

왕벚나무 수피 에틸아세테이트 분획물의 히알루론산 합성효과

송지현^{1,†} · 김명기^{2,†} ·곽수민¹ · 김용민^{1,††}

^{*}세명대학교 화장품과학과, 석사 대학원생

^{**}서원대학교 식품공학과, 교수

^{***}세명대학교 화장품과학과, 교수

(2024년 8월 16일 접수, 2024년 9월 12일 수정, 2024년 9월 20일 채택)

Hyaluronic Acid Synthesis Effect of *Prunus yedoensis* Bark Ethyl Acetate Fraction

Ji Hyun Song^{1,†}, Myong-Ki Kim^{2,†}, Soo Min Kwak¹, and Yong Min Kim^{1,††}

¹Department of Cosmetic Science, Semyung University, 65 Semyung-ro,
Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

²Department of Food science & Engineering, Seowon University

(Received August 16, 2024; Revised September 12, 2024; Accepted September 20, 2024)

요약: 피부장벽은 외부 자극과 체내의 수분 손실을 막아 건강한 피부를 유지하는 중요한 역할을 한다. 피부에서의 hyaluronic acid (HA)는 hyaluronic acid synthase (HAS) 효소에 의해 합성되어 천연보습인자로서 기능을 하며, 수분 보존 및 장벽 기능을 유지하는 데 관여한다. 이에 본 연구에서는 왕벚나무 수피 에틸아세테이트 분획물(*Prunus yedoensis* bark ethyl acetate fraction, PYBEAF)이 HaCaT 세포에서 HA 합성에 미치는 영향을 확인하였다. MTT assay를 통해 세포독성 평가를 진행하였고, HaCaT 세포에서 PYBEAF 처리를 통해 HA 합성량을 ELISA를 통해 확인하였다. HAS-2, HAS-3 mRNA 발현 수준을 qRT-PCR을 사용하여 분석하였으며, western blotting을 통하여 단백질 발현 수준 및 신호전달경로를 확인하였다. 결과적으로 PYBEAF가 MAPK와 CREB 신호전달경로에 관여하여 HAS-2 합성을 통해 HA 생성량을 증가시켰다. 이는 PYBEAF가 피부 보습 및 수분 유지에 중요한 역할을 하는 HA 합성을 증가시켜 장벽 기능을 향상시키는데 효과가 있음을 시사한다.

Abstract: The skin barrier plays an important role in maintaining healthy skin by preventing external irritation and water loss in the body. In the skin, hyaluronic acid (HA) is synthesized by the enzyme hyaluronic acid synthase (HAS), which functions as a natural moisturizing factor and is involved in maintaining water retention and barrier function. Therefore, in this study, the effect of the *Prunus yedoensis* bark ethyl acetate fraction (PYBEAF) on HA synthesis in HaCaT cells was confirmed. Cytotoxicity evaluation was performed through MTT assay, and the amount of HA synthesis in HaCaT cells was confirmed through ELISA through PYBEAF treatment. The levels of HAS-2, HAS-3 mRNA expression were analyzed using qRT-PCR, and the protein expression level and signaling pathway were confirmed through western blotting. Consequently, PYBEAF was involved in the MAPK and CREB signaling pathways, increasing the amount of HA production through HAS-2 synthesis. This suggests that PYBEAF is effective in improving barrier function by increasing HA synthesis, which plays an important role in moisturizing and maintaining skin moisture.

Keywords: *Prunus yedoensis* bark, hyaluronic acid, MAPK, HaCaT

†주 저자 (e-mail: songjh8067@nate.com)

call: 049-649-1616

(e-mail: mkkim1014@naver.com)

call: 043-299-8473

†† 교신저자 (e-mail: dradonroom@semyung.ac.kr)

call: 049-649-1616

1. 서 론

피부는 외부 자극과 체내의 수분 손실을 방지하는 보호 장벽으로 작용하며, 특히 각질층은 수분 유지에 중요한 역할을 수행한다. 건강한 피부를 유지하기 위해서는 적절한 수분 공급이 중요하며, 이는 피부가 수분 증발을 방지하고 효과적인 장벽을 형성하고 있다는 것을 의미한다[1].

표피는 15 ~ 30 nm 두께의 단백질과 지질층으로 이루어져 수분 손실을 방지하고 외부 미생물의 침투를 차단하는 물리적 장벽으로서 중요한 역할을 한다. 표피는 피부 수분 유지를 위한 필수적인 구조물로서, 수분 이동을 조절하고 수분을 끌어당겨 유지하는 보습인자를 포함하고 있다[2]. 따라서, 피부의 보습 효과와 보호 장벽을 유지하기 위해서는 hyaluronic acid (HA)의 함량을 일정하게 유지하는 것이 중요하다.

