

Adenophorae Radix 뿌리 추출물에 의한 Keratinocyte의 분화 및 피부장벽 기능에 대한 연구

남 개 원*†

서원대학교 화장품학부, *글로벌피부임상센터
(2017년 11월 6일 접수, 2017년 11월 17일 수정, 2017년 11월 19일 채택)

Study on Keratinocyte Differentiation and Skin Barrier Function of *Adeonphorae Radix* Root Extracts

Gaewon Nam*†

Department of Cosmetics, Seowon University, 377-3 Musimseoro, Seowon-gu, Cheongju-city, Chungbuk-do 28674, Korea
*Global Skin Research Center, Chungbuk-do 28674, Korea

(Received November 6, 2017; Revised November 17, 2017; Accepted November 19, 2017)

요약: Triterpenoid, saponin, 전분 등이 함유되어 있는 것으로 알려진 *Adenophorae radix* (*A. radix*)의 뿌리 추출물을 이용하여 각질형성세포의 분화와 피부장벽기능에 대한 연구를 수행하였다. *A. radix*의 뿌리 추출물은 CV-1 세포를 이용하여 PPAR α 발현을 살펴본 결과, Wy-14,643 0.5-1.0 μ M 수준의 발현양을 나타내었다. 인체 각질형성 세포주(HaCaT)와 각질형성세포(normal human keratinocyte)에 대한 각질형성능(cornified envelop formation, CE)은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다. HaCaT 세포에 *A. radix*의 뿌리 추출물 처리하였을 때, transglutaminase (TGase-1)의 유의적 증가를 보였다. *A. radix*의 뿌리 추출물을 함유한 간단한 화장품 제형을 약 2주간에 걸쳐 임상시험을 실시한 결과, TEWL의 유의적 감소와 수분량의 증가를 살펴볼 수 있었으며, 하박 내측에서 지질을 추출하여 세라마이드를 분석한 결과 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 있었다. 이를 통하여 *A. radix*의 뿌리 추출물을 건조피부나 아토피 등의 피부질환과 관련된 질환의 예방 및 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

Abstract: We have studied on the keratinocytes differentiation and skin barrier function using *Adenophorae radix* (*A. radix*) root extract, which was known to contain triterpenoid, saponin and starch. *A. radix* root extracts showed the PPAR α expression level of Wy-14,643 0.5-1.0 μ M in CV-1 cells. The cornified envelop formation (CE) of human keratinocyte cell line (HaCaT) and normal human keratinocyte (NHK) showed a statistically significant increased compared to the control. When HaCaT cells were treated with *A. radix* root extract, transglutaminase (TGase-1) was significantly increased. As a result of clinical study of the simple cosmetic formulation containing *A. radix* root extract for about 2 weeks, TEWL values were significantly decreased and water contents were increased. The ceramides, which were obtained from the inner forearm, were also significantly increased statistically. We suggest that the *A. radix* root extract can be used as a preventive and therapeutic agent for skin diseases such as dry skin and atopy.

Keywords: *Adenophorae Radix* root extract, keratinocyte differentiation, skin barrier function, PPAR α , cornified envelope and ceramide

1. 서 론

피부, 즉 스킨은 건조를 방지하는 중요한 방어 조직이다. 건조를 방지하기 위하여 피부 가장 바깥층인 표피는 얇아야 하고, 내부 수분을 유지할 수 있는 층인 각질층으로 분화되는 과정을 겪어야 한다. 가장 안쪽에 있는 기저층은 분화되지 않은 epidermal stem cell을 포함하고, 기저막에서 떨어져 나가 위층으로 올라가면서 분화가 시작되며, 그 조직들을 통과하는 동안 생화학적 변화를 겪게 되는데, 대표적으로 각질층이 형성된다[1]. 이에 관여하는 인자로는 transglutaminase-1 (TGase-1)의 작용으로 각질이 형성되며, 이를 각질 형성능(cornified envelope formation) 분석으로 알려져 있다. 더 나아가 핵 호르몬 수용체 중의 하나인 peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α)의 특이적인 리간드는 각질 형성세포의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다[2-4].

각질층은 건강하고 아름다운 피부를 유지함에 있어서 매우 중요하다. 그중에서도 특히 중요한 기능은 수분의 보유와 증발을 방지하는 기능이다. 피부가 노화되면 각질층의 기능이 저하되어 피부가 건조하게 되고 또한 주름살의 형성을 조장하게 된다. 각질층의 이러한 기능은 천연보습인자와 각질세포사이의 지질에 의존하기 때문에 기초화장품으로써 각질층의 이러한 기능을 향상시키는 것은 매우 중요하다 할 수 있다.

