

천궁으로부터 분리된 ferulic acid의 히알루론산 생성에 미치는 효과

송혜진[†] · 진무현 · 이상화

(주) LG생활건강 기술연구원
(2013년 6월 25일 접수, 2013년 7월 11일 수정, 2013년 7월 31일 채택)

Effect of Ferulic Acid Isolated from *Cnidium Officinale* on the Synthesis of Hyaluronic Acid

Hye Jin Song[†], Mu Hyun Jin, and Sang Hwa Lee

R&D Center, LG Household & Healthcare, Ltd., 84 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea
(Received June 25, 2013; Revised July 11, 2013; Accepted July 31, 2013)

요약: 히알루론산(HA)은 피부의 세포외기질을 구성하는 주성분이다. 인간의 피부에서 히알루론산의 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되어 있으며, 이것은 노화에 따른 피부 수분 감소, 주름 형성 및 피부 탄력 저하에 관여한다고 알려져 있다. 지금까지 밝혀진 히알루론산 합성효소(hyaluronan synthase, HAS)들 중에 HAS-2가 사람의 피부 섬유아세포에서의 히알루론산의 합성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 천궁으로부터 분리된 ferulic acid가 사람의 피부 유래 섬유아세포에서 히알루론산의 생성에 미치는 효과를 확인하였다. Semi-quantitative RT-PCR과 quantitative real-time PCR을 통해 ferulic acid가 HAS-2의 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며 ELISA assay를 통해 ferulic acid가 히알루론산의 생성을 증가시키는 것을 확인하였다. 결론적으로 본 연구를 통해 ferulic acid는 피부 노화에 따른 히알루론산의 감소에 의해 나타나는 건조, 주름 및 탄력 저하와 같은 현상을 개선시킬 가능성을 가진 물질임을 확인하였다.

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is one of the major extracellular matrix components in skin. The HA content is reported to decline with age, which may contribute to decrease in skin moisture, wrinkle formation and the decrease in elasticity of the skin. Among the family of HA synthase genes (HAS-1, 2, 3) identified so far, HAS-2 plays crucial roles in the regulation of HA synthesis in human skin fibroblasts. In this study, we elucidated the effects of ferulic acid isolated from *Cnidium officinale* on HA production. Semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR showed that ferulic acid increased mRNA level of HAS-2 gene and ELISA assay also revealed that ferulic acid increased HA production in human skin fibroblasts. Our study suggests that ferulic acid might prevent age-dependent skin deteriorations such as wrinkles, dryness and elasticity decrease, all of which could be ascribed to the reduction of the HA content in human skin.

Keywords: skin, hyaluronic acid, *Cnidium officinale*, ferulic acid, HAS-2

1. 서 론

피부는 크고 복잡한 조직으로써 외부의 자극이나 외부 균의 침입을 막고 체온을 조절하고 수분을 유지하는 등의 다양한 범위의 기능을 수행한다. 피부는 표

피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있는데 표피는 외부 자극으로부터 피부를 보호하는 역할과 체온조절 및 수분 유지 작용을 주로 한다. 진피는 표피 아래에 있는 조직으로 이루어지는 조직으로 세포외기질(extracellular matrix)이라 불리는 거대 분자의 망상 구조에 의해 채워져 있다. 세포외기질은 피부 탄력성, 신진대

[†] 주 저자 (e-mail: hjjudy@lgcare.com)

사, 유연성 등에 직접적으로 관여하고 있다[1-3].

피부의 노화는 내인성 및 외인성 기전이 복합적으로 작용하여 피부의 구조기능적 혹은 생화학적 변화를 초래하는데, 그중 가장 대표적인 노화의 현상은 주름 및 탄력 감소이다. 피부의 탄력성 감소와 주름의 증가는 진피 내 세포외기질의 주요 성분인 교원섬유(콜라겐, collagen), 탄력섬유(엘라스틴, elastin), 점액다당체(mucopolysaccharide, glycosaminoglycan) 등의 변성과 깊은 관계가 있다고 보고되어 있다[3-5].