피부 보습을 유지하는 대표적인 인자인 HA는 D-glucuronic acid와 N-acetyl-D-glucosamine이 교대로 연결된 구조를 가진 고분자 glycosaminoglycan으로, 분자 구조 내에 수산화기(-OH)를 포함하고 있어 친수성 물질로 분류되고 있다. HA는 눈, 관절, 피부 등 다양한 인체 조직과 기관에 존재하는 세포 외 기질의 주성분이다[3,4]. 또한 다량의 수분을 보유하고 있어 피부의 수분 유지뿐만 아니라 삼투압 조절에 중요하다[5].

HA 함량의 증가는 hyaluronic acid synthase (HAS)에 의해 조절되며, hyaluronic acid synthase-1 (HAS-1), hyaluronic acid synthase-2 (HAS-2), hyaluronic acid synthase-3 (HAS-3)의 세 가지 형태로 알려져 있다[6]. 이 효소들은 원형질막의 내부 표면에서 HA를 합성한 후 기공형 구조를 통해 세포외 공간으로 압출된다[7].

HaCaT 세포에서 epidermal growth factor receptor (EGFR)의 활성화는 extracellular signal-regulated kinase (ERK)의 인산화를 촉진하며, HAS-2 mRNA 발현을 유도하여 HA 생성을 증가시킨다[8]. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로는 세포 외 신호를 세포 내 반응으로 전환하는 데 활용되는 핵심 매개체로, ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 그리고 p38 kinase 세 가지 주요 하위 경로로 분류한다. 각 경로는 유전자 발현, 세포 분화, 생존 및 이동 등 다양한 세포 반응에 관여한다[9,10]. 세포 외 신호를 통해 활성화된 MAPK 경로는 전사인자와의 상호작용을 통해 유전자의 발현을 조절한다. 이전 연구에 따르면, MAPK와 cyclic amp response element-binding protein (CREB) 신호전달 경로가 보습 단백질

질의 유전자 발현 조절에 관여한다고 보고되었다[11].

왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura, *P. yedoensis*)는 장미과에 속하는 벚나무속의 한 종류로, 우리나라에 약 20여종이 분포하고 있다[12]. 오랜 역사 동안 전통 의학과 치료 목적으로 사용되어 왔으며, 최근에는 그 화학적 구성과 의약적 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[13]. 기존 연구 결과에 따르면 왕벚나무는 면역억제 특성, 염증 및 항염증 효과가 있다고 알려져 있다[14]. *Prunus* 종은 flavonoid가 풍부한 것으로 알려져 있는데, flavonoid는 천연 화합물 계열의 구성원으로서 항산화 및 항염증 효과를 나타내며, 염증 반응을 억제하여 세포 손상을 방지하는 데 기여한다[15,16]. Quercetin, kaempferol과 같은 flavonoid 성분들은 항암, 항산화 및 항염증 효과뿐만 아니라, HAS 유전자 발현을 통해 HA 합성을 촉진하여 피부 보습 및 건조 방지에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[17]. 따라서 왕벚나무 수피에 포함된 flavonoid 성분들은 항산화 및 항염증 효과뿐만 아니라, 피부 보습에도 중요한 효능을 발휘할 것으로 예상된다. 따라서 왕벚나무 수피 에틸아세테이트 분획물(*P. yedoensis* bark ethyl acetate fraction, PYBEAF)을 이용한 보습 관련 연구 결과는 없기에 본 연구에서 PYBEAF가 HA 생성에 미치는 영향과 그에 따른 신호전달 경로를 조사하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용된 왕벚나무 수피(*P. yedoensis* Matsumura bark)은 경상북도 영천시에서 재배된 것으로, 참한약초(Korea)에서 구입하였다. 시료 400 g에 70% 에탄올(ethanol) 4 L를 넣고 3일간 침지 추출한 후 여과하였다. 여액을 회전식 감압농축기(N-1300, Eyela, Japan)를 이용하여 40 °C로 농축한 다음 동결건조기(FD8508, Ilsinbiobase co. Ltd., Korea)를 이용하여 건조하였다. 시료 30 g에 증류수(DW) 500 mL로 가하여 시료를 녹인 후 헥산(hexane) 300 mL를 넣고 분획 추출하는 과정을 3회 반복하였다. 헥산층을 합하여 회전식 감압농축기를 이용하여 40 °C로 농축한 다음 동결건조하여 건조된 헥산층 분획물을 얻었다. 분획 후 남은 용액에 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 순서로 분획 추출하였으며 농축 과정은 동일하게 진행하여 메틸렌클로라이드와 에틸아세테이트 동결건조된 분획물을 얻었다. 분획 후 남은 물층은 회