Adenophorae Radix (*A. radix*)는 사삼 또는 잔대라고 알려져 있으며, 초롱꽃과에 속하는 오래살이 풀로써 전국의 어디에서나 자생하며 주로 양지바른 산기슭에서 자라고 있다. 키는 40-120 cm 정도 되며 식물체 전체에 잔털이 있다. *A. radix*는 칼슘과 비타민 A와 C가 풍부한 우수한 식품으로 뿌리의 주성분은 더덕, 도라지와 같은 saponin으로 예로부터 한약명으로 사삼, 백사삼, 남사삼이라하여 진해, 거담, 강장제로 그리고 폐를 맑게 하고 중기 치료에도 효과가 있다고 한다. 이외에도 *A. radix*의 뿌리는 한방에서 해독 및 제염제로 사용하며 기존의 잔대 성분 동정 연구에 의하면 triterpenoid, saponins, syringinose, shashenoside I, II, daucosterol과 전분 등이 함유되어 있다[5].

본 연구에서는 *A. radix* 뿌리 추출물을 이용하여, PPAR α 의 발현 및 TGase-1, 각질 형성능을 통하여 분화 효과를 연구하고자 한다. 그리고 한국인을 대상으

로 *A. radix* 뿌리 추출물을 함유한 외용제를 사용하여 피부장벽기능을 살펴봄으로써, 건조 피부나 아토피와 같은 피부고민에 대하여 건조함을 개선할 수 있는 원료로 개발하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. *A. Radix* 뿌리 추출물 제조

잘게 자른 건조된 *A. radix* 뿌리 500 g 기준으로 3차 증류수 3 L에 4 h 끓인 후, 거름 종이로 걸러 추출하였다. 그 후 동결 건조하여 파우더를 얻었다.

2.2. Cell Culture

인체 각질형성 세포주인 HaCaT세포와 인체 각질형성 세포인 normal human keratinocyte (NHK), monkey kidney 상피 세포주인 CV-1 세포(ATCC CCL 70)를 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)와 1% penicillin/streptomycin (p/s, Sigma, USA)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다[6-8].

2.3. MTT Assay

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 이용하여 HaCaT 세포 독성평가를 확인하였다. HaCaT 세포는 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하여 60-80%까지 배양하였다. 무혈청 배지에 *A. radix* 뿌리 추출물의 다양한 농도별로 희석하여 24 h 동안 처리한 후, 배지를 모두 제거하고 0.5 mg/mL MTT용액을 각 well에 첨가하고 3 h 동안 37 °C에 반응시켰다. 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)로 녹이고 ELISA reader (BioTek Instruments Inc, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. PPAR α Expression

CV-1세포를 charcoal/dextran treated 10% FBS를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA) 배지에 배양하였고 phenol red-free 배지를 사용하였다. Plasmid는 일반 조건에서 발현되는 PPAR- α 유전자를 지닌 것(PPRE (PPARs response element)를 promoter로, firefly luciferase 유전자를 지닌 것을 reporter로, reference로서 *renilla* luciferase 유전자가 결합

된 plasmid가 사용되었다[9,10].

CV-1 세포를 9×10^4 cells/well 농도로 24 h 배양 후 세 종류의 plasmid 유전자를 TransFast™ transfection reagent (Promega, Germany)를 사용하여 transient transfection 하였다. 이후 24 h 배양 후 phosphate buffered saline (PBS, Sigma, USA) washing 후 *A. radix* 뿌리 추출물을 농도별로 처리하여 24 h 배양한 뒤 PBS로 washing 후 Passive Lysis Buffer (PLB, Sigma, USA)로 세포를 lysis하여 Dual-Luciferase® reporter assay system kit (Promega, Germany)를 사용하여 추출물과 reference의 luciferase activity를 측정하였다[11].

