

히알루론산나트륨의 분자량 크기에 따른 Collagen 합성, 항염증 및 피부 흡수에 미치는 영향

신은지·박주웅·최지원*·서정연*·박용일[†]

바이오스트림테크놀로지스(주)

*가톨릭대학교 생명공학과

(2016년 7월 18일 접수, 2016년 8월 15일 수정, 2016년 8월 31일 채택)

Effects of Molecular Weights of Sodium Hyaluronate on the Collagen Synthesis, Anti-inflammation and Transdermal Absorption

Eun Ji Shin, Joo Woong Park, Ji Won Choi*, Jeong Yeon Seo*, and Yong Il Park[†]

Biostream Technology Co., 46 Yongin-si, Gyeonggi-do 17098, Korea

[†]Department of Biothecnology, The Catholic University of Korea, Gyeonggi-do 14662, Korea

(Received July 18, 2016; Revised August 15, 2016; Accepted August 31, 2016)

요약: 본 연구에서는 히알루론산나트륨(sodium hyaluronate, HA)을 효소 분해하여 분자량 크기(1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa) 별로 제조한 뒤 콜라겐 합성 및 항염증 활성에 미치는 영향과 피부투과도를 조사하였다. 이들 HA는 인간피부세포인 Hs68 세포에 세포독성을 나타내지 않았다. 콜라겐 생합성능은 1500 kDa, 50, kDa HA가 각각 59, 50%로 콜라겐 생합성 촉진능이 우수한 것으로 나타났다. 분자량 크기에 따른 HA의 피부투과도를 측정된 결과 660 또는 1500 kDa의 HA은 2% 미만의 미미한 투과율을 보였으나, 저분자 HA (1, 10, 또는 50 kDa)은 시간이 지남에 따라 투과율이 증가하는 것을 확인하였다. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 HA 분자량 크기에 따른 항염증 효과를 확인한 결과, 50 kDa HA가 농도 의존적으로 nitric oxide 및 tumor necrosis factor- α 합성을 저해하여 다른 분자량의 HA (1, 10, 및 100 kDa)에 비해 가장 큰 항염증 효능을 나타냈다. 현재까지 효소(hyaluronidase) 처리하여 제조된 다양한 크기의 분자량(1, 10, 50, 100, 660, 1500 kDa)의 HA 중 50 kDa HA가 collagen의 합성, 항염증 및 피부 흡수도에 대한 종합적인 평가를 한 사례는 없었다. 따라서 이러한 연구결과는 50 kDa의 HA가 인간피부세포에서 콜라겐 합성을 증진시키고, 피부 투과율을 높이며 피부 주름을 유발하는 염증반응을 억제함으로써 피부노화 및 주름 개선용 화장품소재로 개발될 수 있는 가능성을 보여준다.

Abstract: In this study, we examined the effects of various molecular weights (1, 10, 50, 100, 660, and 1500 kDa) of sodium hyaluronate (HA), which were prepared by enzyme hydrolysis, on the collagen synthesis, anti-inflammation and skin absorption. These HA did not significantly affect the viability of human dermal fibroblast Hs68 cells. Among them, 1500 kDa, 50 kDa HA most significantly increased collagen production by 59%, and 50% in the Hs 68 cells, respectively. Whereas 1500 and 660 kDa HA hardly pass through mouse transdermis membrane, lower molecular weights (1, 10, or 50 kDa) of HA showed time-dependent increase in skin permeation. HA of 50 kDa showed highest anti-inflammatory effects by reducing nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in the RAW 264.7 cells, comparing to other HA (1, 10, and 100 kDa HA). Recently, there is no report about anti-wrinkle and anti-inflammatory effects and skin permeation of different molecular weights HA (1, 10, 50, 100, 660 and 1500 kDa), which

[†] 주 저자 (e-mail: yongil382@catholic.ac.kr)
call: 02)2164-4512

were produced by enzyme hydrolysis. These results suggested that 50 kDa HA can be potent candidates for the development of effective anti-aging and anti-wrinkle cosmetic agents. The results of this study demonstrated that among those HA with different molecular weights, 50 kDa HA showed highest anti-inflammatory activity, significant capability to induce collagen synthesis and high level of skin permeation.

Keywords: hyaluronic acid, collagen synthesis, skin absorption, anti-inflammation

1. 서 론

히알루론산나트륨(sodium hyaluronate, HA)은 N-acetyl glucosamine (NAG)과 glucuronic acid로 구성되어 있으며 β -1,3-결합 및 β -1,4-결합으로 된 산성, 뮤코 다당류로 고점도성, 보습성, 생체적합성 등의 특징을 지닌다[1]. 콜라겐 및 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 중 하나인 HA은 피부 내 진피의 주요성분으로 수분보유 능력이 뛰어나 수분유지, 세포 간 간격유지뿐만 아니라 세포의 성장, 분열, 이동 등에 관여하는 것으로 알려져 있다[2,3]. HA은 주로 각질형성세포와 섬유아세포에서 히알루론산나트륨의 합성효소(hyaluronic acid synthase, HAS)에 의해 합성되고, 합성되는 동안 세포 외기질에 축적되는 것으로 알려져 있는데, 노화가 진행되면서 자연스럽게 히알루론산의 양도 감소하여, 피부 내 히알루론산의 감소는 피부의 수분부족, 주름발생 및 탄력감소의 원인 중 하나이다[4,5].

히알루론산은 기원 및 제조 방법에 따라 분자량이 $0.1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ dalton (Da)으로 매우 다양한데, 분자량에 따라 점성, 보습성 및 탄성이 좌우된다[6,7]. 히알루론산은 분자량이 커지면 점성과 탄성이 커지는 특징이 있지만, 피부에 적용할 시 진피층을 통과하지 못하는 문제점이 있다[8,9]. 따라서 독성이 없고 피부 투과도가 높은 저분자 히알루론산을 제조하여 세포 외 기질에 히알루론산을 보충함으로써, 피부의 수분보충 및 탄력저하를 막으려는 노력이 계속되고 있다[8,10]. 저분자 히알루론산 제조방법에는 산 가수분해법, 고온가열 방법, 초음파 및 효소를 이용하는 방법이 있다[11]. 하지만 상기와 같은 강산을 이용한 가수분해나 초음파를 이용하는 방법은 단당이 주로 생성되어 분자의 크기가 균일하지 않고, 고온가열 방법은 변성 가능성 때문에 원하지 않는 부산물이 생길 우려가 있다[6,12,13]. 한편, 효소를 이용한 분해의 경우, 효소의 반응 시간과 온도를 선택함으로써 다양한 분자량 크기의 HA을 얻을 수 있는 장점이 있으며, 효소

분해로 생성된 저분자 HA에 대해 항비만 효능을 비롯한 다양한 생리활성에 관한 연구가 진행 중에 있다 [14,15].