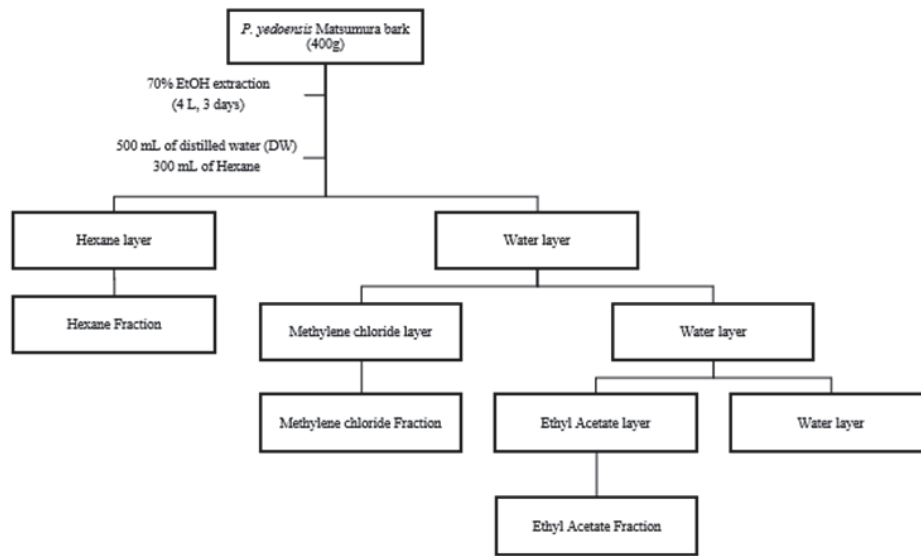


Figure 1. Schematic diagram of PYBEAF.

전식 감압농축기를 이용하여 40 °C에서 감압 농축하고 동결건조하여 분획물을 얻었다. 얻은 분말 시료의 수율은 약 6.99%이다.

2.2. 세포 배양

HaCaT 세포는 Cell Line Service (CLS, Germany)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM, GenDEPO, USA)에 10% Fetal bovine serum (FBS, GenDEPOT, USA)과 1% penicillin/streptomycin (PS, GenDEPOT, USA)이 함유된 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양했다.

2.3. MTT Assay

MTT assay를 통해 PYBEAF의 세포 독성을 평가하였다. 96 well plate에 8 × 10³ cells/well로 HaCaT 세포를 분주한 후 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 PYBEAF를 농도별(25, 50, 100 μg/mL)로 처리한 후 24 h 동안 배양하였다. 24 h 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Bio basic, Canada)를 처리하여 4 h 동안 반응시켰다. 상층액을 제거한 뒤 dimethyl sulfoxide (DMSO, Bio basic, Canada)를 이용해 용해시키고 spectrophotometer (SpectraMax 190; Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PYBEAF가 HA 생성량에 미치는 영향을 확인하기 위해

ELISA를 진행하였다. HaCaT 세포를 6 well plate에 2 × 10⁵ cells/well로 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 24 h 배양하였다. 이후 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 PYBEAF를 처리한 뒤 24 h 동안 반응시켰다. 상층액을 얻어 4 °C, 12,000 rpm, 10 min 조건으로 원심 분리하고 Hyaluronan Enzyme-linked immunosorbent assay kit (Echelon Biosciences, USA)를 이용하였다.

2.5. Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

HAS mRNA 발현에 PYBEAF이 미치는 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR을 진행하였다. HaCaT 세포를 4.5 × 10⁵ cells/well이 되도록 6 well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양하였다. 이 후 상층액을 제거한 뒤 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 PYBEAF을 처리한 후 24 h 동안 배양하였다. Trizol reagent (Ambion, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPC treated-water; Sigma, USA)를 사용해 용해시킨 후 Nano Drop (Thermo Fisher,

Table 1. Gene Name and Assay ID Number in qRT-PCR Analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
HAS-2	Hyaluronan synthase 2	Hs00193435_m1
HAS-3	Hyaluronan synthase 3	Hs00193436_m1

USA)으로 정량하고, cDNA 합성은 cDNA 합성 kit (Revertra Ace- α , Toyobo, Japan)를 사용하여 합성하였다. 합성한 cDNA와 Taqman probe (Thermo fisher, USA)를 사용해 증폭하여 qRT-PCR을 진행하였다. 실험에 사용된 Taqman probe는 Table 1에 표기하였다.

2.6. Immunofluorescence Staining

HaCaT 세포를 12 well plate에 멸균한 cover glass를 넣어 주고 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 24 h 배양하였다. 이 후 상층액을 제거하고 PBS로 3 회 세척 후 cover glass를 옮겨주었고, PYBWE (25, 50, 100 μ g/mL)를 24 h 처리하였다. 차가운 100% methanol로 실온에서 5 min 반응시킨 후 다시 PBS로 3회 세척한 뒤 4% paraformaldehyde로 실온에서 10 min 고정시켰다. 0.1 ~ 0.25% Triton X-100을 사용하여 세포를 용해시켜준 뒤 1% BSA 22.52 mg/mL glycine in PBST (PBS + 0.1% Tween 20)을 넣어 30 min blocking 하였고, 4 °C에서 1 차 항체와 함께 처리하여 overnight 하였다. PBS로 3 회 세척 후 빛에 노출되지 않은 상태에서 2 차 항체를 1% BSA에 희석하여 3 h 반응시켜 주었고, 다시 3 회 세척 후 slide glass 위에 mounting solution (with DAPI) (ab104139, Abcam, UK)을 반응시켜 형광 관찰하였다. 양성 대조군으로 ATRA 1 μ M을 사용하였다.

