

Original Article / 원저

Angelica gigas 에탄올 추출물의 Hyaluronic acid 합성 효과에 대한 실험적 연구

박혜수¹⁾ · 하현용²⁾ · 김희택^{1)*}

¹⁾세명대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과학교실

²⁾서원대학교 제약공학과

An Experimental Study on the Effect of *Angelica gigas* Ethanol Extract on Hyaluronic Acid Synthesis

Hye-Su Park¹⁾ · Hun-Yong Ha²⁾ · Hee-Taek Kim^{1)*}

¹⁾Department of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Korean Medicine, Semyung University

²⁾Department of Pharmaceutical Science & Engineering, Seowon University

Abstract

Objectives : Hyaluronic acid(HA) is a mucopolysaccharide, occurring naturally in living organisms. It is one of the most hydrophilic molecules, so it has been known as being related to skin hydration and skin aging. The purpose of this study is to examine the effects of *Angelica gigas*(*A. gigas*) ethanol extract on hyaluronic acid synthesis.

Methods : To determine cytotoxicity and hyaluronic acid synthase 2 gene expression, hyaluronic acid production in HaCaT cells, MTT assay and RT-PCR ELISA was used.

Results : There were no cytotoxicity in 50 μ g/ml concentration *A. gigas* extract in MTT assay. Hyaluronic acid synthase 2(HAS2) gene expression was increased by all treated concentration *A. gigas* extract. Hyaluronic acid production was higher than control group in 50 μ g/ml & 100 μ g/ml concentration *A. gigas* extract.

Conclusions : Hyaluronic acid production was increased by *A. gigas* extracts. Therefore, We suggest that *A. gigas* can make a contribution to the moisturizing effect on human skin.

Key words : *Angelica gigas*, Hyaluronic acid; Hyaluronic acid synthesis; Moisturizing effect; HAS2

© 2018 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

I. 서 론

인체의 표면에 위치하는 피부조직은 표피, 진피, 피하지방층의 세 층으로 구성되어 있으며 외부에서 들어오는 세균의 침입과 각종 물리적 및 화학적 자극으로부터 보호해 주고 체내 수분을 보호하여 인체의 항상성을 유지하는 기능을 수행하고 있다¹⁾. 표피의 최외곽층인 각질층은 피부의 강력한 물리적인 장벽과 투과장벽기능을 하고 표피의 항상성을 유지하며¹⁻³⁾, 특히 각질층은 정상인의 경우 10~20% 가량의 수분을 함유하고 있어 피부 보습을 증가시키고 수분의 증발을 막아 건강하고 탄력 있는 피부 유지 및 피부 노화를 방지한다⁴⁾.

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 고점도성, 보습성, 생체 적합성의 특징을 지닌 수용성 다당류의 생체 고분자 물질로서⁸⁾ 조직의 수분 보유, 세포 성장 인자 및 영양성분의 저장과 확산, 면역 조절 등에 관여하는 것으로 보고된 바 있다⁸⁻¹⁰⁾. 노화에 따른 HA 양의 감소는 피부 보습 장벽의 결함으로 표피를 위축시켜 피부의 주름 증가, 탄력 감소 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나로 여겨지고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 피부에서 HA의 함량은 hyaluronic acid synthase(HAS)에 의한 합성과 Hyaluronidase(HYAL)에 의한 분해에 의해 조절되며¹¹⁾, 최근 HAS 유전자 발현 증가를 통해 HA의 합성을 조절하여 보습력 및 항노화 기능을 향상시키고자 하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다^{9,12)}.

당귀(當歸)는 미나리과(산형과; Umbelliferae)에 속한 당귀의 다년생 초본의 뿌리를 건조시킨 것으로 甘味는 補하고 辛未는 酸하며 溫性은 通氣하여 補血活血, 行氣止痛하는 대표적인 보혈제의 효능과 더불어

散瘀消腫하여 외과질환에도 다용하여 왔다¹³⁾. 특히 당귀를 군약으로 하는 당귀음자는 보혈기능과 항알러지 작용 및 면역 조절을 통해 건선, 아토피 피부염 등 다양한 피부 질환에 응용되고 있다¹⁴⁻¹⁸⁾. 당귀는 기원 식물에 따라 참당귀(*Angelica gigas Nakai*), 일당귀(*Angelica acutiloba Kitag.*), 중국당귀(*Angelica sinensis(Oliv.) Diels*)로 나뉘며 국내에서는 참당귀와 일당귀가 약재로서 활용되고 있다¹²⁾. 기존 연구에 의하면 참당귀는 피부 미백 및 자외선 차단 효과^{19,20)}, 콜라겐 합성 증가로 인한 항주름 효과²¹⁾, 항암 및 항스트레스 효과²²⁾ 등이 보고된 바 있으며, 자외선 흡수도 측정, 항산화 시험, 미백효과 시험, 주름개선효과 시험 및 안전성 시험을 통해 참당귀의 화장품 소재로서의 응용 가능성이 연구된 바 있으나²³⁾, 참당귀의 피부 보습 효과에 관한 연구는 미흡한 단계이다. 본 연구에서는 참당귀의 HA 합성 촉진을 통한 피부 보습 효과를 정량적으로 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 다음과 같이 보고하고자 한다.