히알루론산과 함께 피부 진피 내 존재하는 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여해 피부 탄력에 가장 큰 영향을 준다[16]. 콜라겐은 섬유아세포(fibroblast)에 의해 합성되고 콜라게네이스(collagenase)에 의해 분해되며, 피부를 구성하는 콜라겐은 제1형 콜라겐(type 1 collagen)이 대부분이다[17]. 피부노화는 내재적 요인과 외재적 요인으로 야기 되는데 내재적 요인으로는 세포 내 염증반응에 의해, 외재적 요인으로는 주로 자외선 노출에 의해 일어난다[18]. 피부는 자외선에 노출되면 광화학적 반응으로 reactive oxygen species (ROS)가 피부에 축적되어 산화적 스트레스를 유발하고, 계속된 산화 스트레스는 염증 반응을 통해 콜라겐 분해, 히알루론산 사슬의 절단 및 DNA 변이 촉진 등 피부 구성 성분들의 손상을 야기한다[19-22]. 결과적으로 산화적 스트레스에 의한 염증반응은 피부 구조적으로는 진피의 두께가 얇아지고, 콜라겐 및 HA의 분해로 진피조직의 세포외기질 성분에 변화를 유발하여 피부기능 악화, 염증 및 노화를 촉진한다[21]. 특히 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 세포 내 염증반응을 유도하고, activating protein-1 (AP-1)의 전사를 통해 콜라겐 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)을 활성화 시켜 콜라겐을 분해시키고 피부의 보습 및 팽팽함을 감소시킨다[20]. 따라서 염증반응을 억제하는 항염증 활성을 갖는 물질들은 피부 노화과정을 지연시키고 주름을 개선시킬 수 있다[23].

따라서 본 연구에서는 고분자 HA을 hyaluronidase로 분해하여 분자량 크기에 따라 다양한 사이즈의 HA을 제조한 뒤, 사람 피부세포(Hs68 cells)에서의 콜라겐 합성능을 비교평가하고, Franz diffusion cell system을 이용하여 피부투과도를 비교하였다. 또한, 이들 HA을 RAW 264.7 (murine macrophage cell type)에서 항염증

활성을 비교 평가하여, 피부투과도 및 콜라겐 합성능이 높으면서 항염증 효과를 갖는 최적 분자량 크기의 HA를 스크리닝하고자 하였다.

2. 실험 및 방법

2.1. 시약 및 기기

Dulbeco's modified Eagle medium (DMEM) 및 fetal bovine serum (FBS)는 ATCC (USA)에서 구입하였고, penicillin / streptomycin (P/S)과 phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone (USA)에서, 0.25% trypsin EDTA는 Thermo fisher scientific (USA)에서 구입하여 사용하였다. N-(1-naphthyl) ethylenediamine, sulfanilamide, 및 phosphoric acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다. EZ cytox kit (Daeil, Korea), procollagen type I c-peptide (PIP) ELISA kit (Takara, Japan) 및 hyaluronan enzyme-linked immunosorbent assay kit (Echelon biosciences, USA)는 각각 세포 생존율, 콜라겐 및 피부 투과도를 측정하기 위해 사용하였다. Quantikine ELISA kit는 R&D (USA)에서 구입하여 TNF- α 를 측정하였고, 분석기기는 microplate reader (Eon, BioTek, USA)를 사용하였다.

2.2. 재료 및 원료

본 실험에서 사용한 고분자 HA는 다미화학(Korea)에서 구입하여 기질로서 사용하였고, Lee 등의 방법에 따라 생산한 hyaluronidase로 분해하여 저분자 HA를 분자량 크기에 따라(1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa) 획득하였다[15]. 효소반응은 1% 고분자 HA를 3% 염화나트륨이 함유된 100 mM Tri-HCl 완충액(pH 7.0)에 용해시킨 후에 35 unit/mL의 hyaluronidase 효소액을 첨가하여 30 °C에서 반응시켰다. 이때 반응시간과 속도를 230 nm 흡광도(DU730, Beckman Coulter, Germany)에서 그 수치로 반응속도를 조절하여 90 °C에서 반응을 중지시켰다. 반응시간 10 min에는 660 kDa, 30 min에는 100 kDa, 70 min에는 50 kDa, 130 min에는 10 kDa, 140 min 1 kDa의 HA를 얻었다. 반응이 멈춘 반응액은 microfiltration (Sartocon Slice microfiltration set 17521105, Sartorius, Germany)을 이용하여 탈염 및 농축한 후, 에탄올로 침전시켜 이것을 회수해 진공건조기(DAVO27, Hanil, Korea)를 이용하여 30 °C에서 48 h 건조한 후 믹서기(HMF-582, Hanil, Korea)로 분쇄하여 균질화한 후

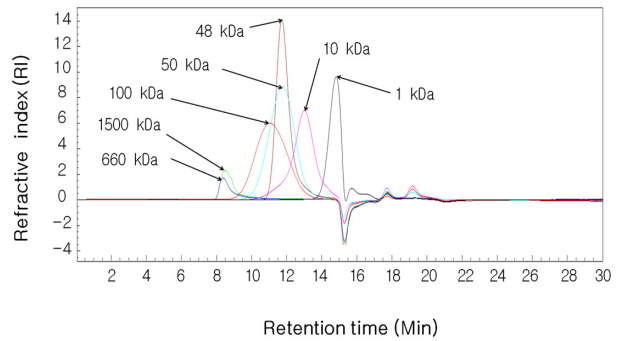


Figure 1. GPC of HA with various molecular weights (1, 10, 50, 100 kDa). GPC (Aliance 2695, Waters, USA), detector: RI (2414 refractive index detector, Waters, USA), detector temperature: 30 °C, column: OHPak column (SB-804HQ, Showa Denko Co., Japan), column temperature: 30 °C, mobile phase: 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), flow rate: 0.7 mL/min, GPC sample: 2.5 mg/mL 660, 1500 kDa, 10mg/mL 1, 10, 50, 100 kDa standard, 10 mg/mL 48 kDa pullulan (6351 pullulan standard set, Sigma, USA) standard.

