

Centella asiatica 추출물 및 표피성장인자가 각질형성세포의 증식에 미치는 효과

김홍표 · 김영중*
서울대학교 약학대학

Effects of Titrated Extract of *Centella asiatica* and Epidermal Growth Factor on the Proliferation of Human Epidermal Keratinocyte

Hong Pyo KIM and Young Choong KIM*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received March 18, 1995; accepted March 24, 1995)

Abstract—Effects of titrated extract of *Centella asiatica* (TECA) and epidermal growth factor (EGF) isolated from the urine of pregnant horse on the proliferation of human epidermal keratinocyte in culture were studied. An increase in the number of keratinocyte was observed with the treatment of TECA at the concentration ranges from 1 $\mu\text{g/ml}$ to 100 $\mu\text{g/ml}$. Effects of low molecular weight EGF (LEGF) and high molecular weight EGF (HEGF) on the proliferation of keratinocyte in culture were also studied. The number of keratinocyte in culture was significantly increased with LEGF and HEGF respectively at the concentration of 10 ng/ml. Simultaneous treatment of the keratinocyte with LEGF, HEGF and TECA led to the increased proliferation of keratinocytes resulting 96% of the effect of a positive control, EGF isolated from mouse submaxillary glands.

Keywords □ normal human epidermal keratinocyte, titrated extract of *Centella asiatica*, epidermal growth factor, DNA content

사람의 피부조직 중에서 표피층은 가장 바깥에 있는 부분으로 세균이나 화학물질과 같은 독성물질의 진입을 차단하는 한편 체내의 수분 및 전해질의 손실을 방지함으로써 인체를 보호하는 중요한 역할을 하고 있다 (Holbrook와 Wolff, 1987; Fitzpatrick 등, 1987). 피부에 생긴 상처의 치유를 목표로 지금까지 개발된 많은 제제, 특히 스테로이드제제는 여러가지 부작용이 보고되고 있어 새로운 상처치유제의 개발이 시급하다 하겠다. 이러한 부작용을 극복할 수 있는 새로운 제제로 개발된 아시아티코사이드 (asiaticoside)는 마다가스카르 섬과 인도에서 민간약으로 사용되어 오던 *Centella asiatica* 추출물의 주요 활성 성분으로 부작용이 적고 상처 치유가 빨라 새로운 상처치유제로서 그 영역을 확대하고 있다 (Boiteau 등, 1949).

이에 저자 등은 아시아티코사이드, 아시아틱 산, 마데

카식 산을 주요 구성성분으로 하는 *Centella asiatica* 추출물의 상처 치유 효과를 규명하기 위하여 일차적으로 각질형성세포의 증식에 미치는 영향을 일차 배양한 각질형성세포를 이용하여 알아 보았다. 또한 각질형성세포의 증식을 유도하는 내인성 물질로 알려진 피부성장인자 (epidermal growth factor, EGF)를 *Centella asiatica* 추출물과 병용 투여하면 그 효과가 증대되는 지를 알아 보았다.

실험재료 및 방법

시약

Insulin, hydrocortisone, ethanolamine, phosphoethanolamine, cefotaxime, bovine pituitary extract, MCDB 153, EGF 및 Hoechst 33258, (2-[2-(4-hydroxy-phenyl)-6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol·3HCl)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

* To whom correspondence should be addressed.

제품을 사용하였으며, trypsin-EDTA는 Gibco Lab. (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Titrated extract of *Centella asiatica* (TECA)와 임마노 (姪馬尿) 에서 분리한 저분자량을 가지는 EGF (low molecular weight, LEGF) 및 고분자량을 가지는 EGF (high molecular weight, HEGF)는 동국제약 주식회사에서 제공받아 사용하였다.

