

## 돌나물추출물에 의한 사람 각질형성세포에서의 Hyaluronan Synthesis 촉진과 인체 피부의 보습력 증진

심관섭<sup>†</sup>·김진화·이동환·나영·이근수·표형배

한불화장품(주) 기술연구소  
(2007년 2월 15일 접수, 2007년 3월 4일 채택)

### *Sedum sarmentosum* Enhances Hyaluronan Synthesis in Transformed Human Keratinocytes and Increases Water Content in Human Skin

Gwan Sub Sim<sup>†</sup>, Jin Hwa Kim, Dong Hwan Lee, Young Na, Geun Soo Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co., 72-7 Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-gun, Chungbuk 369-834, Korea  
(Received February 15, 2007; Accepted March 4, 2007)

**요약:** 본 연구에서는 돌나물추출물이 각질형성세포에서 hyaluronan synthase (HAS) mRNA 발현과 hyaluronan (HA) 생성에 미치는 영향을 알아 보았다. 또한 돌나물추출물이 가지는 인체 피부에서의 보습력 증진 효과를 평가하였다. 돌나물추출물 처리에 따른 각질형성세포에서의 HAS-1, -2, -3 mRNA 발현 변화는 semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 살펴보고, HA의 생성량 변화는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하여 확인하였다. 인체 피부에서의 수분함량 및 피부 수분 손실량에 미치는 영향은 Corneometer와 Tewameter를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 돌나물추출물은 사람 각질형성세포의 HAS-2, -3 mRNA의 발현을 증가시켰고, HA의 생성량을 농도의존적으로 증가시키는 효과를 확인하였다. 사람 피부에서는 수분 함량을 유지하는 효과가 우수하였으며, 표피 수분 손실량 또한 감소시켜 피부 보습제로서 매우 우수한 효과를 보였다. 이상의 결과를 통해 돌나물은 피부에서 HA 생산을 촉진시키며, 피부 보습력을 증진시키는 화장품 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**Abstract:** In this study, we investigated the effects of *Sedum sarmentosum* extract on the expression of hyaluronan synthase (HAS) genes and hyaluronan (HA) production in HaCaT keratinocytes. We also assessed water content (electrical capacitance) and transepidermal water loss (TEWL) in human skin after topical treatment with *Sedum sarmentosum* extract. *Sedum sarmentosum* extract increased expression of HAS-2 and HAS-3 genes in HaCaT cells, when assayed by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCR). *Sedum sarmentosum* extract induced HA production in HaCaT cells, when determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Finally, treatment of *Sedum sarmentosum* extract on human skin increased the skin hydration and decreased TEWL when measured using Corneometer and Tewameter. Our study suggests that *Sedum sarmentosum* extract should be a very useful cosmetic ingredient, as a skin moisturizer.

**Keywords:** *Sedum sarmentosum*, hyaluronan, hyaluronan synthase, HaCaT keratinocytes, moisturizer

## 1. 서 론

피부는 각질층에 존재하는 수분에 의하여 탄력있고 부드럽게 되며 각질층의 탄력성이 유지되려면 10% 이상의 수분 함유가 필수적인 것으로 알려져 왔다[1]. 건강하고 탄력 있는 피부를 위해서는 각질층의 충분한 수분 함유가 요구되며 이를 위해 외부의 건조한 환경에서도 수분

손실을 방지하는 장벽이 존재하여야 한다. 임상적으로 건성피부는 피부 표면이 건조하고 탄력이 떨어지며, 각질탈리(scaling)가 일어나기 쉽고 거칠다. 경우에 따라서 가려움증이 동반되기도 한다. 수분 함량에 영향을 주는 인자로는 외부 환경 요인, 피부 대사, 지질층, 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF), 피부보습막 등이 있다. 일반적으로 보습제는 피부 표면에 도포되며, 건조한 피부의 증상들을 완화, 방지하기 위한 수분 공급 및 유지를 위해 사용된다. 보습제는 피부 표면의 수분을 유지시

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: gssim@hanbul.co.kr)

켜 건조한 피부를 특징으로 하는 피부염이나 아토피 피부염의 피부 건조 증세를 호전시키는 역할을 한다[2,3].