II. 연구대상 및 방법

1. 재료 및 방법

1) 세포 배양 및 실험조건

실험에 사용한 HaCaT 세포주는 미국 ATCC로부터 분양받아 사용하였으며, HaCaT 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)에 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 1% penicillin-streptomycin (PS, Gibco)이 함유된 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) 시약

참당귀(*A. gigas*)는 퓨어마인드제약 (경북, 영천)에서 구입하였으며 시료는 세명대학교 한방바이오융합

Corresponding author : Hee-Taek Kim, 65, Semyung-ro, Jecheon-City, Chungbuk, Korea

(Tel: 043-649-1817, E-mail: kht8725c@naver.com)

● Received 2018/1/9 ● Revised 2018/2/2 ● Accepted 2018/2/9

과학부 천연물실험실에 보관하여 사용하였다. 약제는 100g을 측정하여 70% (v/v) 에탄올 용매에 담가 냉침한 뒤 여과하여 Bottle에 포집하였고 이 과정을 3회 반복하였다. 감압농축기로 농축한 이후에 동결건조하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양 및 독성 실험

세포를 $2 \times 10^5/ml$ 농도로 96 well plate에 seeding 하였다. 24시간 후에 serum-free DMEM으로 교체해 준 후에 *A. gigas* 추출물로 시료를 처리하였다. 24시간 동안 배양해준 후에 media를 걷어내고 20 μ l의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, 5mg/ml)을 넣어주고 CO2 배양기에서 2시간 배양하였다. 100 μ l의 DMSO로 결정을 용해시킨 후에 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존율은 control과 비교하여 %로 표시하였다. 세포에 처리한 샘플에 포함된 DMSO는 최종농도 0.1%에 맞추었다.

2) RT-PCR

세포를 $2 \times 10^5/ml$ 농도로 6 well plate에 seeding 하였다. 24시간 후에 serum-free DMEM으로 교체해 준 후에 *A. gigas* 추출물을 처리해주었다. 최종 DMSO는 농도는 0.1%로 맞추어 주었다. 24시간 동안 배양해준 후에 easyBlue (intron)로 RNA를 추출하였

다. RNA농도와 순도 (OD260 / OD280)를 측정된 후에 2 μ g RNA로 power cDNA synthesis kit (intron)을 이용하여 cDNA 합성을 하였다. PCR은 premix PCR kit (Solgent)을 이용하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 밴드를 확인하였다. All-trans-retinoic acid (ATRA, sigma) 1 μ M을 양성대조군으로 사용하였다. Primer는 기존 논문에서 보고된 sequence로 제작하였다(Table 1)²⁰⁾.

3) ELISA

세포를 $2 \times 10^5/ml$ 농도로 6 well plate에 seeding 하였다. 24시간 후에 serum-free DMEM으로 2번 washing 해준 후에 serum-free DMEM를 새로 교체하고 샘플을 처리해 주었다. DMSO는 0.1%로 맞추어 주었다. 15분 후에 350 μ l의 media를 걷어내었고 다시 15분 후에 동량 걷어내었고, 다시 15분 후에 1차례 더 동량 걷어내었다. 15,000 x g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 걷어내어 ELISA를 수행할 때 까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. ELISA는 HA-ELISA kit (echelon)를 이용하였으며 제조사에서 제공한 방법에 의해 진행하였다. ATRA 1 μ M을 양성대조군으로 사용하였다.

4) 통계

통계는 Student's t-test를 이용하였으며 유의성 기준을 p-value가 0.05 미만일 경우로 설정하였다.

Table 1. Primers Sequence

Gene	Direction	Sequence (5' → 3')	Size (bp)
HAS2	Forward	GCT ACC AGT TTA TCC AAA CG (20 mer)	393
	Reverse	GTG ACT CAT CTG TCT CAC CG (20 mer)	
GAPDH	Forward	ATT GTT GCC ATC AAT GAC CC (20 mer)	546
	Reverse	AGT AGA GGC AGG GAT GAT GT (20 mer)	

PCR 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C 15 min, 32~35 cycles: 94 $^{\circ}$ C 30s 50 $^{\circ}$ C 30s 72 $^{\circ}$ C 60s 72 $^{\circ}$ C 10 min 최종 합성.

