

아미노산 동시분석을 통한 피부보습능과 각질 중 아미노산 함량과의 상관관계 연구

주 경 미[†] · 한 지 연 · 손 의 동 · 남 개 원 · 정 혜 진 · 임 경 민 · 조 준 철

아모레퍼시픽 기술연구원 피부과학연구소
(2012년 2월 29일 접수, 2012년 3월 24일 수정, 2012년 3월 26일 채택)

Study on the Relationship between Skin Dryness and Amino Acids in Stratum Corneum

Kyung-Mi Joo[†], Ji Yeon Han, Eui Dong Son, Gae-Won Nam, Hye-Jin Jeong,
Kyung-Min Lim, and Jun-Cheol Cho

R&D Center, Amorepacific Coporation, 314-1, Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-729, Korea
(Received February 29, 2012; Revised March 24, 2012; Accepted March 26, 2012)

요약: 천연보습인자(NMF, natural moisturizing factor)는 정상 피부 내의 각질층에 존재하는 수용성, 친수성 성분을 총칭하는 말로 외부로부터 수분을 흡수하고 각질층의 수분보유능을 증가시키며 피부가 건조해지는 것을 방지하여 피부의 유연성과 가수성을 유지하는 기능을 한다. NMF는 주로 아미노산과 아미노산의 대사산물로 구성되며 이들은 필라그린(filaggrin)이 분해되면서 생성된다. 본 연구에서는 피부 각질층의 22종의 개별 아미노산의 함량분석을 통하여 피부보습능과 개별 아미노산과의 상관관계를 연구하였다. 15명의 건강한 지원자들의 전박과 이마로부터 tape stripping한 각질 시료 중 22종의 아미노산 함량을 UPLC-PDA를 이용하여 동시 분석하였다. 그 결과 각질 표면보다는 안쪽에서의 아미노산들의 함량이 높음을 확인하였다. 또한 신체 부위별 비교에서 전박이 이마에 비해 아미노산 함량이 1.5배 정도 높음을 확인하였다. 전박부위의 아미노산 총 함량과 보습능(TEWL)과의 상관 관계분석을 통해서 보습능이 클수록 총아미노산 함량이 높은 것으로 확인되었으며 특히 Ser, Glu, Gly, Ala 및 Thr은 각질 내 존재하는 주요 아미노산 성분으로 보습에 긍정적인 영향을 주는 성분으로 확인되었다. 이상의 결과로써 NMF의 주성분인 아미노산의 함량은 각질 생리기능과 밀접한 관련을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며 본 연구를 통해 얻은 각질층의 아미노산의 통합적인 분석법은 보습, 노화, 미백, 피부 염증질환 등 다양한 피부 상태와 아미노산류들의 변화와의 관계를 깊이 이해하고 피부 기능과 관련된 새로운 분자적 타겟을 발굴하고 증명하는데 기초적인 방법으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: Natural moisturizing factors (NMFs) are hydrophilic and water-soluble components in stratum corneum of the skin. NMFs absorb water from outer environment and enhance the water-holding capacity of stratum corneum and thereby, prevent the dryness and increase flexibility and plasticity of skin. NMFs are mainly composed of amino acids and their metabolites that are produced from the degradation of filaggrin. Here we established a simultaneous quantification method for 22 amino acids in tape-stripped stratum corneum samples using UPLC-PDA. With this method, we analyzed amino acid contents from tape-stripped stratum corneum samples of forearm and forehead regions from 15 healthy volunteers. Amino acid contents of inner (or upper) region were higher than outer (or lower) region of stratum corneum. Amino acid contents of stratum corneum of forearm were higher by 1.5 fold than forehead region. Of note, total amino acid contents were significantly and inversely correlated with trans-epidermal water loss (TEWL), an index for skin barrier function. Especially, Ser, Glu, Gly, Ala and Thr were determined to positively affect skin moisturizing activities. In conclusion, we could demonstrate that amino acid contents of stratum corneum are closely linked with skin barrier and moisturizing function, providing an important and fundamental methodology for the study of amino acids in skin physiology.

