

The Effects of the Fruits of *Foeniculum vulgare* on Skin Barrier Function and Hyaluronic Acid Production in HaCaT Keratinocytes

Hak Yin Yu¹, In Jun Yang¹, V.R Lincha¹, In Sik Park², Dong-Ung Lee³ and Heung Mook Shin^{1,4*}

¹Department of Physiology, College of Korean Medicine Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

²Department of Anatomy, College of Korean Medicine Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

³Division of Bioscience, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

⁴Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Kyungsan 712-260, Korea

Received June 29, 2015 / Revised August 12, 2015 / Accepted August 13, 2015

Foeniculum vulgare (FV) has long been used in traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases. In addition, it is usually known as an important medicinal and aromatic plant widely used as a carminative, digestive, lactagogue, and diuretic, and for treating respiratory and gastrointestinal disorders. The skin barrier protects against the invasion of pathogens, fends off chemical and physical assaults, and protects against extensive water loss. In this study, the effects of solvent-fractionated FV fruits on strengthening the skin barrier and maintaining moisture, as well as their antifungal activity, were investigated in human keratinocyte (HaCaT) cells. The expression of involucrin, loricrin, filaggrin, hyaluronic acid synthase, human β defensin, and cathelicidin genes and proteins was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting. The production of hyaluronic acid was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The butanol fraction increased the expression of involucrin and filaggrin. Both the ethyl acetate and the butanol fractions increased hyaluronic acid production by promoting the expression of hyaluronic acid synthase-1. Although the antimicrobial peptides were increased by FV crude extract and its fractions, the samples did not show a significant effect compared to the normal group. These results suggest that the butanol fraction of FV could be very useful in cosmetics for the treatment of dermatological diseases.

Key words : Cornified envelopment peptide, *Foeniculum vulgare*, HaCaT cell, hyaluronic acid, skin barrier function

서 론

피부는 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하조직(subcutaneous tissue, hypodermis)으로 구성된 기관으로써 수분 유지 및 병원균을 포함한 외부 감염원의 침입을 방어하는 장벽기능(barrier function)을 수행한다[13]. 주로 각질형성세포(keratinocyte)로 구성된 표피는 두께가 0.05-1.5 mm 정도 밖에 되지 않지만 낮은 투과성으로 외부 환경에서 인체를 보호하는 물리적 장벽은 물론, 체내 수분을 보호하는 보습장벽, 항균 펩타이드(antimicrobial peptide)로 구성된 화학적 장벽 등 대부분의 피부장벽기능을 수행하고 있다[34].

표피세포의 95%를 차지하는 각질형성세포는 기저층(basal layer)에서 증식(proliferation)하면서, 점차 상부인 유극층(spinous layer), 과립층(granular layer)을 거쳐 각질세포

(corneocyte)로 최종 분화(differentiation)한다[27]. 이러한 분화과정에서 각질형성세포는 납작한 모양의 핵이 없는 각질세포로 변형되고, 동시에 표피의 과립층과 유극층 상부에서 인볼루크린(involucrin) [14], 표피의 과립층과 각질층에서 로리크린(loricrin), 필라그린(filaggrin) [24, 48, 50] 등 분화를 촉진하는 인자들이 발현하여[12, 51] 각질 내 케라틴 세섬유(keratin filament)를 응집함으로써 단단하고 편평한 구조인 각질세포막(cornified cell envelope)을 형성, 피부의 강력한 물리적인 장벽과 투과장벽기능에 기여하게 된다[49]. 특히, filaggrin은 분해과정을 통해 pyrrocarboxylic acid나 trans-uronic acid 등의 천연함습인자(natural moisturizing factors)를 형성하여 피부 보습에 중요한 역할을 수행함은 물론, 각질층 pH의 정상화, 항염작용 등도 수행한다[9, 19].

피부는 filaggrin에서 유래한 천연함습인자 외에도 hyaluronic acid (HA), urea, citrate, lactate, glycerol 등의 다양한 함습인자에 의해 보습장벽 기능을 수행한다. 이중 HA는 분자량이 20-40만에 이르는 고분자화합물로서 표피의 수분 증발을 막아 피부의 탄력성을 유지할 뿐만 아니라, 영양성분의 저장과 확산, 세포 이동 등에 관여한다[11, 47]. HA는 주로 각질형성세포 및 섬유아세포(fibroblast)의 hyaluronic acid synthase (HAS)에 의해 합성되어 세포외기질에 축적된다[41]. 지금까지

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2372, Fax : +82-54-742-5441

E-mail : heungmuk@gmail.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.

알려진 HAS 유전자는 HAS-1, HAS-2, HAS-3의 세 가지 형태가 보고[6, 18]되었으며, 이들의 발현저하로 인한 보습장벽의 결함은 표피의 위축, 주름형성, 피부 수분량 감소, 탄력성 저하 등 피부노화를 일으키는 것으로 보고[29]되었다.

피부는 또한 화학적 장벽의 기능도 갖고 있다. 이러한 화학적 장벽 기능은 각질세포 간 지질의 투과 장벽 기능과 피부 표면의 낮은 산성도(pH 5.5), 각질층 내 항균 펩타이드 등에 의해 유지된다. 피부에서 분비되는 항균 펩타이드에는 디펜신(human β -defensin-1, 2, 3)과 cathelicidin, secretory leukocyte proteinase inhibitor, dermcidin, adrenomedullin 등이 있다[27]. 이러한 항균 펩타이드는 감염이나 염증반응에 의해 급격하게 증가하면서 일차적인 방어기능을 수행하고, 2차적으로 호중구, 비만세포, 단핵구 등과 같은 면역 세포를 활성화하여 면역을 증진하는 화학장벽 기능을 수행한다[36, 53]. 만성 피부질환에서 높은 세균 감염율을 보이는 것은 이러한 항균성 펩타이드의 발현의 저하와 관련 있는 것으로 보고되었다[5, 25, 39].

