

## 레몬그라스와 자소엽 추출물의 피부보습 및 피부장벽에 관한 연구

소양강·황지영·김현우·조하늘·이태범<sup>†</sup>

(재)남원시화장품산업지원센터

(2019년 6월 19일 접수, 2019년 7월 23일 수정, 2019년 8월 13일 채택)

### Skin Hydration and Skin Barrier Effects of *Cymbopogon citratus* and *Perilla frutescens* Extracts

Yangkang So, Ji Young Hwang, Hyun Woo Kim, Ha Neul Jo, and Tae-Bum Lee<sup>†</sup>

Institute of Natural Cosmetic Industry for Namwon, 43 Simyo-gil, Namwon-si, Jeollabuk-do 55801, Korea

(Received June 19, 2019; Revised July 23, 2019; Accepted August 13, 2019)

**요약:** 레몬그라스와 자소엽 추출물은 다양한 생리 효과를 나타내는 것으로 알려져 있지만, 피부보습과 피부장벽에 미치는 영향은 아직까지 연구되지 않았다. 본 연구에서는 레몬그라스와 자소엽 추출물의 피부보습과 피부장벽에 미치는 영향과 페놀성 화합물을 분석하였다. 피부각질형성세포에서 각 추출물이 피부보습에 미치는 영향을 조사한 결과, 두 추출물 모두 물보다 에탄올 추출물에서 히알루론산 생성이 많았다. HPLC를 이용한 19종 페놀성 화합물 분석 결과는 레몬그라스 에탄올 추출물(CCE)에서 chlorogenic acid와 *p*-coumaric acid가 검출되었으며 자소엽 에탄올 추출물(PFE)에서 rosmarinic acid와 caffeic acid가 검출되었다. 피부보습에 관련된 HAS1, HAS2, HAS3 및 AQP3와 피부장벽에 관련된 filaggrin, loricrin 발현은 PFE보다 CCE에서 높았다. 또한, CCE, PFE 모두 피부보습과 표피분화 조절에 관여하는 PPAR- $\alpha$  단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며 CCE의 주요성분인 chlorogenic acid와 *p*-coumaric acid가 PPAR- $\alpha$  발현을 증가시켰다. 결론적으로 피부보습과 피부장벽보호 효과에 있어서 CCE가 PFE보다 우수한 효과를 나타내었고, 두 추출물은 피부보습과 피부장벽개선에 대한 기능성 소재로써 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

**Abstract:** *Cymbopogon citratus* (CC) and *Perilla frutescens* (PF) are known to exert various biological effects. However, their skin hydration and skin barrier effects remain unclear. This study investigated effects of their extracts on skin hydration and skin barrier and analysed the phenolic compounds. effects of these extracts on skin hydration in HaCaT cells showed that Hyaluronic acid production in cells treated with ethanol extracts was higher than that treated with water extracts for both CC and PF. HPLC was used to analyse 19 phenolic compounds in CC and PF ethanol extracts (CCE and PFE). Results revealed chlorogenic acid and *p*-coumaric acid in CCE and rosmarinic acid and caffeic acid in PFE. Expression levels of hyaluronan synthase 1 (HAS1), HAS2, HAS3, and aquaporin 3 (AQP3), which are related to skin moisturization, and filaggrin and loricrin, which are related to skin barrier were higher in cells treated with CCE than with PFE. CCE and PFE also increased expression of PPAR- $\alpha$  protein involved in skin moisturization and epidermal differentiation in a concentration-dependent manner. As major components of CCE, chlorogenic acid and *p*-coumaric acid increased PPAR- $\alpha$  protein expression. Thus, CCE and PFE could be used as functional cosmetic materials for skin hydration and skin barrier effects.

**Keywords:** *Cymbopogon citratus*, *Perilla frutescens*, skin hydration, skin barrier, keratinocyte

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: tblee01@ncn.re.kr  
call: 063)633-8602

## 1. 서 론

피부는 체내 수분을 보유하고 외부인자의 침입으로부터 내부를 보호하는 필수적인 장벽 기능을 수행하면서 면역 반응을 나타내는 대표적 장기이다[1]. 피부보습을 유지하는 대표적인 인자인 히알루론산(hyaluronic acid)은 콜라겐, 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 가운데 하나로[2] 친수성이 강해 물과 결합하여 겔을 형성하는 성질이 있어 피부 수분 유지에 중요한 역할을 하는 천연 보습제로 알려져 있다[3]. 따라서 히알루론산의 합성을 유도하거나 분해를 억제하는 물질은 피부 보습과 노화 방지에 효과적이며, 특히 히알루론산 합성효소(hyaluronic acid synthase, HAS) 중 HAS2와 HAS3는 히알루론산 합성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 최근 HAS의 유전자 발현 증가를 통해 히알루론산의 생산을 촉진시키고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다[4,5]. 또한, filaggrin은 분해과정을 통해 pyrrocarboxylic acid나 trans-urocanic acid 등과 같은 천연보습인자(natural moisturizing factors)를 형성하여 피부 보습에 중요한 역할을 수행하는 물론, 각질층 pH의 정상화, 항염 작용 등도 수행한다[6,7]. 이외에도 피부보습에 관련된 인자로서, aquaporin 3 (AQP3)는 세포내외의 물과 글리세롤의 이동에 관여한다고 알려져 있다[8,9]. 그리고 인간 표피각질형성세포는 세포막에 AQP3를 발현하고 있고, AQP3 녹아웃 마우스는 피부보습, 피부보호막손상, 상처치유능 저하 등의 피부문제를 나타내는 것으로 알려져 있다[9].