세포배양

각질형성세포는 사람의 포피 (包皮, foreskin)를 4°C 에서 0.17% trypsin-EDTA로 약 18시간 처리하여 얻었다. 분리한 각질형성세포를 2×10^5 cells/ml의 농도로 배양 용기에 접종하여 표피성장인자 10 ng/ml, insulin 10 µg/ml, hydrocortisone 5×10^{-7} M, ethanolamine 0.1 mM, phosphoethanolamine 0.1 mM 및 bovine pituitary extract 34 µl을 첨가한 MCDB 153 배양액을 사용하여 (Tsao 등, 1982; Boyce와 Ham, 1983; Kano-Sueoka 등, 1979; Kano-Sueoka 등, 1981) 일정한 온도와 습도가 유지되는 배양기에서 혼합공기 (95% air/5% CO₂)를 공급하여 주면서 배양하였다. 배양액은 매 2일마다 바꾸어 주었다. 각질형성세포 배양시 배양을 시작할 때에는 표피성장인자를 첨가하지 않은 배양액을 사용하였으며 배양액을 처음 갈아준 후 배양액에 표피성장인자를 첨가하였다. 한편, NIH 3T3 섬유아세포를 feeder layer로 (Green과 Todaro, 1963) 이용하여 각질형성세포를 배양하기도 하였다.

DNA 정량

각질형성세포를 4일간 배양한 후 세포 내의 DNA 양은 Labarca 등의 방법 (Labarca와 Paigen, 1980)에 따라 Hoechst 33258, 2-[2-(4-hydroxyphenyl)-6-benzyl-imidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol·3HCl)을 이용하여 fluorometer로 정량하였다.

세포수 측정

각질형성세포의 수는 H 10/10 점안렌즈가 장착된 역상현미경을 이용하여 배양용기 당 임의로 4군데를 지정하여 측정한 후 그 평균치를 세포 수로 간주하였다.

시료의 투여 및 효과 판정

시판 표피성장인자 (SEGF)와 동국제약 주식회사에서 제공한 분자량이 다른 2종의 표피성장인자인 LEGF 및 HEGF를 용량을 달리하여 배양중인 각질형성세포에 투여하여 그 효과를 알아보았다. 또한 *Centella asiatica*의 에탄올 추출물 (TECA)도 용량을 달리하여 배양중인 각질형성세포에 투여하였으며, 이들 물질의 효능을 현미경관찰과 더불어 배양세포 내의 DNA 양을 측정함으로써 알아 보았다.

통계처리

통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "one way ANOVA" test로 하였다. P값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

현재 상처치유제로 사용되고 있는 TECA가 사람의 각질형성세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 배양하고 있는 각질형성세포에 TECA를 1~1000 µg/ml 사이에서 용량을 변화시켜 투여하여 보았다. TECA는 유의성있는 각질형성세포 증식효과를 나타내었으며 50~100 µg/ml의 농도에서 최대의 효과를 나타내었다 (Fig. 3). TECA 1000 µg/ml을 투여하였을 때 배지 내에 TECA 침전이 형성되었을 뿐 아니라 각질형성세포가 배지 위로 부유하는 것으로 보아 고용량의 TECA는 세포독성을 갖는 것으로 보인다.

각질형성세포의 분열 및 증식에 미치는 LEGF 및 HEGF의 효과를 알아보기 위하여 이미 표피성장인자로 그 효능이 인정되어 판매되고 있는, 웅성마우스 하악선에서 분리된 표피성장인자 (SEGF)를 양성대조물질로 본 연구에 도입하였다. LEGF 및 HEGF는 2종의 urogastrone으로 임마노에서 분리되어 현재 EGF로 통용되고 있는 당단백질로 각질형성세포의 증식에 미치는 효과가 기대되어 각각 1~20 ng/ml 사이에서 용량을 달리하여 배양하고 있는 각질형성세포에 작용시켜 보았다. SEGF는 10 ng/ml에서 최대의 각질형성세포 증식효과를 보였으며 LEGF 및 HEGF 역시 SEGF와 마찬가지로 10 ng/ml에서 최대의 각질형성세포 증식효과를 나타내었다 (Fig. 1). LEGF 및 HEGF의 각질형성세포 증식효과는 SEGF를 10 ng/ml를 작용하였을 때의 효과를 100%로 간주하였을 때 LEGF는 64.2%, HEGF는 59.1%이었다.

이에, LEGF나 HEGF를 SEGF와 병용 투여하면 각질형성세포의 증식에 어떻게 영향을 미치는 가를 알아보기 위하여 각각 최대의 효능을 나타낸 농도에서 동시에 투여하여 보았다. 그 결과 SEGF 10 ng/ml을 단독 투여하였을 때 보다 증대된 각질형성세포 증식효과를 나타내었다 (결과는 실지 않음).