글라이코사미노글라이칸(GAG)은 생체 내에서 음전하 밀도가 매우 높은 거대 분자로서 구조적으로는 중심단백질(core protein)을 골격으로 iduronic acid나 glucuronic acid와 결합되는 glucosamine, galactosamine의 이당체 쌍(disaccharide pairs) 사슬로 이루어진다. 피부의 대부분을 차지하는 GAG인 히알루론산(Hyaluronic acid, HA)은 황산기가 존재하지 않을 뿐 아니라 중심단백질을 가지고 있지 않은 자유구조로서, N-acetyl glucosamine과 glucuronic acid가 교대로 결합한 분자량이 20 - 40만에 이르는 고분자화합물이다[6-8].

세포외기질에 있어 히알루론산은 수분보유 능력을 통한 조직의 수분 유지, 세포 간 간격 유지, 세포 성장인자 및 영양성분의 저장과 확산에 관여할 뿐만 아니라 세포의 분열과 분화, 이동 등에 관여하는 것으로 보고된 바 있다[6,9].

포유류의 체내에 존재하는 히알루론산의 50% 이상이 피부, 특히 표피의 세포 간 간격과 진피의 세포외기질에 분포한다고 보고되었고, 이러한 히알루론산은 주로 각질형성세포와 섬유아세포에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다[7-9].

히알루론산의 양은 노화와 함께 감소한다고 알려져 있는데[7,10], 나이에 따른 피부 내 히알루론산 양의 감소는 피부에서의 주름 발생이나 피부의 탄력 감소 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다. 따라서 히알루론산의 합성이나 분해를 조절하는 화합물은 피부 항노화 기능을 가질 가능성이 기대되고 있다[11-14].

피부세포 배양상태에서 히알루론산의 합성은 transforming growth factor β (TGF- β), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF)와 같은 성장인자, retinoic acid (RA) 등에 의해 증가된다는 보고와 피부에

도포된 여성호르몬(estradiol) 및 그 유사물질이 히알루론산의 합성을 증가시킨다는 보고가 있었으나[14-17] 히알루론산의 대사에 대한 자세한 기작은 아직까지 밝혀지지 않았다. 단지 히알루론산의 합성은 히알루론산의 합성효소(Hyaluronic acid synthase, HAS)에 의해 진행되며, 합성되는 동안 세포외기질에 축적되는 것으로 알려졌다[18,19].

지금까지 알려진 히알루론산 합성효소의 유전자는 서열상의 유사성이 높은 HAS-1, HAS-2, HAS-3의 세 가지 형태가 보고되었다. 이 중에서 HAS-2와 HAS-3가 각각 섬유아세포와 각질형성세포에서 히알루론산 합성에 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으며 이러한 히알루론산 합성 효소의 양을 증가시킴으로써 히알루론산의 합성을 촉진하고자 하는 연구가 이루어지고 있다[18-21].

우리는 본 연구에서 HAS-2 촉진 물질을 천연물로부터 확인하고자, 300여 종의 약용식물의 70% 메탄올 추출물을 대상으로 스크리닝(screening)을 실시하였고, 이 중 추출물 수준에서 효과가 가장 우수하였던 천궁을 연구대상 식물로 선정하여 유효성분인 ferulic acid를 분리 정제하였다.

천궁(*Cnidium officinale*)은 다년생 산형과 식물에 속하는 약용식물로서 오래전부터 아시아에서, 특히 한국과 중국에서 약용으로 이용되어 왔다[22,23]. 천궁은 천궁만의 독특한 동양적 맛과 풍부한 휘발성 성분을 지닌 것이 특징적이다[24]. 천궁은 다양한 질병에 민간요법으로 사용되었는데 특히 여성 생식기의 염증성 질병에 주로 사용되어졌다. 이 외에도 천궁은 항균 효과 및 중추신경계의 진정작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 한방에서는 기를 순환시키고 혈액순환을 촉진시키며 통증을 완화시켜주는 약재로 사용된다[24,25]. 주요 성분으로는 ferulic acid, trimethylamine, perloyrine, senkyunolide 등이 알려져 있다. 천궁으로부터 분리한 ferulic acid는 페놀류의 화합물이며[26] 식물의 세포벽을 형성하는 리그닌의 전구체로서 ferulic acid는 슈퍼옥사이드 이온(superoxid anion), 산화질소(nitric oxide), 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical)과 같은 활성산소를 중화시키는 항산화 작용을 하며 특히 세포에 있어서 지질의 산화를 억제하는 작용이 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 또한 혈당 강하 및 콜레스테롤 저하 효과도 있다고 알려져 있다[27-30]. 최