이처럼 피부장벽의 기능과 중요성에 대한 관심이 높아지면서 기존의 항산화기전을 중심으로 수행되어 온 피부미용소재 개발연구는 점차 피부장벽 손상의 회복 및 조절을 통한 개발 연구로 다양화되고 있는 추세이다. 최근에는 아토피피부염과 filaggrin 유전자의 변이와의 관련성이 입증되고[46], 건선 등의 만성 피부질환 또한 항균 펩타이드의 발현 저하와 관련이 있는 것으로 보고[16, 20]됨에 따라 피부질환 치료제 개발에서도 피부장벽의 항상성 유지가 중요한 관건이 되고 있다. 본 연구에서는 피부장벽기능 개선을 위해 이용 가능한 소재를 확인하는 과정에서 회향이 연구가치가 있다고 판단하였다.

회향은 미나리과에 속하는 다년생식물인 *Foeniculum vulgare* Mill. (FV)의 성숙한 과실을 건조한 것으로 주로 *Trans-anethole*, *fenchone*, *methylchavicol*, *estragole*, *limonene* 등의 성분이 함유되어 있다[35]. 한의학에서는 온중산한(溫中散寒), 이기지통(理氣止痛), 난간신(暖肝腎), 조중화위(調中和胃) 등의 효능이 있다고 하였으며, 임상에서 항염(抗炎), 진통(鎮痛), 구충(驅蟲), 이뇨(利尿), 진경(鎮靜)에 사용되어 온 약재이다[44]. 기존 연구에 의하면 회향은 손상된 간세포의 기능 회복에 효과가 있으며[29], 자연발증 고혈압 쥐의 혈압강하에 뛰어난 효과가 있고[23], 활성화된 대식세포에서 염증매개물질의 생성에 대한 억제 효과가 있음[8]을 보고하였다. 회향 추출물은 충치균에 대한 항균효과를 가지고 있으며[28], 항산화[7, 40], 항암, 항돌연변이 및 신경활성이 높고[30], 항비만 효능을 가지고 있다고 보고되었다[43]. 또한 최근에는 회향 추출물의 피부정화 및 피부건조 방지에 의한 피부노화 방지 효과[45]가 연구되기도 하여 피부질환 예방 및 개선 효능을 가질 것으로 보인다. 그러나 아직까지 피부장벽에 관한 회향의 효능에 대해서는 밝혀지지 않아 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 회향 열매 메탄올 추출물을 이용하여

그 분획을 제조한 후, 각질형성세포주(HaCaT cell)에 처리하여 피부장벽 조절인자에 미치는 영향을 규명하고, 향후 미용소재 및 피부질환 치료소재로서의 이용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약

세포배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)은 Welgene Inc (Daegu, Korea)에서 구입하였고, streptomycin-penicillin은 GIBCO (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide는 Roche Applied Science (Mannheim, Germany)에서 구입하였고, hyaluronic acid (HA) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D Systems (Minneapolis, USA)에서 구입하였다. First strand cDNA synthesis kit는 Thermo Scientific (Rockford, USA)에서 구입하였으며, bradford protein assay reagent는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 antibody 중 anti-filaggrin, anti-loricrin, anti-involucrin은 Abcam (Cambridge, MA)에서, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. 그 외에 실험에 사용한 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

시료 제조

본 실험에 사용한 FV는 경상북도 경주 소재 전문한약재상에서 구입하여 동국대학교 한의과대학에서 검정한 다음, 사용하였다. 건조된 FV의 분말 1.0 kg에 80% methanol 900 ml를 가하여 3시간 동안 추출하고, 추출액을 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 농축한 다음 동결 건조하여 92.5 g의 추출물(M)을 얻었다. 메탄올 추출물은 극성 차를 이용해 *n*-hexane (H), methylene chloride (MC), ethyl acetate (E), *n*-butanol (B) 용매를 첨가하여 각 단계별로 2회씩 분획하였다. 메탄올 추출물 중 90 g을 물에 현탁한 후 동일량의 *n*-hexane과 혼합하여 분획하고, 물 층은 다시 methylene chloride로 분획하고, 이를 다시 물 층은 ethyl acetate로 분획한 후, 남은 물 층은 마지막으로 *n*-butanol로 분획한 다음 수득한 각 분획층을 여과, 농축, 동결건조 하여 H는 47.8 g, MC는 1.4 g, E는 1.6 g, B는 5.5 g을 얻었다. 동결건조 후 얻은 시료는 -78°C의 deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

세포 배양

사람의 각질형성세포주(human keratinocyte cell)인 HaCaT 세포는 독일 암연구소(DKFZ)의 Norbert E. Fusenig박사로부터 분양 받아 사용하였다. 세포는 10% FBS와 1% penicillin-

streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

시료들의 각질형성세포에 대한 독성 측정을 위해 XTT kit를 사용하여 실험을 수행하였다. 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 100 µl씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 FBS가 첨가되지 않은 배지로 교체하여 18시간 starvation 시킨 후, 시료를 각각 0, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료처리 후, XTT 시약이 든 배지로 교체하여 4시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군(control)에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며, 독성을 유발하지 않은 농도 범위에서 실험을 진행하였다.

Hyaluronic acid 생성량 측정

HaCaT 세포를 6 well plate에 1×10⁶ cells/well의 농도로 분주하여 배양한 후, FBS가 첨가되지 않은 배지로 교체하여 18시간 starvation 시키고, 각 시료를 50 µg/ml씩 처리하고 양성대조군으로 retinoic acid (1 µM)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 상층액을 회수한 후 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA assay를 수행하여 hyaluronic acid의 생성량을 측정하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

각 시료(50 µg/ml)와 양성대조군으로 Ca²⁺ (1.2 mM), retinoic acid (1 µM)를 처리한 후 24시간을 배양한 HaCaT 세포를 TRI-reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 분리하고, UV-1700 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 260 nm에서 RNA를 정량한 후 total RNA 1 µg은 first strand cDNA synthesis kit를 이용하여 역전사 시켰다. cDNA는 RT-PCR 증폭을 위한 template로 사용되었으며, PCR primer는 선택적인 primer를 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다(Table 1). PCR은 95°C에서 10초(denaturation), 56°C에서 30초(annealing), 72°C에서 1분(extension)의 반응을 30회 반복하는 것을 조건으로 하였다. PCR에 의한 생성물은 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 digital capture system (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel)을 이용하여 확인하였다. 유전자의 발현은 internal control gene인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)로 표준화한 후, Gelquant 2.7 software (DNR Bio-Imaging Systems)를 이용하여 상대 정량하였다.

