents (%)	Contents (g)
Extraction conditions	<i>C. asiatica</i>	0.1	1.0	1.0	10.0	2.0	20.0
	Water	99.9	999.0	99.0	990.0	98.0	980.0
	Total	100	1,000	100	1,000	100	1,000

20% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, MA, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 minimum essential medium(MEM; Gibco)에서 배양하였다. 마우스 유래 RAW 264.7 대식세포주는 한국세포주 은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 10% FBS 및 1% P/S를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA)에서 배양하였다. 두 개의 세포주는 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 37°C 조건으로 배양하여 연구에 이용하였다.

### 3. 장 상피세포(Caco-2)를 이용한 항염증 활성

인체 유래 장 상피세포인 Caco-2 세포주를 이용하여 병풀 추출물이 함유된 음료의 처리에 의한 항염증 활성을 평가하기 위하여 Caco-2세포를 96-well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well로 200  $\mu$ L씩 분주하고 배양기에서 monolayer를 형성할 때까지 배양하였다. 이후 배양 상등액을 제거한 후 serum free-MEM(SFM) 160  $\mu$ L를 분주하고 농도별로 희석한 시료를 20  $\mu$ L 처리하여 1시간 동안 배양하고, interleukin(IL)-1 $\beta$ 를 20  $\mu$ L를 처리하여 24시간 동안 재배양하여 염증 억제모형을 형성하였다. Caco-2 세포주에 대한 시료 독성평가는 0.5 mg/mL 농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 시약을 처리하여 30분간 반응하고, 이후 상등액을 제거하고 100  $\mu$ L의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 분주하여 보라색의 crystal을 용해시켜 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 IL-1 $\beta$  처리군에 대한 세포 생존율(cell viability, %)을 나타냈다. 세포주에서 분비된 염증 인자인 IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein(MCP)-1의 함량은 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)의 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit를 구입하여 분석에 이용하였으며, 제조사에서 제공된 recombinant protein를 이용하여 작성한 표준곡선을 통해 평가하였다.

### 4. 대식세포주(RAW 264.7)를 이용한 항염증 활성

마우스 유래 RAW 264.7 대식세포주를 이용하여 병풀 추출물이 함유된 음료의 처리에 의한 항염증 활성을 평가하였다. 세포주를 96-well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well로 200  $\mu$ L씩 분주하고 배양기에서 약 18시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 제거한 후 serum free-DMEM(SFM)을 160  $\mu$ L씩 분주하고 적당한 농도로 희석된 시료를 20  $\mu$ L 처리하여 1시간 동안 배양하고, LPS(lipopolysaccharide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20  $\mu$ L를 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. LPS 처리에 의해 염증을 유도시킨 RAW 264.7 세포주에 대한 시료 독성평가는 0.1 mg/mL 농도의 MTT 시약을 처리한 후 흡광도를 측정하여 LPS 처리군에 대한 세포 생존율(cell

viability, %)을 나타냈다. 한편, NO(nitric oxide)의 함량은 griess assay를 통해 측정되었으며 sodium nitrate를 이용하여 표준곡선을 작성하여  $\mu$ M로 함량을 평가하였다. IL-6 및 IL-12는 ELISA kit를 이용하여 분석하였으며, 제조사에서 제공된 recombinant protein를 이용하여 작성한 표준곡선을 통해 함량(pg/mL)을 평가하였다.

### 5. HPLC-DAD를 이용한 주요 triterpenoid의 정량 분석

추출 비율을 달리한 병풀 추출물이 함유된 음료 3종에 존재하는 주요 triterpenoid의 함량을 평가하기 위해 Shin 등(2020)의 방법을 참고하여 Table 2와 같은 조건으로 분석을 진행하였다. 분석에 사용한 표준물질은 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, 4 mg/mL 농도의 stock solution으로 조제하고 이를 각각 섞어 1 mg/mL의 working solution으로 조제하여 0.2  $\mu$ m membrane filter(PALL, Port Washington, NY, USA)로 여과한 후 분석하였다. 한편, 시료의 경우에는 각각의 원액을 해동하여 여과한 후 분석에 사용하였으며, 분석한 검량선을 이용하여 시료에 존재하는 성분의 함량을  $\mu$ g/mL로 나타내었다.