Hyaluronan (HA)는 피부의 세포외기질의 주요 구성성분으로 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine이 disaccharide 반복단위 중합체로 구성된 nonsulfated glycosaminoglycan이다. HA는 영양 성분과 이온의 이동을 촉진하고 세포외기질의 주요 성분으로 수분을 보유하는 것으로 잘 알려져 있다[4,5]. 또한, 세포간 간격 유지, 세포의 분열과 분화, 이동, 면역 조절 등에 관여하는 것으로 보고된 바 있다[6-10]. 포유류의 체내에 존재하는 HA의 50% 이상이 피부(0.5 ~ 1.0 mg HA per gram wet tissue weight), 특히 표피의 세포간 간격과 진피의 결합 조직에 분포한다고 보고되었고[4], 이러한 HA는 주로 표피 각질 형성세포와 진피 섬유아세포에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 인체 피부에서의 HA의 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되었는데, 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나로 여겨지고 있다[11,12]. 피부 세포 배양 상태에서의 HA의 합성은 여러 종류의 성장인자와 transretinoic acid, N-methyl-L-serine, N-acetylglucosamine 등에 의해 증가된다고 보고되었다[13-18]. 또 피부에 도포된 여성호르몬(estradiol) 및 그 유사물질이 HA의 합성을 증가시킨다는 보고가[19-21] 있다. 그러나 HA 대사에 대한 자세한 기작은 아직까지 밝혀지지 않았다. 단지, HA의 합성은 세포막의 안쪽 표면에서 hyaluronan synthases (HAS)에 의해 진행되며, 합성되는 동안 세포막을 뚫고 나와 세포외기질에 축적되는 것으로 알려졌다[22]. 이러한 HAS의 유전자는 염기서열의 유사성이 높은 hyaluronan synthase-1 (HAS-1), hyaluronan synthase-2 (HAS-2), hyaluronan synthase-3 (HAS-3)의 세 가지 형태가 보고[23-25]되었으며, epidermal growth factor (EGF), retinoic acid (RA)에 의해 표피세포에서 HAS mRNA 발현이 증가되었고, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )에 의해 감소함이 보고된 바 있다[26,27]. 현재까지, HA의 세포나 조직 내에서의 분포, HAS와 HA의 활성을 조절하는 인자에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)은 돌나물과에 속하는 다년생 초로써 전국 산야지에 분포하고, 식용, 약용, 관상용으로 쓰이며, 불갑초(佛甲草), 수분초(垂盆草)라고도 불리운다. 돌나물의 함유성분으로는 sedoheptulose, sucrose, fructose 등의 당질과 특히 비타민 C, 철분과 칼슘이 풍부하게 들어있으며, 생리활성 연구로는 돌나물의 terpenoids에 의한 간보호 효과[28]와 돌나물에서 분리한 flavonoids인 quercetin, isorhamnetin과 kaempferol 등의 배당체들에 의한 anigtensin converting enzyme 저해효과 등에 대하여 보고 되었다[29].

본 연구에서는 돌나물에 의한 HaCaT kerationcytes에서의 HAS mRNA 발현 증가 현상과 HA 합성 증가 현상을 확인하였고 인체 피부에 미치는 효능을 검증하였다. 이런 결과를 바탕으로, 피부 탄력 증진, 건조 방지, 노화 방지를 위한 화장품 소재로 돌나물의 활용을 제안한다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에서 사용한 돌나물(*Sedum sarmentosum*)은 국내 약초시장에서 구입하였다. 그늘진 곳에서 건조한 돌나물 100 g을 분쇄하여 70% 에탄올 1 L로 환류하면서 3 h 씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 실험에 사용하였다.

피부의 수분 함량 측정에는 피부 수분량 측정기(Corneometer CM 825, Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany)를 피부 수분 손실량(transdermal water loss, TEWL) 측정에는 피부 수분 손실량 측정기(Tewameter TM 210, Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany)를 사용하였다.

### 2.2. 세포 배양

본 연구에 사용한 HaCaT kerationcytes는 Dulbecco's modified of Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, MD, USA), 1% penicillin-streptomycin (BioWhittaker, MD, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### 2.3. RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA 추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, MD, USA)을 이용하였다. cDNA합성은 1  $\mu$ g의 total RNA를 oligo (dT) 15 primer, dNTP (0.5  $\mu$ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37°C에서 60 min, 93°C에서 5 min heating시킴으로써 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 cDNA로부터 HAS-1, -2, -3, GAPDH를 증폭하기 위하여 1  $\mu$ L cDNA, 0.5  $\mu$ M의 5'-과 3'-primer, 10X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200  $\mu$ M dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25  $\mu$ L로 맞추는 다음 PCR을 실시하였다. PCR증폭은 94°C 0.5 min, 50°C 0.5 min, 72°C 1 min, 24 ~ 28 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 HAS-1, -2, -3, GAPDH의 유전자 발