Table 2. Antibody Name and Assay ID Number in Western Blotting Analysis

Symbol	Antibody name	Assay ID
β -actin	β -actin (13E5) Rabbit mAb	4970S
p-ERK	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP [®] Rabbit mAb	4370S
ERK	p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	4695S
p-p38	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP [®] Rabbit mAb	4511S
p38	p38 MAPK (D13E1) XP [®] Rabbit mAb	8690S
p-JNK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit mAb	4668S
JNK	SAPK/JNK Antibody	9252S
p-CREB	Phospho-CREB (Ser133) (87G3)	9198S
CREB	CREB (48H2) Rabbit mAb	9197S

2.7. Western Blotting

HaCaT 세포를 4.5×10^5 cells/well이 되도록 60 mm plate에 분주한 후 24 h 동안 incubator에서 배양하였다. 이 후 상층액을 제거한 뒤 PYBEAF를 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 15 min 동안 반응시켰다. RIPA lysis and extraction buffer (Thermo fisher, USA)와 Halt[™] protease and phosphatase inhibitor cocktail, EDTA-free (Thermo fisher, USA)를 혼합한 용액을 이용하여 세포를 용해시키고 20 min, 4 °C, 12,000 rpm의 조건에서 원심분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질을 Pierce[™] BCA protein assay kit (Thermo fisher, USA)로 정량한 후, SDS-PAGE 5X로 염색한 후 전기영동 하였다. 전기영동 한 후 membrane에 transfer하고 blocking buffer로 30 min blocking하였다. 1 차 항체를 overnight하여 처리한 후 Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST)로 5 min, 3 회 세척한 후 3 h 동안 2 차 항체를 처리하였다. TBST로 5 min, 3 회 세척한 후 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 실험에 사용된 항체들은 Cell Signaling Technology (USA)에서 구매하였으며, Table 2에 표기하였다.

2.8. 통계분석

모든 실험 데이터는 3 회 반복되었으며 student *t*-test를 이용하였고 평균 \pm 표준편차로 나타내어 비교 분석하였다. 통계적 유의수준은 *p*-value가 0.05 미만일 경우 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존율 측정

PYBEAF을 HaCaT 세포에 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 세포 독성을 평가하였다. 그 결과, control 대비 $113.42 \pm 2.77\%$, $115.65 \pm 6.37\%$, $118.22 \pm 7.43\%$ 로 모든 농도에서 독성이 없음을 확인하였다. 따라서 이 후 실험은 100 μ g/mL의 농도를 최대 농도로 설정하여 진행하였다 (Figure 2).

3.2. Hyaluronic Acid (HA) 생성량 측정 결과

피부의 건강을 유지하는 데 있어 수분 유지는 중요한 요소 중 하나이다. HA는 세포 외 기질의 주요 성분으로, 연골, 피부, 눈 등을 포함한 여러 조직에서 중요한 역할을 한다. 특히 피부에서의 HA는 수분 손실을 방지하고, 세포 사이의 공간을 채워 피부의 구조적 안전성을 유지하는데 기여한다[18]. 피부 내

HA의 함량이 감소하면, 피부의 수분 유지 능력이 저하되어 피부 장벽이 손상되고, 이는 피부 건조 민감성 증가뿐만 아니라 염증과 같은 피부 질환으로 이어질 수 있다[19]. 본 연구에서는 HaCaT 세포에서 PYBEAF 처리에 따른 HA 생성량을 확인하였다. ELISA를 통해 PYBEAF을 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 결과, HA 생성량이 각각 825%, 943% 및 1056%로 농도 의존적으로 증가했음을 확인할 수 있었다. 이는 PYBEAF가 HA 합성을 촉진하여 피부의 수분 유지 능력을 강화하여 피부 장벽의 손상을 예방하거나 개선할 수 있을 것으로 예상된다(Figure 3).

3.3. HAS mRNA 발현량 및 HAS-2 단백질 발현 측정 결과

Hyaluronic acid synthase (HAS)는 히알루론산 합성 효소로, 다양한 조직에서 히알루론산 생성에 중요한 역할 수행

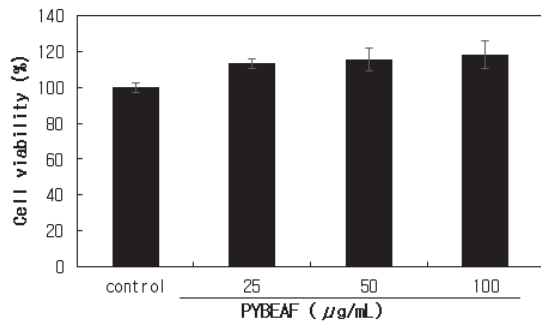


Figure 2. The effects of PYBEAF on cell viability in HaCaT cells. Cells were treated with various concentration (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) of PYBEAF for 24 h. Results are expressed as the means \pm SD of three independent experiments.