III. 결 과

1. MTT assay

70% 에탄올 *A. gigas* 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 추출물을 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 범위에서 그 생존율을 확인하였다. 각 농도별 생존율은 양성대조군인 ATRA에 비하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 102.11%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 111.06%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 120.82%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 87.49%로 모든 농도 범위에서 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않아 생물학적으로 비교적 안전한 물질임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

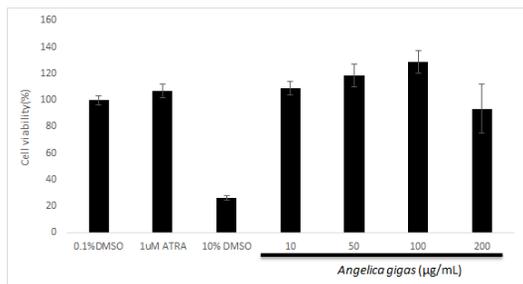
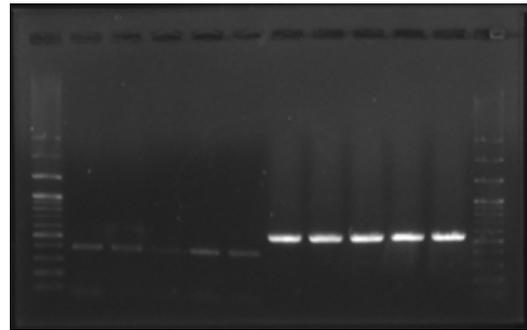


Fig. 1. Effect of *Angelica Gigas* Ethanol Extract on Viability of HaCaT Cells. Viability of HaCaT cells treated with test compounds (10~ 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h was analyzed by MTT assay. Values represent the mean \pm SD of three independent measurements.

2. *A. gigas*의 HAS2 유전자 발현 증가

70% 에탄올 *A. gigas* 추출물의 HAS2 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 시행하였다. 모든 농도의 70% 에탄올 *A. gigas* 추출물 처리군에서 HAS2 유전자가 발현되었음을 확인하였으며, 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 밴드가 가장 뚜렷하게 발현되었다(Fig. 2).



1 2 3 4 5 6
HAS2 GAPDH

Fig. 2. RT-PCR Results.

- 1 : DNA Ladder
- 2 : 0.1% DMSO - 10 μL
- 3 : 1 μM ATRA - 10 μL
- 4 : 50 $\mu\text{g/mL}$ *A. gigas* Ethanol Extract - 10 μL
- 5 : 100 $\mu\text{g/mL}$ *A. gigas* Ethanol Extract - 10 μL
- 6 : 200 $\mu\text{g/mL}$ *A. gigas* Ethanol Extract - 10 μL

3. HA-ELISA assay

70% 에탄올 *A. gigas* 추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리했을 때 HA의 생성량을 확인하기 위해 ELISA kit를 사용하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 샘플군에서는 HA의 생성량이 15분, 30분, 45분, 60분에서 각각 498.10, 560.62, 531.96, 499.08이었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 샘플군에서는 449.26, 489.49, 456.57, 412.82이었으며 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리 샘플군에서는 118.39, 139.07, 132.35, 101.84로 시료 처리 후 30분에서 HA 생성량이 가장 높게 나타났으며, 시료 처리 후 15분, 45분, 60분의 순대로 HA의 생성량이 높게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 3,4,5,6). *A. gigas* 추출물 처리군의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 순으로 HA의 생성량이 높았으며, 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 샘플의 경우 DMSO 0.1% 처리한 vehicle 군에 비하여 오히려 HA생성량이 낮았는데 이는 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 보이는 *A. gigas* 추출물의 세포독성에 기인한 것으로 생각된다.

IV. 고 찰

피부의 노화는 세월이 흘러감에 따라 자연스럽게 나타나는 내인적 노화와 외부 환경 자극에 의한 외인적 노화가 상호 작용하여 피부의 구조적, 기능적 변화 혹은 생화학적 변화를 초래하는 현상이다¹⁰⁾. 노화된 피부는 표피 두께 감소와 표피 내 랑게르한스세포 및

멜라닌세포 수와 기능의 감소로 인한 면역기능 및 색소침착반응 감소, 진피 두께 감소와 진피 내 아교질 결합 및 탄력섬유 감소로 인한 주름 형성 및 탄력 감소, 상처치유능력의 감소, 피부의 양성 및 악성종양의 증가, 피부면역 및 항산화 방어기능 감소, 비타민D 합성의 감소와 같은 다양한 조직학적 및 기능적 저하가 발생하는데 이 중 가장 대표적인 현상은 주름의 발생, 탄력의 감소 및 건조한 피부이다^{1,10)}. 노화된 피