현을 image analyzer (BIS303PC, DNR Imaging Systems Ltd., UK)로 확인하였으며 각 band의 density는 densitometric program (NIH Image software, MD, USA)을 이용하여 측정하였다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5 % agarose gel에서 전기영동하여 유전자의 발현을 확인하였다. 각 유전자들의 primer서열은 다음과 같다. HAS-1, Forward; 5'-GAC TCC TGG GTC AGC TTC CTA AG-3', Reverse; 5'-GTA GAA CAG ACG CAG CAC AG-3', HAS-2, Forward; 5'-GCT ACC AGT TTA TCC AAA CG-3', Reverse; 5'-GTG ACT CAT CTG TCT CAC CG-3', HAS-3, Forward; 5'-GAG GAC TGG TAC CAT CAG AA-3', Reverse; 5'-GCC AGA TTT GTT GAT GGT AGC-3', GAPDH, Forward; 5'-ATT GTT GCC ATC AAT GAC CC-3', Reverse; 5'-AGT AGA GGC AGG GAT GAT GT-3'.

#### 2.4. Hyaluronan 측정

HaCaT keratinocytes를 24 well plate에 high density로 배양하고 실험에 사용하기 전에 serum free 배지로 2번 세척하여 세포가 자라는 동안 생성하는 HA를 완전하게 제거하였다. 배양된 HaCaT keratinocytes에 시료를 처리하고 24 h 배양 후 배양 상등액을 이용하여 HA 발현량을 측정하였다. HA의 분석은 enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) kit (Echelon bioscience, Salt Lake, UT, USA)을 이용하여 측정하였다.

#### 2.5. 피부 보습 효과

연구대상은 과거에 알레르기성 질환이나 아토피 피부염 등 질환의 병력이 없는 건강한 성인 남녀 10명을 대상으로 하였다. 검사 전 최소 일주일 동안 경구 부신피질 호르몬제나 항히스타민제, 항염제를 복용하지 않았으며, 검사 부위에 국소 부신피질 호르몬제를 바르지 않았다. 연령은 27세에서 38세까지였으며, 평균 연령은 32.1세였다. 수분 함량을 피부 정전부하용량 측정법(skin capacitance measurement)으로 측정하는 장비인 피부 수분량 측정기(Corneometer CM 825)를 이용하여 피부의 수분 함량을 측정하였다. 피부 수분 손실량은 Tewameter TM 210을 이용하여 측정하였다. 시험 시작 30 min 전부터 항온 항습조건(20 ~ 22°C, 상대습도 40 ~ 60%)의 실내에서 대기한 지원자의 상박부에 각각의 시료 2.0 mg/mL을 균일하게 도포하고, 시료를 도포하지 않은 좌측상박부를 대조군으로 도포 직전 및 도포 직후에 피부 수분 함량 및 피부 수분 손실량을 측정하였다. 10 min, 30 min, 60 min, 120 min 경과한 후, 피부 수분 함량 및 피부 수분 손실량을 각각 측정하였다. 측정된 capacitance value는 0 ~ 120 사이의 arbitrary capacitance units (A.U.)으로 전환하였으

며, 측정된 TEWL은 g/h/m<sup>2</sup>로 표기하였다.

#### 2.6. 자료 분석 및 통계 처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Hyaluronan Synthase mRNA 발현에 미치는 영향

Hyaluronan synthase는 세포외기질의 주요 성분 중 하나인 hyaluronan을 합성하는 효소로 알려져 있다. Hyaluronan은 표피의 세포간 간격과 진피의 결합 조직에 분포하며, 주로 표피 각질형성세포와 진피 섬유아세포에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 인체 피부에서의 hyaluronan 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되었고, 이는 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다.

돌나물추출물을 HaCaT keratinocyte에 처리한 후 HAS mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. HaCaT keratinocyte에 돌나물추출물을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 농도로 처리하고 24 h 배양 후 HAS-1, -2, -3 mRNA 발현을 확인한 결과 HAS-1 mRNA 발현에는 아무런 영향이 없었으며, HAS-2 mRNA는 1.59배, 1.84배, 2.98배 증가하였으며, HAS-3 mRNA는 1.49배, 1.55배, 1.69배 증가하였다(Figure 1). 따라서 돌나물추출물에 의한 HaCaT keratinocytes에서의 HAS-2 mRNA 발현 증가는 1 µM retinoic acid (RA)에 의한 효과보다 큰 것으로 나타났으며, HAS-3 mRNA 발현은 RA와 유사한 결과를 나타내었다.