### 6. 통계처리

모든 시험 분석은 3번 반복으로 진행하였으며, 결과는 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation; SD)로 나타냈다. 분석 결과는 Statistical Package for the Social Science(SPSS V26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Levene's test를 실시하여 분산의 동질성을 비교하였으며, 동질성을 갖는 경우 분산분석(analysis of variance; ANOVA)을 실시한 후 분석값 간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 사후분석을 통해 검증하였다. 또한, 시료간 유의차를 가지는 경우, 측정값을 나타내는 막대 위에 소문자(stock)와 대문자(dilution)로 표기하여 유의차를 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 병풀 추출물 함유 음료 시제품 3종의 세포주 독성 평가

본 실험에서 진행한 염증 억제 활성은 세포주에 시료를 처리한 후 LPS 또는 사이토카인과 같은 염증 매개 인자를 처리하여 시료처리에 의한 염증성 물질 생산의 억제를 평가하는 시험법으로, 시료의 독성에 의해 세포가 사멸하면 이로 인하여 염증 관련 바이오 마커가 감소되고, 이를 염증 억제 활성으로 오인할 수 있다. 따라서, 이러한 염증억제 활성을 평가하기 전 병풀 추출물 함유 음료의 세포독성 평가를 먼저 진행하였다. Caco-2 세포주의 세포독성 평가 결과는 Fig. 1A에 나타냈으며, 병풀 추출물 함유 음료 3종은 음성대조군(NC;

**Table 2. HPLC conditions for quantitative analysis of major triterpenoids in CAE-added beverages**

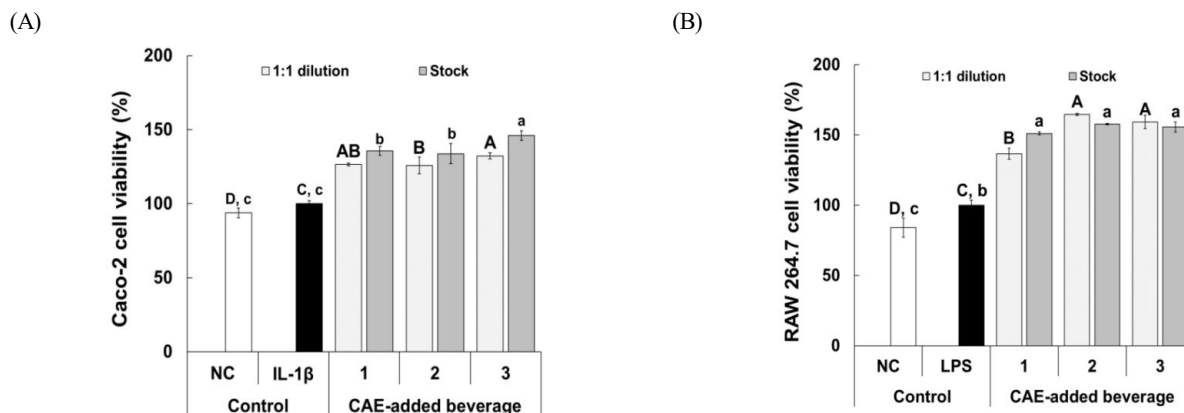
Analysis	Conditions		
Instrument	YL-9100 series (Young Lin Co. Ltd, Anyang, Korea)		
	YMC-Triart C18 (150×4.6 mm, 3 μm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)		
Mobile phase	Time (min)	Deionized water (%)	Acetonitrile (%)
	0	79	21
	9	79	21
	12	77	23
	20	77	23
	24	65	35
	30	65	35
	32	56	44
	34	33	67
	42	33	67
	45	0	100
	50	79	21
	65	79	21
Column temp.	30°C		
Flow rate	0.8 mL/min		
Detector	Uv at 205 nm		
Injection volume	20 μL		
Data calculator	Clarity system		

normal control) 및 IL-1β 처리군과 비교하여 모든 시료에서 세포의 생존율에 영향이 없는 것으로 나타났다. 시료 처리군의 세포 생존율이 80% 이상이면 일반적으로 세포독성은 없는 것으로 알려져 있으므로(López-García 등 2014), 3종 음료 모두 장 상피세포주에 대한 세포독성은 없는 것으로 확인되었다. 특히, 병풍 추출물 함유 음료의 처리가 IL-1β 처리군 대비 통계적으로 유의한 세포증식능을 나타낸 것은, Díaz-Coránguez 등(2019)이 장 상피의 치밀결합이 세포 증식 및 분화와 밀접한 관련이 있음을 보고한 연구결과로부터, 병풍 추출물 함유 음료의 처리를 통해 치밀결합이 조직 장벽을 형성하고 유지하는데 필요한 장상피의 세포 증식에 기여할 수 있을 것으로 추정되었다. 한편, 이러한 시료의 무독성은 마우스 유래 RAW264.7 대식세포주의 세포 독성 평가에서도 유사하게 나타나, NC 대조군 및 LPS 처리군 대비 장 상피세포주와 마찬가지로 오히려 36.7~55.7%의 통계적으로 유의한 세포 증식능을 나타내었다(Fig. 1B). 결론적으로 세포독성 평가를 종합한 결과, 병풍 추출물 함유 음료는 두 세포주에서 모두 대