2.5. Transglutaminase-1 (TGase-1) Expression

배양 배지 내의 TGase-1 발현을 ELISA를 통해 분석하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 분주하여 70-80% 배양 후, 여러 농도의 *A. radix* 뿌리 추출물을 배지에 희석하여 처리하였다. 48 h 배양 후, 배지를 제거한 후, -20 °C와 상온으로 freeze-thawing을 2회 반복 실시하였다. 세포를 -20 °C ethanol/acetone (1/1, v/v)을 투여하여 plate에 고정 시킨 후, 4 °C에서 30 min간 반응 후, 실온에서 자연증발 시켰다. 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA)로 blocking 한 후, TGase-1-specific monoclonal antibody B.C1 (Biomedical technologies, USA)를 37 °C, 1 h 배양하였다. 0.05% Tween-20 (Sigma, USA)을 함유한 PBS로 3회 세척 후 horseradish peroxidase (HRP, abcam, UK)가 결합된 이차항체를 1 h 처리하였다. TGase-1의 양은 *o*-phenylenediamine (OPD, Sigma, USA) 기질과의 반응으로 정량하였으며, 정량에는 490 nm 흡광도에서 ELISA reader를 사용하여 측정하였다[12-15].

2.6. Cornified Envelope (CE) Formation

배양 배지내의 각질 형성능(cornified envelope formation, CE)을 살펴보기 위해, HaCaT 세포와 NHK를 100 mm dish에 분주하여, 70-80% 배양 후, 여러 농도의 *A. radix* 뿌리 추출물을 배지에 희석하여 처리하였다. 5 day 배양 후, 배지를 제거한 후, Trypsin-EDTA (Sigma, USA) 용액으로 세포를 떼어낸 후, 5,000 rpm 원심분리하여 상등액을 제거하였다. PBS로 희석하여 단백질 양을 측정한 후, 3 min 간 초음파 분쇄하였다. 5 min 간 boiling 후, 13,000 rpm 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이를 2회 반복한 후, 340 nm에서 흡광

도를 측정하였다[16,17].

2.7. 임상 시험

총 12명의 건강한 성인(20-35세, 남성 5명, 여성 7명)을 대상으로 참여의사 확인서를 받은 후, 시험에 참여하였다. 1%의 *A. radix* 뿌리 추출물을 임상시험에 사용하고, 단순한 외용제 제조를 실시하였다. 대조군의 성분은 정제수에 0.5% carbopol ETD 2020 (Lubrizol, USA)와 triethanolamine (TEA, Sigma, USA) 1%를 첨가하여 사용하였다. 총 11일간 피험자의 하박 내측에 제품을 도포하여 시험을 실시하였으며, 시험 수행기간동안 하박 내측에 병리학적 증상을 보이지 않았으며, 어떠한 국소 도포 제품도 사용하지 않았다. 이 연구에 대하여, 학교 내 임상윤리심의위원회(IRB, international review board)의 허가를 득하여 수행하였다.

2.7.1. 보습 임상 시험

제품에 대한 보습관련 효과를 보기위하여, 경피수분손실량(TEWL, trans epidermal water loss)과 피부수분량을 측정하였다. 경피수분손실량은 Vapometer® (delfin, Finland)으로, 피부수분량은 Corenometer® (CM825, Germany)을 이용하여 측정하여 분석하였다.

2.7.2. 세라마이드 분석

제품에 대한 피부에서 세라마이드 분석을 위하여, 하박 내측에 지질추출을 실시하였고, 분석을 위한 시약은 모두 Sigma (USA)에서 구입하였다. 1 mL cyclohexane/ethanol (4/1, v/v)로 1 min간 추출한 후, 1 mL cyclohexane/ethanol (1/1, v/v)로 1 min간 추출을 실시한 후, N₂ gas를 이용하여 evaporation을 실시하여, 200 µL chloroform/methanol (2/1, v/v)로 희석시켜, -20 °C에 보관하였다. 지질분석을 위한 chromatography는 silica gel을 입힌 high performance thin layer chromatography (HPTLC) plate (60F254, 20 × 10 cm, Merck, Germany)를 사용하였다. 지질정량분석을 위해 사용될 표준물질로는 미국 Sigma Chemical Co.에서 구입한 non-hydroxy ceramide, hydroxy ceramide를 사용하였다. 자동화된 TLC sampler III ATS3 (Camag, Switzerland)를 사용하여 각 plate마다 각 표준혼합물을 2, 5, 10, 15, 20 µL씩 plate 하단에 10 mm에 7 mm의 밴드로 자동 점적하였다. 각 plates를 Camag AMD instrument로 (1) chloroform/methanol/water (40/10/1), (2) chloroform/methanol/acetic