실험에 사용하였다[15,56].

2.3. GPC를 이용한 HA의 분자량 측정

HA의 분자량을 측정하기 위해 1500, 660 kDa, 2.5 mg/mL 그리고 100 kDa, 50, 10, 1 kDa와 48 kDa의 pullulan (6351 pullulan standard set, Sigma, USA) standard를 10 mg/mL을 증류수에 녹여 gel permeation chromatography (GPC, Alliance 2695, Waters, USA)을 이용하여 이동상은 10 mM sodium phosphate (pH 7.0)을 사용하였고, 유량(flow rate)은 0.7 mL/min, 검출기는 refractive index detector (RI, 2414 refractive index detector, Waters, USA), 검출온도는 30 °C, 컬럼은 OHPak column (SB-804HQ, Showa Denko, Japan), 컬럼온도는 30 °C로 측정을 하여 분자량을 얻었다(Figure 1)[58].

2.4. Hs68 섬유아세포에 대한 HA의 세포 독성 평가

사람 피부 섬유아세포인 Hs68 (CRL-1635, ATCC, USA)세포를 1×10^4 cells/mL의 농도로 96-well plate에 seeding한 후, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지와 함께 5% CO₂ incubator에서 37 °C, 24 h 배양하였다. 24 h 뒤, 분자량 크기에 따라 제조된 HA (1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa)을 각각 0.2%, 0.5%, 및 1% 농도로 DMEM 배지에 녹여 세포에 처리하였다[24]. 24 h

동안 배양한 다음, 배양액을 모아 EZ cytox kit 에 100 μL 씩 분주하여 4 h 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응한 뒤 분자량 크기에 따른 HA의 세포 독성을 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다[57].

2.5. HA의 분자량 크기에 따른 섬유아세포의 콜라겐 합성능 평가

Hs68 섬유아세포 5×10^4 cells/well 농도로 9-well plate에 분주한 후, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지와 함께 5% CO_2 incubator에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 24 h 배양하였다. 24 h 뒤, 분자량 크기별로 제조된 HA (1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa)을 각각 0.2%, 0.5%, 및 1% 농도로 DMEM 배지에 녹여 세포에 처리하였다. 24 h 동안 배양한 다음 배양액을 모아 procollagen type I C-peptide (PIP) ELISA kit를 이용하여 다음과 같은 방법으로 콜라겐 양을 측정하였다[25]. 단일클론 항체가 코팅된 plate에 antibody peroxidase (POD)와 배양액을 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 h 반응시킨 다음, 기질액(tetramethylbenzidine solution, TMBZ) 100 μL 를 넣고 15 min 동안 상온에서 반응시켰다. 15 min 뒤 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 분자량 크기에 따른 HA의 콜라겐 합성능을 측정하였고, vitamin C (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)는 positive control로 사용하였다.

2.6. HA의 분자량 크기에 따른 피부 투과 실험

2.6.1. Transdermal Franz Diffusion Cell System을 이용한 HA의 분자량 크기에 따른 피부 투과 실험

인공피부를 사용하여 실험을 진행하였으며 인공피부는 각질층, 표피(epidermis), 진피(dermis) 피부의 전층을 재현해 놓은 3D 피부모델의 Neoderm-ED (TEGO Science, Korea) 6-well을 테고사이언스에서 구입하여 사용했다. 구입한 인공피부를 Franz diffusion cell 양쪽에 부착하여 클램프로 고정하였다. 이 후 donor chamber 한쪽에는 0.2% 농도의 분자량 크기별로 제조된 HA (1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa) 5 mL를 넣고 다른 한쪽(receptor chamber)에는 PBS 5 mL를 넣은 후에 diffusion cell drive console을 이용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 600 rpm으로 일정하게 교반을 하였다. 시간별(1, 2, 4, 8, 및 12 h)로 투과한 HA를 hyaluronan enzyme-linked immunosorbent assay kit을 이용하여 다음과 같은 방법으로

로 정량하였다[27].

96-well plate에 standard 및 투과한 HA 용액 각각 100 μL 와 HA 검출 용액 50 μL 를 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응하였다. 1 h 뒤 반응 용액 100 μL 를 antibody가 코팅된 plate에 넣어 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 min 동안 반응 후, 세척용액으로 3번 세척하였다. 세척용액을 완전히 제거 한 후, 반응 효소를 100 μL 씩 각 well에 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 min 동안 반응하였고, 기질용액 100 μL 를 넣어 30 min간 추가로 반응하였다. 30 min 뒤 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[28].

2.7. HA의 분자량 크기에 따른 항염증 활성 비교

2.7.1. HA의 분자량 크기에 따른 NO 생성 저해 활성

HA의 분자량 크기에 따른 NO 생성 저해 활성을 mouse macrophage cell인 RAW 264.7 (TIB-71, ATCC, USA)세포를 이용하여 조사하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^4 cells/mL의 농도로 96-well plate에 seeding한 후, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지와 함께 5% CO_2 incubator에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 24 h 배양하였다. 24 h 뒤, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 lipopolysaccharide (LPS)와 분자량 크기별로 제조된 HA (1, 10, 50, 100 kDa)을 각각 0.2%, 0.5%, 및 1% 농도로 DMEM 배지에 녹여 세포에 처리하였다. 24 h 동안 배양한 다음, Griess reagent [A: 0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine in H_2O , B: 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid; A : B = 1 : 1]와 배양액을 1 : 1로 10 min간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.7.2. HA의 분자량 크기에 따른 TNF- α 생성 저해 활성

HA의 분자량 크기에 따른 TNF- α 의 생성 저해 활성을 평가하기 위해 Quantikine ELISA kit를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^4 cells/mL의 농도로 96-well plate에 seeding한 후, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지와 함께 5% CO_2 incubator에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 24 h 배양하였다. 24 h 뒤, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS와 분자량 크기별로 제조된 HA (1, 10, 50, 및 100 kDa)을 각각 0.2%, 0.5%, 및 1% 농도로 DMEM 배지에 녹여 세포에 처리하였다. 24 h 동안 배양한 다음, 배양액을 모아 항-TNF- α 1차 항체가 코팅된 96-well plate 분주하여 2 h