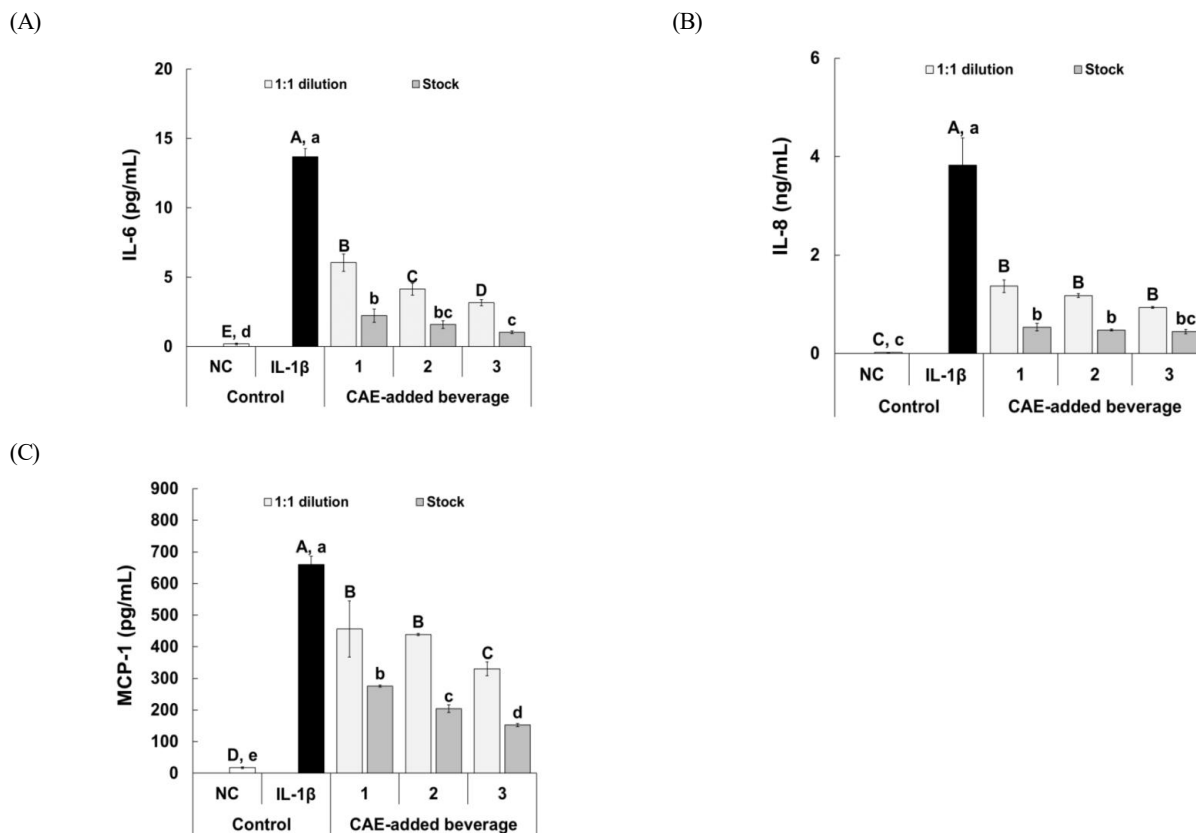
조군 대비 유의한 세포독성을 나타내지 않았으므로 위 농도에서 장내 면역조절 관련 바이오 마커의 분석을 진행하였다.