근 피부 세포에서는 ferulic acid가 항산화 작용을 통해 광노화에 예방적인 효과를 갖는 것으로 보고되고 있는데 피부 세포에서 ferulic acid 처리로 인해 UV에 의해 유도되는 MMP의 활성을 억제한다[31]. 또한 ferulic acid는 상처회복 기전에도 관여하는 것으로 보고되고 있는데 ferulic acid의 처리로 인해 상처의 재상피화(reepithelization) 과정 및 신생 혈관 형성(angiogenesis) 등 상처회복이 일어나는 과정에 관여하여 상처 회복을 촉진시킨다고 한다[32,33].

우리는 본 연구에서 천궁으로부터 분리 정제한 ferulic acid가 HAS-2 mRNA 발현 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, ferulic acid가 결과적으로 피부 섬유아세포에서 히알루론산의 생성을 증가시키는지 조사하여 ferulic acid가 히알루론산 합성 촉진을 통한 피부 노화 방지 및 개선을 위한 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 시약 및 기기

서울 경동시장에서 천궁(*C. officinale*)을 구입하여 사용하였다. Open column chromatography를 위해 RP C1 column (Shiseido C1 DM1020, 200 μ m, Japan)을 TLC 분석을 위해 silica gel 60F254 (Merck, Germany), Prep-HPLC (Shimadzu Prominence LC8A, Japan)을 위해 Prevail RP C18 column (Alltech, 10 mm \times 250 mm, USA)을 각각 사용하였다. 구조분석을 위해 Auto Spec mass spectrometer (Micromass, UK)를 사용하였다. 사람 피부 섬유아세포는 건강한 사람의 표피로부터 배양된 것으로 충남 의과대학교 피부과로부터 제공받았으며, 세포 배양을 위해서 사용한 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 Invitrogen사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정에는 BioTek사의 PowerWave XS microplate reader (BioTek, USA)를 사용하여 측정하였다. 히알루론산의 정량을 위해 사용한 Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit는 Echelon Bioscience (Salt Lake, UK)사에서 구입하여 사용하였다.

2.2. Ferulic acid 분리

경동시장에서 구입한 건조 천궁(*C. officinale*)을 세

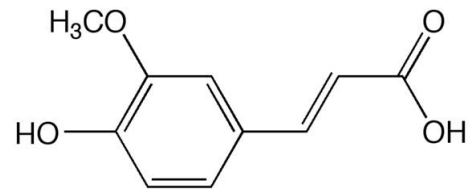


Figure 1. The chemical structure of ferulic acid.

절한 1 kg을 70% 메탄올 10 L를 가하여 70 $^{\circ}$ C에서 추출하고 여과하여 추출액을 얻고 감압 농축하여 천궁 70% 메탄올 추출물을 얻었다. 추출물을 3 L의 물에 현탁하고 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 실시하였다. 현탁된 추출물을 n-Hexane으로 먼저 추출하고 난 후 물 층을 다시 Chloroform (CHCl_3), Ethyl acetate (EtOAc), n-Butyl alcohol (n-BuOH)로 순차적으로 추출하였다. 각 용매 추출 분획 중 가장 높은 HAS-2 mRNA 발현 증가 효과를 보인 EtOAc 분획을 silica gel column상에서 CHCl_3 : MeOH 40 : 1에서 시작하여 2 : 1의 혼합용매까지 극성을 올리면서 용출시켜 8개(CO-EA-SC1 ~ SC8)의 분획으로 나누었다. 이 중 SC1 분획에 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography (80% MeOH)를 수행하여 주요 성분 분획을 얻었다. 얻은 성분 분획은 순상 Prep-HPLC (Toluene : EtOAc 60 : 1)를 수행하여 고순도의 화합물 1을 얻었다. 화합물 1은 백색의 침상결정으로써 녹는점 175~177 $^{\circ}$ C, 분자량은 194임을 용점측정기와 Mass spectrometer로 확인하였으며, Sigma에서 구입한 ferulic acid와 TLC 및 HPLC Co-injection을 통하여 동일한 물질임을 확인하였다. ferulic acid의 화학적 구조는 Figure 1에 나타내었다.