동안 교반하며 반응시킨 후에, enzyme-linked 항-TNF- α 2차 항체를 50 μ L씩 분주한 후 2 h 반응시켰다. 반응 후에 기질을 넣어 30 min 동안 추가로 반응하였다. 반응이 끝난 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 통계처리

실험결과는 mean \pm S.D.로 나타내었다. 유의성 검증은 Student's *t*-test를 실시하였으며 실험군 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 HA의 분자량크기에 따른 Hs68 섬유아세포에 대한 독성 평가

HA의 분자량(1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa) 및 농도(0.2, 0.5, 및 1%)에 따른 Hs68 섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 EZ cytox kit을 이용하였다. 0.2, 0.5, 및 1%의 1 kDa의 HA를 처리하였을 때 대조군과 비교하여 세포 생존율이 각각 12, 11, 9% 감소하였고 10 kDa의 HA를 처리하였을 때는 세포 생존율이 각각 14, 14, 10% 감소하였다. 한편, 50, 100, 660 및 1500 kDa의 HA를 농도별로 처리하였을 때, 5% 내외의 미미한 세포 생존율 감소를 나타냈다(Figure 2). 따라서 저분자에서 약 10% 내외의 세포독성을 나타냈으나, 전반적으로는 분자량에 상관없이 세포독성은 미미하거나 없는 것으로 나타났다.

3.2 HA의 분자량 크기에 따른 섬유아세포의 콜라겐 합성능 평가

콜라겐은 피부를 구성하는 주요 단백질로, 섬유아세포에서 콜라겐 합성은 피부 세포의 결합조직의 탄력과 주름에 직접적인 영향을 미친다[17]. 콜라겐은 pro-collagen이라는 전구물질의 형태로 합성되며 말단에 프로펩티드 염기서열을 포함하고 있는데, 콜라겐 중합반응이 일어날 때 말단의 프로펩티드가 절단, 분리되어 콜라겐 분자의 folding을 도와 합성을 도와준다고 알려져 있다. 따라서 프로펩티드의 양을 측정함으로써 콜라겐 생합성 정도를 측정할 수 있다[29,30].

염증성 사이토카인인 TNF- α 를 처리하여 콜라겐의 분해를 유도하고, 0.2%의 HA를 처리하여 분해된 콜라

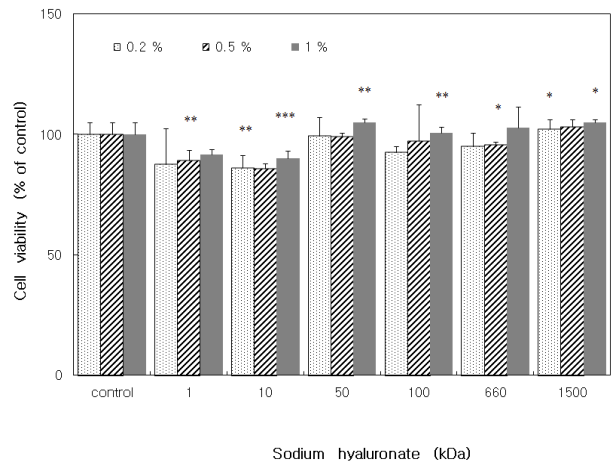


Figure 2. The cytotoxic effects of HA with various molecular weights (1, 10, 50, 100, 660, 1500 kDa). Hs68 cells, seeded at 10⁴ cells/well, was incubated in a 96-well plate at 37 °C. After 24 h, cells were treated with several concentrations of various molecular weights (1, 10, 50, 100, 660, 1500 kDa) cultured for 24 h. Then cytotoxic effects were measured as described in EZ cytox kit. The results were expressed as the percentate of the control and values represented the mean \pm S.D. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, versus untreated control).

겐의 회복능을 측정하였다. 그 결과 TNF- α (20 ng/mL)만 처리한 대조군은 아무것도 처리하지 않은 untreated control과 비교한 결과 콜라겐 생합성이 20% 감소하였다. 한편, TNF- α (20 ng/mL)만 처리한 대조군과 비교하여, 1 kDa의 HA과 동시에 처리한 군은 38%, 10 kDa의 HA을 처리한 경우는 53%, 50 kDa의 HA을 처리한 경우는 50%, 100 kDa의 HA을 처리한 경우는 35%, 660 kDa의 HA을 처리한 경우는 48%, 1500 kDa의 HA을 처리한 경우는 59%의 콜라겐 생합성 증가로 HA의 분자량이 커질수록 콜라겐 생합성 정도가 증가하는 경향을 나타냈다(Figure 3). Park 등의 연구에 의하면 11.5 ~ 1500 kDa의 HA에서 콜라겐 생합성을 증가시켜 우리의 결과와 일치하는 양상을 보였다[31].

3.3 HA의 분자량 크기에 따른 인공피부 투과 실험

HA의 분자량 크기에 따른 인공피부 투과율을 12 h 까지 시간에 따라 정량 분석하여 피부를 투과한 HA의 양은 Figure 4와 같다. 0.2%의 660 및 1500 kDa HA의 시간에 따른 피부 투과도는 처리하기 전에 비해 2% 미만으로 투과율이 미미한 반면, 100 kDa 이하의 HA은

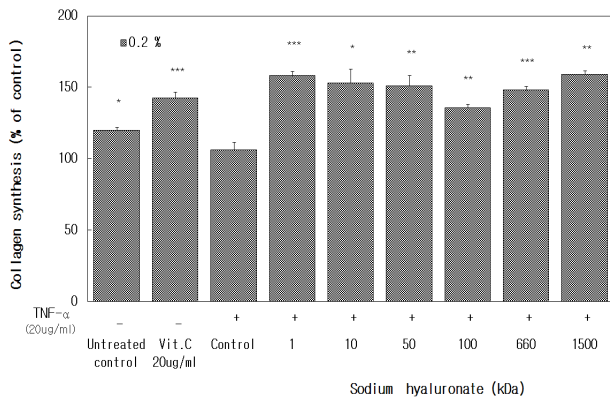


Figure 3. Collagen synthesis effects of sodium hyaluronate with various molecular weights (1, 10, 50, 100, 660, 1500 kDa) Hs68 cells seeded at 5×10^4 cells/well, was incubated in a 96-well plate at 37°C . After 24 h, cells were TNF- α -treated with several concentrations of various molecular weights (1, 10, 50, 100, 660, 1500 kDa) cultured for 24 h. Then collagen synthesis effects were measured as described in procollagen type I C-peptide (PIP). The Results were expressed as the percentate of the untreated control and values represented the mean \pm S.D. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, versus control (TNF- α 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)).