## 2. 장 상피세포주(Caco-2)를 이용한 장 염증 억제 활성

IL-1β 처리로 인해 자극된 Caco-2 세포주는 전염증성 사이토카인 IL-6와 IL-8 및 MCP-1과 같은 케모카인을 생성하여 장 점막에 염증을 유도하는 것으로 알려져 있다(Tesoriere 등 2014). 따라서, 인간 유래 장 상피세포인 Caco-2 세포주에 IL-1β를 처리하여 염증반응을 유도시킨 후 병풍 추출물이 함유된 음료 3종을 첨가하여 항염증 활성을 측정하였다. 먼저, 세포주에서 과량 생산 시 만성 염증 및 자가면역 질환을 유발시키는 친염증성 사이토카인인 IL-6의 억제 활성을 평가한 결과는 Fig. 2A에 나타났다. 음성대조군의 경우에 IL-6 생성량은 0.2 pg/mL인 반면, IL-1β 처리군은 10 ng/mL 농도에서 13.7 pg/mL의 IL-6 생성량을 나타내어 통계적으로 유의한 수준에서 염증 유도 모델이 효과적인 것을 확인하였다. 시료의 처리에 따른 장 염증 억제활성 결과, 1번 음료는 2배 희석 및 원액에서 IL-1β 처리군 대비 각각 6.1 및 2.2 pg/mL의 생성으로 통계적으로 유의한 IL-6 억제 활성(IL-1β 처리군 농도 대비 55.7 및 83.7% 억제)을 나타냈으며, 2번 음료도 각각 4.1 및 1.6 pg/mL 생산으로 유의한 IL-6 억제 활성(69.7 및 88.4% 억제)을 보였다. 한편, 3번 음료는 원액 및 2배 희석에서 IL-1β 처리군 대비 각각 3.2 및 1.0 pg/mL의 IL-6 생성능을 나타내어 3번 음료가 가장 우수한 장 염증 억제 활성(76.9 및 92.4% 억제)을 나타내는 것을 확인하였다. 다음으로 호중구를 활성화시켜 염증반응을 증폭시키는 IL-8 억제 활성을 평가한 결과를 Fig. 2B에 나타났다. 1번 음료의 2배 희석 및 원액에서 IL-1β 처리군 대비 각각 1.4 및 0.5 ng/mL의 생산으로 통계적으로 유의한 IL-8 억제 활성(64.2 및 86.0% 억제)을 나타냈으며, 2번 음료에서는 각각 1.2 및 0.5 ng/mL 농도로 유의한 IL-8 억제 활성(69.2 및 87.6% 억제)을 나타냈다. 3번 음료도 IL-1β 처리군 대비 각각 0.9 및 0.4 ng/mL의 생산능으로 가장 우수한 IL-8 억제 활성(75.6 및 88.3%)을 보였으나 1번 및 2번 음료와 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 마지막으로 단핵구와 대식세포를 유인하여 염증을 유도하는 케모카인인 MCP-1의 억제 활성을 평가한 결과는 Fig. 2C와 같다. 1번 및 2번 음료의 2배 희석 및 원액에서는 IL-1β 처리군 대비 각각 456.0 및 275.6 ng/mL과 438.5 및 204.4 ng/mL의 생산으로 IL-1β 처리군과 통계적으로 유의한 MCP-1 억제 활성(IL-1β 처리군 농도 대비 30.9 및 58.2% 억제; 33.6 및 69.0% 억제)을 나타냈다. 한편, 3번 음료는 IL-1β 처리군 대비 각각 330.3 및 152.5 ng/mL의 MCP-1 생성능을 나타내어 1번 및 2번 음료보다 유의적으로 우수한 억제활성(49.9 및 78.6%)을 나타내었다. 결론적으로 IL-1β로 유도된 Caco-2 세포주



**Fig. 1.** Cytotoxic effect of CAE-added beverages against Caco-2 cell (A), and RAW 264.7 macrophage (B). Each beverage was treated to Caco-2 or RAW 264.7 cells, and IL-1 $\beta$  or LPS were subsequently stimulated for 24 h. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of three independent tests in triplicate. Means with different letters (lowercase; stock and uppercase; dilution) above the bars are significantly different between groups at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. 1; 0.1% CAE-added beverage, 2; 1% CAE-added beverage, and 3; 2% CAE-added beverage.



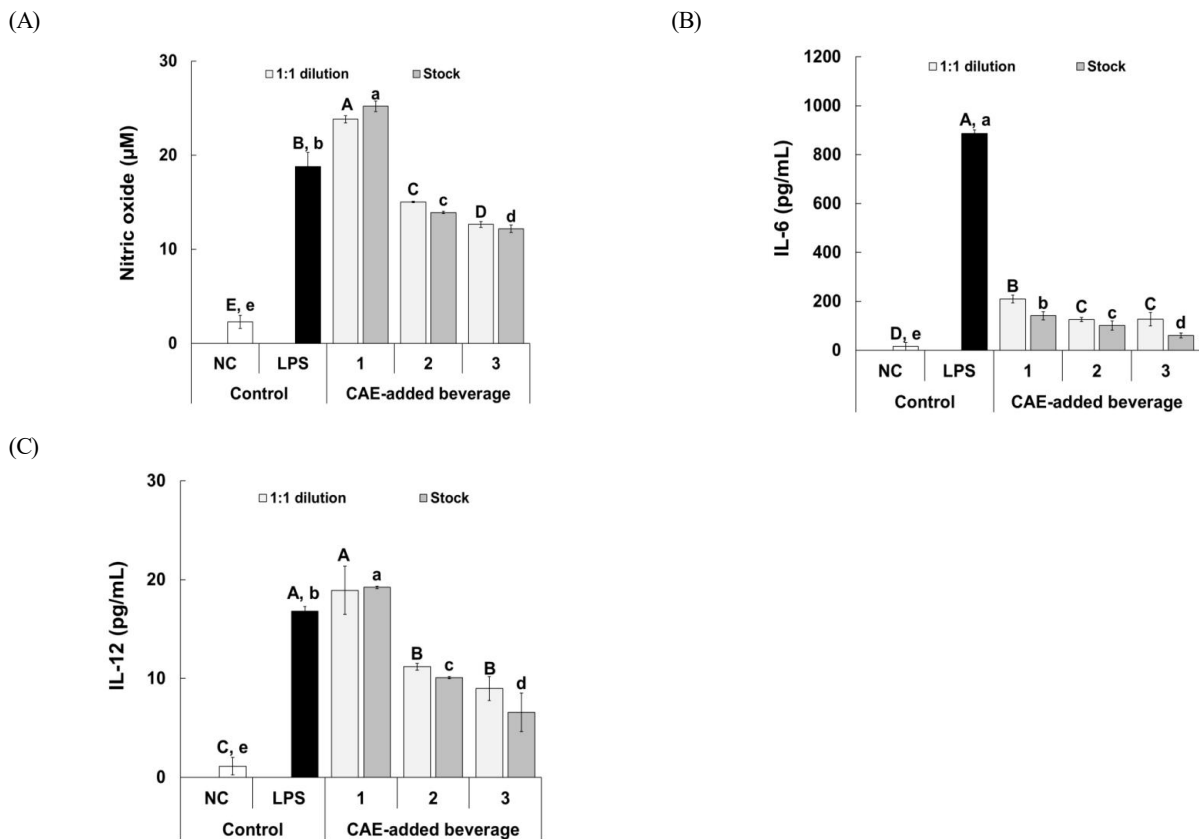
**Fig. 2.** Anti-inflammatory effect of CAE-added beverage on IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cell. Caco-2 cells were treated with each beverage followed by IL-1 $\beta$  treatment for 24 h, and the production of IL-6 (A), IL-8 (B), and MCP-1 (C) was evaluated. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of three independent tests in triplicate. Means with different letters (lowercase; stock and uppercase; dilution) above the bars are significantly different between groups at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. 1; 0.1% CAE-added beverage, 2; 1% CAE-added beverage, and 3; 2% CAE-added beverage.