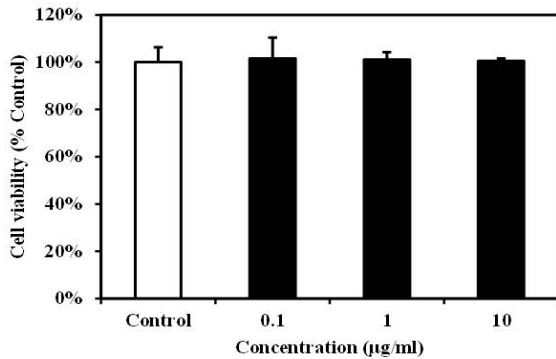


Figure 1. Effect of *A. radix* root extract treatment on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with various concentrations of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay.

acid (190/9/1), (3) acetic acid/hexane/diethyl ether (2/12/3), (4) petroleum ether의 용매하에서 전개하였다. 전개 전에 각 plates는 chloroform-methanol (2 : 1, v/v)로 미리 수세하였다. 전개가 완료된 plate는 10% (w/v) cupric sulfate pentahydrate (Sigma, USA)에 담근 후 charring 시키고 140 °C에서 15 min 굽는 과정을 시행하여 발색시켰다. 시료들과 지질표준혼합물들의 발색된 띠는 photodensitometer (TLC2 scanner II, Camag, Switzerland)와 TLC evaluation software (ver. 3.15, Camag, Switzerland)를 사용하여 slit width 0.4 × 7 mm, wavelength 570 nm로 scanning한 후 각 plates 마다 각각의 표준물질의 농도와 질량에 따른 각각의 밀도와 면적을 측정하여 시료와의 상관식을 구하여, 시료들의 정량적 측정을 시행하였다[18,19].

2.8. Statistical Analysis

실험 결과의 올바른 분석을 위하여, 통계적으로 유의한 차이는 95% 신뢰수준으로 Student's paired *t*-test 및 ANOVA test를 수행하였으며, 모든 통계 분석은 SPSS ver.23 (IBM, USA) 소프트웨어를 이용하여 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 독성 평가

MTT assay를 통해 *A. radix* 뿌리 추출물이 인체 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포에 대한 독성 평가를 수행

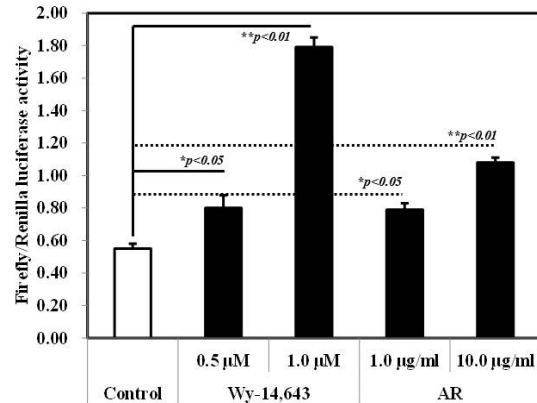


Figure 2. Transactivation of a PPAR response element (PPRE) by *A. radix* root extract (AR): CV-1 cell line was transfected with PPRE luciferase and PPAR- α together with pSV40-luciferase and treated the following day for 24 h (Error bar: S.D., ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, $n = 3$).

하여 다음 시험을 위한 시료의 농도 범위를 결정하였다. 0.1-10.0 µg/mL 농도의 *A. radix* 뿌리 추출물에서는 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 1). 따라서 본 연구에서는 0.1-10.0 µg/mL 농도 범위에서 시험을 실시하였다.

3.2. PPAR- α Expression 평가

A. radix 뿌리 추출물에 대한 PPRE의 trans-activation을 CV-1 세포를 통해서 살펴보았다. 양성 대조군으로 사용된 PPAR- α 에 특이적으로 luciferase 활성을 보이는 Wy-14,643 10 µM에 비하여 낮은 활성을 보였으나, 대조군인 control에 비하여 통계적으로 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었다(Figure 2). 농도 의존적으로 PPAR- α 에 활성이 증가하는 결과를 보였다.

3.3. TGase-1 Expression 평가

HaCaT 세포를 통한 표피의 대표적 분화 인자인 TGase-1의 발현양을 *A. radix* 뿌리 추출물 처리에 따라 평가하였다. 표피 세포의 분화 조건인 칼슘 이온의 1.2 mM 조건에서 TGase-1이 증가하는 결과를 확인하였고, *A. radix* 뿌리 추출물의 여러 농도에서 통계적으로 유의하게 발현양이 증가하였다(Figure 3). 농도 의존적으로 발현양이 증가하는 것은 관찰하지 못하였다.