Keywords: amino acids, human stratum corneum, natural moisturizing factor (NMF), UPLC-PDA

[†] 주 저자 (e-mail: kmjoo@amorepacific.com)

1. 서 론

피부의 각질층(stratum corneum, SC)은 피부에서 최외각 층에 존재하고, 외부환경에 직접 접하고 있어 인체에서 매우 중요한 역할을 한다. 정상적인 피부의 각질층에는 보통 10 % 이상의 수분이 함유되어 탄력성과 유연성을 지니고 있는데, 각질층은 두 가지 성분, 즉 죽은 각질세포로부터 생성된 단백질과 각질세포 사이에 존재하는 각질세포간 지질로 이루어져 있으며, 그 외 표피지질, 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF)가 존재한다. 피부의 건조는 주로 표피의 상층에서 일어나는 변화 때문에 생기는 것으로 알려져 있으며, 표피 상층부 중에서도 표피장벽의 역할을 하는 각질층에서 일어나는 변화가 건조피부의 중요한 원인으로 생각되고 있다. 건조피부 발생은 생화학적 측면에서 많은 연구가 이루어지고 있는데 특히 세 가지 요소인 피지, 각질 세포간 지질, 각질 세포 내 NMF 및 교소체(desmosome)의 분해에 의한 각질세포의 탈락 등이 중요하다. 피부 각질층중 수분은 건강한 피부를 유지하는 데 필수적인 요소로서[1] 각질 중 과다한 수분은 외부의 물리적 화학적 스트레스로부터 우리 몸을 보호하는 데 중요한 정상적인 장벽기능에 손상을 줄 수도 있다.

각질중 수분은 높은 흡습성과 수분보유능이 있는 천연보습인자(NMF) 성분에 의해 조절된다. 천연보습인자는 정상 피부 내의 각질층에 존재하는 수용성, 친수성 성분을 총칭하는 말로 외부로부터 수분을 흡수하고 각질층의 수분보유능을 증가시키며 피부가 건조해지는 것을 방지하여 피부의 유연성과 가수성을 유지하는 기능을 한다[2]. NMF는 필라그린이 분해되면서 생성된 아미노산과 아미노산의 대사산물로 구성되며[3] 이외에 각종 무기염류도 포함된다. 아토피피부염, 건선 등의 피부질환 환자[4]와 건조하거나 과각화된 피부의 각질에서는 NMF의 구성성분인 아미노산의 양이 비정상적으로 감소되어 있음이 보고되었다[5-8]. 또한 필라그린의 유전적 기능 손상은 각질 중 아미노산양의 감소와 밀접하게 관련되어 있으며[9,10] 아미노산이 피부의 보습상태에 중요한 역할을 한다는 연구가 다수 보고되었다[11-13]. Katagiri 등은 무모생쥐모델을 이용하여 전기전도도와 각질층 아미노산 양을 측정하여 각질층 수분상태와 아미노산 양 사이의 관계를 관찰하고 필라그린 면역반응성 연구를 통해 아미노산이 감소되면 피부가 건조된다고 하였다[14]. 또한 염기성 아미노산과 같은 NMF성분이 각질의 유연성을 유지하는데 중요한 성분이라는 연구가 보고되기도

하였다[15]. 따라서 각질 중 아미노산과 아미노산의 대사산물을 측정함으로써 피부의 건조 상태를 결정할 수 있는 중요한 정보를 얻을 수 있다. 본 연구에서는 피부 각질층의 보습에 중요한 역할을 하는 보습인자로서 각각의 개별 아미노산의 함량이 보습능(Trans-epithelial Water Loss, TEWL)과 어떤 상관성을 갖는지 알아보고자 22종의 아미노산을 동시분석할 수 있는 정량법을 UPLC-PDA (Ultra Performance Liquid Chromatography-Photodiode array)를 이용하여 확립하였다. 또 tape stripping을 이용하여 건강한 지원자들의 전박과 이마부위로부터 채취한 각질시료 중의 아미노산 조성 분포를 측정하고 수분증발력(TEWL)값과의 관계 연구를 통해 피부 보습력을 평가할 수 있는지, 보습에 중요한 아미노산은 어떤 성분인지 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

경피수분증발량(TEWL)측정에 사용된 기기는 Vapo-Meter (Delfin, Finland)를 사용하였으며 HPLC는 AQUITY UPLC-PDA system (Waters, USA)을 사용하여 실험하였으며 데이터 처리는 Waters Empower Pro software를 사용하였다. Microplate Reader는 Spectramax190 (Molecular Devices, USA)을 원심분리기는 Eppendorf (Germany)사의 5810R을 사용하였다.