2.3. 세포 배양

사람의 피부 유래 섬유아세포를 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 50 U/mL, streptomycin 50 μ g/mL를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 5%의 CO_2 , 37 $^{\circ}$ C 조건에서 배양하였다.

2.4. RNA 분리 및 semi-quantitative RT-PCR

사람 피부 섬유아세포 3×10^5 개를 6-well plate에 분주하여 24 h 배양한 후에 serum-free 배지로 교환하여 또다시 24 h 동안 배양하였는데, 여기에 여러 농도(2, 5, 10 μ g/mL)의 천궁 분획 또는 ferulic acid가 포함되

도록 하였다.

이렇게 처리한 세포들에서 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 정량하여 1 µg의 RNA를 GeneAmp[®] RNA PCR kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 역전사 반응은 Mycycler[®] PCR 기기 (Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA는 HAS-2 및 GAPDH 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 통해 증폭하였다. HAS-2 및 GAPDH의 PCR 수행을 위한 프라이머 서열은 다음과 같다. HAS-2 (sense primer : 5'-CCT TGG AAT CAC AGC TGC TT-3', Anti-sense primer : 5'-GGA CCC TTT TCG TGG ACG TT-3'); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer : 5'-CTG ATG CCC CCA TGT TCG T-3'; anti-sense primer : 5'-TGT GAG GGG AGA TTC A-3'). 모든 프라이머는 Bionner (Korea)에서 주문 제작하였다. 반응 조건은 94 °C에서 10 min 배양 후, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s를 25 cycles 반복하고, 마지막에 72 °C에서 7 min 동안 배양하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로스 젤에 전기영동하고 이를 Fluoro-S Multimeter (Biorad, USA)를 이용하여 분석하였다. 발현량의 변화는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다.

2.5. Quantitative real-time PCR

2.4에서 합성된 cDNA를 이용하여 quantitative real time PCR 역시 수행하였다. 합성된 cDNA는 한 반응당 300 ng을 사용하였고, iTaq[™] Fast SYBR[®] Green Supermix with ROX (Biorad, USA)와 유전자 특이적인 프라이머를 사용하여 quantitative real time PCR을 수행하였다. Real time PCR은 Rotor Gene 2000 PCR machine (RG2072M, Corbett Research, Cambridge, UK)를 이용하여 수행하였다. Quantitative real time PCR에 사용된 프라이머는 semi-quantitative RT-PCR에서 사용된 프라이머와 같다. Real time PCR을 통해 얻은 실험 결과는 housekeeping 유전자인 GAPDH를 기준으로 $\Delta\Delta Ct$ 방법으로 계산하여 나타내었다.

2.6 히알루론산 정량

사람 피부 섬유아세포를 24-well plate에 2×10^4 개/well로 분주하여 배양하였다. 24 h 후 세포들을 se-

rum-free 배지로 2번 세척하여 세포가 자라는 동안 축적된 히알루론산을 완전히 배제하였다. 그 후엔 ferulic acid를 농도별(2, 5, 10 µg/mL)로 녹인 serum-free 배지 용액으로 교환하고 24 h 동안 배양하였다. 배양액으로부터 새로 생성된 히알루론산은 ELISA kit를 이용해 정량하였다. 실험은 각 농도에 대하여 3회 반복 수행하였으며 얻어진 값은 평균과 표준 편차를 구하여 통계적 유의성을 검증하였다.

2.7. 통계적 분석

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, Student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 천궁 분획물의 HAS-2 mRNA 발현량 변화 측정