모두 시간이 지남에 따라 인공피부 투과율이 현저히 증가하였다. 100 kDa 이하의 HA는 모두 시간이 지남에 따라 인공피부 투과율이 현저히 증가하였다. 그중 가장 높은 투과율을 보인 HA는 분자량 1 kDa의 HA으로 1, 2, 4, 8, 및 12 h에 측정된 피부 투과량이 처리하기 전에 비해하여 26, 53, 62, 69 및 87%로 증가하였고, 다음으로 높은 투과율을 보인 HA는 분자량 10 kDa의 HA으로 나타났다. 10 kDa의 HA는 시간이 지남에 따라 25, 51, 55, 64 및 75%로 인공피부 투과율이 증가하였다. 그 외에 50 kDa HA의 피부 투과율은 처리하기 전에 HA 투과율에 비교하여 시간에 지남에 따라 24, 41, 55, 57 및 76%로 증가하였고, 100 kDa의 HA는 시간이 지남에 따라 23, 33, 36, 37 및 50%로 인공피부 투과율이 증가하였다.

저분자 HA의 높은 피부 투과율은 이미 보고된 바가 있다. M. Essendoubi에 의하면 Franz cell (300 μL , 8 h/ 32°C)을 이용하여 HA의 농도를 1%로 하고, 1000 ~ 1400 kDa, 100 ~ 300 kDa, and 20 ~ 50 kDa 피부 투과도를 Raman spectroscopy으로 측정된 결과 HA의 분자량이 감소할수록 피부 투과율이 증가하였다는 보고가

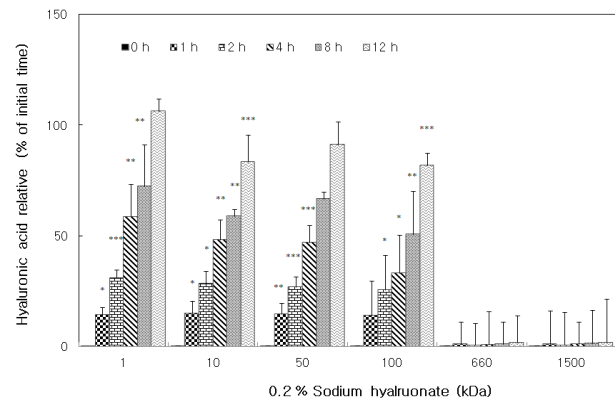


Figure 4. Comparison of percutaneous permeation of 0.2% low molecular weight HA (1, 10, 50, 100 kDa) and 0.2% high molecular weight HA (660, 1500 kDa) through a constructed artificial skin. The contents of high molecular weight HA and low molecular weight HA in PBS permeation were measured (0, 1, 2, 4, 8 h and 12 h) by hyaluronic acid ELISA kit. The results were expressed as the percentate of the initial time and values represented the mean \pm S.D. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus initial time).

있다[55]. Kim 등에 따르면 1,100 kDa의 HA의 투과율을 인공피부를 이용하여 조사한 결과, 1.2%의 미미한 투과율을 보인 반면, 5 kDa 이하의 HA는 90.52%의 높은 투과율을 나타냈다[8]. 또한 Farwick 등에 따르면 300 kDa의 HA에 비교하여 50 kDa의 HA이 3배 이상 더 높은 투과율을 보인다고 보고하였다[32]. 그러나 위 보고들은 생체에서 얻은 피부조직을 사용하지 않았고, 방사선 동위원소를 사용하여 간접적으로 확인한 결과이며 본 실험은 최초로 인공피부를 이용하여 직접적인 HA의 피부투과도를 측정하였으므로 큰 의의가 있다.

한편, 저분자 HA는 높은 피부 투과도와 함께 보습 효력 역시 뛰어나다고 알려져 있다[8]. HA는 분자량이 커지면 점성과 탄성이 커지는 특징이 있지만, 진피층을 통과하지 못하는 반면, 저분자 HA는 피부 안쪽으로 흡수되어 자체 친수성기에 의해 수분을 흡착하여 고분자 HA과 비슷한 보습효력을 나타낸다고 보고되어 있다[8]. 따라서 본 실험에 사용된 저분자 HA (1, 10, 50, 및 100 kDa)은 피부 장벽을 통과하여 기저층을 지나 피부 안쪽까지 흡수가 가능하고 흡수된 저분자 HA는 수분을 흡착하여 보습 효과가 뛰어날 것으로 기대된다.