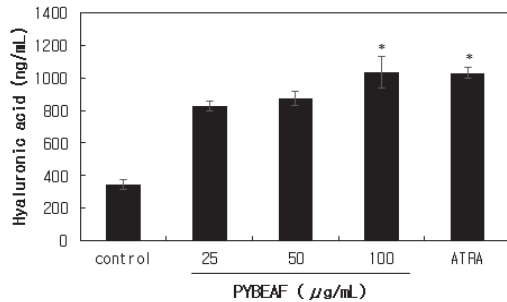


Figure 3. The effects of PYBEAF on hyaluronic acid production in HaCaT cells. PYBEAF increased hyaluronic acid production. Results are expressed as the means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

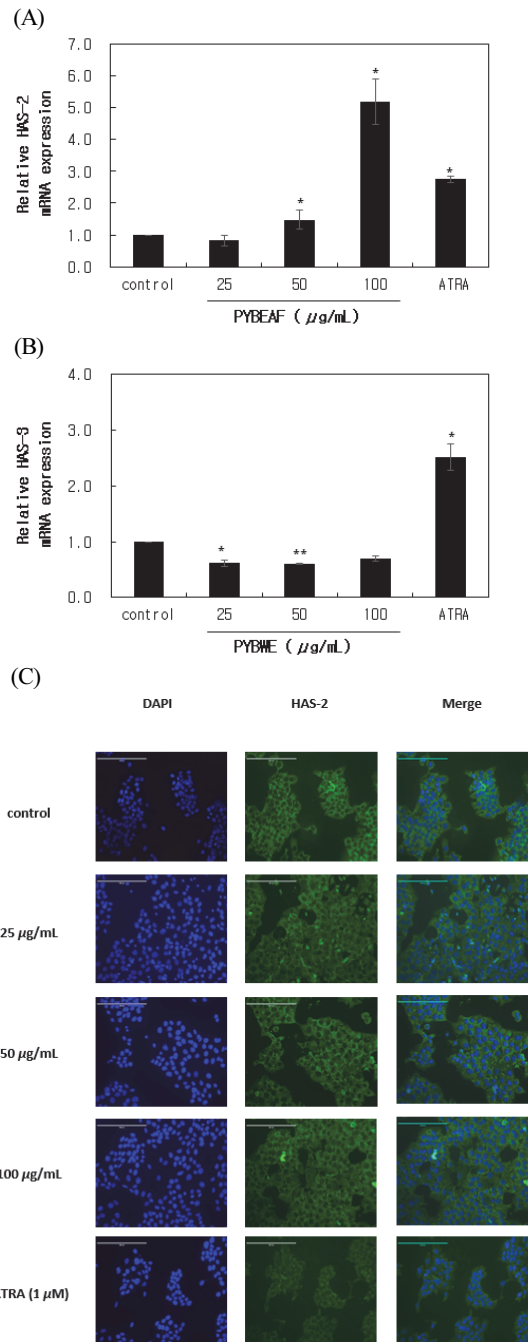


Figure 4. The effects of PYBEAF on HAS-2, HAS-3 mRNA expression and Hyaluronic acid synthase-2 protein expression HaCaT cells. HaCaT cells were starved in serum-free DMEM and then treated with 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ PYBEAF for 24 h. (A) confirmed the expression of HAS-2. (B) confirmed the expression of HAS-3. (C) PYBEAF secreted HAS-2 protein at all concentrations. Cells that were not treated with anything were used as control. * $p < 0.05$ compared to control.

한다. HAS는 HAS-1, HAS-2, HAS-3의 세 가지 유형으로 나뉘며, 각 유형은 서로 다른 형태와 기능의 HA를 합성한다. HAS 중 HAS-2와 HAS-3는 히알루론산 합성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[20]. 반면, HAS-1은 세포막에 HA 사슬을 안정적으로 유지하는 능력이 상대적으로 제한적이며, HAS-1의 발현과 활성화는 염증성 환경에서 인터루킨과 사이토카인과 같은 염증성 인자에 의해 유도되는 것으로 보고되었다[21].

본 연구에서는 HaCaT 세포에 PYBEAF을 처리하여 HAS-2와 HAS-3의 mRNA 발현 및 HAS-2 단백질 발현량을 qRT-PCR과 Immunofluorescence staining을 이용하여 평가하였다. PYBEAF을 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 결과, HAS-2의 mRNA 발현이 각각 $1.41 \pm 0.2\%$, $1.67 \pm 0.12\%$, $3.96 \pm 0.38\%$ 로 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 반면 HAS-3 mRNA 발현량은 $0.62 \pm 0.06\%$, $0.60 \pm 0.01\%$, $0.69 \pm 0.04\%$ 로 HAS mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다. 또한 모든 농도에서 HAS-2 단백질이 분비된 것을 확인하였다(Figure 4). 이러한 결과는 PYBEAF가 HAS-2 mRNA 발현을 유도하여 HA 합성을 촉진하고, 이를 통해 피부의 수분 유지 및 보습 기능을 개선하는데 기여할 가능성이 있음을 보여준다.