의 염증억제 활성 평가결과, 병풀 추출물 함유 모든 음료에서 유의적인 억제활성을 확인할 수 있었으며, 2.0% 병풀 추출물이 함유된 3번 음료에서 염증 억제 활성이 증가하지만 상대적으로 0.1% 병풀 추출물이 함유된 1번 음료에서도 효과적인 염증 억제활성을 나타냄으로써 산업적인 활용가능성을 높여주었다. Praengam 등(2021)의 연구에 따르면 병풀을 이용한 추출물이 IL-1 $\beta$ 로 염증을 유발시킨 Caco-2 세포주에서 전염증성 사이토카인인 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 의 생산을 감소시킨다는 점에서 본 연구와 유사한 것을 확인할 수 있었으며, 병풀 추출물 및 병풀 추출물 함유 음료의 처리를 통해 전염증성 사이토카인/케모카인의 생성을 감소시켜 장 염증을 억제할 수 있는 기능성 소재로서의 개발가능성을 제시할 수 있었다.

### 3. 대식세포주(RAW 264.7)에서의 염증 억제 활성

선천면역과 적응면역에서 방어와 조절에 관여하는 대식

세포주는 염증 발생 시 사이토카인을 분비하여 신속하게 면역세포를 활성화시켜 초기방어에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며(Kim 등 2018a), 장내에 분포하여 소장 과 대장의 장벽 기능을 조절하고 장의 항상성을 유지하는데 기여한다(Kühl 등 2015). 그러나, LPS 처리로 인해 자극을 유도시킨 RAW 264.7은 IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 생성하여 급성 및 만성 염증반응을 유도시킨다(Kim & Kim 2015). 따라서, 본 연구에서는 대식세포주에 병풀 추출물이 함유된 음료를 처리하였을 때 생성되는 염증 유발 인자에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 먼저, 과잉 생산 시 염증반응을 촉진시키는 NO의 억제 활성 평가 결과를 염증 유도 반응에서 평가하였는데, NC 대조군의 경우, NO 생성량은 2.3  $\mu$ M로 확인되었고 LPS 처리군은 1  $\mu$ g/mL의 농도에서 18.8  $\mu$ M의 NO 생성량을 나타내어 염증 유도 모델이 효과적으로 형성된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 시료처리의 결



**Fig. 3.** Anti-inflammatory effect of CAE-added beverage on LPS-stimulated RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were treated with each beverage followed by LPS treatment for 24 h, and production of NO (A), IL-6 (B), and IL-12 (C) was evaluated. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of three independent tests in triplicate. Means with different letters (lowercase; stock and uppercase; dilution) above the bars are significantly different between groups at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. 1; 0.1% CAE-added beverage, 2; 1% CAE-added beverage, and 3; 2% CAE-added beverage.