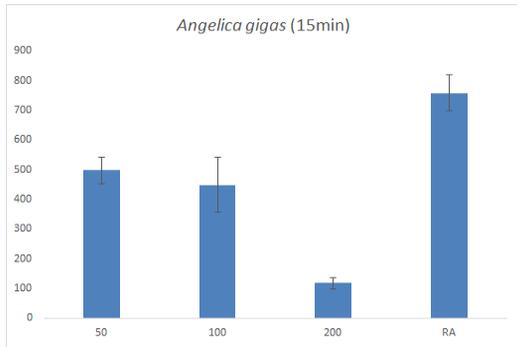


Fig. 3. Hyaluronic Acid Production (μg/mL) – 15min
 50 : 50 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 100 : 100 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 200 : 200 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 ATRA : Retinoic Acid treated group
 Values represent the mean±SD of three independent measurements, Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Student's t-test.

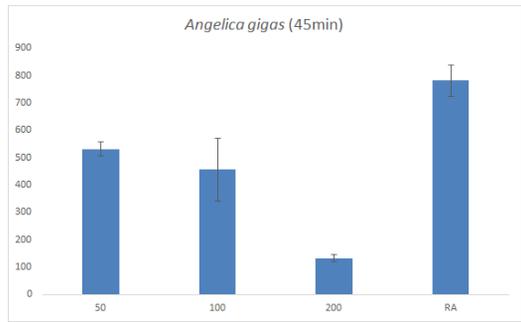


Fig. 5. Hyaluronic Acid Production (μg/mL) – 45min
 50 : 50 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 100 : 100 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 200 : 200 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 ATRA : Retinoic Acid treated group
 Values represent the mean±SD of three independent measurements, Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Student's t-test.

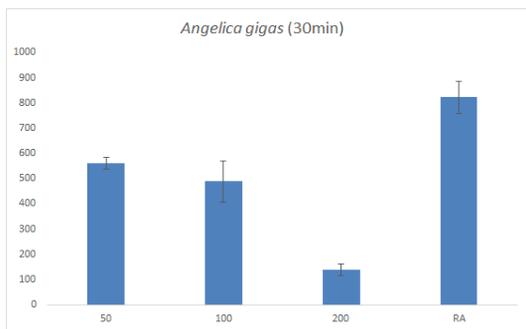


Fig. 4. Hyaluronic Acid Production (μg/mL) – 30min
 50 : 50 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 100 : 100 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 200 : 200 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 ATRA : Retinoic Acid treated group
 Values represent the mean±SD of three independent measurements, Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Student's t-test.

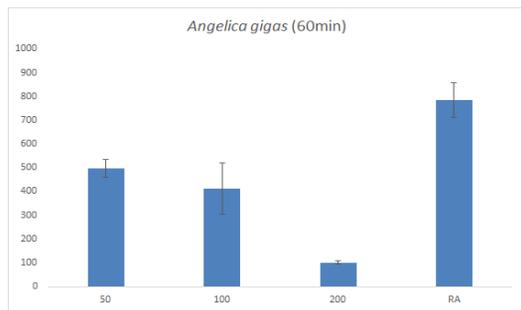


Fig. 6. Hyaluronic Acid Production (μg/mL) – 60min
 50 : 50 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 100 : 100 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 200 : 200 μg/mL *Angelica gigas* Ethanol Extract treated group
 ATRA : Retinoic Acid treated group
 Values represent the mean±SD of three independent measurements, Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by Student's t-test.