Table 1. Sequences of PCR primers of the genes investigated

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')
Involucrin	Sense	ACCTAGCGGACCCGAAATAA
	Antisense	TGGAACAGCAGGAAAAGCAC
Loricrin	Sense	CACTGGGGTTGGGAGGTAGT
	Antisense	GCTCTCATGATGCTACCCGA
Filaggrin	Sense	AAGCTTCATGGTGTATGCGAC
	Antisense	TCAAGCAGAAGAGGAAGGCA
HAS-1	Sense	CCACCCAGTACAGCGTCAAC
	Antisense	CATGGTGTCTCTGTCGCTCT
HAS-2	Sense	TTTGTTC AAGTCCCAGCAGC
	Antisense	ATCCTCTGGGTGGTGTGAT
HAS-3	Sense	CCCAGCCAGATTGTGTGATG
	Antisense	AGTGGTCAACGGGTTTCTTCC
HBD-1	Sense	TTCTGGTCACTCCCAGCTCA
	Antisense	GAGGTGTGCAATCCACCAG
HBD-2	Sense	GCCTAGCATGGTGGCTTACA
	Antisense	TCTTTGCATACCCCACCAGA
HBD-3	Sense	CTGTTCTCTTTGGAAAGGC
	Antisense	GTGGGTGTGTTCTGCATGGT
LL-37	Sense	GGCGGTAGAGGTTAGCATCC
	Antisense	ATCAGGAAGGCTCCTGGTTG
GAPDH	Sense	CAAAGTTGTCATGGATGACC
	Antisense	CCATGGAGAAGGCTGGGG

Western blot analysis

각 시료(50 µg/ml)와 양성대조군으로 Ca²⁺ (1.2 mM)을 처리하여 24시간 동안 배양한 세포를 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하고, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)을 함유한 lysis buffer를 혼합하여 얼음 위에 30분간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 5분 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 단백질 농도는 Bradford protein assay reagent를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 정량 후의 동일한 단백질 양의 각 시료를 SDS-polyacrylamide gel (7.5%~12%)을 이용하여 변성 분리하고, 이를 polyvinylidene difluoride membrane에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk가 함유된 Tris buffered saline에 2시간 동안 상온에서 blocking한 후 primary antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 하였다. 그런 다음 TBST (Tris-buffered saline and 0.1% tween 20)로 5분씩 3회 세척하고, secondary antibody를 TBST에 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 다시 세척하였다. 면역반응이 완료된 membrane은 enhanced chemiluminescence system (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA)을 이용하여 발색한 후, X-ray 필름상에서 단백질 발현을 관찰하였다. 단백질 발현은 internal control protein인 β-actin으로 표준화한 후, Gelquant 2.7 software (DNR Bio-Imaging Systems)를 이용하여 상대 정량하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 데이터는 마이크로 소프트웨어 엑셀(EXCEL) 2007 프로그램을 이용하여 평균 ± 표준편차(mean ± standard deviation)로 나타내었다. 통계적 유의성은 일원분산(one-way ANOVA)으로 분석한 후, student's t-test검정을 실시하여 p값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

세포 독성에 미치는 영향

HaCaT 세포에 각 시료를 0, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하고, 24시간 경과 후 XTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 FV메탄올 추출물(M)과 모든 분획물(H, MC, E, B)에서 50 µg/ml의 농도까지는 95%이상의 세포 생존율을 보였다. 그러나 100 µg/ml의 농도에서 M은 99%, H는87%, MC는 28%, E는 77%, B는 84%의 세포 생존율을 보이며 H, MC, E, B 처리군에서 독성을 나타냈고, 특히 MC 처리군에서 강한 독성을 보였음을 확인하였다(Fig. 1). 따라서 모든 시료처리군에서 독성을 나타내지 않은 50 µg/ml의 농도에서 실험을 진행하였다.

Ivolucrin, loricrin, filaggrin의 발현에 미치는 영향

피부장벽은 각질형성세포의 분화 말기과정에서 분비되는 분화 촉진인자들에 의해 각질세포막을 형성함으로써 물리적 장벽의 정상적인 기능을 유지하게 된다. FV가 피부장벽기능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 각질형성세포 분화 촉진 시에 분비되는 ivolucrin, loricrin, filaggrin의 발현을 RT-PCR과

Western blot을 이용하여 측정하였다. HaCaT 세포에 시료를 50 µg/ml씩 처리하여 24시간 동안 배양한 후 ivolucrin, loricrin, filaggrin의 mRNA와 protein 발현을 확인하였다. Calcium은 각질형성세포 분화의 촉진에 관여하는 생체 인자로서 피부장벽기능의 강화에 관련하는 인자들의 발현 관찰에서 양성대조군으로 사용하였다.

그 결과 ivolucrin의 경우 M과 H, MC, E, B의 분획에서 mRNA 발현율이 각각 111.7%, 119.1%, 117.7%, 116%, 122.8%로 측정되어 모든 시료처리군이 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났으며, M, H, E, B에서 유의한 증가 효과를 보였다. Loricrin의 발현은 각각 101.9%, 103.2%, 100.5%, 107.8, 110%의 발현율을, filaggrin은 103.1%, 103.6%, 105.03%, 103.2, 105.02%로 loricrin, filaggrin의 mRNA 발현에서도 모든 시료처리군이 대조군에 비해 증가한 발현율을 보였으나 유의한 효과를 나타내지는 않았다(Fig. 2A).