또한 TECA에 LEGF나 HEGF를 함께 투여하였을 때의 각질형성세포 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 유의성있는 각질형성세포 증식 효과를 나타낸 용량인 LEGF 10 ng/ml나 HEGF 10 ng/ml를 TECA 100 µg/ml와 함께 배양하고 있는 각질형성세포에 투여하여 보았다. 그 결과 LEGF 10 ng/ml, HEGF 10 ng/ml 및 TECA 100 µg/ml를 동시에 투여하였을 때의 각질형성세포 증식효과는 대조군으로 사용한 SEGF 10 ng/ml 효과의 96.0%에 해당하였다 (Fig. 1, 2).

각질형성세포의 증식에 미치는 표피성장인자의 효과를 배양하고 있는 세포의 수를 측정함과 동시에 배양하고 있는 각질형성세포 내의 DNA의 양을 정량함으로써 알아 보았다. 각질형성세포 내의 DNA의 양은 Labarca 등의 방법 (Labarca와 Paigen, 1980)에 따라 calf thymus DNA를 표준물질로 하여 DNA 형광을 증가시키는 염료

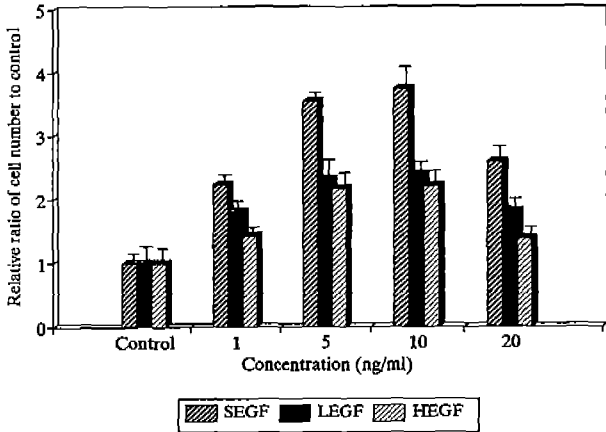


Fig. 1. Effects of SEGF, LEGF and HEGF on the proliferation of heman kerationcyte in culture. Control: cell number of non-treated group (n=3~5): $4.6 \pm 0.6 \times 10^5$ cells/ml, All values are significantly different ($p < 0.001$)

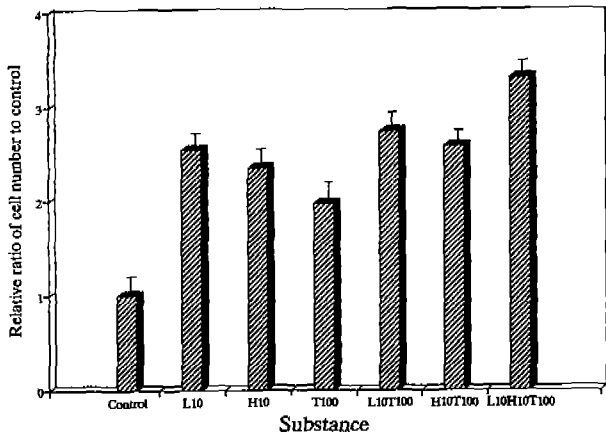


Fig. 2. Effects of the treatment of LEGF, HEGF and TECA in combination on the proliferation of human kerationcyte in culture. Control: cell number of non-treated group (n=3~5): $5.2 \pm 1.1 \times 10^5$ cells/ml, L10:LEGF 10 ng/ml, H10:LEGF 10 ng/ml, T100:TECA 100 μ g/ml, L10T100:LEGF 10 ng/ml+TECA 100 μ g/ml, H10T100:HEGF 10 ng/ml+TECA 100 μ g/ml, All values are significantly different ($p < 0.001$)