부에서는 피부 진피의 기질단백질 중 아교질원섬유의 길이와 분포가 손상되며 양이 감소하고 탄력섬유가 변성되어 그 결과 피부 주름 및 탄력 감소 등의 증상을 초래하며 표피의 각질층 내 수분 함유량이 10-20% 정도를 유지하지 못하고 감소하게 되면 건조 피부 및 가려움 등을 유발하여 피부의 노화를 촉진시키게 된다^{1,4)}. 한의학적 관점에서 피부는 인체의 최외곽에 위치하여 일차 방어선으로서 중요한 역할을 담당하며 표피와 대응하는 한의학적 개념은 ‘膚膜’로 볼 수 있다⁵⁾. 膚는 신체의 표피이고, 膜는 肌肉의 紋理인데, 《雜病源流犀燭》에서는 “皮也者 所以包涵肌肉 防衛筋骨者也”라 하여 고인들은 膚膜가 담장과 유사한 기능을 한다고 인식하였다. 특히 膜는 津液의 滲泄을 주관함으로써⁵⁾, 몸 안의 수분을 배설하고 氣血을 통하게 하여 外邪의 침범을 방어하는 기능을 한다⁶⁾. 또한 표피와 진피 및 피하지방층은 통틀어 ‘肌膚’에 해당한다고 볼 수 있으며 한의학의 肌膚는 脾에 속한다고 하여 노화에 의한 주름의 발생은 脾臟 기능 저하로 肌膚가 지양 받지 못해 발생하는 현상으로 본다²⁵⁾. 肺의 선발작용을 통해 散布된 衛氣가 외부 자극으로 인한 피부 수분 손실을 방지하고 膜理 개합을 조절하고 津液을 輸布함으로써 피부를 촉촉하게 유지시켜주는 반면 노화로 인해 肺가 손상되어 衛氣와 津液이 輸布하지 못하면 피부 내부의 윤택함이 소실되어 피부 건조를 유발하게 되며²⁵⁾, 보습 기능의 저하를 ‘燥’로 파악하고 그 원인을 ‘血少’와 ‘金受熱’ 등으로 보아 보습의 작용을 ‘潤燥’라고 하여 ‘補血養血’의 치료법을 중시하였다²⁶⁾. 또한 일반적으로 모든 소양감은 虛로 보는데 血虛의 소양은 벌레가 피부를 기는 듯하여 참기 어려운 심한 가려움 및 통증을 유발한다 하여 補血養血을 중시하였으며⁵⁾, 체내 精氣와 津液을 자양하지 못하거나 영양공급에 이상이 초래되면 피부에 병변이 나타나게 된다고 하였다⁷⁾. 이와 같이 한의학적 관점에서도 표피의 보습 기능을 적절히 유지하는 것이 다양한 피부 병변을 예방하고 건강한 피부를 유지하여 노화를 방지하는 데에 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

히알루론산(Hyaluronic acid, HA)은 콜라겐 및 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 중 하나로 인체 피부의 대부분을 차지하는 Glycosaminoglycan(GAG)로서 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 교대로 결합한 disaccharide 반복 단위의 중합체로 분자량이 20~40만에 달하는 직쇄상의 고분자 화합물이다^{9,10,12)}. 포유류의 체내에 존재하는 HA는 관절액의 주 성분이고 50% 이상이 표피의 세포 간 간격과 진피의 세포외기질에 분포한다고 보고되어 있으며 주로 표피의 각질형성세포와 진피의 섬유아세포에 의해 2~4.5일의 주기로 합성되어 수분 보유 능력을 통한 조직의 수분 유지, 세포 간 간격 유지, 세포의 분열과 분화, 세포의 성장 인자 및 영양 성분의 저장과 확산, 조직 치유 반응 등에 관여한다고 보고된 바 있다⁸⁻¹⁰⁾. 피부 세포 배양상태에서 HA의 합성은 trans forming growth factor β (TGF- β), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF)와 같은 다양한 성장인자와 trans-retinoic acid, N-methyl-L-serine 등에 의해 증가된다는 보고가 있으나 대사에 대한 자세한 메커니즘은 정확히 밝혀지지 않았으며 다만 HA의 합성은 세포막의 내측 표면에서 히알루론산 합성 효소(Hyaluronic acid synthase, HAS)에 의해 진행되며 세포외기질에 축적된다고 알려져 있다^{9,10)}. HA의 양은 노화에 따라 함량이 줄어든다고 보고되어 있으며 수분 증발을 막는 장벽인 HA의 함량 감소는 거칠고 건조한 피부, 각질의 부적절한 탈락으로 인한 피부 탄력 저하, 피부 주름의 주요한 요인이 된다고 알려져 있다¹¹⁾. 한편 현대 사회의 소득수준 및 삶의 질 향상으로 인한 미에 대한 관심 및 젊은 피부를 유지하려는 욕구가 증가하면서 피부 보습과 그와 관련된 HA에 대한 관심도가 증대되어 HA의 합성을 증가하여 피부의 보습력을 강화시키려는 연구가 진행되어 오고 있으며 한약재를 이용한 대표적인 연구로는 송 등¹⁰⁾의 천궁으로부터 분리된 ferulic acid, 이 등¹¹⁾의 황기 메탄올 추출물, 정 등²⁷⁾의 황금 에탄올 추출물, 유 등

²⁾의 회향 메탄을 추출물, 강 등¹²⁾의 일당귀 에탄올 추출물, 홍 등²⁸⁾의 갈근 에탄올 추출물 등이 있다.