과, 1번 음료는 LPS 처리군 대비 통계적으로 유의한 NO 억제 활성은 확인되지 않았으나, 2번 및 3번 음료의 2배 희석 및 원액에서 LPS 처리군 대비 각각 15.0 및 13.9  $\mu\text{M}$ 와 12.6 및 12.2  $\mu\text{M}$ 의 NO 생성을 나타내어, LPS 처리군 생산 대비 22.7~29.5%와 37.2~40.0%의 통계적으로 유의한 NO 억제 활성이 나타나는 것으로 확인되었다. 다음으로 IL-6의 억제 활성은 Fig. 3B에 나타내었는데, 1번 음료의 2배 희석 및 원액에서는 LPS 처리군 대비 각각 209.5 및 141.0 pg/mL의 IL-6 생성능을 나타내어 통계적으로 유의한 억제 활성(LPS 처리군 대비 77.7~85.6% 억제)을 나타내었다. 한편, 2번 음료의 경우에는 2배 희석 및 원액에서 LPS 처리군 대비 각각 125.3 및 101.3 pg/mL의 유의한 IL-6 억제 활성(87.4~90.2% 억제)을 나타냈으며, 3번 음료는 LPS 처리군 대비 각각 126.7 및 60.9 pg/mL의 생산으로 원액에서 다른 시료보다 유의적으로 높은 IL-6 억제 활성(87.3~94.8% 억제)을 나타냈다. 마지막으로 IFN- $\gamma$ 의 natural killer 및 T 세포에서 생산을 유도하여 염증을 유발하는 IL-12 억제 활성을 평가한 결과는 Fig. 3C에 나타냈다. 1번 음료의 경우, LPS 처리군 대비 통계적으로 유의한 IL-12 억제 활성은 확인되지 않았으나, 2번 및 3번 음료의 2배 희석 및 원액에서 LPS 처리군 대비 각각 11.2 및 10.1 pg/mL과 9.0 및 6.6 pg/mL의 IL-12 생성을 나타내어, LPS 처리군 농도 대비 35.7~42.8%와 49.8~65.1%의 통계적으로 유의한 IL-12 억제 활성을 나타냈다. Cho 등(2020)은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포주에서 병풀 추출물 처리 시 친염증성 사이토카인인 iNOS(inducible nitric oxide synthase), IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현량 감소를 보고하였는데, 본 연구에서는 세포주에서 분비되는 염증성 인자 자체의 농도분석을 통해 억제활성을 측정하였기에 향후 mRNA gene expression 또는 immunoblotting을 통한 구체적인 염증 억제 활성 및 기작에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 결론적으로 Caco-2 세포와 RAW264.7 세포의 염증 억제 활성을 종합한 결과, 병풀 추출물 함유 음료는 장 상피세포주와 대식세포주에서 IL-1 $\beta$  및 LPS 처리로부터 유도된 염증반응을 억제하는 활성을 확인할 수 있었으며, 추후 장 건강 개선에 관한 건강 기능성 식품 소재로의 활용가능성을 제시할 수 있었다.

#### 4. 병풀 추출물이 함유된 음료의 주요 triterpenoid 분석

병풀은 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 등과 같은 triterpenoid 화합물을 함유하고 있으며(Eom 등 2021), 이러한 triterpenoid 화합물은 상처치료(Kil 등 2018), 콜라겐 합성(Seong 등 2021), 항생제 및 항염증제(Kim 등 2018b) 등의 효능을 가지고 있다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 병풀 추출물이 함유된 음료 3종이 Caco-2 및 RAW 264.7 세포주에서 염증을 억제하는 활성을 확인하였으므로

이러한 활성과 주요 triterpenoid의 상관성을 확인하고, 병풀 추출물 함유 장 염증 개선 음료의 산업화를 위한 지표물질의 제시를 위하여 4종의 triterpenoid를 혼합한 표준물질과 병풀 추출물 함유 음료 3종의 triterpenoid 화합물을 HPLC로 분석하였다(Fig. 4). 병풀 추출물 함유 음료 3종의 주요 triterpenoid 함량을 분석한 결과, 음료 3종에서는 공통적으로 madecassoside, madecassic acid 및 asiatic acid는 검출되지 않았고, asiaticoside만 검출되었다. 본 연구진은 선행연구(Kim 등 2023)에서 병풀 추출물의 지표물질을 확립하기 위한 분석법 검증을 통해 asiaticoside를 지표물질로 확립하였으며, asiaticoside 검출한계와 정량한계를 분석한 결과, 각각 4.99  $\mu\text{g/mL}$  및 15.12  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었는데 본 연구에서 분석한 병풀 추출물 함유 음료 3종의 asiaticoside의 함량은 각각 19.39, 19.25 및 19.98  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되어, 지표물질로서 활용 가능할 것으로 판단되었다(Table 3). 한편, 병풀 추출물 함유 음료 3종간에 asiaticoside의 함량은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 0.1% 병풀 추출물이 함유된 1번 음료에서도 우수한 장 염증 억제활성이 나타난 원인으로 볼 수도 있으나, 병풀 원료의 양에 따른 asiaticoside의 함량 간의 상관성을 높이지 않았기에 활성물질보다는 지표물질로서의 의미가 높은 것으로 사료된다. 따라서, 병풀 추출물 함유 음료 3종의 주요 triterpenoid 분석결과, asiaticoside는 지표물질로서의 활용가능성은 확인할 수 있었지만, 장내 면역조절에 관여하는 활성과 지표성분 간의 상관관계는 좀 더 확인이 필요하므로 향후 용매의 극성도에 따른 용매 분획, 컬럼크로마토그래피 등을 통한 방법을 통해 장내 면역조절에 관여하는 유효/활성 물질에 대한 규명이 필요할 것으로 판단된다.