Protein 발현에서 ivolucrin은 M과 각 분획이 100.6%, 101.5%, 96.2%, 113.2%, 124.6%로 MC를 제외한 M, H, E, B 분획에서 발현율이 증가하였으며, 특히 B에서 유의하게 증가한 것으로 확인되었다. Loricrin의 경우 100.4%, 99%, 91.6%, 93.8%, 99.3%로 M에서만 발현이 증가하였고, 유의한 증가효과를 나타내지는 않은 것을 확인하였다. Filaggrin의 단백질 발현은 111.1%, 127.3%, 127%, 118.4%, 127.9%로 모든 시료처리군에서 증가하였으며, B에서 유의한 효과를 나타내었다(Fig. 2B).

Hyaluronic acid의 생성과 hyaluronic acid synthase의 mRNA 발현에 미치는 영향

FV가 보습효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HaCaT 세포에 각 시료를 50 µg/ml씩 처리하고, 24시간 배양한 후 회수한 배양액은 ELISA kit를 이용하여 hyaluronic acid (HA)의 생성량을 측정하였으며, 세포는 RT-PCR를 이용하여 hyaluronic acid synthase (HAS) mRNA 발현량을 조사하였다. HA의 생성량 측정 결과 대조군에서는 43.34±1.71 ng/ml, M은 46.14±0.59 ng/ml, H는47.8±0.06 ng/ml, MC는 47.8±1.22 ng/ml, E는 50.88±0.02 ng/ml, B는 48.18±0.96 ng/ml로 모든 시료처리군에서 대조군에 비해 HA의 생성량이 증가한 것으로 나타났으며, 특히 E와 B에서 유의한 증가 효과를 보였다(Fig. 3A).

HAS mRNA 발현을 조사한 결과 HAS-1은 M과 각 분획에서 162.9%, 201.1%, 187.2%, 216.8%, 297.8%로 모든 시료처리군에서 mRNA 발현이 현저하게 증가하였으며, B에서 가장 많은 증가 효과를 보였고, HAS-2의 경우 104.9%, 107.2%, 96%, 94.5%, 94%로 M과 H에서만 mRNA 발현이 증가하였고, H에서 유의성 있는 증가 효과를 나타냈다. HAS-3는 112.2%, 105.1%, 100.3%, 111.1%, 102.3%로 모든 시료처리군에서 발현율이 증가하였으나 유의한 효과를 보이지 않았다(Fig. 3B).

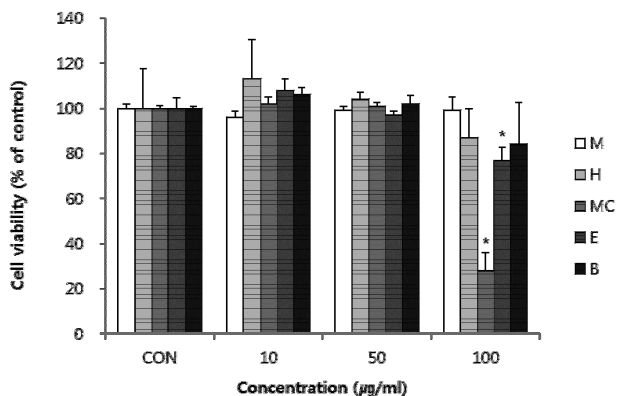


Fig. 1. Effect of FV methanol extract and of its fractions on HaCaT cell viability. Cells were treated with different concentration (0, 10, 50, 100 µg/ml) for 24 hr. Cell viabilities were measured by XTT assay as described in materials and methods. Results are expressed as the means ± SDs of three independent experiments. * p<0.05 ver. control. M, 80% methanol extract; H, hexane fraction; MC, methylene chloride fraction; E, ethylacetate fraction; B, butanol fraction.

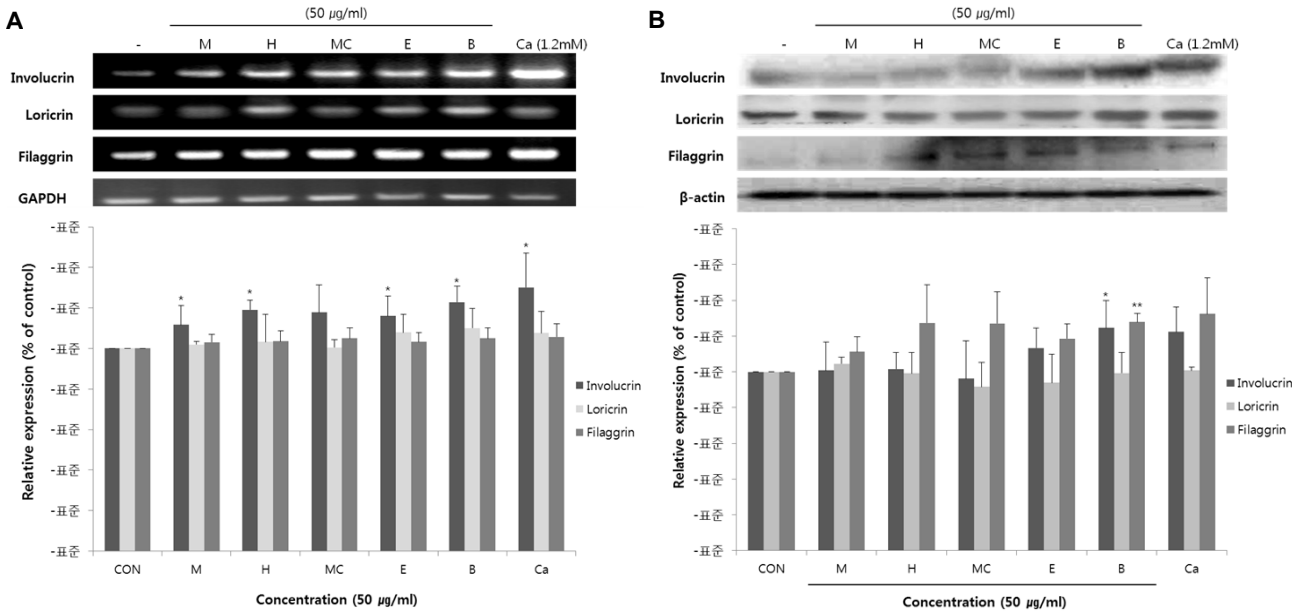


Fig. 2. Effect of FV methanol extract and of its fractions on involucrin, loricrin and filaggrin mRNA and protein expressions. HaCaT cells were treated with each sample (50 µg/ml) for 24 hr. (A) mRNA expression were determined by RT-PCR using GAPDH mRNA is used as the internal control. (B) Protein expression were determined by western blotting. β-Actin is used as the internal control. Result represents three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ver. control.