피부 중 표피층은 매우 복잡하고 역동적이며 자기재생적인 피부장벽으로 인체의 조직 가운데에서도 가장 역동적인 기관으로 표피세포의 형성, 분화 및 탈각과정이 끊임없이 반복되면서 표피의 항상성을 유지한다[10]. 표피의 주요구성세포는 각질형성세포의 분화 정도에 따라 각질층, 과립층, 유극층 및 기저층 4개로 나뉘는데 각 층에 따라 유전자의 발현이 다르게 나타난다. 기저층에서는 keratin 5와 14가 발현되는데 분화과정으로 이행하면 발현이 중단된다[11]. 유극층에서는 keratin 1과 10이 합성되며, 유극층 및 과립층에서는 각질세포막 연관 단백질인 involucrin, loricrin, envoplakin 등이 합성되며, 과립층의 세포내에 존재하는 keratohyalin granule 안에 있는 profilaggrin은 filaggrin의 전구체로서 과립층의 세포가 각질층으로 이동하면서 filaggrin으로 변하게 된다[12,13]. 또한, 피부보습과 표피분화에 핵심적인 역할을 하는 인자로 nuclear hormone receptor 중에 하나인 peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- $\alpha$ )가 알려져 있다[14].

레몬그라스(*Cymbopogon citratus* (CC) Stapf)는 벚과(Poaceae)의 여러해살이풀로 레몬향이 나고 \근육이완, 진통, 해열, 스트레스 조절 효과로 인하여 동서양에서 널리 섭취해 오고 있는 허브중의 하나이며 항산화, 항염증, 항균의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[15,16]. 레몬그라스는 isoscoparin, swertiajaponin, chlorogenic acid, caffeic acid, 및 *p*-coumaric acid 등의 다양한 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[17,18]. 자소엽(*Perilla frutescens* var. *acuta* (Odash.) Kudo)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 한 해살이 풀로서 차즈기 또는 차조기로 알려져 있으며 예로부터 발한, 해열, 기관지염, 위장염 등에 사용되어 왔다[19]. 자소엽은 항산화, 항염, 항균 효과가 우수하다고 알려져 있다[20,21]. 이러한 약리활성은 자소엽이 가지고 있는 phenolic compounds, rosmarinic acid, anthocyanin, caffeic acid, luteolin 등 때문으로 보고되었다[22,23]. 이와 같이 자소엽과 레몬그라스의 다양한 효능에도 불구하고 피부보습과 피부장벽에 대한 연구는 현재까지 보고된 바 없다.

본 연구에서는 인간 피부각질형성세포인 HaCaT 세포에서 레몬그라스와 자소엽 추출물의 피부보습 및 피부장벽 개선 효과를 검증함으로써 화장품소재 원료로서의 응용가능성을 제시하고자 한다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 재료

본 시험에서 사용한 레몬그라스와 자소엽은 각각 2017년 10월과 8월에 전라북도 남원시 운봉읍과 주천면에서 채취하여 사용하였으며, 뿌리를 제외한 지상부를 사용하였다. 채취한 원물은 40 °C에서 72 h 건조(LD9013, L'EQUIP, Korea)한 후 4 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2.2. 시료 추출물 제조

건조된 레몬그라스와 자소엽을 분쇄기(HMF-3600TG, Haniil, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 100 g에 물과 50% 에탄올 2 L를 혼합하고 물은 100 °C, 50% 에탄올은 80 °C에서 각각 4 h 동안 추출하였다. 추출물은 부직포와 종이여과지를 이용하여 2회 여과하였으며, 여과된 추출물은 감압농축기(R-100, BUCHI, Switzerland)를 이용하여 50 °C에서 농축하고, 동결건조기(MCFD8508, IlshinBiobase, Korea)를 이용하여 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

### 2.3. 세포주 및 세포배양

인간 피부각질형성세포주인 HaCaT 세포를 56 °C에서 30 min 열처리된 fetal bovine serum (Merck, USA) 10%와 항생제(penicillin/streptomycin, Gibco, USA)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM, Welgene, Korea)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 세포 배양기에서 배양하였다.

### 2.4. 세포독성검사

WST-1 assay를 이용하여 레몬그라스와 자소엽 추출물의 세포 생존율을 측정하였다. 96 well plate에 HaCaT 세포를 5×10<sup>3</sup> cells로 분주한 후 24 h 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 조건에서 부착 및 안정화를 시킨 후, 레몬그라스와 자소엽 추출물을 농도별로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. WST-1 assay는 cell viability assay kit (EZ-Cytox, Dogen, Korea)를 이용하였고, 모든 well에 EZ-Cytox 용액 10 μL를 가해 주고 다시 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2 h 배양한 뒤 흡광도 측정을 위해 1 min 정도 부드럽게 shaking을 한 뒤 microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.5. 히알루론산 생성능

6 well plate에 HaCaT 세포를 6×10<sup>5</sup> cells로 분주한 후 24 h 동안 배양하고, FBS가 없는 DMEM 기본배지로 2번 세척한 후 다시 DMEM 배지로 교체하고 레몬그라스와 자소엽 추출물을 48 h 동안 처리하였다. 48 h 후에 350 μL media를 걷어내었고 12,000 rpm에서 5 min 원심분리하고

상층액을 걷어내어 HA sandwich ELISA kit (echelon, USA)를 이용하였으며 제조사에서 제공한 방법에 의해 진행하였다. 양성대조군은 1 μM all-trans retinoic acid (ATRA)를 사용하였다.

### 2.6. 페놀성 화합물에 대한 HPLC 분석

레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물에 대한 19종 페놀성 화합물(phenolic compounds)의 함량 분석은 HPLC (Alliance e2695, Waters, USA)를 이용하여 함량을 분석하였다. 시료 10 mg 또는 표준품 1 mg을 취하여 50% 에탄올 1 mL에 용해하였고, 시료 10 μL를 HPLC에 주입하고 0.8 mL/min 속도로 분석하였다. 이동상으로는 water (0.1% formic acid)와 acetonitrile (0.1% formic acid)를 사용하였고, column은 Shim-pack VP-ODS (4.6 mm x 250 mm, 5 μm) (Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도 280 nm에서 분석하였다. 19종 표준품은 gallic acid, chlorogenic acid, methyl gallate, caffeic acid, EGCG, syringic acid, *p*-coumaric acid, rutin, ellagic acid, ferulic acid, astragalol, quercitrin hydrate, rosmarinic acid, myricetin, luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol, hesperetin (Sigma, USA)을 이용하였다. 19종 페놀성 화합물의 retention time과 최대흡수파장은 Table 1과 같다.