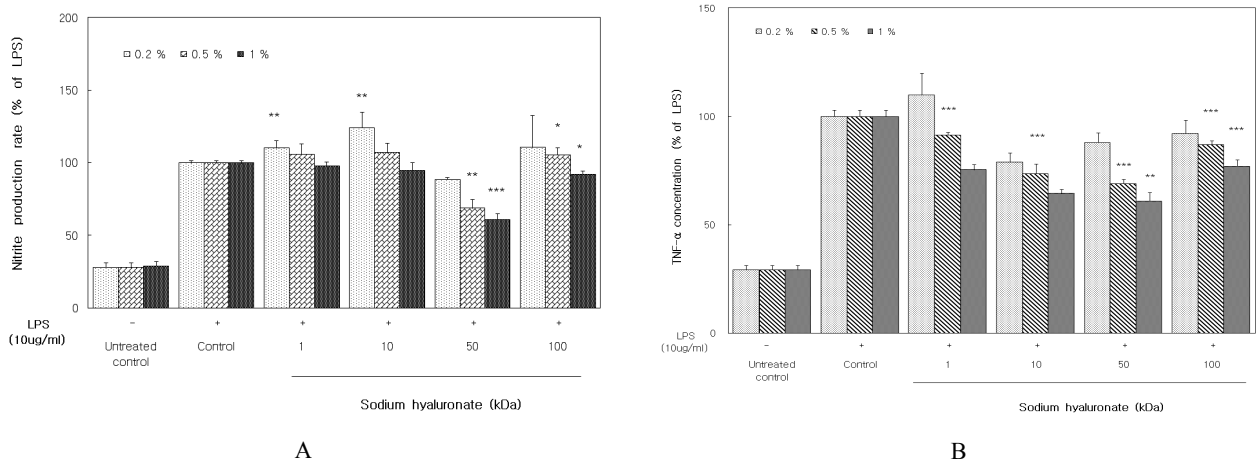


Figure 5. Anti-inflammatory effects of sodium hyaluronate with various molecular weights (1, 10, 50, 100 kDa) on the LPS-induced RAW 264.7 cells. (A) Effects of sodium hyaluronate with various molecular weights (1, 10, 50, 100 kDa) on the NO production in the RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells seeded at 10^4 cells/well, was incubated in a 96-well plate at 37 °C. After 24 h, cells were 10 μ g/mL LPS treated with several concentrations of various molecular weights (1 kDa, 10 kDa, 50 kDa, 100 kDa HA) cultured for 24h. Then anti-inflammatory effects were measured as described in Griess reagent. The results were expressed as the percentage of the untreated control and values represented the mean \pm S.D. (** p < 0.01, *** p < 0.001 versus control (LPS 10 μ g/mL)). (B) Effects of sodium hyaluronate with various molecular (1, 10, 50, 100 kDa) weights on the TNF- α production in the RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells seeded at 10^4 cells/well, was incubated in a 96-well plate at 37 °C. After 24 h, cells were 10 μ g/mL LPS treated with several concentrations of various molecular weights (1, 10, 50, 100 kDa) cultured for 24 h. Then TNF- α production effects were measured as described in immunosorbent assay. The results were expressed as the percentage of the untreated control and values represented the mean \pm S.D. (p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, versus control (TNF- α)).

3.4. HA의 분자량 크기에 따른 RAW 264.7에 대한 항염증 효능

내재적 요인에 의한 피부노화는 주로 세포 내 염증 반응에 의해 일어나며 콜라겐 분해, HA 사슬의 절단 및 DNA 변이 축진을 유발하여 진피조직의 성분을 변화 시키는 것으로 보고되어 있다[22]. 따라서 염증 억제제를 통한 주름 개선용 물질을 찾고자 하는 노력이 증가하는 추세이며, 그중 HA는 활성산소 제거, 지질과산화물 생성억제, hydroxyl 라디칼 및 diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, 그리고 macrophage의 phagocytic ability 저해를 통한 항염증 작용이 보고된 바가 있다[16,33-35]. 따라서, 본 연구에서는 hyaluronidase를 처리하여 분자량 크기별로 제조한 HA의 항염증 효능을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도하고, 동시에 HA를 처리하여 산화질소 및 TNF- α 의 생성량에 미치는 영향을 조사하였다.

산화질소(NO)는 강력한 염증 유도 인자로서, 병원에 의한 감염에 노출되었을 때 병원체 사멸을 위해 대

식세포(macrophage)에서 iNOS (inducible nitric oxide synthase)와 같은 효소에 의해 생성된다. 그러나 NO의 과생성은 산화독성을 유발해 염증을 유발하여 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다[36-38]. 따라서 피부 투과도가 미미한 고분자 HA (660 및 1500 kDa)을 제외하고 100 kDa 이하의 HA를 이용하여 NO 생성 억제능을 평가한 결과, LPS (10 μ g/mL)와 함께 100 kDa의 HA 0.2 및 0.5%를 처리한 군은 LPS만 처리한 대조군과 비교하여 NO 합성량이 각각 10.5 및 5% 증가율을 보였다. 반면에 50 kDa의 HA를 처리한 군은 가장 높은 NO 생성 저해율을 보였는데, 50 kDa의 HA 0.2, 0.5, 및 1%를 처리한 군은 12, 32, 및 40%의 높은 NO 생성 저해율로 처리한 농도에 비례하여 항염증 효과를 보였다. 한편 1 kDa의 HA를 처리한 군은 NO 생성에 영향을 미치지 않았다는 결과가 나타났다(Figure 5A).

한편, 분자량 크기에 따른 HA가 TNF- α 생성량에 어떤 영향을 미치는지 RAW 264.7세포를 이용하여 조사하였다. TNF- α 는 강력한 염증성 사이토카인으로, 염증 반응 초기에 다량으로 생성되어 염증 반응을 촉

진하는 것으로 알려져 있다[39]. 100 kDa 이하의 HA를 이용하여 TNF- α 생성량을 측정한 결과, LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 1 kDa의 HA 0.2%를 처리한 군은 대조군과 비교하여 TNF- α 생성량이 10% 증가하였고, NO 생성량 측정 결과와 일치하였고, 100 kDa의 HA 0.2, 0.5 및 1%를 처리한 군은 LPS만 처리한 대조군과 비교하여 TNF- α 생성량이 각각 8, 13 및 23% 저해하였다.(Figure 5B).

TNF- α 는 면역반응 초기에 분비되는 강력한 염증 유발 사이토카인으로 다른 염증성 사이토카인의 발현을 유도하고 면역세포를 활성화시켜 다양한 병리생리학 과정에 관여한다고 알려져 있다[40]. 특히 최근 연구에 따르면 TNF- α 를 선택적으로 제거한 쥐는 류마티스 관절염과 같은 해로운 자가면역질환이 발현되지 않았으며, 쥐의 대식세포에 TNF- α 의 발현을 임의로 억제시킬 경우 *Listeria monocytogenes*에 쉽게 감염되는 경향을 보였다[41,42]. 따라서 TNF- α 는 면역 및 염증반응에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 반면, NO는 병원체의 외부 침입에 대표로 발현되어 병원체를 공격하는 것으로 알려져 있지만, NO 생성이 염증 유발의 유일한 반응은 아니기 때문에 NO와 무관하게 염증반응이 일어나기도 한다. 예를 들면, 혈청 내의 옴소닌(opsonin)화 된 zymosan의 식균작용은 NO가 아닌 다른 과산화물에 의해 유도되며, RAW 264.7에서 면역반응을 유발하는 인삼박 올리고머는 NO생성에는 영향을 미치지 않지만 TNF- α 의 발현을 급격히 유도하여 작용하는 것으로 알려져 있다[43,44]. 따라서 본 실험에 사용된 1 kDa HA 또한 NO생성에는 영향을 미치지 않고, 면역 및 염증반응에 가장 중요한 인자인 TNF- α 의 생성을 급격히 증가시켜 대식세포 내 염증반응을 유도하는 것으로 보인다.