실험에서 사용된 양성 대조군인 all-trans-retinoic acid (ATRA)는 비타민 A형태 천연 유도체로, 세포 분화, 증식, 세포사멸에 관여를 하며, 피부 질환 치료에 널리 사용되고 있다[22]. 특히 HAS-2 mRNA 발현을 증가시키는 유도체로 알려져 있다[23]. 실험 결과, ATRA를 처리한 군은 HAS-2 발현이 현저하게 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 이는 기존 연구 결과와 일치하였다.

3.4. MAPK 신호전달경로 단백질 발현 확인

MAPK는 세포 내 신호전달 경로에서 중요한 역할을 하는 단백질 중 하나로 알려져 있다. MAPK는 ERK, JNK 그리고 p38로 분류되며, 이들은 각각 상이한 신호전달 경로에서 작용하며, ERK, p38, JNK의 활성화는 성장 인자, 사이토카인 등의 다양한 외부 신호 분자에 의해 조절된다[24].

본 연구에서는 PYBEAF가 MAPK 신호전달 경로에 미치는 영향을 평가하기 위해, HaCaT 세포에 PYBEAF를 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후, western blotting을 이용하여 MAPK의 인산화 상태를 분석하였다. PYBEAF 처리 결과, p-ERK, p-p38, p-JNK의 단백질 발현이 농도 의존적으로 인산화하였음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과

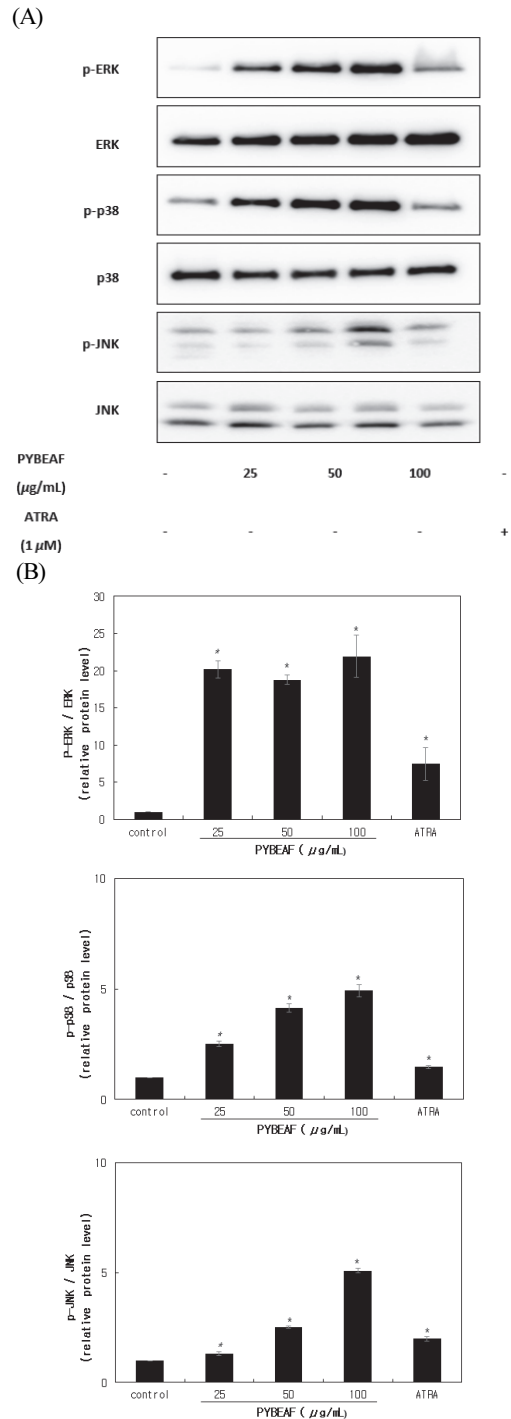


Figure 5. The effects of PYBEAF on the activation of MAPK signaling pathways in HaCaT cells. HaCaT cells were starved in serum-free DMEM and then treated with 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PYBEAF for 15 min. (A) PYBEAF increased the phosphorylation of MAPK. (B) Data analyzed using image J. Cells that were not treated with anything were used as control. * $p < 0.05$ compared to control.