### 2.7. 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통한 유전자 발현

6 well plate에 HaCaT 세포를 6×10<sup>5</sup> cells로 분주한 후 24 h 동안 배양하고, FBS 미포함 DMEM 배지로 2번 세척한 후

**Table 1.** Retention Time and Maximum Absorbance Wavelength of 19 Standard Phenolic Compounds

NO.	Compound	RT (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	NO.	Compound	RT (min)	λ <sub>max</sub> (nm)
1	Gallic acid	12.491	271	11	Astragalol	28.610	347, 265
2	Chlorogenic acid	20.062	325, 217	12	Quercitrin hydrate	28.798	348, 255
3	Methyl gallate	20.401	272	13	Rosmarinic acid	30.659	329
4	Caffeic acid	21.862	323, 217	14	Myricetin	30.877	363, 253
5	EGCG	22.323	274	15	Luteolin	35.384	348, 253
6	Syringic acid	22.584	274	16	Quercetin	35.606	363, 255
7	<i>p</i> -Coumaric acid	25.686	210, 226	17	Apigenin	39.220	336, 267
8	Rutin	25.686	354, 255	18	Kaempferol	40.032	363, 265
9	Ellagic acid	26.174	363, 253	19	Hesperetin	40.730	287
10	Ferulic acid	27.359	323, 217				

RT, Retention time

FBS 미포함 DMEM 배지로 교체하고 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물을 48 h 동안 처리하였다. 48 h 후에 세포에서 RNA를 추출하기 위해 total RNA extraction reagent인 tri reagent (RNAiso PLUS, Takara, Japan)를 이용하였다. Tri reagent 1 mL을 세포에 넣은 후 15 s 동안 vortex하였다. 이어 15,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리한 후 chloroform 200  $\mu$ L를 넣고 20 s 동안 vortex한 후 원심 분리한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 차가운 isopropanol 동량을 넣고 상온에서 10 min 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 20 min 동안 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. RNA 침전물을 75% ethanol로 씻은 후, 침전물을 2 ~ 3 min 동안 실온에서 건조시켜 0.1% DEPC water에 녹였다. RNA 농도(1 OD = 40  $\mu$ g/mL)는 Evloution 260 Bio UV-Vis

spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정된 후, reverse transcription kit (RNA to cDNA EcoDry Premix (Oligo dT), Clontech, USA)를 이용하여 1  $\mu$ g RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 멸균된 3 차증류수로 5배 희석한 후 실시간 PCR 은 Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I kit (Roche, Germany)을 이용하여 Light Cycler 2.0 (Roche)에서 증폭하였다. 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 2, 3과 같으며 유전자의 정량분석은 Light Cycler Software 4.0 (Roche)을 이용하였다. 피부보습과 피부 장벽에 대한 양성대조군은 각각 1  $\mu$ M ATRA과 2 mM의 calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>)를 사용하였다.

**Table 2.** PCR Primers for Real-time PCR

Gene	NCBI Reference Sequence	Species	Forward/Reverse	Sequences(5'-->3')	CDS	Location	Size (bp)
HAS1	NM_001523.3	human	F	GTGCGGGTACTGGACGA	60 - 1796	810	826
			R	GACCGCTGATGCAGGATACA		981	962
HAS2	NM_005328.2	human	F	GCAGTGTAAGATATTGGATGGC	539 - 2197	1305	1326
			R	CCCATAAAATTCTTGATTGTACCAATCTTC		1455	1427
HAS3	AF234839.1	human	F	TGTCCAGATCCTCAACAAGTACGA	157 - 1818	888	911
			R	CTGGAGGAGGCTGTTGC		1044	1028
Filaggrin	AH002947.2	human	F	GGCTAAGTGAAAGACTTGAAGAGA	2586 - 4929	3751	3774
			R	AATAGACTATCAGTGGTGCATAGG		3907	3883
AQP3	NM_004925	human	F	TGCAATCTGGCACTTCGC	104 - 982	478	495
			R	GCCAGCACACACACGATAA		633	615
Loricrin	NM_000427.2	human	F	CTGCTTCTCCTCCGGTG	55 - 993	390	406
			R	TCCGTAGCTCTGGCACT		540	524
$\beta$ -actin	NM_001101.4	human	F	CACTGTGCCCATCTACG	193 - 1320	675	691
			R	CTTAATGTCACGCACGATTTTC		831	811

**Table 3.** Real-time PCR Conditions

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
HAS1					
HAS2					
HAS3	95 $^{\circ}$ C, 10 min	95 $^{\circ}$ C, 15 s	60 $^{\circ}$ C, 10 s	72 $^{\circ}$ C, 10 s	45
Filaggrin					
AQP3					
Loricrin	95 $^{\circ}$ C, 10 min	95 $^{\circ}$ C, 15 s	62 $^{\circ}$ C, 10 s	72 $^{\circ}$ C, 10 s	45
$\beta$ -actin	95 $^{\circ}$ C, 10 min	95 $^{\circ}$ C, 15 s	60 $^{\circ}$ C, 10 s	72 $^{\circ}$ C, 10 s	40

## 2.8. 단백질분석

60 mm dish에 HaCaT 세포를  $1 \times 10^6$  cells로 분주한 후 24 h 동안 배양하고, FBS 미포함 DMEM 배지로 2번 세척한 후 FBS 미포함 DMEM 배지로 교체하고 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물을 48 h 처리하였다. 48 h 후에 lysis buffer로 단백질을 추출하고 Bradford 방법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 이후 SDS-PAGE gel에 20  $\mu\text{g}$ 을 loading 한 후 PVDF membrane에 transfer 한 다음 blocking, 1차 항체(PPAR- $\alpha$  1 : 1000,  $\beta$ -actin 1 : 2500), 2차 항체(anti-rabbit 1 : 5000) 및 ECL Western Blotting Substrate (Promega, USA) 로 PPAR- $\alpha$  단백질의 발현 정도를 확인하였다. 피부보습과 피부장벽에 대한 양성대조군은 각각 1  $\mu\text{M}$  ATRA과 2 mM의  $\text{CaCl}_2$ 를 사용하였고 페놀성 단일 화합물의 농도는 20  $\mu\text{M}$ 을 사용하였다.