HPLC 이동상은 AccQ-Tag Ultra Eluent A, B (Waters, USA)를 사용하였으며 Sodium dodecyl sulfate, propylene glycol 및 22종의 아미노산은 L-Alanine (Ala), L-Aspartic acid (Asp), L-Asparagine (Asn), L-Arginine (Arg), L-Glutamic acid (Glu), L-Glutamine (Gln), L-Glycine (Gly), L-Histidine (His), L-Isoleucine (Ile), L-Leucine (Leu), L-Lysine (Lys), L-Methionine (Met), L-Proline (Pro), L-Serine (Ser), L-Threonine (Thr), L-Valine (Val), L-Tyrosine (Tyr), L-Cystine (Cys), L-Tryptophane (Trp), L-Theanine (The), L-Phenylalanin (Phe), γ -Aminobutyric acid (GABA)은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 아미노산 형광 유도체화시약으로 AccQ-Tag amino acids derivatization kit (Waters, USA)를 사용하였으며 PBS buffer는 Lonza (Swiss)사의 시액을 사용하였다. 단백질 정량에 사용된 시약은 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, USA)를 사용하였다. 물은 Millipore (USA)사 Water Purification System의 정수된 물을 사용하였다. 각질 채

취에 사용된 테이프는 2.2 cm 크기의 D-squame standard tape (Cuderm Inc, USA)를 사용하였다.

2.2. 표준액의 제조

아미노산 표준액은 아미노산 22종을 혼합하여 200 µg/mL의 농도가 되도록 증류수에 녹여 표준원액을 제조 후 표준원액을 순차적으로 희석하여 0.5 ~ 50 µg/mL 범위의 표준액을 5개 이상 만들어 검량곡선용 표준액으로 사용하였다.

2.3. 경피수분증발량(TEWL) 측정 및 각질 채취

건강한 지원자 15명(연령 27 ~ 40세, 남자 6명, 여자 9명)의 피부보습능을 TEWL (Trans-epithelial Water Loss)로 측정하여 평가한 후 동일 부위의 피부각질을 채취하였다. 시험부위는 전박 내측면에 반지름 1.1 cm의 원형 한곳을 정하여 측정하였다. 측정방법으로는 전박 내측을 비누로 세척하고 항온항습실(온도 24 ± 2 °C, 상대습도 40 ± 2 %)에서 20 min간 적응한 후 각 측정부위를 3회 측정하였으며 측정시 probe는 피부 표면에서 수직이 되도록 접촉하였다. 측정값은 단위면적당 증발되는 수분량(g · m²/h)으로 표시하였다. 경피수분증발량(TEWL) 측정 후 D-squame standard tape를 부착하여 같은 부위에서 10장의 테이프를 사용하여 연속적으로 각질을 채취하였다.

2.4. 각질시료 중 단백질량 분석

연속적으로 채취한 각질 시료 테이프 5장씩을 20 mL 유리 바이알에 넣고 PBS buffer에 0.1 % (w/v) sodium dodecyl sulfate/2 % (w/v) propylene glycol이 되도록 제조한 용액 5 mL를 넣어 실온에서 1 h 동안 교반추출한 후 1 mL를 취하여 원심분리(12,000 rpm, 4 °C, 5 min)하여 상등액을 검액으로 하였다. 정량용 표준품은 bicinchoninic acid protein assay kit의 BSA를 사용하여 25 ~ 500 µg/mL의 검량선용 표준액을 제조하였다. 시료 및 표준액 각 25 µL씩을 취하여 bicinchoninic acid protein assay법을 이용하여 96-well plate에 취하고 37 °C에서 30 min간 반응시킨 후 Microplate Reader로 595 nm에서 측정하여 단백질량을 분석하였다.

2.5. 각질시료 중 아미노산 분석

공시험액, 아미노산 표준혼합액 및 2.4.항에서 추출한 검액을 20 µL씩 취하여 HPLC 바이알에 넣고 AccQ-Tag amino acids derivatization kit의 유도체화 시액 중 borate

Table 1. HPLC Conditions for Determination of 22 Amino Acids

Operation condition of HPLC analysis		
Column	ACQUITY UPLC AccQ-Tag Ultra C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm)	
Mobile phase	A : AccQ-Tag Ultra Eluent A (buffer), B : AccQ-Tag Ultra Eluent B (1 % formic acid in Acetonitrile)	
Time (min)	A (%)	B (%)
0	99.1	0.1
0.54	99.1	0.1
4.75	93.5	6.5
7.74	82.5	17.5
8.50	82.5	17.5
8.70	40.4	59.6
8.90	99.1	0.1
10.0	99.1	0.1
Flow rate	0.7 mL/min.	
Injection volume	1 µL	
Column temperature	60 °C	
Detection	PDA 260 nm	

buffer 70 µL, Flour reagent 2A 20 µL를 넣어 잘 흔들어 섞어 1 min간 실온에 방치 후 55 °C에서 10 min 동안 반응시켜 형광유도체화하여 검액으로 하였으며 검액과 표준액은 3회 반복 측정하였다.