Human β-defensin-1, 2, 3와 cathelicidin의 mRNA 발현에 미치는 영향

FV의 화학적 장벽 기능을 확인하기 위하여 항균 펩타이드인 human β-defensin (HBD)-1, 2, 3와 cathelicidin (LL-37)의

mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 조사하였다. 그 결과 HBD-1의 mRNA 발현은 M과 H, MC, E, B 각 분획에서 105.8%, 112.2%, 116.1%, 121.2%, 121.1%로 측정되어 모든 시료처리군에서 대조군에 비해 발현이 증가하였으며, HBD-2는

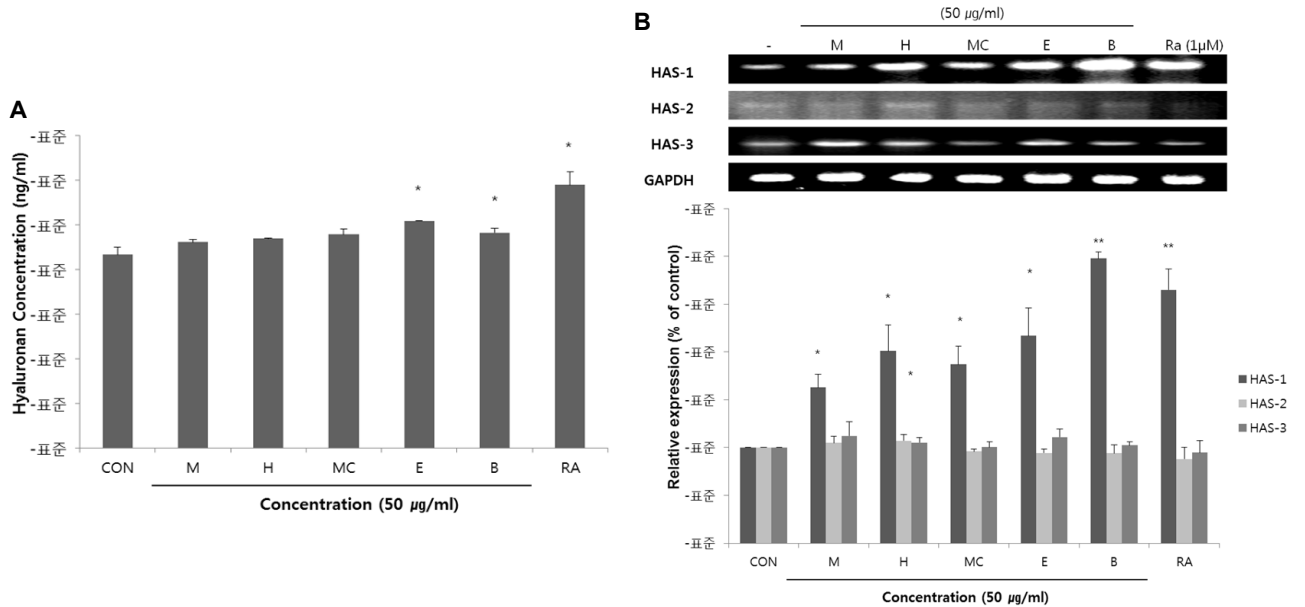


Fig. 3. Effect of FV methanol extract and of its fractions on production of hyaluronic acid and hyaluronic acid synthase mRNA expression. HaCaT cells were treated with each sample (50 µg/ml) for 24 hr. (A) The supernatants were analyzed for the production of hyaluronic acid using an ELISA assay kit. Result represents three independent experiments. (B) mRNA expression were assessed by RT-PCR. The GAPDH mRNA is used as the internal control. Result represents three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ver. control.

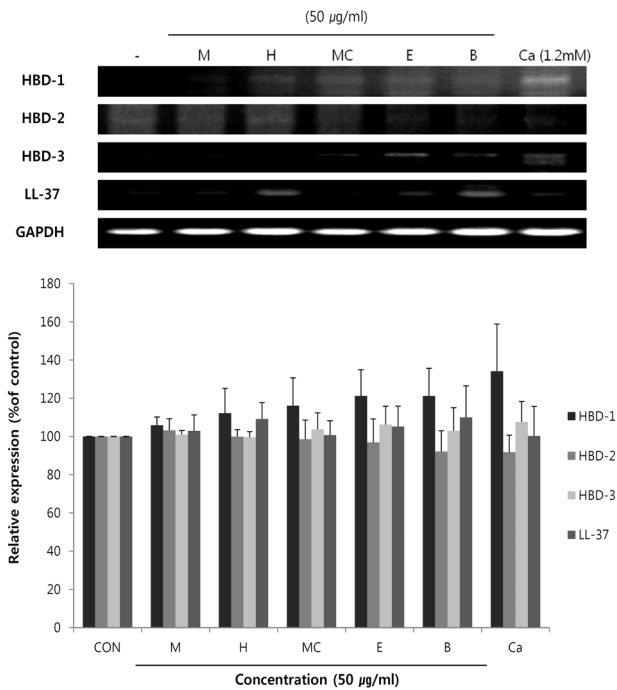


Fig. 4. Effect of FV methanol extract and of its fractions on mRNA expression of HBD and LL-37. HaCaT cells were treated with each sample (50 µg/ml) for 24 hr. mRNA expression were assessed by RT-PCR. The GAPDH mRNA is used as the internal control. Result represents three independent experiments.