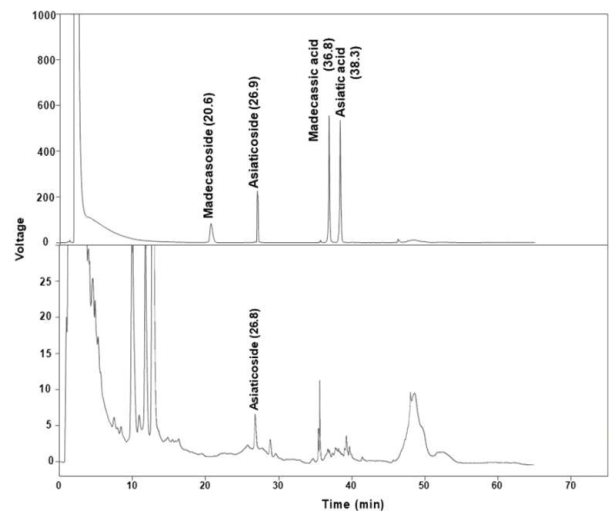


Fig. 4. HPLC chromatogram of triterpenoid standard mixture, and 2% CAE-added beverage.

**Table 3. Contents of major triterpenoids in CAE-added beverages**

Major triterpenoids	Madecassoside (µg/mL)	Asiaticoside (µg/mL)	Madecassic acid (µg/mL)	Asiatic acid (µg/mL)
CAE-added beverages	1	n.d <sup>1)</sup>	19.39±0.51 <sup>n,s2)</sup>	n.d
	2	n.d	19.25±0.66	n.d
	3	n.d	19.98±1.05	n.d

<sup>1)</sup> Not detected.

<sup>2)</sup> Not significant.

All results are expressed as mean±S.D. for three independent experiments. 1; 0.1% CAE-added beverage, 2; 1% CAE-added beverage, and 3; 2% CAE-added beverage.

## 요약 및 결론

병풀(*Centella asiatica*) 추출물(CAE)을 함유하는 장관 면역 조절 음료를 제조하기 위하여, CAE가 첨가된 음료 시제품 3종을 제조하고 이들의 활성과 생산을 위한 지표물질을 분석하였다. 먼저, CAE가 첨가된 음료의 면역 조절효과를 평가하기 위하여 세포주에 대한 독성 결과, 어떤 음료도 염증 유발균에 비해 유의적인 독성을 나타내지 않았다. 염증 억제활성 평가에서, 병풀 추출물 첨가 음료 시제품 3종은 IL-1 $\beta$ 로 유도된 Caco-2 세포주에서 장내 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-8 및 MCP-1의 생성을, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포주에서는 NO, IL-6 및 IL-12의 생성을 유의미하게 감소시키는 염증 억제활성을 나타내었다. 또한, 병풀 추출물의 첨가에 따른 농도 의존적인 활성을 나타내었으나, 첨가량이 낮은 음료 시제품(0.1%)에서도 우수한 활성을 나타내어 산업적인 활용가능성을 확인할 수 있었다. 한편, CAE가 첨가된 음료 제품화를 위한 지표물질로서 주요 triterpenoids를 HPLC-DAD로 분석한 결과, asiaticoside만이 정량한계를 초과하여 검출되었으며, madecassoside, madecassic acid, asiatic acid는 검출되지 않았고, 음료 시제품간 통계적으로 유의한 차이는 확인되지 않아 면역조절 활성성분으로서의 규명은 향후 필요할 것으로 판단된다. 결론적으로, CAE가 첨가된 음료 시제품은 장내 염증 세포주 모델에서 향상된 면역 조절 효과를 입증했으며, asiaticoside가 CAE가 첨가된 음료 생산을 위한 지표물질로 사용될 수 있음을 시사했다.

## 감사의 글

본 논문은 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001; 핵심기술개발사업).