## 2.9. 통계학적 분석

모든 분석 자료는 평균 $\pm$ 표준오차 (Mean  $\pm$  SD)로 나타내었으며 실험결과는 GraphPad InStat software (San Diego, USA)를 이용하였다. 통계적인 분석은 one-way analysis of variance with tukey-kramer multiple comparisons test 방법을 이용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 레몬그라스와 자소엽 추출물의 세포독성

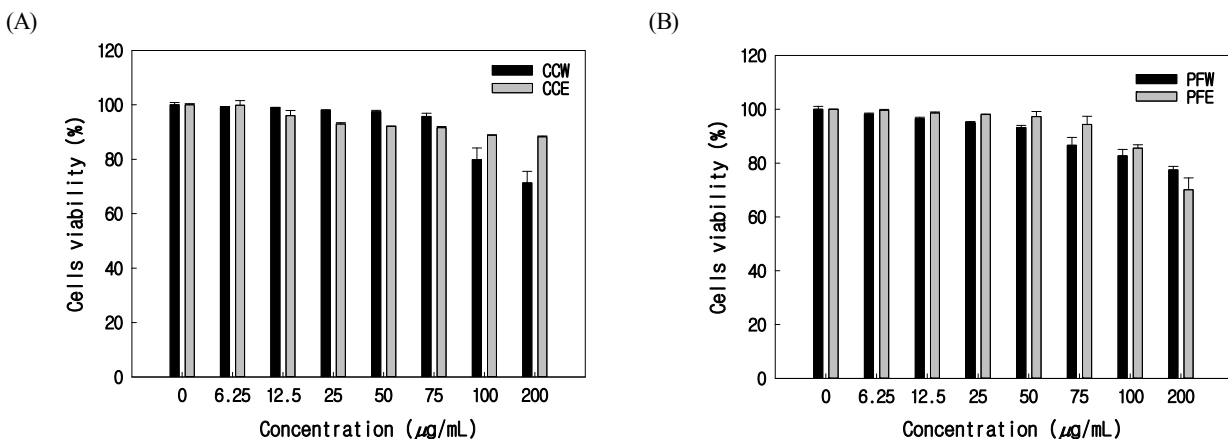
인간 피부각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 레몬그라

스와 자소엽의 물 추출물과 50% 에탄올 추출물을 6.25 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 48 h 처리한 후 세포독성을 측정할 결과, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지는 세포독성을 보이지 않았으나, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다(Figure 1).

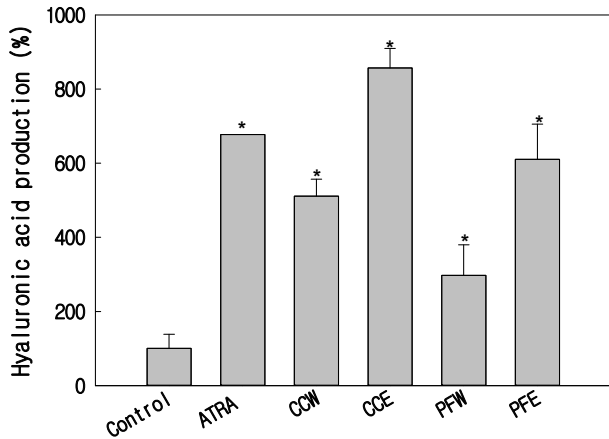
### 3.2. 레몬그라스와 자소엽 추출물의 히알루론산 생성능

히알루론산은 glucuronic acid와 N-acetyl glucosamine이 반복된 서열로 결합하여 있는 천연 다당류이며[24], 분자량이 20 - 40만에 이르는 고분자 화합물로서 표피의 수분 증발을 막아 피부의 탄력성을 유지할 뿐만 아니라, 영양성분의 저장과 확산, 세포 이동 등에 관여한다[25,26]. 인체 내에서 히알루론산은 보습기능 이외에 항산화, 항염, 항균, 부종 억제 등 다양한 기능을 한다고 알려져 있다[27]. 히알루론산은 연령의 증가에 따라 피부에서 감소되며 자외선의 장기 노출과 같은 환경적 요인에 의해서도 부정적 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이러한 히알루론산의 감소는 피부 수분 함량의 감소와 함께 탄력의 감소, 거친 피부 및 주름 등의 원인으로 알려져 있다[5].

인간 피부각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 레몬그라스와 자소엽의 물 추출물과 50% 에탄올 추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 48 h 동안 처리한 후 히알루론산 생성능을 측정할 결과, 양성대조군인 ATRA를 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해 6.8배 증가하였고 레몬그라스 물 추출물과 50% 에탄올 추출물은 각각 5.1배, 8.6배 증가하였으며 자소엽 물 추출물과 에탄올 추출물에서는 각각 3.0



**Figure 1.** Cytotoxicity effect of (A) *C. citratus* and (B) *P. frutescens* extracts in human keratinocyte HaCaT cells. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. CCW, *C. citratus* water extract; CCE, *C. citratus* ethanol extract; PFW, *P. frutescens* water extract; PFE, *P. frutescens* ethanol extract.



**Figure 2.** Hyaluronic acid release of *C. citratus* and *P. frutescens* extracts in HaCaT cells. Each value represents the mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control ( $p < 0.05$ ). ATRA, all-trans retinoic acid.

배, 6.1배 증가하였다. 결과적으로 레몬그라스 추출물이 자소엽 추출물보다 히알루론산 생성이 더 많았으며, 레몬그라스와 자소엽 물 추출물보다 50% 에탄올 추출물에서 훨씬 더 많은 히알루론산을 방출하였다(Figure 2).