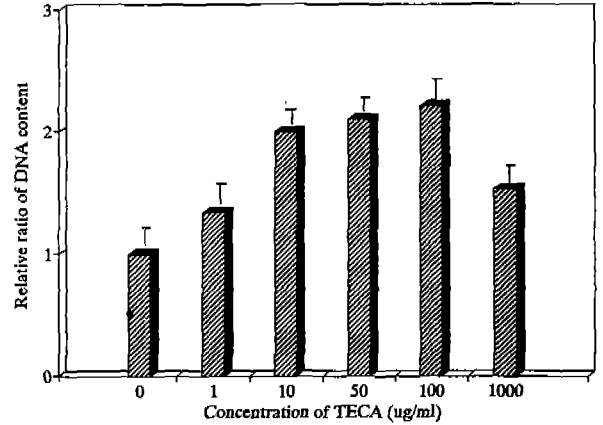


Fig. 3. The effect of TECA on DNA content of heman kerationcyte in culture. (n=4)

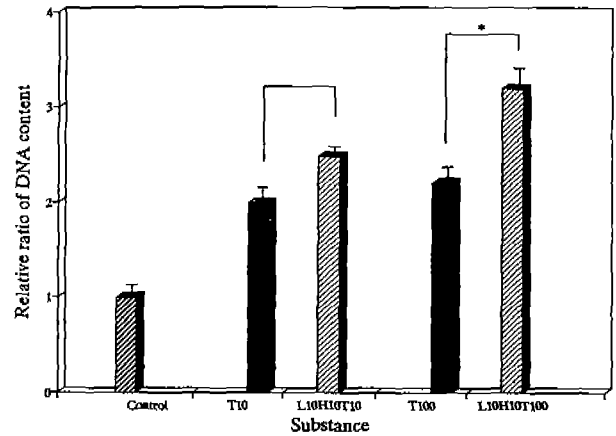


Fig. 4. Effects of the treatment of LEGF, HEGF and TECA in combination on DNA content of human kerationcyte in culture. T10:TECA 10 ng/ml, T100:TECA 100 ng/ml, L10H10T10:LEGF 10 ng/ml+HEGF 10 ng/ml+TECA 10 μ g/ml, L10H10T100:LEGF 10 ng/ml+HEGF 10 ng/ml+TECA 100 μ g/ml, *significantly different ($p < 0.001$)

고찰

로 알려진 Hoechst 33258를 이용하여 정량하였다. 배양하고 있는 각질형성세포에 TECA를 1 μ g/ml에서 1000 μ g/ml까지 농도를 달리하여 투여하였을 때, TECA 100 μ g/ml 농도에서 배양세포 내의 DNA 양이 가장 높았다 (Fig. 3). LEGF 10 ng/ml, HEGF 10 ng/ml 및 TECA 100 μ g/ml를 혼용하여 배양중인 각질형성세포에 투여한 경우 세포내의 DNA량은 대조군의 3.2배이었으며 이는 세포수를 측정하여 대조군과 비교하였을 때의 값인 3.3과 거의 일치하였기에 세포수를 측정함으로써 각질형성세포의 증식정도를 알아본, 본 실험 결과의 타당성을 더욱 뒷받쳐 주고 있다 (Fig. 2, 4).

본 연구의 수단으로 사용한 각질형성세포의 배양은 인체 유래의 각질형성세포를 체외에서 배양할 때 섬유아세포의 과다증식이 문제이었다. 그러나 이 문제는 포피조직에서 부터 각질형성세포를 개개의 세포로 분리할 때 불가피하게 혼입되는 섬유아세포를 mitomycin C로 처리한 3T3 섬유아세포를 feeder layer로 사용하여 각질형성세포를 배양함으로써 해결할 수 있었다. 섬유아세포의 혼입을 막기 위하여 최근에는 각질형성세포 특이배지인 MCDB 153 무혈청 배지를 사용한다 (Tsao 등, 1982; Boyce와 Ham, 1983; Kano-Sueoka 등, 1979; Kano-Sueoka 등, 1981). 이러한 MCDB 153 무혈청배

지를 본 연구에서도 사용함으로써 실험의 전 과정에서 섬유아세포 과다증식의 문제를 피할 수 있었기에 다시 한 번 MCDB 153 무혈청 배지가 각질형성세포의 배양에 적절함을 입증할 수 있었다. 각질형성세포의 분리과정에서 혼입되는 또 다른 세포종인 melanocyte는 숫적으로 볼 때 각질형성세포의 1/36 정도이며 분열능력도 낮을 뿐만 아니라 세포의 형태가 현미경 관찰로 각질형성세포와 확연히 구분 (Weiss와 Greep, 1977)되기 때문에 별 문제가 되지 않았다. 또한 각질형성세포 배양시 미생물에 의한 오염이 그 빈도가 클 뿐만 아니라 박테리아 등의 오염원도 다양해서 큰 문제로 대두되었으나 본 연구에 도입한 여러가지 항생제 중에서 cefotaxime을 사용하였을 때 오염원을 제거할 수 있었기에 미생물에 의한 오염 문제도 해결할 수 있었다.