Table 1. Mean TEWL (g/m²h) ± S.D. and Mean Water Content (A.U.) ± S.D. Measured during 11 Days of Treatment with Untreat, Vehicle, and *A. Radix* Root Extract (AR 1.0%)

(a)				
Water Contents	0 day	2 day	7 day	11 day
Untreat	18.83 ± 6.23	18.5 ± 7.25	19.56 ± 7.15	20.72 ± 8.04
Vehicle	20.61 ± 11.82	20.56 ± 7.58	19.33 ± 7.99	20.56 ± 6.22
AR 1.0%	19.33 ± 7.12	18.78 ± 8.23	19.67 ± 7.25	21.44 ± 6.16

(b)				
TEWL	0 day	2 day	7 day	11 day
Untreat	4.60 ± 0.14	3.85 ± 1.09	4.12 ± 1.08	3.80 ± 0.89
Vehicle	4.26 ± 0.39	4.38 ± 1.25	3.72 ± 1.43	3.80 ± 1.10
AR 1.0%	4.90 ± 1.59	4.62 ± 1.86	4.78 ± 1.88	3.57 ± 1.37*

All data were normally distributed. Compared to untreat data were ANOVA test and significant difference are indicated. (* $p < 0.05$)

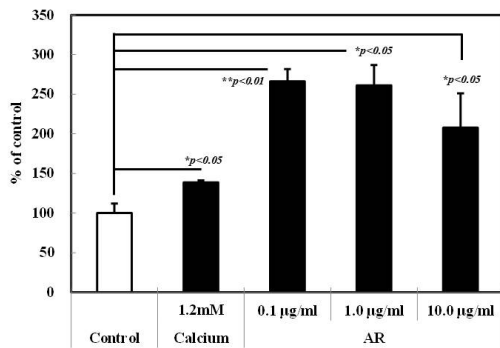


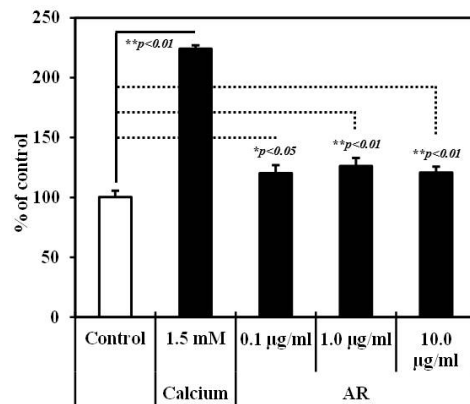
Figure 3. Transglutaminase-1 (TGase-1) increasing rate by *A. radix* root extract (AR): HaCaT cell line was treated the following day for 48 h with calcium 1.2 mM and various concentrations of sample (Error bar: S.D., ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, n = 5).

3.4. CE Formation 평가

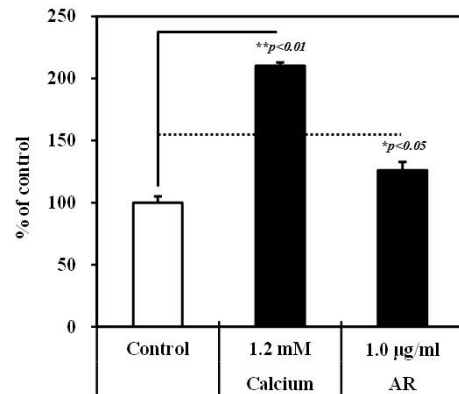
HaCaT 세포와 NHK 세포를 통하여 *A. radix* 뿌리 추출물에 의한 각질(CE) 형성능을 평가하였다. 칼슘 이온의 농도를 통한 분화를 유도하여 나타난 양성 대조군의 각질 형성능에 비해 *A. radix* 뿌리 추출물은 낮은 각질 형성능을 보였지만, 통계적으로 유의하게 control 보다는 높은 결과를 보였다(Figure 4).