血病의 요약으로 불리는 당귀는 한의학의 대표적인 보혈제로서 산형과에 속한 다년생 초본인 당귀의 뿌리를 늦가을부터 이듬해 봄 새싹이 돋기 전에 채취하여 진흙을 제거한 뒤 수일 동안 건조한 것으로 국내에서는 참당귀, 일본에서는 일당귀, 중국에서는 중국당귀를 기원으로 한다^{13,29,30)}. 당귀는 신농본초경(神農本草經) 中品에 수록된 이래 寶血活血, 行氣調經止痛, 潤燥滑腸 등의 효능으로 한의학계 임상에서 부인과 및 외과 질환에 활용되는 한약재로서 감초, 생강과 함께 최다 빈용 약물에 속한다^{13,30)}. 당귀의 약리작용으로는 조혈계통 및 심혈관 계통에 대한 작용, 자궁의 발육 촉진과 조절작용, 항염작용, 진통작용, 면역증강 작용, 말초순환장애 개선 작용, 진정 작용 등의 효능이 보고되어 있으며 혈류 개선 효과로 혈액 순환을 도와주어 주름 개선 및 노화 방지와 조직 재생에 도움이 된다고 알려져 있다^{30,31)}. 당귀는 기원에 따라 참당귀, 일당귀, 중국당귀의 3종으로 분류할 수 있으며 이들은 각각 외형적 차이뿐만 아니라 이화학적 성분 및 구성 생화학합물의 약리 작용에서도 차이가 있는 것으로 보고되어 있다^{13,31)}. 당귀의 기원 식물 및 기미의 차이에 따라 補血에는 참당귀보다 甘한 일당귀를 사용하고 活血祛瘀에는 일당귀보다 苦한 참당귀를 사용하는 것이 일반적이다¹³⁾. 이 중 참당귀는 강 등³⁰⁾의 연구에서 cyclophosphamide로 유발된 흰쥐의 빈혈에 있어 조혈작용이 일당귀와 중국당귀에 비해 뛰어나다는 것이 보고되었고 오 등³²⁾의 연구에서 혈관신생작용과 혈관이완효과가 입증되었으며 피부미용에서 중요한 요소인 혈류 개선 효과 및 혈액 순환을 도와 피부 조직 재생을 통한 자외선 차단 효과와 피부 미백에도 효과가 있다고 보고된 바 있다^{19,23)}. 현대 사회의 미에 대한 욕구 증가로 인해 피부 보습에 대한 관심이 증대하는 반면 최근까지 당귀의 보습 효과에 대한 연구는 미흡한 단계이며 최근 일당귀의 HA 합성 촉진으로 인한 보습 효능에 관한 연구가 수행된 바 있

으나¹²⁾, 국내에서 비교적 안정적으로 대량 수확이 가능하며 수입품인 일당귀에 비해 저렴한 가격으로 구할 수 있는 참당귀의 약재 활용 가치가 더욱 탁월하기 때문에 참당귀의 보습 효과에 대한 연구가 지속적으로 필요하다고 볼 수 있다.

일당귀 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 추출물의 농도를 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 MTT assay에서 각 농도별 생존율은 대조군에 비하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 102.11%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 111.06%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 120.82%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 87.49%로 모든 농도 범위에서 뚜렷한 세포독성을 보이지 않았다.

HA는 주로 각질형성세포와 섬유아세포의 hyaluronic acid synthase(HAS)에 의해 합성되고²⁾, 피부에서 HA의 함량은 HAS에 의한 합성과 Hyaluronidase(HYAL)에 의한 분해에 의해 조절되며¹¹⁾, 특히 HAS 유전자 중 HAS2와 HAS3는 히알루론산 합성에 중대한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다.¹²⁾ 참당귀 추출물의 HAS2 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 시행한 RT-PCR에서는 모든 농도의 70% 에탄올 참당귀 추출물 처리군에서 HAS 2 유전자가 발현되었음을 확인하였으며, 이는 처리농도 범위에서 보습효과와 관련된 HA 합성을 유도한다는 것을 보여준다. 또한 모든 농도에서 유전자의 발현이 확인되었으나, 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유전자의 발현이 비교적 뚜렷하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 고농도인 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 HAS2 유전자의 발현이 약간 감소되는 현상이 확인되었으며, 이는 세포생존율에서 확인된 미약한 세포독성과 관련이 있을 것으로 판단된다.