### 3.3. 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물의 페놀성 화합물 분석

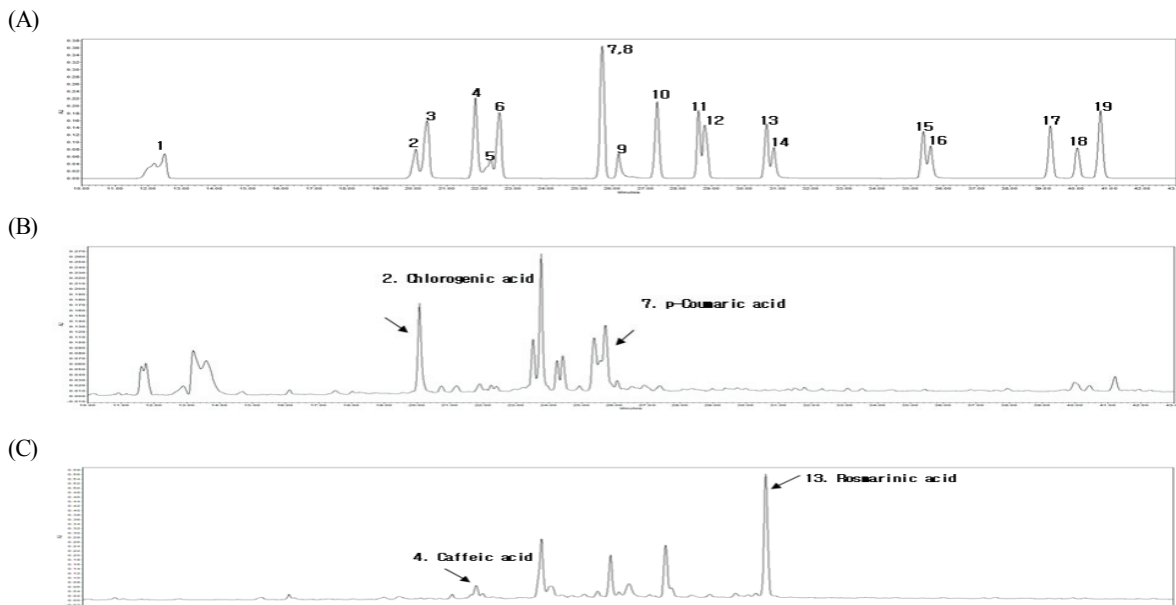
레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물에 대한 페놀성 화

합물을 검출하기 위하여 HPLC를 이용한 동시 다분석을 실시하였다. 19종의 표준물질을 이용하여 동시 다분석 HPLC 그래프는 Figure 3A와 같으며 레몬그라스 에탄올 추출물은 chlorogenic acid와 *p*-coumaric acid가 각각 11.15 mg/g과 2.05 mg/g이 검출되었으며 자소엽 에탄올 추출물에서 rosmarinic acid와 caffeic acid가 각각 20.87 mg/g과 1.50 mg/g이 검출되었다(Figure 3B, Figure 3C).

페놀성 화합물 중 caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid는 hyaluronidase 억제효과가 보고되었으며[28,29], kameferol과 quercetin은 히알루론산 분비를 촉진시킬 뿐만 아니라 HAS2와 HAS3 유전자의 발현을 증가시킨다고 보고된 바 있다[30]. 또한 ferulic acid도 히알루론산분비와 HAS2 유전자의 발현을 증가시킨다고 보고되었다[4].

### 3.4. 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물의 피부보습 및 피부장벽에 미치는 영향

피부보습을 유지하는 히알루론산은 표피의 기저층과 유극층에서 활발한 합성이 일어나고 HAS에 의해 생성이 되는데 HAS1과 HAS2는 fibroblast에서 HAS3는 keratinocyte에서 과발현된다고 알려져 있다[31]. 최근 HAS 유전자 발현 증가를 통해 히알루론산의 합성을 조절하여 보습력 및 항노화 기능을 향상 시키고자 하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다[32]. AQP family는 작은 소수성 세포막 내재 단백질로 수분을 특이적으로 세포내로 수송하는 역할을 담



**Figure 3.** HPLC chromatogram of (A) 19 standard phenolic compounds, and ethanol extracts of (B) *C. citratus* and (C) *P. frutescens*.

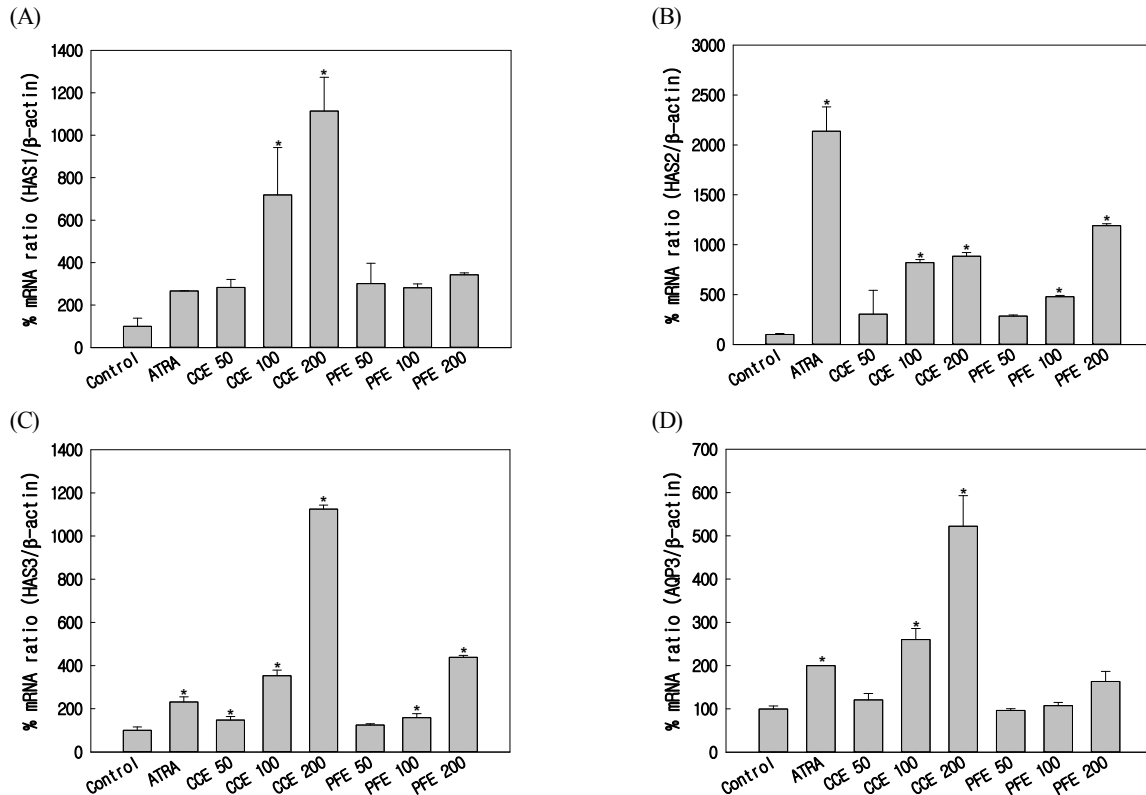
당한다[9,33]. 또한, 피부장벽보호 단백질로 involucrin, loricrin, filaggrin, comifin, small proline-rich protein, transglutaminase 1 및 3 등이 있다[34,35].