103.26%, 99.9%, 98.5%, 96.8%, 92.1%로 M에서만 발현이 증가하였다. 또 HBD-3는 100.9%, 99.6%, 103.7%, 106.2%, 102.9%로 H를 제외한 시료처리군에서 mRNA의 발현이 증가하였으며, LL-37은 102.9%, 109.1%, 100.7%, 105.2%, 109.9%로 모든 시료처리군에서 발현이 증가한 것으로 나타났다. 그러나 M과 분획물들 모두 항균 펩타이드 발현을 유의하게 증가시키지 않은 것으로 나타났다(Fig. 4).

고찰

피부장벽의 손상은 보호막 기능을 저하하여 수분 손실로 인한 건조증과 외부로부터 항원의 침입에 의한 다양한 피부 질환을 유발하게 한다. 최근에는 피부 질환이 피부장벽기능과 밀접한 관련이 있다[33, 38]고 보고되었으며, 피부장벽기능 강화 및 수분의 보충이 피부 질환 치료에 중요한 역할을 할 것으로 보고 이를 위한 치료제 개발의 연구가 지속적으로 진행되고 있다.

본 연구에서는 회향의 항염증, 항산화, 항암 및 피부노화방지 효능 등 기존 연구를 기반으로 FV가 피부장벽 및 보습에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

각질세포의 분화 촉진자인 involucrin, loricrin, filaggrin은 피부의 물리적 장벽 역할을 하는 각질세포막의 형성 및

기능 유지에 중요한 역할을 하여 이들의 발현 감소는 피부장벽 기능 저하에 의한 아토피피부염 및 건선과 같은 피부질환을 야기한다고 알려져 있다. Howell 등[21]은 Th2사이토카인인 interleukin-4, 5, 13 등이 인체 내 B 세포를 활성화하여 IgE 및 프로스타글란딘 D2 등의 염증매개물질을 분비시킬 뿐만 아니라, loricrin, involucrin, filaggrin의 발현을 억제하여 발적과 건조감, 소양감과 같은 아토피피부염의 임상증상을 나타낸다고 보고하였다. 또한 filaggrin 유전자 돌연변이의 경우 피부의 주름과 갈라짐이 자주 발생한다는 임상연구 결과[52]들이 계속 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 FV가 피부의 물리적 장벽에 미치는 영향을 확인하기 위해 메탄올추출물(M) 및 그 분획물(H, MC, E, B)을 24시간 동안 각질형성세포에 처리한 후, involucrin, loricrin, filaggrin의 mRNA 및 protein 발현량을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 각질형성세포의 분화를 촉진시키는 것으로 알려진 칼슘(1.2mM)처리 양성대조군에서는 involucrin, loricrin, filaggrin mRNA 및 protein이 모두 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 각질세포막 형성인자는 M과 분획물을 처리함에 따라 증가되는 양상을 보였는데, 특히 B 처리시 involucrin은 mRNA와 protein, filaggrin의 경우 protein의 발현율이 통계적으로 유의미한 수준에서 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 본 결과는 분획물 중 B가 각질형성세포의 분화를 촉진시켜 피부의 물리적 장벽을 개선 및 강화시킬 수 있음을 제시하고 있다.

피부 세포외기질의 주요 구성성분으로 보습장벽의 역할을 하는 HA는 생성량이 감소하면 주름 및 탄력 감소를 유발하여 피부의 조기 노화, 건선 및 피부염 질환을 일으킬 수 있으므로 [10] 피부 노화 방지 및 피부질환 개선에 HA의 함량 보유가 중요한 영향을 미칠 것으로 보인다. FV가 피부 보습에 미치는 영향을 확인하기 위해 HA의 생성량을 관찰한 결과 E와 B는 50 µg/ml 처리 농도에서 50.88±0.02 ng/ml, 48.18±0.96 ng/ml로 측정되어 대조군에 비해 각각17%, 11%의 HA 생성 촉진 효과를 보였다(Fig. 3A). 이러한 HA의 합성은 각질형성세포 내 HAS에 의해 진행되는데, HAS는 염기서열의 유사성이 높은 순서로 HAS-1, HAS-2, HAS-3의 세가지 형태가 존재하는 것으로 보고되었다[26]. 이들은 HA합성에 결정적인 역할을 하는 효소로서 HA 생성 증가에 관여하므로[32] HAS의 발현을 촉진함으로써 HA의 합성을 증가시키고자 하는 연구[31, 37]가 이루어지고 있다. 따라서 본 실험에서는 HAS-1, -2, -3 발현 촉진효과를 조사하고자 하였으며, 그 결과50 µg/ml 의E와 B를 24시간 동안 처리시 HAS-1 유전자를 유의미하게 증가시킴을 확인하였다(Fig. 3B). 이를 통해 E와 B가 HAS-1 유전자 발현을 촉진하여 최종적으로 HA의 생성을 촉진하는 것으로 사료된다.

피부는 표피의 각질세포에서 자체 항균력을 갖는 β-defensins (HBD), cathelicidin (LL-37)과 같은 항균 펩타이드의 생산을 통해 병원균 침입에 대한 화학적 장벽의 역할을 한다[22,

25]. β -defensin은 3-4 kDa의 cationic peptide로 사람에서 유래한 것은 모두 11종류로 보고되었으나[1] 피부에서 주로 발현되는 것은 HBD-1, HBD-2, HBD-3로 알려져 있다[15, 17]. HBD-1은 상피와 땀샘에서 정상적인 상태에서 항상 발현되며, HBD-2와 HBD-3은 세균 감염이나 IL-1 β , TNF- α 와 같은 사이토카인의 자극, 그리고 각질형성세포의 분화에 의해 피부나 상피세포에서 발현된다[3]. LL-37은 HBD-2와 함께 각질형성세포의 증판소체 내에 존재하는 것으로 그람음성/양성세균, 진균, 바이러스 등에 대한 강력한 항균작용을 가지며, 피부장벽의 정상적인 기능 유지에도 관여한다[4]. 이러한 항균 펩타이드는 세균이나 바이러스에 감염될 경우 급격히 발현량이 증가하여 항균력을 증진시키는 것으로 알려져 있으나 정상 상태에서도 분비함으로써 면역력을 강화하여 외부 감염원으로부터 개체를 방어하는 선천 면역의 중요한 구성 요소이다[42]. 따라서 항균 펩타이드의 감소는 선천 면역을 저하시키고, 외부 병원체에 대한 항균력이 감퇴되어 건선[20]이나 여드름 및 만성 염증성 피부 질환[16]을 유발한다. 이에 본 연구에서는 FV매탄을 추출물 및 분획물을 각질형성세포에 처리한 후 HBD-1, 2, 3와 LL-37 mRNA 발현량을 측정하였다. 그 결과 HBD-1, 2, 3와 LL-37 모두 mRNA 발현량이 유의하게 증가하지 않은 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서 FV는 피부의 화학적 장벽에 관여하지 않는 것으로 보인다.