## References

- Cho YC, Vuong HL, Ha J, Lee S, Park J, Wibow AE, Cho S. 2020. Inhibition of inflammatory responses by *Centella asiatica* via suppression of IRAK1-TAK1 in mouse macrophages. *Am J Chin Med* 48:1103-1120
- Choi JN, Lee HJ, Lee YJ, Jeong JT, Lee JH, Chang JK, Park CG. 2020. Growth characteristics and asiaticoside content, and antioxidant activities in *Centella asiatica* by cultivation and irrigation methods. *Korean J Med Crop Sci* 28:254-259
- Choi JN, Oh MW, Lee HJ, Lee JH, Jeong JT, Lee YJ, Park CG. 2021. Comparison of growth characteristics, asiaticoside content and antioxidant activities of *Centella asiatica* (L.) Urb. *Korean J Plant Res* 34:44-51
- Choi S, Bae H. 2013. The effects of *Centella asiatica* extract and micro needle therapy system on the women's facial skin. *Korean J Aesthet Cosmetol* 11:787-794
- Díaz-Coránguez M, Liu X, Antonetti DA. 2019. Tight junctions in cell proliferation. *Int J Mol Sci* 20:5972
- Eom HJ, Shin HY, Ji YM, Kwon NR, Yoon HS, Kim IJ, Song Y, Yu KW. 2021. Nutritional components and physiological activity of *Centella asiatica* cultured in Chungju by drying method. *Korean J Food Nutr* 34:165-173
- Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. 2003. Intestinal barrier: An interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 18:479-497
- Ha JE, Jang EJ, Im SG, Sohn HS. 2019. Medication use and drug expenditure in inflammatory bowel disease: Based on Korean National Health Insurance Claims Data (2010-2014). *Korean J Clin Pharm* 29:79-88
- Han K, Kim K, Wang J, Kim H. 2013. Effect of unfermented and fermented *Atractylodes macrocephalae* on gut permeability



- and lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Korean Med Obes Res* 13:24-32
- Han M, Lee S, Lim J, Lee H, Han M, Kim W, Park I, Son SC. 2008. Assessment of intestinal permeability using polyethylene glycol in liver cirrhosis with ascites. *Chonnam Med J* 44:87-92
- Kil YS, Sin SM, Lee DY, Jeong WM, Yang K, 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* 28:917-922
- Kim EH, Gwak JY, Chung MJ. 2018a. Immunomodulatory activity of *Platycodon grandiflorum*, *Codonopsis lanceolata*, and *Adenophora triphylla* extracts in macrophage cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47:1069-1075
- Kim KB, Kim HW, Lee JS, Yoon SM. 2020. Inflammatory bowel disease and vitamin D. *Korean J Gastroenterol* 76: 275-281
- Kim MK, Kim DY. 2015. Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. *Korean J Food Preserv* 22:735-743
- Kim WI, Ko YG, Park MR, Jung KH, Kwon OH. 2018b. Preparation and characterization of polyurethane foam dressings containing natural antimicrobial agents for wound healing. *Polym Korea* 42:806-812
- Kim YS, Shin HY, Ha EJ, Koo JP, Jeong SB, Kim G, Jeung MY, Yu KW. 2023. Validation of asiaticoside as marker compound of *Centella asiatica* juice and extract, and its antioxidant activity. *Korean J Food Nutr* 36:93-102
- Kühl AA, Erben U, Kredel LI, Siegmund B. 2015. Diversity of intestinal macrophages in inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* 6:613
- López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. 2014. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J Funct Biomater* 5:43-57
- Nam AY, Lee DS, Shin KS. 2022. Improvement effects on inflammatory bowel disease of ethanol extract isolated from *Saururus chinensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:205-212
- Orhan IE. 2012. *Centella asiatica* (L.) urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:946259
- Park WS. 2017. A study on relationship between Nagoya protocol and international treaty on plant genetic resources for food and agriculture-Focus on possible policy and practical approaches for food and agricultural industries. *Chung-Ang Law Rev* 19:33-66
- Pithadia AB, Jain S. 2011. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep* 63:629-642
- Praengam K, Tuntipopipat S, Muangnoi C. 2021. Protective effects of ethanol extract and bioaccessible fraction of *Centella asiatica* against IL-1 $\beta$ -induced inflammation and oxidative stress in human intestinal Caco-2 cells. *Thai J Toxicol* 36:71-85
- Seong EJ, Heo H, Oh S, Kim D, Jang KI, Lee J. 2021. Optimization of ultrasound-assisted extraction for triterpene compounds from *Centella asiatica* using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 50:294-300
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim JE, Lee KH, Bae YJ, Yu KW. 2020. Bioactive compounds, anti-oxidant activities and anti-inflammatory activities of solvent extracts from *Centella asiatica* cultured in Chungju. *Korean J Food Nutr* 33: 692-701
- Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Gentile C, Livrea MA. 2014. Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- $\kappa$ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 $\beta$ -exposed Caco-2 cells. *Br J Nutr* 111:415-423
- Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Mestecky J, Kolinska J, Rossmann P, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Hrnecir T, Frolova L, Kverka M. 2005. Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scand J Immunol* 62:106-113
- Widgerow AD, Chait LA, Stals R, Stals PJ. 2000. New innovations in scar management. *Aesthetic Plast Surg* 24: 227-234

---

Received 5 October, 2023

Revised 23 October, 2023

Accepted 31 October, 2023