2.6. HPLC 조건

분석 컬럼은 ACQUITY UPLC AccQ-Tag Ultra C18 컬럼(2.1 × 100 mm, 1.7 µm)을 사용하였으며 이동상은 AccQ-Tag Ultra Eluent A, B를 이용하여 농도구배조건으로 분석하였으며 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

2.7. 데이터 분석 및 통계처리

각질에서 분석된 아미노산 함량은 각질단백질량으로 보정하여 µmole/mg protein으로 표시하였으며 통계분석은 미니탭(MINITAB^(R) release 14.2, LEAD Technologies, Inc., USA) 통계프로그램을 이용하여 상관분석을 하고 데이터의 유의수준을 평가하였다.

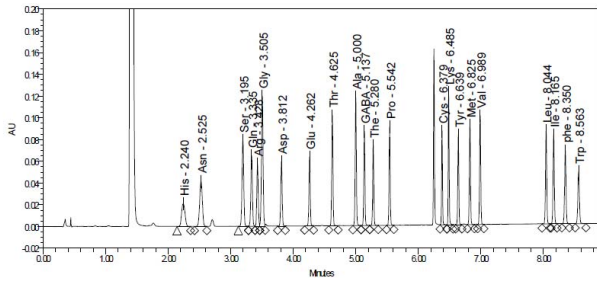


Figure 1. HPLC chromatogram of 22 amino acids.

3. 결과 및 고찰

3.1. 각질시료테이프 중 아미노산 추출 및 분석

각질시료테이프로부터 효과적으로 아미노산을 추출하기 위해 추출용매, 추출시간 등의 여러 가지 조건을 시험하여 최적 추출방법을 선정하였다. 추출용매는 자유아미노산(free amino acid)의 추출률을 높이기 위하여 PBS 버퍼에 sodium dodecyl sulfate와 propylene glycol을 혼합한 용매를 사용하였다. 추출방법은 테이프를 잘게 잘라서 추출하는 방법과 테이프를 그대로 추출하는 방법을 비교하였으며 테이프를 잘라서 추출하는 방법보다는 테이프가 충분히 담겨질 수 있는 바이알용기에 용매를 넣어 추출시 추출률이 우수하였으며 테이프당 용매비율은 1 : 1의 비율이 적당하였다(data not shown). 또한 추출시간은 초음파추출기를 이용하여 추출 시 최적시간으로 1 h임을 확인하여 이후 실험에서 추출시간을 1 h로 설정하였다.

시료로부터 추출한 아미노산은 AccQ-TagTM 형광유도체화 방법을 이용하여 UPLC-PDA를 이용하여 분석하였다. UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)TM는 2 μ m 이하의 작은 입자 크기의 고정상을 사용함으로써 짧은 시간 내에 효과적으로 다성분들을 분리할 수 있는 장점이 있으며 복잡한 생체 시료 내에서 빠른 시간 내에 고분해능, 고감도, 높은 피크용량의 특성으로 신속 정확한 분석이 가능하다. 본 연구에서는 22종의 아미노산을 농도구배조건을 이용하여 10 min내에 분석하였으며 대표 크로마토그램은 Figure 1에 나타내었다. 22종의 아미노산은 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 μ g/mL 6개 농도를 이용하여 검량선을 작성하였으며 검량선식 및 R²값을 Table 2에 나타내었다. Asp, Glu, GABA, Lys을 제외한 대부분의 성분들은 검량선식을 1차방정식으로 적용할 때 모두 0.99 이상의 직선성을 나타내었다.