각질형성세포는 Ca^{2+} 농도에 따라 분화되거나 분열능력을 보유하거나 하는데 Ca^{2+} 농도가 1 mM 이상일 때는 분화과정으로 진입하지만 1 mM 이하에서는 분열능력을 그대로 보유한다고 알려져 있다 (Boyce와 Ham, 1983; Rheinwald와 Ham, 1975). 본 연구는 상처치유를 위한 피부의 증식에 미치는 기원이 각기 다른 표피성장인자와 천연물 유래의 TECA의 효과를 알아보기 위한 연구이므로 각질형성세포를 배양할 때 각질형성세포가 분열능력을 보유할 수 있는 Ca^{2+} 농도조건인 0.03~0.1 mM 사이를 유지하는 배양액을 사용하였다.

현미경 관찰 소견에 의하면 각질형성세포는 방추모양의 섬유아세포와는 달리 질락을 이루어나가면서 pavement-유사형태 (paving stone appearance)로 분열증식하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 개개의 각질형성세포의 형태는 다각형 (polygonal)이었으며 세포와 세포사이의 간격이 뚜렷함을 관찰할 수 있었다.

각질형성세포의 분열 및 증식에 미치는 2종의 표피성장인자 (LEGF, HEGF) 및 TECA의 효과를 알아보기 위하여 이미 표피성장인자로 그 효능이 인정되어 판매되고 있는, 웅성마우스 하악선에서 분리된 분자량 6,045의 polypeptide인 SEGFG를 양성대조물질로 본 연구에 도입하였다. 최근에는 각질형성세포성장인자 (Keratinocyte Growth Factor, KGF)를 사용하였을 때 각질형성세포의 분열능력이 더 증가된다는 보고 (Wille 등, 1984)가 있으나 본 연구에서는 SEGFG는 상피세포 뿐만 아니라 섬유아세포 및 다른 몇 종의 세포에 대하여서도 분열능력을 갖는다고 알려져 있기에 (Cohen, 1962; Cohen, 1965; Carpenter와 Cohen, 1979) SEGFG를 대조물질로 채택하였다.

SEGFG는 10 ng/ml에서 최대로 각질형성세포의 증식을 유도하였으며 (Fig. 1) 이러한 결과는 다른 연구자의 결과 (Rheinwald와 Green, 1975; Marchese, 1990; Wille 등 1984)와 일치함을 확인할 수 있었다.

임마노에서 분리한 2종의 urogastrone은 당단백질로 현재 EGF로 통용되고 있으므로 각질형성세포의 증식에

미치는 효과가 기대되어 그 효과를 알아보았을 때 LEGF 및 HEGFG가 각각 SEGFG와 마찬가지로 10 ng/ml에서 최대의 각질형성세포 증식 효과를 나타내었으며, SEGFG 10 ng/ml에 대하여 LEGFG는 64.2%, HEGFG는 59.1%이었다 (Fig. 1). 임마노 기원의 LEGFG, HEGFG는 분리, 정제 과정에서 분자량의 차이에 따라 구분된 것이나 양자의 각질형성세포 증식에 미치는 효과에는 유의성 있는 차이가 없었다.

현재 상처치유제로 사용되고 있는 *Centella asiatica*의 추출물도 각질형성세포 증식효과를 나타내었으나 LEGFG나 HEGFG와 병용 투여하였을 때 그 효과는 크게 증진됨을 알 수 있었다 (Fig. 2, 4).

또한 LEGFG 10 ng/ml과 HEGFG 10 ng/ml를 TECA 100 μ g/ml와 병용 투여하면 각질형성세포 증식효과는 대조군으로 사용한 SEGFG 10 ng/ml 효과의 96.0%에 해당하여 SEGFG와 거의 같은 정도의 효과를 나타내므로 각질형성세포의 증식에 있어 이들을 SEGFG를 대체하여 사용하는 방안도 생각할 수 있겠다 (Fig. 2, 4).