결론적으로 FV 분획물 중 B는 involucrin과 filaggrin의 발현에 뛰어난 증가 효과를 나타냈다. 또한, E와 B는 HAS-1의 합성을 증가시킴으로써 HA 생성량을 증가시켰다. 한편 FV는 모든 항균 펩타이드의 mRNA 발현에서 유의미한 변화를 일으키지 않았으므로, 피부의 화학장벽에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다. 따라서 FV 분획물 중 B는 각질형성세포의 분화를 촉진하여 피부의 물리적 장벽기능을 향상시키고, 피부보습인자의 생성을 통해 피부건조증을 개선함으로써 피부질환 치료제 및 미용 기능성 소재로 활용이 가능하리라 사료된다. 활성이 우수한 E 분획물에는 cardiac glycoside류, tannin류, phenol류가 그리고 B 분획물에서는 alkaloid류, steroid류, cardiac glycoside류, tannin류, phenol류 및 triterpenoid류 등이 함유되어 있음이 보고되어 있다[2]. 향후 FV의 B분획물이나 B분획물에 함유된 성분들의 분리 및 분석을 실시하고 나아가 생리활성 기전을 규명한다면, 피부장벽 기능개선 소재로 개발될 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업(과제번호: HN12C0057)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Alis, R. S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C. E., Cerio, R. and Quinn, A. G. 2001. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 106-111.
- Anitha, T., Balakumar, C., Ilango, K. B., Benedict Jose, C. and Vetrivel, D. 2014. Antidiabetic activity of the aqueous extracts of *Foeniculum vulgare* on streptozotocin-induced diabetic rats. *IJAPBC* **3**, 487-494.
- Bals, R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* **1**, 141-150.
- Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V. and Gallo, R. L. 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 9-13.
- Braff, M. H., Di Nardo, A. and Gallo, R. L. 2005. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 394-400.
- Brown, M. B. and Jones, S. A. 2005. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **19**, 308-318.
- Choi, E. M. and Hwang, J. K. 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* **75**, 557-565.
- Choi, E. M. and Koo, S. J. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated inflammatory mediator production in RAW264.7 macrophages by *Foeniculum vulgare* fruit extract. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **20**, 505-510.
- Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., Guy, R. H., Macqowan, A. L., Tazi-Ahmini, R. and Ward, S. J. 2009. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1892-1908.
- Dahiya, P. and Kamal, R. 2013. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *N. Am. J. Med. Sci.* **5**, 309-315.
- Dübe, B., Lüke, H. J., Aumailley, M. and Prehm, P. 2001. Hyaluronan reduces migration and proliferation in CHO cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1538**, 283-289.
- Elias, P. M., Wood, L. C. and Feingold, K. R. 1999. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am. J. Contact. Dermat.* **10**, 119-126.
- Forslin, B. 1994. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta. Derrn. Venereol.* **74**, 1-6.
- Fuchs, E. 1993. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J. Cell Sci.* **17**, 197-208.
- Gallo, R. L. and Huttner, K. M. 1998. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 739-743.
- Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T. and Zaiou, M. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 823-831.
- Ganz, T. 1999. Defensins and host defense. *Science* **286**, 420-421.
- Ghersetich, I., Notti, T., Gampainle, G., Grappone, C. and Dini, G. 1994. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int. J. Dermatol.* **33**, 119-122.
- Harding, C. R., Watkinson, A., Rawlings, A. V. and Scott, I. R. 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int. J. Cosmet. Sci.* **22**, 21-52.