Table 2. Linearity Results of 22 Amino Acids

Compounds	Equation for regression	Correlation coefficient
His	$y = 4910x + 200$	0.9994
Asn	$y = 5640x + 714$	0.9993
Ser	$y = 6190x + 287$	0.9949
Gln	$y = 4320x + 187$	0.9989
Arg	$y = 4010x + 316$	0.9990
Gly	$y = 9330x + 418$	0.9977
Asp	$y = 3310x + 465$	0.9861
Glu	$y = 3230x + 850$	0.9892
Thr	$y = 5300x + 280$	0.9937
Ala	$y = 7440x + 193$	0.9917
GABA	$y = 3860x + 300$	0.9842
The	$y = 3890x + 654$	0.9981
Pro	$y = 5340x + 260$	0.9952
Cys	$y = 5350x + 663$	0.9992
Lys	$y = 5260x + 338$	0.9853
Tyr	$y = 4570x + 391$	0.9998
Met	$y = 4940x + 178$	0.9977
Val	$y = 5520x + 267$	0.9932
Leu	$y = 4960x + 300$	0.9941
Ile	$y = 5070x + 282$	0.9940
Phe	$y = 4940x + 450$	0.9998
Trp	$y = 3990x + 347$	0.9999

L-Histidine (His), L-Asparagine (Asn), L-Serine (Ser), L-Glutamine (Gln), L-Arginine (Arg), L-Glycine (Gly), L-Aspartic acid (Asp), L-Glutamic acid (Glu), L-Threonine (Thr), L-Alanine (Ala), γ -Aminobutyric acid (GABA), L-Theanine (The), L-Proline (Pro), L-Cystine (Cys), L-Lysine (Lys), L-Tyrosine (Tyr), L-Methionine (Met), L-Valine (Val), L-Leucine (Leu), L-Isoleucine (Ile), L-Phenylalanin (Phe), L-Tryptophane (Trp)

3.2. 이마와 전박부위의 아미노산 함량

동일인의 이마와 전박부위에서 각질을 tape stripping 하여 얻은 시료를 분석하여 아미노산 함량을 Table 3, Figure 2에 나타내었다. Figure 2는 각 부위별, 피부 깊이 별 각 아미노산의 프로파일을 표시하였으며 함량결과는 Table 3에 표시하였다. 이 때 전박은 Ser > Glu > Gly > Ala > Thr의 순으로 아미노산이 함량이 높았으며 이마는 Ser > Glu > Gly > Asp > Ala > Thr의 순으로 함량이 높았다. 전박에서 관찰된 아미노산 프로파일은 이전에 보고된 연구 결과[2,16]와 거의 유사하였으며 이마의 경우도 크게 다르지 않을 것으로 예상된다. 각질의 아미노산 조성 중 Ser, Glu, Gly, Ala 등의 함량이 큰 것은 주로

Table 3. Amino Acid Levels in Skin Stratum Corneum of Forearm and Forehead (mean ± SD, N = 15)

Amino acids	Forearm (μmole/mg protein)		Forehead (μmole/mg protein)	
	Tape 1 ~ 5	Tape 6 ~ 10	Tape 1 ~ 5	Tape 6 ~ 10
His	0.058 ± 0.013	0.12 ± 0.057	0.040 ± 0.015	0.11 ± 0.038
Ser	0.39 ± 0.133	0.74 ± 0.32	0.15 ± 0.065	0.45 ± 0.22
Arg	0.035 ± 0.041	0.055 ± 0.037	0.031 ± 0.011	0.017 ± 0.014
Gly	0.21 ± 0.081	0.41 ± 0.18	0.073 ± 0.033	0.082 ± 0.033
Asp	0.057 ± 0.029	0.11 ± 0.061	0.072 ± 0.027	0.21 ± 0.11
Glu	0.228 ± 0.066	0.41 ± 0.18	0.14 ± 0.051	0.19 ± 0.089
Thr	0.086 ± 0.030	0.16 ± 0.066	0.041 ± 0.016	0.35 ± 0.14
Ala	0.17 ± 0.055	0.34 ± 0.015	0.049 ± 0.028	0.11 ± 0.049
GABA	0.021 ± 0.006	0.035 ± 0.012	0.011 ± 0.015	0.14 ± 0.072
Pro	0.034 ± 0.018	0.061 ± 0.028	0.009 ± 0.007	0.033 ± 0.020
Lys	0.030 ± 0.013	0.054 ± 0.031	0.025 ± 0.005	0.062 ± 0.025
Tyr	0.015 ± 0.006	0.027 ± 0.012	0.010 ± 0.002	0.022 ± 0.008
Val	0.044 ± 0.012	0.078 ± 0.030	0.025 ± 0.008	0.064 ± 0.025
Leu	0.019 ± 0.005	0.037 ± 0.015	0.012 ± 0.004	0.033 ± 0.013
Ile	0.017 ± 0.005	0.037 ± 0.010	0.015 ± 0.004	0.039 ± 0.015
Phe	0.010 ± 0.003	0.017 ± 0.005	0.007 ± 0.003	0.017 ± 0.006
Trp	0.005 ± 0.002	0.011 ± 0.006	0.003 ± 0.002	0.008 ± 0.004