PPAR- $\alpha$ 는 피부보습과 표피분화 조절에 핵심적인 인자로 알려져 있으며[14], 히알루론산 생성과 피부각질세포 분화 물질로 알려진 ATRA와  $\text{CaCl}_2$  처리에 의해 증가된다고 알려져 있다[36,37]. 또한, PPAR- $\alpha$  activator는 피부보습과 관련된 히알루론산 생성, HAS 및 AQP3의 발현을 증가시킬뿐만 아니라 피부장벽보호물질인 filaggrin, involucrin, loricrin의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다[38,39].

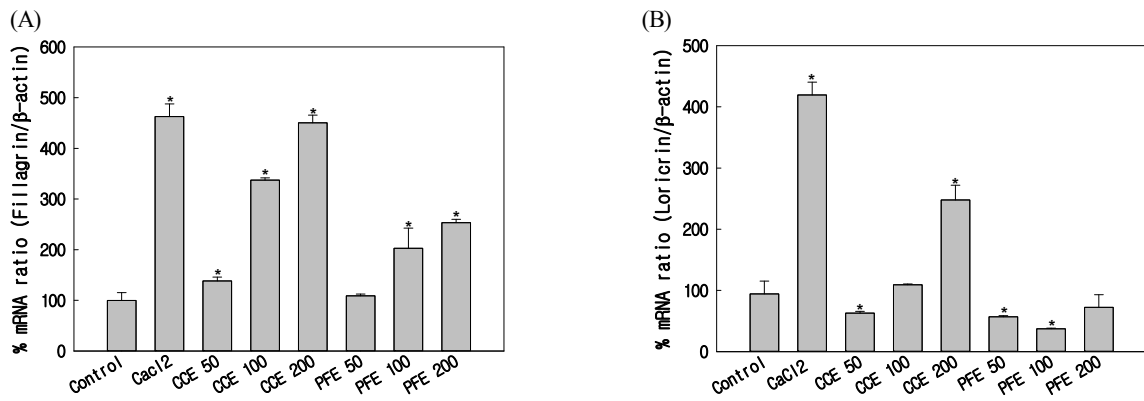
인간 피부각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물을 48 h 동안 처리한 후 real-time PCR를 통해 피부보습 및 피부장벽에 관한 유전자의 발현을 조사하였다. 피부보습에 관련된 유전자는 HAS1, HAS2, HAS3 및 AQP3 mRNA와 피부장벽에 관련된 유전자는 filaggrin, loricrin 및 involucrin mRNA의 발현을 측정하였다. 피부보습에 관련된 양성대조군으로 ATRA 1  $\mu\text{M}$  를 사용하였으며 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물은 50, 100,

200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하였다(Figure 4). 실험결과 양성대조군인 ATRA는 대조군과 비교하였을 때 HAS1, HAS2, HAS3 및 AQP3 mRNA의 발현이 각각 2.7배, 21.4배, 2.3배, 2.0배 증가하였다. 그리고 레몬그라스와 에탄올 추출물을 처리한 경우에는 HAS1, HAS2, HAS3 및 AQP3 mRNA의 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, 자소엽 에탄올 추출물 처리에 의해서는 HAS2와 HAS3 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물을 비교한 경우 레몬그라스가 자소엽보다 훨씬 많은 피부보습에 관련된 유전자를 증가시켰음을 알 수 있었다.

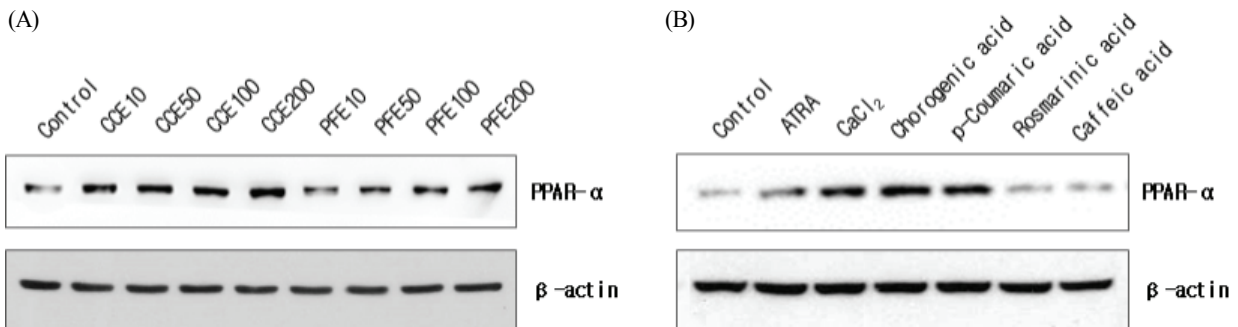
이 뿐 아니라, 피부장벽에 관련된 유전자를 조사하기 위하여 양성대조군으로 2 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 사용하였으며 레몬그라스와 자소엽의 에탄올 추출물은 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 테스트한 결과, 양성대조군인  $\text{CaCl}_2$ 는 filaggrin과 loricrin mRNA의 발현을 각각 4.6배, 4.2배 증가시켰다(Figure 5). 그리고 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물 모두 filaggrin mRNA의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰지만 loricrin



**Figure 4.** Effect of ethanol extract of *C. citratus* and *P. frutescens* on expression of (A) HAS1, (B) HAS2, (C) HAS3 and (D) AQP3 mRNA in HaCaT cells. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control ( $*p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Effect of ethanol extract of *C. citratus* and *P. frutescens* on expression of (A) filaggrin and (B) lorixin mRNA in HaCaT cells. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control (\* $p$  < 0.05).