3.5. 임상 평가

피험자의 하박 내측에 *A. radix* 뿌리 추출물 1%를 함유한 외용제 제형을 11일간 도포하여 수분량과 TEWL을 측정하였다. Table 1(a)에서 보는 것과 같이 수분량은 무처리 군(untreat)과 대조군(vehicle), *A. radix* 뿌리



(A)



(B)

Figure 4. Cornified envelope (CE) formation increasing rate by *A. radix* root extract (AR): HaCaT cell line (A) and NHK cell (B) was treated the following day for 5 days with calcium and various concentrations of sample (Error bar: S.D., ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, n = 3).

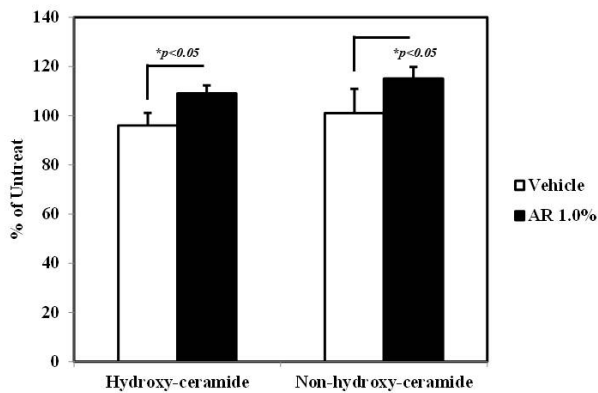


Figure 5. Percentage of increasing ceramides contents treatment with Untreat, Vehicle, and *A. radix* root extract (AR 1.0%). All data were normally distributed. Compared to vehicle data were Student's paired *t*-test and significant difference are indicated ($*p < 0.05$).

추출물에서 통계적으로 유의한 변화를 관찰하지 못하였다. 그러나, 피부 장벽 기능을 나타내는 인자인 TEWL에 있어서는 *A. radix* 뿌리 추출물 1%를 함유한 군에서 무처리 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하는 결과를 보였다(Table 1(b)). 11일간 *A. radix* 뿌리 추출물을 도포한 후, 분석한 세라마이드 분석에 있어서, 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 세라마이드 양이 증가하는 결과를 보였다(Figure 5).

4. 결 론

본 연구에서는 사삼으로 알려진 *A. radix* 뿌리 추출물을 대상으로 각질형성세포의 각질 형성능과 피부장벽회복기능을 연구하였다. 인체 표피 세포주인 HaCaT 세포에 대한 독성 평가에서 0.1-10.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 피부의 분화에 초기 인자로 알려진 PPAR α 리간드로서 CV-1세포에서 그 효능을 살펴본 결과, 강력한 양성 대조군인 Wy-14,643의 10 μM 농도에는 미치지 못하였으나, 5-10 μM 의 범위에서 *A. radix* 뿌리 추출물의 효과가 나타나 PPAR α 리간드로서 효능을 나타내었다. 각질 형성에 있어서 대표적인 marker인 TGase-1의 발현을 HaCaT세포에서 살펴보았을 때, 농도 의존적인 효과를 보이지 않으나, control에 비해 통계적으로 유의하게 증가하는 결과를 보여 분화를 촉진함을 알 수 있었다. 피부 분화의 최종 단계

인 각질 형성능에 있어서, HaCaT세포와 NHK세포에서 모두 증식 조건보다 통계적으로 유의하게 각질 형성능을 보였다. 분화 조건인 고농도의 칼슘 이온 조건에는 미치지 못하였지만, control보다 높은 형성능을 보였다. 이러한 세포 시험을 통하여, *A. radix* 뿌리 추출물은 표피 내에서 표피의 분화를 촉진시켜 각질 형성에 도움이 된다는 것을 관찰하였다.

단순한 피부 외용제 제형으로 *A. radix* 뿌리 추출물을 함유한 임상평가에 있어서, 약 2주 동안 피험자의 하박 내측에 도포한 결과, 피부 수분량은 통계적으로 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나, 피부 장벽기능을 나타내는 TEWL의 결과, 무처리 군에 비해 11일차에 통계적으로 유의한 변화를 관찰할 수 있었다. 이를 통해 *A. radix* 뿌리 추출물은 피부장벽기능에 효과적임을 알 수 있었다. 임상평가를 진행하여, 2주간 도포한 부위에서 피부 표피 지질을 추출하여, 세라마이드를 분석한 결과 hydroxy-ceramide와 non-hydroxy-ceramide의 분석에서 vehicle에 비해 세라마이드의 양이 통계적으로 유의하게 증가하는 결과를 보였다.