우리는 서론에서 서술했듯이, HAS-2의 mRNA 발현을 증가시키는 천연물을 스크리닝하기 위해 300여 종의 천연물을 대상으로 HAS-2에 대한 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였고, 그 결과 천궁이 HAS-2의 mRNA 발현량을 증가시키는 가장 우수한 천연물로 선정되었다. 그리고 이 천궁 추출물의 어떠한 분획물에서 HAS-2의 mRNA의 발현량을 증가시키는지 알아보기 위하여, 사람 섬유아세포를 24 h 배양한 후 다시 천궁 메탄올 추출물과 그 분획물인 CHCl₃ 분획, EtOAc 분획, BuOH 분획, water 분획을 2, 5, 10 µg/mL의 농도로 serum-free 배지에 희석하여 24 h 처리한 뒤 RT-PCR을 사용하여 HAS-2 mRNA 발현량을 측정하였다. 발현 변화율은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다. 이때, 처리한 천궁 메탄올 추출물과 4가지 분획물의 농도는 사람 피부 섬유아세포에서 24 h 동안 처리한 뒤 MTT를 실시하여 세포 생존에 영향을 주지 않는 농도임을 확인하였다 (data not shown). Table 1에서 보는 바와 같이, 음성 대조군 대비 EtOAc 분획물과 water 분획물에서 HAS-2 mRNA 발현 증가를 보였고, 그중에서 EtOAc 분획물이 2, 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 음성 대조군 대비 127, 180, 193%의 증가를 보여 양성 대조군으로 사용된 retinoic acid보다도 높은 HAS-2 mRNA 발현 증가율을 보였다. 이 실험결과를 통해 EtOAc 분획물이 가

Table 1. Effect of *C. officinale* Extract on the HAS-2 mRNA Level in Human Fibroblast Cells

	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Rate of increase (% of control)
Retinoic acid	10^{-6} M	126
MeOH extract	2	159
	5	162
	10	169
CHCl ₃ layer	2	118
	5	93
	10	112
EtOAc layer	2	127
	5	180
	10	193
BuOH layer	2	101
	5	93
	10	105
Water layer	2	119
	5	128
	10	100

Cells were incubated in serum-free medium for 24 h with various *Cnidium officinale* layers (2, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and all trans-retinol (10^{-6} M). After extraction of total RNA, the expression of HAS-2 mRNA was measured by semi-quantitative RT-PCR. The expression of GAPDH was used as a control. Four different layers are shown

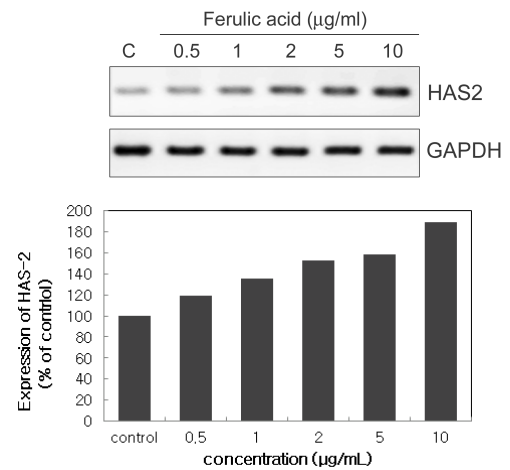
장 우수한 HAS2 mRNA 발현 증가 효능을 보인 분획물임을 알 수 있었다.

3.2. Ferulic acid의 분리

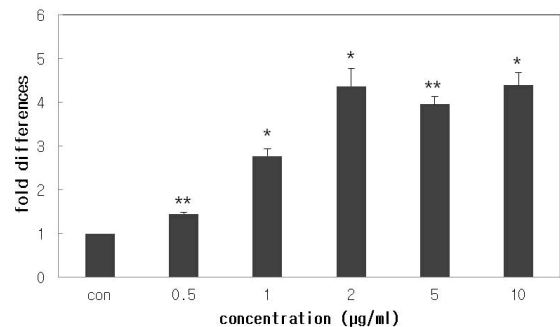
천궁 메탄올 추출물의 4가지 분획물 중에서 가장 HAS-2 mRNA 증가 효능이 높은 EtOAc 분획물을 HPLC를 통하여 대략적인 성분들을 확인하고 많은 양을 차지하는 피크를 선별하여 분리, 정제하였다. 이렇게 얻어진 ferulic acid를 이후 HAS-2 mRNA 발현 변화 및 히알루론산 정량 실험에 사용하였다.