#### 3.2. Hyaluronan 합성에 미치는 영향

돌나물추출물이 HaCaT keratinocytes에서의 HA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 돌나물추출물을 농도별로 처리한 후 ELISA kit을 이용하여 HA 양을 평가하였다. 그 결과 돌나물을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 농도로 처리시, HA 양은 948 ng/mL, 1,164 ng/mL, 1,489 ng/mL 증가함을 나타내었다(Figure 2). HA 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있는 RA와 유사한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

#### 3.3. 돌나물의 피부 보습 효과와 피부 수분 손실량 감소 효과

피부의 최상층인 각질층(stratum corneum)은 거의 모든 신체 부위에서 여러 겹의 각질화된 각화 세포로 이루

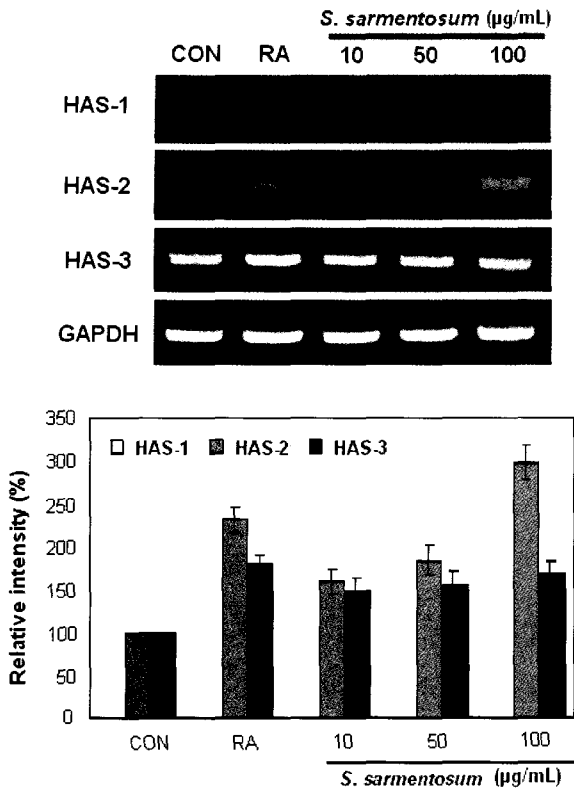


Figure 1. Effects of *S. sarmentosum* on the expression of hyaluronan synthase mRNA in HaCaT keratinocytes. HASs mRNA level were quantified by image analysis. RA: 1  $\mu$ M retinoic acid.

어져 있으며 그 두께는 20 ~ 40  $\mu$ m 정도이다. 이러한 각질층은 인체를 보호하는 장벽으로서 매우 중요한 역할을 담당할 뿐만 아니라 열이나 전기에 대한 저항성이 크고 산이나 알칼리에 대한 완충작용을 하고 있으며, 미생물에 대한 침입을 막고 수분 및 가스의 출입을 조절함으로써 생체의 항상성을 유지시켜 주고 있다. 현재까지 보습제의 보습력을 측정하기 위한 *in vitro* 방법에는 중량법, 피부 탄력성 측정법 등이 있으며 *in vivo* 방법으로는 임피던스(impedence), 절연계수(dielectronic coefficient) 등을 측정하여 피부 수분을 측정하는 방법, 피부에서 외부로 상실되는 수분(transepidermal water loss, TEWL) 량을 측정하는 방법, 피부 탄력 측정 및 피부 형태 측정법 등이 제시되어 있다.

돌나물추출물이 HaCaT keratinocytes에서 HAS mRNA 발현을 촉진하여 HA 합성을 촉진하는 것을 토대로 피부에서의 보습효과를 살펴보았다. 돌나물의 피부 수분 함량 유지 효과를 평가하기 위하여, 돌나물을 함유한 O/W 제형의 화장료와 돌나물을 함유하지 않은 제형의 화장료를 제조하고 각각의 화장료를 피부에 도포하여 피부 수분 함