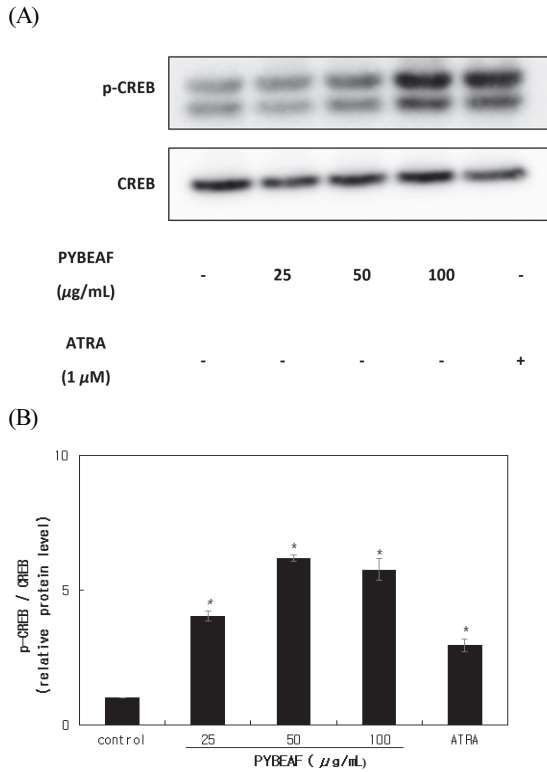


Figure 6. The effects of PYBEAF on the activation of CREB signaling pathways in HaCaT cells. HaCaT cells were starved in serum-free DMEM and then treated with 25, 50, 100 µg/mL of PYBEAF for 15 min. (A) PYBEAF increased the phosphorylation of CREB. (B) Data analyzed using image J. Cells that were not treated with anything were used as control. **p* < 0.05 compared to control.

는 PYBEAF가 MAPK 신호전달 경로를 통하여 HA 합성을 조절한다는 것을 나타낸다(Figure 5).

3.5. CREB 전사인자 단백질 발현 측정

CREB은 중요한 전사 인자로, ERK에 의해 조절된다[25]. 과거 연구에 따르면 CREB은 세포의 증식, 분화, 적응 반응 등 다양한 생리적 과정에 필수적인 역할을 한다는 것이 밝혀졌다[26]. 특히, HAS-2의 발현은 ERK 및 CREB의 조절에 의존하는 것으로 보고된 바 있다[27]. 이러한 배경을 바탕으로, 본 연구에서는 PYBEAF 처리가 HaCaT 세포에서 CREB의 인산화를 유도하여 MAPK, CREB 신호전달 경로를 통해 HA 합성이 촉진될 것으로 예상하였다.

PYBEAF가 CREB의 인산화에 미치는 영향을 평가하기 위해 HaCaT 세포에 PYBEAF를 25, 50, 100 µg/mL의 농도

로 처리한 후, CREB 단백질의 전사 인자로서의 발현 변화를 확인하기 위해 western blotting을 실시하였다. PYBEAF 처리 결과, CREB 단백질의 발현이 유의성 있게 증가하였다(Figure 6). 이러한 결과는 PYBEAF가 CREB의 인산화를 유도하고, MAPK, CREB 신호전달 경로를 활성화시켜 HA 단백질의 분비를 촉진하는 것으로 해석될 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 PYBEAF가 HaCaT 세포에서 HA 생성에 미치는 영향을 분석하였다. 세포 생존율 측정 결과, PYBEAF는 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 모두 독성이 없으며, 최대 농도를 100 µg/mL로 설정하였다. 피부 보습 유지에 중요한 HA의 생성량을 측정하기 위해 ELISA를 수행한 결과, PYBEAF 처리에 의해 HA 생성량이 농도 의존적으로 유의미하게 증가하였다. 이는 PYBEAF가 HA 합성을 촉진하여 피부의 수분 유지 능력을 향상시킬 수 있음을 나타낸다. HAS-2의 단백질 발현과 HAS mRNA 발현량 분석을 통해 PYBEAF가 HAS-2의 mRNA 발현을 유도하고, HAS-2 단백질의 분비를 증가시킨 것을 확인하였다. 반면, HAS-3의 발현에는 유의미한 변화가 없었으며, 이는 PYBEAF가 주로 HAS-2를 통해 HA 합성을 조절함을 시사한다. MAPK 신호전달 경로 분석 결과, PYBEAF가 p-ERK, p-p38, p-JNK의 인산화를 유도하여 MAPK 신호전달 경로를 활성화함을 확인하였고, CREB 단백질의 인산화 분석을 통해, PYBEAF가 CREB의 인산화를 증가시켜 MAPK, CREB 신호전달 경로를 활성화한다는 것을 확인하였다.

왕벚나무에는 다양한 flavonoids 성분들이 함유되어 있는데, 그 종류로는 naringenin, sakuranetin 및 prunetin 등이 있으며 이 중 naringenin의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다[24]. 이전 연구에 따르면, flavonoid류인 kaempferol과 quercetin이 각질형성세포주인 HaCaT에서 HAS 유전자의 발현을 증가시켜 HA 합성량을 증가시킨다는 연구 보고가 있다[18]. 이 연구 결과를 통해 왕벚나무에 함유된 flavonoid 성분들도 HA 합성을 촉진할 가능성이 있다고 시사된다.

결과적으로, PYBEAF는 HA 합성을 촉진하고 피부의 수분 보존 및 장벽 기능을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시한다. 이는 PYBEAF가 MAPK, CREB 신호전달 경로를 통해 HA 합성을 조절하며, 피부 건강 유지에 중요한 역할을 할 수 있음을 보여준다.

Acknowledgement

본 과제(결과물)는 2024년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역 혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001(1345370811)).