참당귀 추출물의 HA의 생성량을 확인하기 위해 시행한 ELISA에서는 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 샘플군에서 HA의 생성량이 15분, 30분, 45분, 60분에서 각각 498.10, 560.62, 531.96, 499.08, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 샘플군에서는 449.26, 489.49, 456.57, 412.82, 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리 샘플군에서는 118.39, 139.07, 132.35, 101.84로 시료 처리 후 30분에서 HA 생성량이 가장 높게 나타났

으며 15분, 45분, 60분을 처리한 순대로 HA의 생성량이 높았다. 참당귀 추출물 처리군의 경우 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 순으로 HA의 생성량이 높았으며, 200 μ g/ml 처리한 샘플의 경우 DMSO 0.1% 처리한 vehicle 군에 비하여 오히려 HA생성량이 낮았는데 이는 200 μ g/ml의 농도에서 보이는 참당귀 추출물의 세포 독성에 기인한 것으로 보인다. 각각의 실험 결과는 student's t-test를 이용하여 양성대조군인 ATRA와 비교하였을 때 통계적으로 유의한 결과임을 확인하였다($p(0.05)$).

이상으로 본 연구에서 참당귀 추출물의 HA 합성에 대해 시험한 결과 특정 농도에서 비교적 유의한 효과를 보임을 알 수 있었다. 다만 본 연구는 HA합성에 대한 보습효과의 검정이 3종의 당귀 중 참당귀에 한해 이루어 졌으며, 추출물을 50, 100, 200 μ g/ml의 농도에서 처리하여 그 효과를 시험하였으나 100 μ g/ml 이상 농도에서 보인 미약한 세포독성으로 HA의 합성으로 인한 보습효과를 기대하기에 가장 적절한 농도를 찾기가 어렵고, 고농도인 200 μ g/ml에서 HAS2 유전자의 발현이 약간 감소되는 현상에 대한 정확한 원인을 알 수 없다는 한계가 있다. 추후 당귀 3종에 대한 HA의 합성에 관한 보습 효과 비교 및 세포독성을 보이지 않는 저농도에서 최고 효율을 나타내는 농도를 찾고 고농도 처리군에서 HAS2 유전자 발현 감소 현상의 정확한 원인을 파악하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

*A. gigas*의 HA 합성 효과를 알아보기 위해 HaCaT cell을 이용하여 세포독성, HAS2 유전자 발현, HA 합성량을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *A. gigas* 추출물은 100 μ g/ml의 범위에서 인체유래

각질세포에 대하여 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았으며, 200 μ g/ml의 농도에서는 저농도와 비교하였을 때 미약한 세포독성 반응이 확인되었다.

2. HaCaT cell에서 *A. gigas* 추출물은 모든 시료처리 농도에서 HAS2 유전자의 발현량을 증가시켰다.

3. *A. gigas* 추출물을 50, 100 μ g/ml로 처리한 샘플의 경우 DMSO 0.1% 처리한 vehicle 군과 비교하여 HA 생성량이 높았고 200 μ g/ml 처리 시에는 vehicle 군에 비하여 그 생성량이 뚜렷하게 증가하지는 않았으나, HA의 합성을 유도할 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임

References

1. KDA Textbook Editing Board, Textbook of Dermatology, 6th edition, Seoul:medbook, 2014:2-3,697-703.
2. Yu HY, Yang IJ, V.R Lincha, Park IS, Lee DU, Shin HM, The Effects of the Fruits of *Foeniculum vulgare* on Skin Barrier Function and Hyaluronic Acid Production in HaCaT Keratinocytes, Journal of Life Science, 2015;25(8):880-8.
3. Park CS, Epidermal Homeostasis and Dry Skin Management, J Soc Cosmet Scientists Korea, 2008;34(1):1-8.
4. Kim DS, Jeon BK, Mun YJ, Kim YM, Lee YE, Woo WH, Effect of *Dioscorea Aimadoimo* on Anti-aging and Skin Moisture Capacity, Korean J Oriental Physiology &