3.3. Ferulic acid의 HAS-2 mRNA 발현 증가 효과

우리는 천궁의 EtOAc 분획물로부터 분리 정제된 ferulic acid가 HAS-2 mRNA 발현을 증가시키는지 확인하기 위해서 사람 피부 섬유아세포를 이용하여 먼



(a)



(b)

Figure 2. Effect of ferulic acid on the expression of HAS-2 mRNA. (a) Human fibroblast cells were treated with the indicated concentrations of ferulic acid for 24 h. Total RNA was extracted and reversely transcribed. The cDNAs of HAS-2 and GAPDH, an internal control, were amplified with 25 PCR cycles. (b) Further confirmation of semi-quantitative RT-PCR data by real-time PCR. Total RNA was extracted and subjected to real time PCR analysis with GAPDH as internal control. The expression level of mRNA HAS-2 in the control was designated as 1.0. Results are the means \pm S. D. of three samples. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

저 semi-quantitative RT-PCR을 실시하였다. Ferulic acid를 5개의 농도(0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하였고, 이 농도로 세포에서 24 h 동안 처리한 후 MTT assay를 실시하여 세포 생존에 영향을 주지 않는 농도임을 확인하였다(data not shown). 각각의 농도에서 ferulic acid를 24 h 처리한 후 RNA를 추출하고 cDNA를 만들어 RT-PCR를 실시한 후 전기영동하여 image analy-

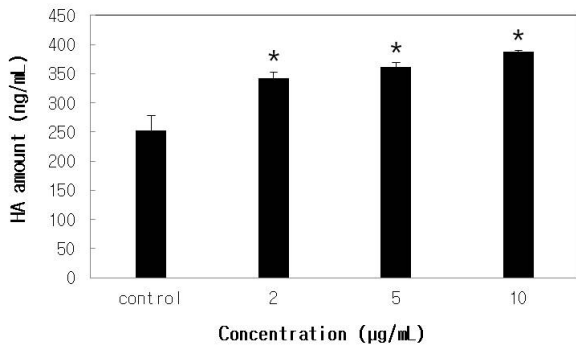


Figure 3. Effect of ferulic acid on the amount of HA released by human fibroblast cells. Human Fibroblast cells were grown to high density and washed with serum-free medium to completely remove HA accumulated during cell growth. Subsequently, cells were treated with the indicated concentrations of ferulic acid for 24 h. At the end of incubation, the supernatants were analyzed for the presence of HA using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Data are shown as the means \pm S. D. of three samples. (* $P < 0.05$)

sis system으로 정량하고 발현률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다. Figure 2(a)에서 보는 바와 같이, 음성 대조군 대비 ferulic acid를 처리한 실험군에서 농도가 증가함에 따라 HAS-2의 mRNA 발현량이 증가하였다. Ferulic acid를 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리했을 때, 각각 음성 대조군 대비 19.55, 35.19, 53.15, 88.76%의 HAS-2 mRNA 발현량이 증가하였다. 이 결과를 다시 한 번 확인하기 위해서 quantitative real-time PCR를 수행하였으며, $\Delta\Delta\text{Ct}$ 법을 이용하여 HAS-2 mRNA 발현량을 계산하였다. 또한, 음성 대조군의 HAS-2 mRNA 발현량을 1.0으로 기준하여 ferulic acid 처리 실험군의 HAS-2 mRNA 발현량을 수치화하여 나타내었다. 그 결과 Figure 2(b)에서 보는 바와 같이, 음성 대조군 대비 ferulic acid를 처리한 실험군에서 HAS-2 mRNA의 발현량이 유의미하게 증가하였다. Ferulic acid를 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리했을 때, 각각 1.5, 2.8, 4.4, 4.0, 4.4 배만큼 HAS-2 mRNA 발현량이 증가한다는 것을 알 수 있었다.

3.4. 히알루론산 생성 촉진 효과

HAS-2는 섬유아세포에서 히알루론산을 생합성하는데 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다[18-21].