**Figure 6.** Effect of (A) ethanol extract and (B) main compounds of *C. citratus* and *P. frutescens* on expression of PPAR- $\alpha$  protein in HaCaT cells.

mRNA의 발현에서는 레몬그라스 추출물 처리에 의해 증가를 보였지만 자소엽 추출물은 변화를 보이지 않았다. 또한, 레몬그라스 추출물과 자소엽 에탄올 추출물 모두 피부보습과 표피분화 조절에 관여하는 PPAR- $\alpha$  단백질의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며 레몬그라스의 추출물의 주요성분인 chlorogenic acid와 p-coumaric acid를 20  $\mu$ M의 농도로 처리하였을 때 PPAR- $\alpha$  단백질의 발현을 증가시켰다 (Figure 6). 하지만 자소엽의 주요성분인 rosmarinic acid와 caffeic acid 처리에 의해서 큰 변화를 보이지 않은 이유는 천연물을 수 백가지 이상의 화합물로 구성되어 있고 rosmarinic acid와 caffeic acid 이외의 성분들이 PPAR- $\alpha$  단백질의 발현에 영향을 미칠 것으로 생각되어진다. 자소엽은 폐놀성 화합물 이외에 apigenin과 luteolin 유도체 같은 플라보노이드 성분을 함유한다고 알려져 있다[40]. Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide 성분은 hyaluronidase을 강력하게 억제한다고 알려져 있고[41], luteolin-7-glucoside 성분은 피부각질형성의 분화를 촉진한다고 알려져 있다[42].

결과적으로 피부보습과 피부장벽보호 효과에 있어서 레몬그라스 에탄올 추출물이 자소엽 에탄올 추출물보다 우수한 효과를 나타내었다. 결론적으로, 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물은 피부보습과 피부장벽에 대한 유전자를 증가시키므로써 피부보습과 피부장벽 개선효과가 있음을 확인하였다.

#### 4. 결 론

피부의 가장 중요한 기능은 신체로부터 체액이 빠져나가는 것을 막고, 병원 및 유해물질이 침투하는 것을 막는 장벽으로서의 역할이다. 본 연구에서는 피부각질 형성세포인 HaCaT 세포에서 레몬그라스와 자소엽 추출물의 피부보습과 피부장벽개선에 대한 화장품 소재원료로서의 가능성을 검토하였다.

레몬그라스와 자소엽의 물 추출물과 에탄올 추출물을 비교한 결과 에탄올 추출에서 훨씬 많은 히알루론산 생성



을 확인하였다. 그리고 레몬그라스와 자소엽 에탄올 추출물 모두 피부보습과 피부장벽 개선 효과를 나타내었지만 자소엽 에탄올 추출물보다 레몬그라스 에탄올 추출물에서 우수한 효과를 나타내었고, 특히 레몬그라스의 주요성분인 chlorogenic acid와 *p*-coumaric acid에서 우수한 피부보습과 피부장벽 개선 효과를 나타내었다.

### Acknowledgment

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품 기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다 (과제번호 : 317024-5).

### Reference

1. A. Sandilands, C. Sutherland, A. D. Irvine, and W. H. McLean, Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease, *J. Cell Sci.*, **122**(9), 1285 (2009).
2. M. B. Brown and S. A. Jones, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin, *J. Eur Acad Dermatol Venereol*, **19**(3), 308 (2005).
3. E. M. Choi and J. K. Hwang, Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*, *Fitoterapia*, **75**(6), 557 (2004).
4. C. H. Kim, M. C. Kwon, J. G. Han, C. S. Na, H. G. Kwak, G. O. Choi, U. Y. Park, and H. Y. Lee, Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **16**(4), 255 (2008).
5. P. J. Lee, H. T. Kim, K. S. Yoon, H. C. Park, and H. Y. Ha, The effect of *Astragalus membranaceus* methanol extract on hyaluronic acid production in HaCaT cells, *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, **26**(1), 75 (2013).
6. M. J. Cork, S. G. Danby, Y. Vasilopoulos, J. Hadgraft, M. E. Lane, M. Moustafa, R. H. Guy, A. L. Macgowan, R. Tazi-Ahmini, and S. J. Ward, Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.*, **129**(8), 1892 (2009).
7. C. R. Harding, A. Watkinson, A. V. Rawlings, and I. R. Scott, Dry skin, moisturization and comeodesmolysis, *Int J Cosmet Sci*, **22**(1), 21 (2000).
8. A. S. Verkman and A. K. Mitra, Structure and function of aquaporin water channels, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **278**(1), 13 (2000).
9. R. Sougrat, M. Morand, C. Gondran, P. Barré, R. Gobin, F. Bonté, M. Dumas, and J. M. Verbavatz, Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **118**(4), 678 (2002).
10. M. Lodén M, The skin barrier and use of moisturizers in atopic dermatitis, *Clin. Dermatol.*, **21**(2), 145 (2003).
11. H. Alam, L. Sehgal, S. T. Kundu, S. N. Dalal, and M. M Vaidya, Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells, *Mol. Biol. Cell*, **22**(21), 4068 (2011).
12. H. H. Jang, Effects of acetyl glutamine on the improvement of skin barrier and inhibition of senescence, *Asian J Beauty Cosmetol*, **16**(4), 579 (2018).
13. J. S. Oh and H. H. Jang, Epidermal Differentiation and Skin Barrier. *Kor J Aesthet Cosmetol.*, **13**(6), 713 (2015).
14. S. W. Woo, D. B. Rhim, C. Kim C, and J. K. Hwang, Effect of standardized *Boesenbergia pandurata* extract and its active compound panduratin A on skin hydration and barrier function in human epidermal keratinocytes, *Prev Nutr Food Sci*, **20**(1), 15 (2015).
15. M. O. Soares, R. C. Alves, P. C. Pires, M. B. Oliveira, and A. F. Vinha, Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts, *Food Chem. Toxicol.*, **60**, 413 (2013).
16. M. N. Boukhatem, M. A. Ferhat, A. Kameli, F. Saidi, and H. T. Kebir, Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs, *Libyan J Med*, **9**(1), 25431 (2014).
17. J. Cheel, C. Theoduloz, J. Rodriguez, and G. Schmeda-Hirschmann, Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.),