- Pathology, 2011;25(3):425-30.
5. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Busan:Sunwoo Publisher, 2007:58-9.
 6. Oriental Medical Terminology. Seoul: Hamchunhanhak, 2006:342.
 7. Choi JH, Kim HM, Song YS, Park SG, Kim JJ, Lee CK. Physical Effects of the Cosmetic Product Containing of *Saccharomyces* Fermented Modified *Kyungohkgo* Extract on Human Skin. *Kor J Herbology*, 2007;22(4):227-32.
 8. Kim KT, Kim YH, Kim JG, Han CS, Park SH, Lee BY, et al. Preparation of Oligo Hyaluronic Acid by Hydrolysis and Its Application as a Cosmetic Ingredient. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 2007;33(3):189-96.
 9. Kim SH, Nam GW, Kang BY, Lee HK, Moon SJ, Chang IS. The Effect of Kaempferol, Quercetin on Hyaluronan-Synthesis Stimulation in Human Keratinocyte (HaCaT). *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 2005;31(1):97-102.
 10. Song HJ, Mu HJ, Lee SH. Effect of Ferulic Acid Isolated from *Cnidium Officinale* on the Synthesis of Hyaluronic Acid. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 2013;39(4):281-8.
 11. Lee PJ, Kim HT, Yoon KS, Park HC, Ha HY. The effect of *Astragalus membranaceus* methanol extract on hyaluronic acid production in HaCaT cells. *The Journal of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, 2013;26(1): 75-81.
 12. Kang MS, Ha HY, Kim HT. An Experimental Study on the Effect of *Angelica acutiloba* Ethanol Extract on Hyaluronic Acid Synthesis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2015;28(1):32-40.
 13. Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW, Cho SI. A Review of Pharmacological Effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and their Bioactive Compounds. *J Korean Oriental Med*, 2011;32(4):1-24.
 14. Roh SS, Lee KN. Effects of *Dangkiyeumja* Water Extract on the Anti-Allergic Responses and the Functions of Murine Immunocytes. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 1991;4(1):23-42.
 15. Choi JH. Cytotoxicity of water extract of *Dangkwieumja ka Sumsu* on A431 Cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 1996;9(1):1-15.
 16. Roh SS, Lee KH. Research of Experimental *Kamidangkwieumja* in Psoriasis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 1999;12(1):113-42.
 17. Shim SH, Kim JH, Choi JH. A Clinical study about the effect of *Danguiumjagagam* on a Psoriasis Patient. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2002;15(1):336-42.
 18. Kim SH, Choi JH, Kim JH, Park SY. Effect of *Tang-gwi-eum-za-gagambang* along with External Spray Therapy on the Spontaneously Occurring Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mouse. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2005;18(1):27-49.
 19. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, et al. Skin-Whitening and UV-Protective Effects of *Angelica gigas* Nakai Extracts on Ultra High Pressure Extraction Process. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2008;16(4):255-60.
 20. Hwang SY, Lee JT, Kim YU, Kim HJ. Skin

- Whitening Effects of Extracts from *Angelicae Gigantis Radix* and *Lycii fructus* Ethanol Extracts. *Herbal Formula Science*. 2013;21(1):91-8.
21. Lee JH, Lee S, Kim MG, Kim MH, Kim HJ, Jo HJ, et al. Effects of *Angelica Gigantis Radix* Extracts on the Collagenase Activity and Procollagen Synthesis in HS68 Human Fibroblasts and Tyrosinase Activity. *Kor J Herbology*. 2011;26(1):29-33.
 22. Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, et al. Effect of Aqueous Extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on Anti-tumor and Anti-stress activities in mice. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2006;14(4):206-11.
 23. Park SK, Hong SK, Kim HJ, Kim BY, Kim T, Kang JS, et al. Cosmetic effect of *Angelica gigas* Nakai root extracts. *Korean Chem Eng Res*. 2009;47(5):553-7.
 24. Sim GS, Lee DH, Kim JH, An SK, Choe TB, Kwon TJ, et al. Black rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) hydrolyzed peptides induce expression of hyaluronan synthase 2 gene in HaCaT keratinocytes. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;17(2):271-9.
 25. Han JM, Kang NR, Ko WS, Yoon HJ. The Study on the Korean and Western Medical Literatures for Skin Aging wrinkle, hyperpigmentation, dry skin, facial flush. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2014;27(2):1-13.
 26. Lee JG, Lee JS, Park HJ, Cho WJ, Kim MR, Ha ID, et al. The moisturizing Effects of the Cosmetic Products Containing Herbs Extract on Infant Skin. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2008;21(3):124-31.
 27. Jeong YS, Ha HY. Effect of *Scutellariae Radix* Ethanol Extract on Hyaluronic Acid Synthesis. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2015;11(4):309-13.
 28. Hong CH, Lee SJ. Study on the Moisturizing Effects of *Puerariae Radix* Ethanol Extract. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2017;30(1):106-17.
 29. Park WS, Lee CH, Soh KS, Lee YJ, Lee CY, Lee TH, et al. Study on Biophoton Emission from roots of *Angelica gigas* N., *Angelica sinensis* D., and *Angelica acutiloba* K. *The Korea journal of herbology*. 2007;22(4):95-100.
 30. Kang SA, Jang KH, Lee JE, Ahn DK, Park SK. Differences of Hematopoietic Effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* Extract on Cyclophosphamide-induced Anemic Rats. *Korean J Food Sci Technol*. 2003;35(6):1204-8.
 31. Lee JJ, Kim AR, Seo YN, Lee MY. Comparison of Physicochemical Composition of Three Species of Genus *Angelica*. *Korean J Food Preserv*. 2009;16(1):94-100.
 32. Oh HS. Comparative studies on the angiogenic activity of water extract of *Angelica Gigantis Radix*, *Angelica Sinensis Radix* and *Angelica Radix*. *The Korea journal of herbology*. 2001;16(2):19-27.