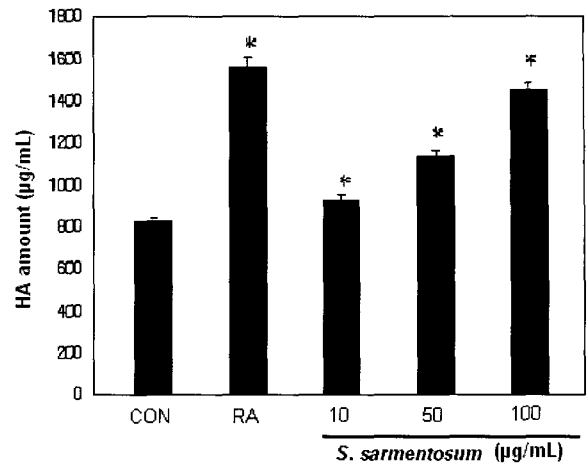


Figure 2. Effects of *S. sarmentosum* on the amount of hyaluronan released by HaCaT keratinocytes. All values are means  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  compared with control. RA: 1  $\mu$ M retinoic acid.

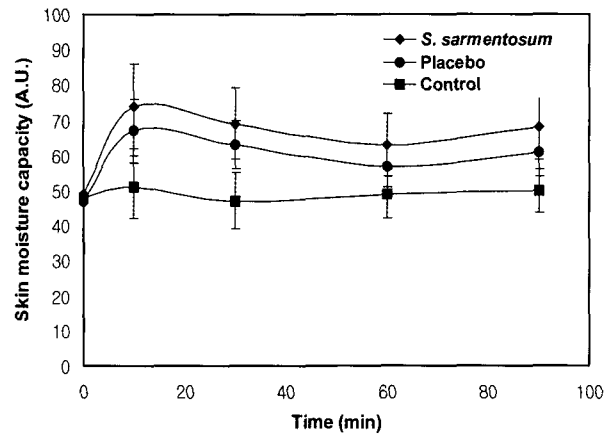
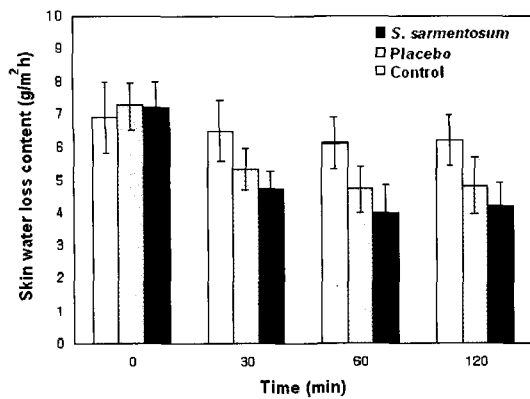


Figure 3. Comparison of skin moisture of the volunteer's forearm area before and after the treatment of the O/W emulsion containing *S. sarmentosum*. Arbitrary capacitance units (A.U., Corneometer CM 825).

량 변화를 기온 20 ~ 22 $^{\circ}$ C, 상대습도 40 ~ 60%의 항온 항습 조건에서 측정하였다. 피부 도포 실험 결과, O/W 에 멸전에 5% 돌나물을 첨가한 경우 첨가하지 않은 경우에 비해 우수한 피부 보습력을 나타내었다(Figure 3).

또한, 피부표면을 통한 수분의 증발에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 시료를 O/W 에 멸전에 5% 첨가한 경우와 첨가하지 않았을 경우를 비교해 본 결과 첨가하였을 경우가 첨가하지 않은 경우에 비해 상대적으로 낮은 피부 수분 손실량을 가지는 것으로 나타나, 돌나물추출물이 매우 우수한 피부 수분 보호막을 형성하는 것을 확인하였다(Figure 4).



**Figure 4.** Comparison of the trans-epidermal water loss (TEWL) of volunteer's forearm area before and after the treatment of the O/W emulsion containing *S. sarmentosum*.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 돌나물추출물이 HaCaT keratinocytes에서 HAS mRNA와 HA 합성 촉진과 피부 보습효과에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과, 돌나물은 HaCaT keratinocytes에서 HAS-2, -3 mRNA의 발현을 촉진함으로써 HA 합성량이 증가하였다. 사람 피부에서 보습효과를 나타내는지 알아보기 위하여 돌나물추출물을 함유한 O/W 화장품 제형을 피부에 도포한 후 피부 수분량과 경피수분손실량을 측정된 결과 우수한 보습 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 돌나물은 HAS mRNA 발현 촉진과 HA 합성 증가를 유도하여 피부의 수분함량을 증가시키는 우수한 보습소재로 화장품에 활용될 수 있다고 사료된다.