References

1. S. Verdier-Sévrain and F. Bonté, Skin hydration: a review on its molecular mechanisms, *J. Cosmet. Dermatol*, **6**(2), 75 (2007).
2. H. H. Jang and S. N. Lee, Epidermal skin barrier, *Asian J. Beauty Cosmetol*, **14**(3), 339 (2016).
3. G. Abatangelo, V. Vindigni, G. Avruscio, L. Pandis, and P. Brun, Hyaluronic acid: redefining its role, *Cells*, **9**(7), 1743 (2020).
4. A. J. Al-Ahmad, R. Patel, S. P. Palecek, and E. V. Shusta, Hyaluronan impairs the barrier integrity of brain microvascular endothelial cells through a CD44-dependent pathway, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **39**(9), 1759 (2019).
5. R. Stern and H. I. Maibach, Hyaluronan in skin: Aspects of aging and its pharmacologic modulation, *Clin. Dermatol*, **26**(2), 106 (2008).
6. J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner and J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): A review, *Vet. Med*, **53**(8), 397 (2008).
7. P. Prehm, Release of hyaluronate from eukaryotic cells, *Biochem. J*, **267**(1), 185 (1990).
8. J. E. Lee, Y. A. Kim, S. Yu, S. Y. Park, and K. H. Kim, 3, 6-Anhydro-L-galactose increases hyaluronic acid production via the EGFR and AMPK α signaling pathway in HaCaT keratinocytes, *J. Dermatol. Sci*, **96**(2), 90 (2019).
9. S. Arbabi and R. V. Maier, Mitogen-activated protein kinases, *Crit. Care Med*, **30**(1), S74 (2002).
10. T. P. Garrington and G. L. Johnson, Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways, *Curr. Opin. Cell Biol*, **11**(2), 211 (1999).
11. J. O. Lee, S. H. Hwang, T. Shen, J. H. Kim, L. You, W. Hu and J. Y. Cho, Enhancement of skin barrier and hydration-related molecules by protopanaxatriol in human keratinocytes, *J. Ginseng Res*, **45**(2), 354 (2021).
12. S. Y. Joo, Comparison of *Prunus yedoensis* Matsumura bark ethanol extract and solvent fraction antioxidant activities, *Korean J. Food Sci. Technol*, **52**(4), 350 (2020).
13. K. Lee, K. W. Kim, H. Heo, I. Ham, M. H. Lee, B. Kim, Y. Bu, H. Kim and H. Y. Choi, Vasorelaxant effect of *Prunus yedoensis* leaf on rat aortic rings, *Korean J. Herbology*, **28**(4), 63 (2013).
14. J. Lee, G. Yang, K. Lee, M. H. Lee, J. W. Eom, I. Ham, and H. Y. Choi, Anti-inflammatory effect of *Prunus yedoensis* through inhibition of nuclear factor- κ B in macrophages, *BMC Complement. Altern. Med*, **13**(1), 1 (2013).
15. V. Poonam, Raunak, G. Kumar, C. S. Reddy L, R. Jain, S. K. Sharma, A. K. Prasad and V. S. Parmar, Chemical constituents of the genus *Prunus* and their medicinal properties, *Curr. Med. Chem*, **18**(25), 3758 (2011).
16. B. H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Ther*, **96**(2-3), 67 (2002).
17. S. H. Kim, G. W. Nam, B. Y. Kang, H. K. Lee, S. J. Moon and I. S. Chang, The effect of kaempferol, quercetin on hyaluronan-synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT), *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **31**(1), 97 (2005).
18. 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. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 281 (2013).
19. B. E. Kim, and D. Y. M. Leung, Significance of skin barrier dysfunction in atopic dermatitis, *Allergy Asthma Immunol. Res*, **10**(3), 207 (2018).
20. 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).
21. H. Siiskonen, S. Pasonen-Seppänen, and M. I. Tammi, Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions, *Front. Immunol*, **6**, 43 (2015).
22. Ł. Szymański, M. Sobolewska-Szymańska, and K. Drożdż, Retinoic acid and its derivatives in skin, *Cells*, **9**(12), 2660 (2020).
23. K. Saavalainen, M. Pasonen-Seppänen, M. Dunlop, M. Tammi, and R. T. Sironen, The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene, *J. Biol. Chem*, **280**(15), 14636 (2005).

24. G. Pearson, F. Robinsin, T. B. Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar and M. H. Cobb, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.*, **22**(2), 153 (2001).
25. S. Ohno, H. J. Im, C. B. Knudson, and W. Knudson, Hyaluronan oligosaccharides induce matrix metalloproteinase 13 via transcriptional activation of NF κ B and p38 MAP kinase in articular chondrocytes, *J. Biol. Chem.*, **281**(26), 17952 (2006).
26. A. J. Silva, J. H. Kogan, P. W. Frankland, and S. Kida, Annual review of neuroscience, *Annu. Rev. Neurosci.*, **21**, 127 (1998).
27. L. Li, T. Asteriou, B. Bernert, C. H. Heldin, and P. Heldin, Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB, *Biochem. J.*, **404**(2), 327 (2007).
28. E. N. Kim, S. C. Kim, and G. S. Jeong, Isolation and quantitative analysis of naringenin, sakuranetin and prunetin from the barks of *Prunus yedoensis*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **50**(3), 226 (2019).