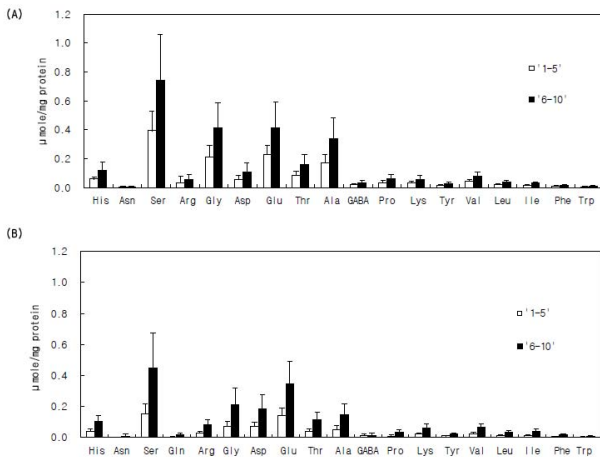


Figure 2. Amino acid levels in skin stratum corneum of forearm and forehead: Tape-stripped samples of stratum corneum from forearm (A) and forehead regions (B) were analyzed for the levels of amino acids. Amino acids were higher in deeper stratum corneum regions. Data are presented as mean SD of 15 healthy volunteers.

필라그린은 이러한 아미노산으로 구성되어 있으며 필라그린이 분해되어 이들 아미노산들이 생성된 것으로 예측된다.

동일 부위에서 각질 깊이별로 비교(Table 4)했을 때

전박의 경우 각질 표면쪽(1 ~ 5)의 아미노산 함량은 $1.44 \pm 0.42 \mu\text{mole/mg protein}$ 이었고 안쪽(6 ~ 10)의 아미노산 함량은 $2.70 \pm 1.12 \mu\text{mole/mg protein}$ 이었으며 이마의 경우 표면이 $0.72 \pm 0.25 \mu\text{mole/mg protein}$, 안쪽이 $1.96 \pm 0.85 \mu\text{mole/mg protein}$ 의 함량을 나타내었다. 표면과 안쪽의 아미노산 함량 비교 시 안쪽의 아미노산 함량은 전박과 이마 모두에서 표면에 비해 함량이 높았으며 유의적인 결과($p < 0.05$)임을 확인하였다. 피부 안쪽의 아미노산 함량이 많은 것은 flaggrin의 분해가 deeper epidermis 즉, stratum corneum-stratum granulosum에서 활발히 일어나는 것으로 보고되었으며[9,17] 관찰된 결과도 이전의 결과와 일치하였다.

또한 아미노산 함량을 각질시료 부위별로 비교하였다. 1 ~ 5까지의 각질 테이프 시료를 분석하여 두 부위의 아미노산 조성 프로파일을 Figure 3에 나타내었으며 그 결과 각 아미노산의 함량은 이마보다 전박에서 더 높았음을 확인하였으며 Table 4의 전체 총 함량 결과에서도 전박의 아미노산 함량(총량 $4.14 \pm 1.35 \mu\text{mole/mg protein}$)이 이마의 아미노산 함량(총량 $2.68 \pm 0.99 \mu\text{mole/mg protein}$)보다 1.5배 높았고 이는 통계적으로 유의성($p < 0.01$)이 있음을 확인하였다.