#### 참 고 문 헌

- O. K. Jacobi, About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of skin, *Proc. Sci. Sec. Toilet Goods Assoc.*, **31**, 22 (1959).
- T. C. Flynn, J. Petros, R. E. Clark, and G. E. Viehman, Dry skin and moisturizers, *Clin. Dermatol.*, **199**, 387 (2001).
- E. Held, S. Sveinsdottir, and T. Agner, Effect of long term use of moisturizer on skin hydration, barrier function and susceptibility to irritants, *Acta Dermatol. Veneresol.*, **79**, 49 (1999).
- T. C. Laurent and J. R. Fraser, Hyaluronan, *FASEB J.*, **6**, 2397 (1992).

- W. Manuskiatti and H. I. Maibach, Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging, *Int. J. Dermatol.*, **35**, 539 (1996).
- E. A. Turley, P. Bowman, and M. A. Kytryk, Effects of hyaluronate and hyaluronate binding proteins on cell motile and contact behaviour, *J. Cell Sci.*, **78**, 133 (1985).
- A. M. Alho and C. B. Underhill, The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells, *J. Cell. Biol.*, **108**, 1557 (1989).
- B. P. Toole, G. Jackson, and J. Gross, Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1348 (1972).
- M. Brecht, U. Mayer, E. Schlosser, and P. Prehm, Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis, *Biochem. J.*, **239**, 445 (1986).
- B. Dube, H. J. Luke, M. Aumailley, and P. Prehm, Hyaluronan reduces migration and proliferation in CHO cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1538**, 283 (2001).
- M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**, 127 (1987).
- I. Gheretich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
- P. Heldin, T. C. Laurent, and C. H. Heldin, Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts, *Biochem. J.*, **258**, 919 (1989).
- M. Suzuki, T. Asplund, H. Yamashita, C. H. Heldin, and P. Heldin, Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-β1 involves activation of protein kinase C, *Biochem. J.*, **307**, 817 (1995).
- E. Tirone, C. D. Alessandris, V. C. Hascall, G. Siracusa, and A. Salustri, Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulation hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming factor-β1), *J. Biol. Chem.*, **272**, 4787 (1997).
- R. Tammi, J. A. Ripellino, R. U. Margolis, H. I. Maibach, and M. Tammi, Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in

- skin organ culture, *J. Invest. Dermatol.*, **92**, 326 (1989).
17. S. Sakai, T. Sayo, S. Kodama, and S. Inoue, N-methyl-L-serine stimulates hyaluronan production in human skin fibroblasts, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **12**, 276 (1999).
  18. T. Sayo, S. Sakai, and S. Inoue, Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **17**, 77 (2004).
  19. H. Sobel and R. A. Cohen, Effect of estradiol on hyaluronic acid in the skin of aging mice, *Steroids*, **16**, 1 (1970).
  20. J. P. Bentley, R. M. Brenner, A. D. Linstedt, N. B. West, K. S. Carlisle, B. C. Rokosova, and N. MacDonald, Increased hyaluronate and collagen biosynthesis and fibroblast estrogen receptors in macaque sex skin, *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 668 (1986).
  21. K. Miyazaki, T. Hanamizu, R. Iizuka, and K. Chiba, Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15**, 175 (2002).
  22. P. H. Weigel, V. C. Hascall, and M. Tammi, Hyaluronan synthase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 13997 (1997).
  23. N. Itano and K. Kimata, Molecular cloning of human hyaluronan synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 816 (1996).
  24. K. Watanabe and Y. Yamaguchi, Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 22945 (1996).
  25. A. P. Spicer, J. S. Olson, and J. A. McDonald, Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 8957 (1997).
  26. S. Katri, P. S. Sanna, W. D. Thomas, T. Raija, I. T. Markku, and C. Carsten, The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14636 (2005).
  27. P. S. Sanna, K. Susanna, T. Kari, M. T. H. Juha, J. Tiina, J. L. Mikko, I. T. Markku, and T. Raija, EFG upregulates, whereas TGF- $\beta$  downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 1038 (2003).
  28. H. Aimin, W. Mingshi, H. Hongyan, Z. Decheng, and K. H. Lee, Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*, *Phytochemistry*, **49**, 2607 (1998).
  29. H. C. Oh, D. G. Kang, J. W. Kwon, T. O. Kwon, S. Y. Lee, D. B. Lee, and H. S. Lee, Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 2035 (2004).