따라서 우리는 ferulic acid를 처리하여 HAS-2 mRNA 발현량이 증가된 섬유아세포군에서 히알루론산의 생성 역시 증가되는지를 알아보기 위해 ferulic acid를 사람 피부 섬유아세포에 처리한 후 히알루론산에 대한 ELISA assay를 실시하였다. 사람 피부 섬유아세포에 ferulic acid를 각각 2, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24 h 동안 처리한 후에 그 배양액에서 히알루론산에 대한 ELISA assay를 시행하였다. 그 결과, Figure 3에서 알 수 있듯이, ferulic acid를 처리한 실험군에서 음성 대조군에 비해 히알루론산의 양이 유의미하게 증가하였다. 아무것도 처리하지 않은 음성대조군에서 분비된 히알루론산의 양은 252.4 ng/mL (STD 26.4)이었고, ferulic acid를 처리한 실험군에서 분비된 히알루론산의 양은 2, 5, 10 mL에서 각각 342.9 (STD 10.1), 361.2 (STD 8.1), 387.5 (STD 2.2) ng/mL로 나타났다. 이 결과는 HAS-2 mRNA에 대한 semi-quantitative RT-PCR 실험 결과와 유사하며, ferulic acid에는 HAS-2 mRNA의 발현을 증가시킬 뿐 아니라 히알루론산의 생성 역시 촉진시킬 수 있다는 것을 시사한다.

4. 결 론

히알루론산은 진피의 세포외기질을 채우고 있는 주요 성분 중에 하나이다. 히알루론산은 피부에서 수분을 유지해주고 세포 사이의 공간을 채워주어 피부의 보습과 탄력을 유지시켜주는 역할을 한다. 피부에서 히알루론산의 양은 노화에 따라 감소하는데 이러한 감소가 피부 건조, 탄력 저하나 주름 형성에 있어 한 요인으로 간주되고 있다. 히알루론산은 히알루론산 합성효소인 HAS에 의해 생합성된다. 진피에서는 HAS-2가 히알루론산 합성 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[19]. 따라서 우리는 이 연구를 통해 사람 섬유아세포에서 HAS-2의 발현량을 증가시켜 결과적으로 히알루론산의 분비를 증가시키는 성분을 찾고자 하였다. 그 결과 천궁(*C. officinale*)으로부터 분리, 정제된 ferulic acid가 사람 섬유아세포에서 HAS-2의 mRNA 발현량을 증가시키고, 히알루론산의 생성 역시 촉진시키는 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 ferulic acid가 노화에 따른 히알루론산의 감소에 의해 나타나는 건조, 주름 및 탄력 저하와 같은 현상을 개선시킬 수 화장품 소재로서의 개발될 수 있는 가능성

을 확인하였다.

Reference

1. J. H. Chung, Photoaging in asians, *Photodermatol. photoimmunol photomed.*, **19**, 109 (2003).
2. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanism of photoaging and chronological skin aging, *Arch Dermatol.*, **138**, 1462 (2002).
3. P. U. Giacomoni and G. Rein, Factors of skin ageing share common mechanisms, *Biogerontology*, **2**, 219 (2001).
4. M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol.*, **11**, 398 (2002).
5. D. A. Carriono, A. Calabro, A. B. Darr, M. T. Dours-Zimmermann, J. D. Sandy, D. R. Zimmermann, J. M. Sorrell, V. C. Hascall, and A. I. Caplan, Age-related differences in human skin proteoglycans, *Glycobiology*, **21**, 257 (2011).
6. S. I. Lamberg and A. C. Stoolmiller, Glycosaminoglycans, *J. Invest Dermatol.*, **63**, 433 (1974).
7. I. Ghersetich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
8. S. Sakai, T. Sayo, S. Kodama, and S. Inoue, N-Methyl-L-Serine stimulates hyaluronan production in human skin fibroblasts, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **12**, 276 (1999).
9. R. Tammi, J. A. Ripellino, R. U. Margolis, and M. Tammi, Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycans as a specific probe, *J. Invest Dermatol.*, **90**, 412 (1988).
10. W. Manuskiatti and H. I. Maibach, Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging, *Int. J. Dermatol.*, **35**, 539 (1996).
11. K. Fukuda, M. Takayama, M. Ueno, M. Oh, S. Asada, F. Kumano, and S. Tanaka, Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes, *Inflamm. Res.*, **46**, 114 (1997).
12. R. Fleischmajer, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glycosaminoglycans and aging, *Biochim. Biophys. Acta.*, **279**, 265 (1972).
13. M. O. Longas, C. S. Russel, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**, 127 (1987).
14. H. Akiyama, M. Saito, G. Qiu, T. Toida, and T. Imanari, Analytical studies on hyaluronic acid synthesis by normal human epidermal keratinocytes cultured in a serum-free medium, *Biol. Pharm Bull.*, **17**, 361 (1994).
15. I. A. King, Increased epidermal hyaluronic acid synthesis caused by four retinoids, *Br. J. Dermatol.*, **110**, 607 (1984).
16. R. Tammi, C. T. Jansen, and M. Tammi, Effects of retinoic acid on adult human epidermis in whole skin organ culture, *Arch. Dermatol. Res.*, **277**, 276 (1985).
17. R. Tammi, J. A. Ripellino, R. U. Margolis, H. I. Maibach, and M. Tammi, Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture, *J. Invest Dermatol.*, **92**, 326 (1989).
18. S. Karvinen, S. Pasonen-Seppanen, J. M. Hyttinen, J. P. Pienimaki, K. Toronen, T. A. Jokela, M. I. Tammi, and R. Tammi, Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthase 2 and 3, *J. Biol. Chem.*, **278** (49), 49495 (2003).
19. S. Kim, B. Y. Kang, S. Y. Cho, D. S. Sung, H. K. Chang, M. H. Yeom, D. H. Kim, Y. C. Sim, and Y. S. Lee, Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **316**, 348 (2004).
20. T. Sayo, Y. Sugiyama, Y. Takahashi, N. Ozawa, S.