시험 피험자의 성별(남자 6명, 여자 9명)간의 차이를 알아보고자 측정 부위별, 각질 깊이별 아미노산의 함량

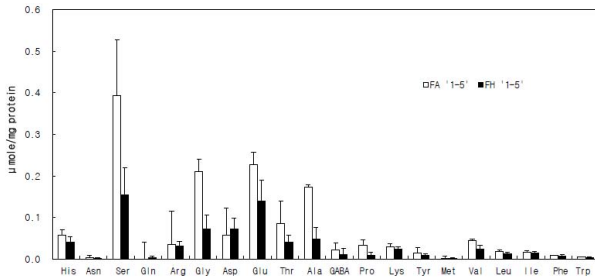


Figure 3. Comparison of amino acid levels in skin stratum corneum between forearm and forehead: Tape-stripped samples of stratum corneum (5 tapes) from forearm and forehead regions were analyzed for the levels of amino acids. Amino acids were higher in forearm than forehead. Data are presented as mean ± SD of 15 healthy volunteers (FA : Forearm, FH : Forehead).

Table 4. Total Amino Acid Levels in Skin Stratum Corneum of Forearm and Forehead by Skin Depth (mean ± SD, N = 15)

Skin depth	Forearm (μmole/mg protein)	Forehead (μmole/mg protein)
1 ~ 5	1.44 ± 0.42	0.72 ± 0.25
6 ~ 10	2.70 ± 1.12*	1.96 ± 0.85*
total	4.14 ± 1.35	2.68 ± 0.99

Paired *t*-test, **P* < 0.05

과 수분증발력(TEWL)을 비교하였다. 전박의 경우 남성, 여성간의 패턴 차이가 없었으나 흥미롭게도 이마부위의 수분증발력(TEWL)과 각질 중 아미노산 양을 비교한 결과에서는 남성이 수분증발력(TEWL)은 유의적으로 높고, 반대로 아미노산양은 낮은 것으로 측정되었으나(data not shown) 측정례의 수가 적어 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3.3. 보습능(TEWL)과의 상관 관계분석

전박과 이마의 아미노산 함량을 수분증발력(TEWL) 값과 비교하여 보습능과의 상관 관계를 알아보려 하였다. 상대적으로 적은 수분증발력(TEWL) 값을 보이는 전박(평균 TEWL : 9.0)과 전박에 비해 높은 수분증발력(TEWL) 값을 보이는 이마(평균 TEWL : 15.2)의 아미노산 함량을 비교하면 전박의 아미노산 총량(4.14 ± 1.35 μmole/mg protein)이 이마의 총량(2.68 ± 0.99 μmole/mg protein)보다 컸으며 이는 아미노산의 함량이 높은 부위가 보습능이 높았음을 확인할 수 있었다. Figure

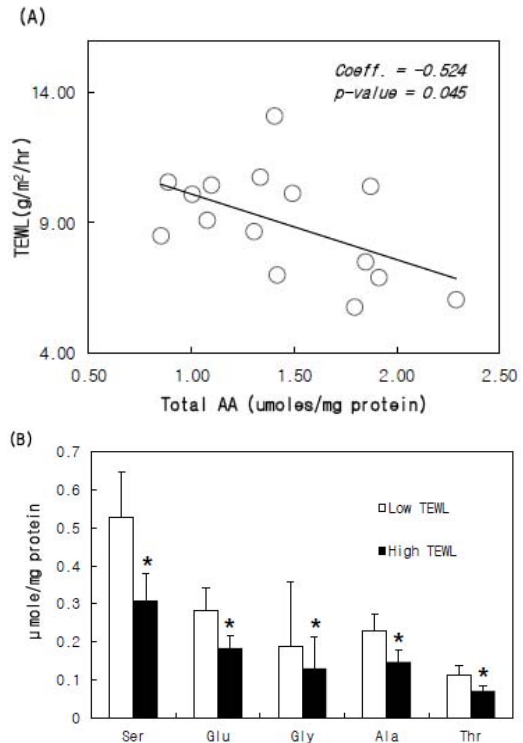


Figure 4. Relationship between amino acid levels in skin stratum corneum and barrier function: (A) Correlation between total amino acid levels in stratum corneum of forearm (5 tapes) and trans-epithelial water loss (TEWL) of 15 healthy volunteers. Correlation was analyzed using Pearson's correlation analysis (B) Comparison of amino acid levels between subjects with low and high TEWL (N = 4). * represents statistical significance (*p* < 0.05), Student's *t*-test.