최근 아토피에서 나타나는 건조피부를 개선하는 화장품을 기능성화장품으로 간주하고 있는데, 건조피부를 개선하기 위하여, 비정상적인 표피의 분화를 정상으로 돌려 피부의 장벽기능을 제대로 작동하여 개선하고자 많은 연구가 진행되고 있다. *A. radix* 뿌리 추출물은 이에 대해 훌륭한 화장품 원료 후보로서 제안할 수 있으며, 건조 피부 개선을 나타낼 수 있을 것으로 예측된다.

Reference

1. E. Fuchs, Epidermal differentiation: the bare essentials, *J. Cell. Biol.*, **111**, 2807 (1990).
2. W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing, *Swiss Med. Wkly.*, **132**, 7 (2002).
3. K. J. Smith, D. Eipreta, and H. Skelton, Peroxisomes in dermatology Part I, *J. Cutan. Med. Surg.*, **5**, 231 (2001).
4. K. J. Smith, D. Eipreta, and H. Skelton, Peroxisomes in dermatology Part II, *J. Cutan. Med. Surg.*, **5**, 315 (2001).

5. K. M. Lim, H. J. Ko, J. H. Choi, S. Y. Park, J. H. Kim, and M. Y. Jung, Effects of Adenophorae radix (AR) on atopic dermatitis (AD) induced by DNCB in mice, *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **30**, 31 (2017).
6. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreuz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell. Biol.*, **106**, 761 (1988).
7. T. Tezuka, J. Qing, M. Saheki, S. Kusuda, and M. Takahashi, Terminal differentiation of facial epidermis of the aged: immunohistochemical studies, *Dermatology*, **188**, 21 (1994).
8. B. M. Forman, P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans, 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma, *Cell*, **83**, 803 (1995).
9. B. M. Forman, J. Chen, and R. M. Evans, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferators-activated receptors alpha and delta, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 4312 (1997).
10. S. A. Kliewer, K. Umesono, D. J. Noonan, R. A. Heyman, and R. M. Evans, Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, *Nature*, **358**, 771 (1992).
11. M. H. Hsu, C. N. Palmer, K. J. Griffin, and E. F. Johnson, A single amino acid change in the mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha alters transcriptional responses to peroxisome proliferators, *Mol. Pharmacol.*, **48**, 559 (1995).
12. S. Michel, A. Courseaux, C. Miquel, J. M. Bernardon, R. Schmidt, B. Shroot, S. M. Thacher, and U. Reichert, Determination of retinoid activity by an enzyme-linked immunosorbent assay, *Anal. Biochem.*, **192**, 232 (1991).
13. M. Westergaard, J. Henningsen, M. L. Svendsen, C. Johansen, U. B. Jensen, H. D. Schröder, I. Kratchmarova, R. K. Berge, L. Iversen, L. Bolund, K. Kragballe, and K. Kristiansen, Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid, *J. Invest. Dermatol.*, **116**, 702 (2001).
14. M. L. Svendsen, G. Daneels, J. Geysen, L. Binderup, and K. Kragballe, Proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes is modulated by 1,25(OH)₂D₃ and synthetic vitamin D₃ analogues in a cell density-, calcium- and serum-dependent manner, *Pharmacol. Toxicol.*, **80**, 49 (1997).
15. C. Johansen, L. Iversen, A. Ryborg, and K. Kragballe, 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ induced differentiation of cultured human keratinocytes is accompanied by a PKC-independent regulation of AP-1 DNA binding activity, *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 1174 (2000).
16. I. King, S. L. Mella, and A. C. Sartorelli, A sensitive method to quantify the terminal differentiation of cultured epidermal cells, *Exp. Cell. Res.*, **167**, 252 (1986).
17. S. Pillai, D. D. Bikle, M. Hincenbergs, and P. M. Elias, Biochemical and morphological characterization of growth and differentiation of normal human neonatal keratinocytes in a serum-free medium, *J. Cell. Physiol.*, **134**, 229 (1988).
18. D. M. Both, K. Goodtzova, D. B. Yarosh, and D. A. Brown, Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells, *Arch. Dermatol. Res.*, **293**, 569 (2002).
19. A. H. Kennedy, G. M. Golden, C. L. Gay, R. H. Guy, M. L. Francoeur, and H. W. V. Mak, Stratum corneum lipids of human epidermal keratinocytes air-liquid cultures: implications for barrier function. *Pharm. Res.*, **13**, 1162 (1996).