- J. Agric. Food Chem.*, **53**(7), 2511 (2005).
18. E. M. H. Méabed, A. I. B. Abou-Sreera, and M. H. H. Roby, Chemical analysis and giardicidal effectiveness of the aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf, *Parasitol. Res.*, **117**(6), 1745 (2018).
  19. D. Y. Park and K. Y. Lee, Evaluation of the cosmeceutical activity of ethanol extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta*, *J Korea Acad Industr Coop Soc*, **18**(3), 513 (2017).
  20. Y. So, S. Y. Lee, A. R. Han, J. B. Kim, H. G. Jeong, and C. H. Jin, Rosmarinic acid methyl ester inhibits LPS-induced NO production via suppression of MyD88-dependent and independent pathways and induction of HO-1 in RAW 264.7 Cells, *Molecules*, **21**(8), 1083 (2016).
  21. N. Li, Z. J. Zhang, X. J. Li, H. Z. Li, L. X. Cui, and D. L. He, Microcapsules biologically prepared using *Perilla frutescens* (L.) Britt. essential oil and their use for extension of fruit shelf life, *J. Sci. Food Agric.*, **98**(3), 1033 (2018).
  22. B. Y. Kim, J. S. Jeong, H. J. Kwon, J. H. Lee, and S. P. Hong. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid from *Perilla frutescens* var. *japonica* and var. *acuta* by reversed-phase HPLC, *Kor. J. Herbol.*, **23**(3), 67 (2008).
  23. Y. Nakamura, Y. Ohto, A. Murakami, and H. Ohigashi, Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton Var. *acuta* f. *viridis*, *J. Agric. Food Chem.*, **46**(11), 4545 (1998).
  24. G. Huang and J. Chen, Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.*, **125**, 478 (2019).
  25. B. Dübe, H. J. Lüke, M. Aumailley, and P. Prehm, Hyaluronan reduces migration and proliferation in CHO cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1538**(2-3), 283 (2001).
  26. H. J. Song, M. H. Jin, and S. H. Lee, Effect of ferulic acid isolated from *Cnidium Officinale* on the synthesis of hyaluronic acid, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 281 (2013).
  27. P. Dahiya and R. Kamal, Hyaluronic Acid: a boon in periodontal therapy, *N Am J Med Sci*, **5**(5), 309 (2013).
  28. Y. M. Park, M. Y. Yoon, K. W. Kim, N. Y. Cho, H. W. Lim, J. Y. Lee, J. H. Lee, Y. J. Kim, C. J. Kim, and S. S. Sim. Effects of phenylpropanoid compounds on melanin production in B16 melanoma cells. *J. Pharm. Soc. Korea*, **47**(6), 398 (2003).
  29. M. A. Muhit, M. Izumikawa, K. Umehara, and H. Noguchi, Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. *Phytochemistry*, **121**, 30 (2016).
  30. S. H. Kim, G. W. Nam, B. Y. Kang, H. K. Lee, S. J. Moon, and I. S. Chang, The effect of kaempferol, guercetin on hyaluronan-synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT), *J. Cosmet. Sci. Korea*, **31**(1), 97 (2011).
  31. S. Saito Y. Takayama, K. Mizumachi, and C. Suzuki, Lactoferrin promotes hyaluronan synthesis in human dermal fibroblasts, *Biotechnol. Lett.*, **33**(1), 33 (2011).
  32. M. S. Kang, H. Y. Ha, and H. T. Kim, An experimental study on the effect of *Angelica acutiloba* ethanol extract on hyaluronic acid synthesis, *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, **28**(1), 32 (2015).
  33. M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman, Roles of aquaporin-3 in the epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **128**(9), 2145 (2008).
  34. E. Fuchs, Epidermal differentiation and keratin gene expression, *J. Cell Sci.*, **17**, 197 (1993).
  35. P. M. Steinert and L. N. Marekov, The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope, *J. Biol. Chem.*, **270**(30), 17702 (1995).
  36. S. Natesan, N. L. Wrice, and R. J. Christy, Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist and all-trans retinoic acid induce epithelial differentiation of subcutaneous adipose-derived stem cells from debrided burn skin, *J. Cell. Biochem.*, **120**(6), 9213 (2019).
  37. M. Westergaard, J. Henningsen, M. L. Svendsen, C. Johansen, U. B. Jensen, H. D. Schröder, I. Kratchmarova, R. K. Berge, L. Iversen, Bolund L, K. Kragballe, and

- K. J. Kristiansen, Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid, *J. Invest. Dermatol.*, **116** (5), 702 (2001).
38. S. H. Kim, G. W. Nam, H. K. Lee, S. J. Moon, and I. S. Chang, The effects of Musk T on peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]- $\alpha$  activation, epidermal skin homeostasis and dermal hyaluronic acid synthesis, *Arch. Dermatol. Res.*, **298**(6), 273 (2006).
39. Y. J. Jiang, P. Kim, Y. F. Lu, and K. R. Feingold. PPAR $\gamma$  activators stimulate aquaporin 3 expression in keratinocytes/epidermis, *Exp. Dermatol.*, **20**(7), 595 (2011).
40. L. Meng, Y. F. Lozano, E. M. Gaydou, and B. Li, Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties, *Molecules*, **14**(1), 133 (2008).
41. T. Murata, T. Miyase, and F. Yoshizaki, Cyclic spermidine alkaloids and flavone glycosides from *Meehania fargesii*, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**(5), 696 (2010).
42. R. Palombo, I. Savini, L. Avigliano, S. Madonna, A. Cavani, C. Albanesi, A. Mauriello, G. Melino, and A. Terrinoni, Luteolin-7-glucoside inhibits IL-22/STAT3 pathway, reducing proliferation, acanthosis, and inflammation in keratinocytes and in mouse psoriatic model, *Cell Death Dis*, **7**(8). e2344 (2016).