1 및 100 kDa의 HA 외에 50 kDa의 HA를 처리한 군은 가장 높은 TNF- α 생성 저해율을 보이며 항염증 효과를 나타냈다. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS와 함께 50 kDa의 HA 함량을 0.2, 0.5, 및 1%를 처리한 군은 12, 31 및 39%의 높은 TNF- α 생성 저해율을 나타냈고, 10 kDa의 HA를 처리한 군 또한 21, 26 및 36%의 높은 TNF- α 생성 저해율을 나타냈다(Figure 5B). 이는 앞서 언급한 NO 생성 저해율 측정 결과와 일치하였으며, 결론적으로 LPS를 처리한 마우스 유래 대식세포(RAW 264.7)에 대해 50 kDa의 HA의 농도 의존적이며 강력한 항염증 효능

을 나타냄을 확인할 수 있었다.

따라서 50 kDa의 HA이 피부주름을 유도하는 염증 반응을 효과적으로 억제시킴으로써 콜라겐 분해 및 DNA 변이를 억제하고 결과적으로 피부 노화를 지연시키는 효과가 있을 것으로 판단되며, 따라서 이들 저분자 HA이 피부 개선용 화장품 조성물로서 활용될 가능성을 확인하였다.

4. 결 론

HA은 피부진피의 3대 구성성분 중 하나로 세포성장, 분열, 수분유지에 영향을 미쳐 피부의 보습과 탄력을 유지시켜주는 역할을 하며 노화에 따라 그 양이 감소하며 피부 건조와 주름을 유발한다. 따라서 피부에 HA의 생합성을 촉진 시키거나, 인위적으로 HA을 투여함으로써 피부노화의 방지 및 주름 문제를 개선할 수 있을 것이다. 그러나 HA을 피부에 적용할 시, 분자량이 큰 HA은 진피층을 통과하지 못하는 문제점이 있어, 독성이 없고 피부 투과도가 높은 HA을 개발할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 고분자 HA으로부터 hyaluronidase 효소 분해를 통해 다양한 사이즈의 HA (1, 10, 50, 100, 660, 및 1500 kDa)을 제조하였고 콜라겐 합성능, 항염증능, 및 특히 피부투과도를 비교하였다.

이들 HA은 사람 피부 섬유아세포인 Hs68에 독성이 없는 것을 확인하였으며, 콜라겐 합성능을 측정한 결과, 분자량 크기가 증가함에 따라 콜라겐 합성률이 증가하는 것을 확인하였다. Franz diffusion cell system을 이용하여 시간에 따른 인공피부 투과율을 측정한 결과 600 및 1500 kDa의 HA은 전혀 투과하지 못한 반면, 상대적으로 저분자인 1, 10, 50, 및 100 kDa의 HA은 시간이 지남에 따라 투과율이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 피부노화에 직·간접적 영향을 미치는 염증반응에 대한 HA의 항염증 효능을 RAW 264.7 세포를 이용하여 조사한 결과, 50 kDa의 HA이 LPS에 의해 유도된 NO 및 TNF- α 의 생성을 감소시켜 가장 높은 항염증 효능을 보였다.

따라서 이러한 연구결과는 50 kDa의 HA가 사람 피부세포에서 콜라겐 합성을 증진시키고, 피부 투과율이 높으면서 뛰어난 항염증 효능을 가지므로 피부 주름을 유발하는 콜라겐 및 HA의 감소와 염증반응을 억제함

으로써 피부노화 및 주름 개선용 화장품소재로 개발될 수 있는 가능성을 제시하였고, HA 분자량의 크기를 효소(hyaluronidase)에 의해 제조된 50 kDa의 HA에 대해서 collagen의 합성, 항염증 및 피부 흡수도를 종합적인 평가를 한 사례는 없으며 그 의의가 있다.

Reference

1. J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, and J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet. Med.*, **53**(8), 397 (2008).
2. S. I. Lamberg and A. C. Stoolmiller, Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review, *J. Invest. Dermatol.*, **63**(6), 433 (1974).
3. R. Tammi, J. A. Ripellino, R. U. Margolis, and M. Tammi, Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe, *J. Invest. Dermatol.*, **90**(3), 412 (1988).
4. J. H. Poulsen and M. K. Cramers, Determination of hyaluronic acid, dermatan sulphate, heparan sulphate and chondroitin 4/6 sulphate in human dermis, and a material of reference, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **42**(7), 545 (1982).
5. R. Fleischmajer, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glycosaminoglycans and aging, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **279**(2), 265 (1972).
6. Y. Tokita and A. Okamoto, Hydrolytic degradation of hyaluronic acid, *Polym. Degrad. Stab.*, **48**(2), 269 (1995).
7. J. A. Alkrad, Y. Mrestani, D. Stroehl, S. Wartewig, and R. Neubert, Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-vis spectroscopies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**(3), 545 (2003).
8. K. H. Kim, K. T. Kim, Y. H. Kim, G. Kim, C. S. Han, S. H. Park, and B. Y. Lee, Preparation of oligo hyaluronic acid by hydrolysis and its application as a cosmetic ingredient, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(3), 189 (2007).
9. Y. S. Soh, Hyaluronic acid ; properties and applications, *Polym. Kor.*, **12**(6), 484 (1988).
10. A. Sattar, P. Rooney, S. Kumar, D. Pye, D. C. West, I. Scott, and P. Ledger, Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin, *J. Invest. Dermatol.*, **103**(4), 576 (1994).
11. J. Courtois, Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology, *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**(3), 261 (2009).
12. N. Motohashi, Y. Nakamichi, I. Mori, H. Nishikawa, and J. Umemoto, Analysis by high performance gel permeation chromatography of hyaluronic acid in animal skins and rabbit synovial fluid, *J. Chromatogr. A*, **435**(2), 335 (1988).
13. H. Bothner, T. Waaler, and O. Wik, Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation, *Int. J. Biol.*, **10**(5), 287 (1988).
14. B. G. Park, C. W. Lee, J. W. Park, Y. Cui, Y. S. Park, and W. S. Shin, Enzymatic fragments of hyaluronan inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**(4), 623 (2015).
15. C. W. Lee, J. Y. Seo, J. W. Choi, J. Lee, J. W. Park, J. Y. Lee, K. Y. Hwang, Y. S. Park, and Y. I. Park, Potential anti-osteoporotic activity of low-molecular weight hyaluronan by attenuation of osteoclast cell differentiation and function *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **449**(4), 438 (2014).
16. P. Ghosh, The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid, *Clin. Exp. Rheumatol.*, **12**(1), 75 (1994).
17. M. Brincat, S. Kabalan, J. W. Studd, C. F. Moniz, J. de Trafford, and J. Montgomery, A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman, *Obstet. Gynecol.*, **70**(6), 840 (1987).
18. B. A. Gilchrest and M. Yaar, Ageing and photo-