- Sakai, O. Ishikawa, M. Tamura, and S. Inoue, Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes, *J. Invest Dermatol.*, **118**, 43 (2002).
21. S. H. Kim, G. W. Nam, H. K. Lee, S. J. Moon, and I. S. Chang, The effects of Musk T on peroxisome proliferator-activated receptor[PPAR]-alpha activation, epidermal skin homeostasis and dermal hyaluronic acid synthesis, *Arch. Dermatol. Res.*, **298**, 273 (2006).
 22. C. B. Lee, Encyclopedia of Korean Plants, 583, Hyang Mun Sa, Seoul, Korea (1985).
 23. H. Mitsuhashi, Illustrated medicinal plants of the world in colour, 358, Hokuryukan, Tokyo, Japan (1998).
 24. S. K. Cho, O. I. Kwon, and C. J. Kim, Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Extracts and Fractions of Cnidii Rhizoma, *Kor. J. Pharmacogn.*, **27**, 282 (1996).
 25. S. Y. Lee, M. J. Kim, D. S. Yim, K. J. Chi, and H. S. Kim, Phthalide Content of Cnidium Rhizome, *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**, 69 (1990).
 26. S. Y. Lee and H. J. Chi, Cheical Components of Korean Chidii Rhizoma, Chemical components of the aireal part, *Kor. J. Pharmacogn.*, **16**, 42 (1985).
 27. Q. D. Liang, Y. Gao, H. L. Tan, P. Guo, Y. F. Li, Z. Zhou, W. Tan, Z. C. Ma, B. P. Ma, and S. Q. Wang, Effects of four Si-Wu-Tang's constituents and their combination on irradiated mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1378 (2006).
 28. M. Srinivasan, A. R. Sudheer, and V. P. Menon, Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **40**, 92 (2007).
 29. D. K. Maurya, V. P. Salvi, and C. K. Nair, Radiation protection of DNA by ferulic acid under *in vitro* and *in vivo* conditions, *Mol. Cell. Biochem.*, **280**, 209 (2005).
 30. M. Srinivasan, A. R. Sudheer, K. R. Pillai, P. R. Kumar, P. R. Sudhakaran, and V. P. Menon, Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes, *Toxicology*, **228**, 249 (2006).
 31. V. Staniforth, W. C. Huang, K. Aravindaram, and N. S. Yang, Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms, *J. Nutr. Biochem.*, **23**, 443 (2012).
 32. M. M. Ghaisas, S. B. Kshirsagar, and R. S. Sahane, Evaluation of wound healing activity of ferulic acid in diabetic rats, *Int Wound J.*, doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01119.x. (2012).
 33. C. M. Lin, J. H. Chiu, I. H. Wu, B. W. Wang, C. M. Pan, and Y. H. Chen, Ferulic acid augments angiogenesis via VEGF, PDGF and HIF-1 alpha, *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 627 (2010).