20. Hwang, S. P., Choi, U. H. and An, S. G. 2009. Skin barrier and antimicrobial activity. *J. Skin Barrier Res.* **11**, 55-63.
21. Howell, M. D., Kim, B. E., Gao, P., Grant, A. V., Boguniewicz, M., De Benedetto, A., Schneider, L., Beck, L. A., Barnes, K. C. and Leung, D. Y. 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 150-155.
22. Hata, T. R. and Gallo, R. L. 2008. Antimicrobial peptides, skin infections and atopic dermatitis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **27**, 144-150.
23. Hwang, H. Y., Choi, Y. S., Jung, B. H., Lim, B. W. and Kim, J. D. 2007. Effect of *Foeniculum vulgare* Gaertner extracts on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proceedings of the Convention of the Korean Society of Applied Pharmacology.* 161-162
24. Ishida-Yamamoto, A., Kartasova, T., Matsuo, S., Kuroki, T. and Izuka, H. 1997. Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 12-16.
25. Izadpahah, A. and Gallo, R. L. 2005. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 381-390.
26. Karvinen, S., Pasonen-Seppänen, S., Hyttinen, J. M., Pienimäki, J. P., Törrönen, K., Jokela, T. A., Tammi, M. I. and Tammi, R. 2003. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **278**, 49495-49504.
27. Kim, H. J., Shin, J. U. and Lee, K. H. 2013. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. *Allergy Asthma Respir. Dis.* **1**, 20-28.
28. Kim, S. M., Choi, C. H., Kim, J. W., Won, S. R. and Rhee, H. I. 2008. The anticaries activity of hot water extracts from *Foeniculum vulgare*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 84-87
29. Lee, J. C., Lee, E., Lee, Y. C., Oh, H., Yoon, H. S., Ha, T. K. and Hong, E. H. 2007. Effects of *Fructus foeniculi* extract on recovering liver function. *Kor. J. Herbology.* **22**, 213-218
30. Lee, J. J., Choe, M. S., Chung, C. S. and Choe, B. 2003. Effect of food restriction on rat adipose lipoprotein lipase activity and lipogenesis. *Kor. J. Exercise Nutr.* **7**, 135-141
31. Longas, M. O., Russell, C. S. and He, X. Y. 1987. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr. Res.* **159**, 127-136.
32. Malaise, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit C., Nikkels, A. F., Flamion, B. and Poumay, Y. 2014. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2174-2182.
33. Mohsenzadeh, M. 2007. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pak. J. Biol. Sci.* **10**, 3693 - 3697.
34. Nemes, Z. and Steinert, P. M. 1999. Brick and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* **31**, 5-19.
35. Oktay, M., Gülçin, I. and Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* **36**, 263-271.
36. Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. and Leung, D. Y. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1151-1160.
37. Pienimäki, J. P., Rilla, K., Fülöp, C., Sironen, R. K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M. J., Tammi, R., Hascall V. C. and Tammi, M. I. 2001. Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **276**, 20428-20435.
38. Rasul, A., Akhtar, N., Khan, B. A., Mahmood, T., Uz Zaman, S. and Khan, H. M. 2012. Formulation development of a cream containing fennel extract: *in vivo* evaluation for anti-aging effects. *Pharmazie* **67**, 54-58.
39. Reinholz, M., Ruzicka, T. and Schaubert, J. 2012. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann. Dermatol.* **24**, 126-135.
40. Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. J. and Dorman, H. J. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta. Med.* **66**, 687-693.
41. Sakai, S., Sayo, T., Kodama, S. and Inoue, S. 1999. N-Methyl-L-serine stimulates hyaluronan production in human skin fibroblasts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **12**, 276-283.
42. Schroder, J. M. and Harder, J. 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 469-486.
43. Seo, D. J., Kim, T. H., Kim, H. S. and Choe, M. 2011. Effects of *Foeniculi fructus* water extracts on activities of key enzymes of lipid metabolism related with obesity. *Kor. J. Plant Res.* **24**, 181-188
44. Shin, M. G. 2000. *Clinical traditional herbalogy*, pp. 305-306, Young-lim Publishing, Seoul, Korea.
45. Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P. and Catalan, C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* **17**, 745-752.
46. Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P. and McLean, W. H. 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* **38**, 337-342.
47. Song, H. J., Jin, M. H. and Lee, S. H. 2013. Effect of ferulic acid isolated from *Cnidium officinale* on the synthesis of hyaluronic acid. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **39**, 281-288.
48. Steinert, P. M. 1995. A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope. *Cell Death Differ.* **2**, 33-40.
49. Steinert, P. M. and Marekov, L. N. 1995. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* **270**, 17702-17711.

50. Steven, A. C. and Steiner, P. M. 1994. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocyte. *J. Cell Sci.* **107**, 693-700.
51. Täiieb, A. 1999. Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. *Contact. Dermatitis.* **41**, 177-180.
52. Thyssen, J. P., Ross-Hansen, K., Johansen, J. D., Zachariae, C., Carlsen, B. C., Linneberg, A., Bisgaard, H., Carson, C. G., Nielsen, N. H., Meldgaard, M., Szecsi, P. B., Stender, S. and Menné, T. 2012. Filaggrin loss-of-function mutation R501X and 2282del4 carrier status is associated with fissured skin on the hands: results from a cross-sectional population study. *Br. J. Dermatol.* **166**, 46-53.
53. Yamasaki, K. and Gallo, R. L. 2008. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur. J. Dermatol.* **18**, 11-21.

초록 : HaCaT 세포에서 회향 열매의 피부장벽기능과 hyaluronic acid 생성에 미치는 영향

유학인¹ · 양인준¹ · 빅터루베리오린차¹ · 박인식² · 이동웅³ · 신흥묵^{1,4*}

(¹동국대학교 한의과대학 생리학교실, ²동국대학교 한의과대학 해부학교실, ³동국대학교 과학기술대학 바이오학부, ⁴한국한방산업진흥원)

회향은 미나리과에 속하는 다년생식물인 *Foeniculum vulgare* Mill.의 성숙한 과실로서 향염, 진통, 피부노화방지 등의 효과를 가지고 있어 다양한 질환에 우수한 치료효과를 나타내는 것으로 알려져 왔다. 따라서 본 연구에서는 기능성이 우수한 회향 열매 추출물을 이용하여 피부 질환 치료제 및 피부장벽 기능 개선 소재로서의 적용가능성을 확인하였다. 이를 위해 각질형성세포주인 HaCaT에 회향 열매 메탄올 추출물과 그 분획물(hexane, methyl chloride, ethyl acetate, butanol)을 처리한 후, involucrin, loricrin, filaggrin의 발현과 hyaluronic acid의 생성 및 β-defensin -1, -2, -3, LL-37의 mRNA 발현을 측정하였다. 그 결과butanol 분획물 50 µg/ml을 24시간 동안 처리시 involucrin과 filaggrin단백질 발현을 각각122.8%, 105%로 유의하게 증가시킴을 확인하였다. Elisa assay를 통해 분석한 결과, ethyl acetate와 butanol 분획물은 대조군에 비해 hyaluronic acid의 생성을 각각17%, 11% 증가시켰으며, 이는 hyaluronic acid synthesis-1의 mRNA 발현 증가에 의한 것임을 확인하였다. 그러나 회향 열매 메탄올 추출물과 분획물 모두에서 β-defensin -1, -2, -3, LL-37의 mRNA 발현은 증가되지 않았다. 이러한 결과는 회향 열매 butanol 분획물이 각질형성세포에서 물리적 장벽을 형성하고 보습인자 조절을 통해 피부장벽 기능을 강화하는데 효과적임을 의미한다.