- ageing of the skin: observations at the cellular and molecular level, *Br. J. Dermatol.*, **127**(41), 25 (1992).
19. M. Inui, M. Ooe, K. Fujii, H. Matsunaka, M. Yoshida, and M. Ichihashi, Mechanisms of inhibitory effects of CoQ10 on UVB-induced wrinkle formation *in vitro* and *in vivo*, *Biofactors*, **32**(1), 237 (2008).
 20. D. C. Shin, G. C. Kim, S. Y. Song, H. J. Kim, J. C. Yang, Y. H. Lee, and B. A. Kim, Antiaging activity of mixed extracts from Korean medicinal herbs on HS68 skin fibroblast. *Korea J. Herbol.*, **29**(2), 39 (2014)
 21. L. Ritti and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
 22. R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress-new approaches for their evaluation, *Biomed. Pharmacother.*, **53**(4), 181 (1999).
 23. S. K. Katiyar, F. Afaq, A. Perez, and H. Mukhtar, Green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress, *Carcinogenesis*, **22**(2), 287 (2001).
 24. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**(1), 55 (1983).
 25. G. W. Lee, S. M. Park, Y. C. Yoo, and Y. H. Cho, Effect of *Ponciri fructus* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on the collagen synthesis and expression of matrix metalloproteinase-1, *KSBB Journal*, **28**(2), 106 (2013).
 26. G. S. Lee, D. H. Lee, K. B. Kim, H. J. Ko, and H. B. Pyo, Synergistic effects of n-methyl-2-pyrrolidone on skin permeation of a hydrophobic active ingredient, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **36**(2), 115 (2010).
 27. S. N. Park, M. S. Lim, M. A. Park, S. S. Kwon, and S. B. Han, Transdermal delivery of quercetin using elastic liposomes: preparation, characterization and *in vitro* skin permeation study, *Polym. Kor.*, **36**(6), 705 (2012).
 28. M. H. Yeom, J. Y. Lee, J. S. Kim, C. W. Park, D. H. Kim, and H. K. Kim, The anti-aging effects of Korean ginseng berry in the skin, *Kor. J. Pharmacogn.*, **41**(1), 26 (2010).
 29. A. M. Parfitt, L. S. Simon, A. R. Villanueva, and S. M. Krane, Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase, *J. Bone Miner. Res.*, **2**(5), 427 (1987).
 30. H. S. Talwar, C. E. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees, Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **105**(2), 285 (1995).
 31. H. K. Hong, S. K. Lee, Y. S. Song, D. S. Kim, S. Eom, H. E. Kim, D. W. Lee, and G. S. Khang, Biodisc regeneration using annulus fibrosus cell with hyaluronic acid impregnated small intestinal submucosa sponge, *Polym. Kor.*, **34**(3), 282 (2010).
 32. M. Farwick, P. Lersch, and G. Strutz, Low molecular weight hyaluronic acid: its effects on epidermal gene expression & skin ageing, *SOFW Journal*, **134**(11), 17 (2008).
 33. F. Wang, L. A. Garza, S. Kang, J. Varani, J. S. Orringer, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, *In vivo* stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin, *Arch. Dermatol.*, **143**(2), 155 (2007).
 34. C. Ke, L. Sun, D. Qiao, D. Wang, and X. Zeng, Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid, *Food Chem. Toxicol.*, **49**(10), 2670 (2011).
 35. D. B. Lyle, J. C. Breger, L. F. Baeva, J. C. Shallcross, C. N. Durfor, N. S. Wang, and J. J. Langone, Low molecular weight hyaluronic acid effects on murine macrophage nitric oxide production, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **94**(3), 893 (2010).
 36. D. L. Duval, D. R. Miller, J. Collier, and R. E. Billings, Characterization of hepatic nitric oxide synthase: identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants, *Mol. Pharmacol.*, **50**(2), 277 (1996).

37. T. Lawrence, D. W. Gilroy, P. R. Colville-Nash, and D. A. Willoughby, Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation, *Nat. Med.*, **7**(12), 1291 (2001).
38. I. Huk, V. Brovkovich, J. Nanobash Vili, G. Weigel, C. Neumayer, L. Partyka, S. Patton, and T. Malinski, Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study, *Br. J. Surg.*, **85**(8), 1080 (1998).
39. G. S. Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders, *Nature*, **444**(7121), 860 (2006).
40. W. Fiers, Tumor necrosis factor characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level, *FEBS Letters*, **285**(2), 199 (1991).
41. B. B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nat. Rev. Immunol.*, **3**(9), 745 (2003).
42. P. Lacy and J. L. Stow, Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways, *Blood*, **118**(1), 9 (2011).
43. J. Y. Seo, C. W. Lee, D. J. Choi, J. Lee, J. Y. Lee, and Y. I. Park, Ginseng marcerderived low molecular weight oligosaccharide inhibits the growth of skin melanoma cells via activation of RAW 264.7 cells, *Int. Immunopharmacol.*, **29**(2), 344 (2015).
44. J. S. Kim, H. Y. Kwon, W. H. Choi, C. Y. Jeon, J. I. Kim, J. Kim, J. Y. Lee, Y. S. Kim, and J. B. Park, Phagocytosis of serum and IgG-opsonized zymosan particles induces apoptosis through superoxide but not nitric oxide in macrophage J774A.1, *Exp. Mol. Med.*, **35**(3), 211 (2003).
55. M. Essendoubi, C. Gobinet, R. Reynaud, and J. F. Angiboust, M. Manfait, and O. Piot, Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy, *Skin Res. Technol.*, **22**(1), 55 (2016).
56. Korea, 1,020,110,031,094 (2011).
57. S. I. Kim, J. Y. Na, K. B. Song, D. S. Choi, J. H. Kim, Y. B. Kwon, and J. Kwon, Protective effect of ginsenoside Rb1 on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in rat articular chondrocytes, *J. Ginseng Res.*, **36**(2), 161 (2012).
58. P. Chabreck, L. Soltes, Z. Kallay, and I. Novak, Gel permeation chromatographic characterization of sodium hyaluronate and its fractions prepared by ultrasonic degradation, *Chromatographia*, **30**(3), 201 (1990).