현미경 관찰 소견에 의한 표피성장인자나 TECA의 각질형성세포 증식 효과를 뒷받침하기 위하여 배양하고 있는 세포의 수를 측정함과 동시에 각질형성세포의 DNA 양을 정량하였다. 배양중인 각질형성세포에 LEGFG 10 ng/ml, HEGFG 10 ng/ml 및 TECA 100 μ g/ml를 병용 투여한 경우 세포내의 DNA량은 대조군의 3.2배이었으며 (Fig. 4) 이는 세포수를 측정하여 대조군과 비교하였을 때의 값인 3.3과 거의 일치하였기에 세포수를 측정함으로써 각질형성세포의 증식정도를 알아본 본 실험 결과의 타당성을 뒷받침 할 수 있었다. 본 실험 결과 당단백질인 LEGFG나 HEGFG도 시판 중인 polypeptide계 표피성장 촉진인자인 SEGFG와 마찬가지로 각질형성세포의 증식을 촉진시키는 작용을 가짐을 밝힐 수 있었으며 LEGFG, HEGFG 및 TECA를 혼용하면 SEGFG와 거의 동등한 (96%) 효과를 얻을 수 있음을 밝힐 수 있었다.

상처 치유와 관련하여 EGF를 제외한 또 다른 내인성 물질들의 각질형성세포에 대한 작용이나 천연물 기원의 활성물질과의 상관관계는 본 연구에서는 다루지 않았으나 차후에 수행되어야 할 과제로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 동국제약 주식회사에서 지원한 과학재단의 중간핵심과제연구로 이루어졌기에 이에 감사드립니다. 또한 실험에 필요한 재료를 제공하여 주신 박산부인과 박 광선 박사님과 실험의 구체적인 내용에 조언을 아끼지 않은 경희대학교 의과대학 박 재경 선생님께도 감사드립니다.

참고문헌

Boiteau, P., Buzas, A., Lederer, E. and Polonsky, J. (1949)

- Sur la constitution chimique de l'asiaticoside, 'heteroside' naturel utilise contre la lepre. *Bull. Ste. Chim. Biol.*, **31**, 46-51.
- Boyce, S. T. and Ham, R. G. (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol., (suppl)*, **81**, 33s-40s.
- Carpenter, G. and Cohen, S. (1979) Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 193-216.
- Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555-1562.
- Cohen, S. (1965) The stimulating of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev. Biol.*, **12**, 394-407.
- Fitzpatrick, T. B., Bernhard, J. D. and Soter, N. A. (1987) Correlation of pathophysiology of skin. In *Dermatology in general medicine*, p. 69. McGraw Hill Inc., NY.
- Holbrook, K. A. and Wolff, K. (1987) The structure and development of skin. In *Dermatology in general medicine*, p. 93. McGraw Hill Inc., NY.
- Green, H. and Todaro, G. J. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.*, **17**, 299-313.
- Kano-Sueoka, T., Cohen, D. M., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Mori, M. and Fujiki, H. (1979) Phosphoethanolamine as a growth factor of a mammary carcino cell line of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5741-5744.
- Kano-Sueoka, T. and Errick, J. E. (1981) Effects of phosphoethanolamine and ethanolamine on growth of mammary carcinoma cells in culture. *Exp. Cell Res.*, **136**, 137-145.
- Labarca, C. and Paigen, K. (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Chem.*, **102**, 344-352.
- Marchese, C., Rubin, J., Ron, D., Faggioni, A., Torrisi, M. R., Messina, A., Frati, L. and Aaronson, A. (1990) Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation response distinguishes KGF from EGF family. *J. Cell Physiol.* **144**, 326-332.
- Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, **6**, 331-343.
- Tsao, M. C., Walthall, B. J. and Ham, R. G. (1982) Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cellular Physiol.*, **110**, 219-229.
- Weiss, L. and Greep R. O., (1977) *Histology*, p. 595, McGraw Hill Inc., NY. Wille Jr, J., Pittelkow, M. R., Shipley, G. D. and Scott, R. E. (1984) Intergrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium; Clonal analysis growth kinetics and cell cycle studies. *J. Cell Physiol.* **121**, 31-44.