4(A)는 15명의 피험자들의 전박부위 5장의 테이프 중 아미노산 총량과 보습능(TEWL)과의 상관 관계도를 plotting하고 Pearson's correlation analysis를 통해 두 지표간의 통계적 상관관계를 구하였다. 그 결과 전박(1-5장 테이프)의 아미노산 총량은 보습능(TEWL)과 음의 상관관계를 갖는 것을 확인하였으며 *p* < 0.05으로 확인되어 유의성을 확인하였다. 즉 수분증발력(TEWL)이 적은 사람일수록 각질 내 아미노산의 함량이 높았음을 의미하는 것이다. 또한 보습능에 중요한 아미노산 성분을 확인하고자 TEWL값이 높은 상위 4명과 TEWL값이 작은 하위 4명을 분리(TEWL difference, *p* < 0.05)하여 각 아미노산 데이터를 분석한 결과 Ser, Glu, Gly, Ala, Thr, Pro, Val, Trp의 성분들이 두 그룹간에 유의적인 차이를 보이는(*p* < 0.05) 중요한 성분임을 확인하였다. 그 중요한 5가지 성분에 대한 결과를 Figure 4(B)에 나타내

었다.

마찬가지로 이마부위에서 아미노산 총량과 보습능 (TEWL)과의 상관 관계를 비교하고자 하였으나 이마의 경우 전박에 비해 높은 수분증발량(TEWL : 15.2 ± 2.27) 값과 낮은 아미노산 함량 분포를 보임으로써 전박의 결과와 다른 양상을 나타내어 아미노산과 보습능과의 상관 관계를 확인할 수 없었다. 이는 아마도 피부 보습 유지에 중요한 역할을 담당하는 성분인 피지, 각질세포간 지질, NMF의 세 가지 성분들이 이마와 전박부위에서 서로 다른 기여도로 작용하여 보습효능을 나타내는 것으로 추측된다. 또한 본 연구에 사용된 시료는 건강한 피험자의 각질시료를 대상으로 하였기 때문에 보다 명확한 결과비교를 위해서는 추가적으로 정상 피부 vs 아토피 피부에 대해서 보습능과 NMF 및 각질 세포간 지질과의 상관관계 분석 등 종합적인 연구를 통해 각질생리에 대한 추가연구가 진행되어야 할 것이다.

4. 결 론

본 연구를 통하여 피부 각질층의 보습에 중요한 역할을 하는 보습인자로서 NMF의 주요성분인 개별 아미노산 함량을 분석하여 보습능과의 상관관계를 평가하였다. Tape stripping한 전박과 이마의 각질 시료 중 22종의 아미노산을 UPLC-PDA를 이용하여 10 min 내에 분석하였으며 각질 시료 중 효과적으로 자유아미노산(free amino acids)을 추출하기 위한 추출 방법을 설정하였다. 부위별, 피부 깊이별 각 아미노산의 프로파일을 확인한 결과 전박은 Ser > Glu > Gly > Ala > Thr의 순으로 주요 아미노산을 확인하였으며 이마는 Ser > Glu > Gly > Asp > Ala > Thr의 순으로 함량이 높았음을 확인하였으며 각질의 아미노산 조성 중 Ser, Glu, Gly, Ala 등의 함량이 큰 것은 주로 필라그린이 이러한 아미노산으로 구성되어 있어 필라그린 분해 후 이들 아미노산들이 생성된 것으로 예측된다. 각질 깊이별 아미노산의 비교는 각질 표면(tape 1 ~ 5)보다는 안쪽(tape 6 ~ 10)에서 보습인들의 함량이 컸음을 확인하였다. 피부 안쪽의 아미노산 함량이 많은 것은 flaggrin의 분해가 deeper epidermis 즉, stratum corneum-stratum granulosum에서 활발히 일어나는 것으로 보고되었으며 관찰된 결과도 이전의 결과와 일치하였다. 또한 부위별 비교에서 전박이 이마에 비해 아미노산 총 함량이 1.5배 정도 높았으며, TEWL과의 상관성을 Pearson's 분석법으로 평가해본 결과 아미노산 총량은 음의 상관관계를 갖는 것을 확인할 수 있어 아미

노산 함량이 높을수록 보습유지에 효과적임을 확인할 수 있었다. 이 때 보습능에 중요한 아미노산 성분은 Ser, Glu, Gly, Ala, Thr, Pro, Val, Trp임을 확인하였고 이 중 Ser, Glu, Gly, Ala, Thr은 각질 내 존재하는 주요 아미노산 성분으로 보습에 긍정적인 영향을 주는 성분으로 사료된다.

피험자의 성별차이에 의한 차이 비교 시 전박의 경우 성별에 의한 아미노산 함량 및 수분증발력(TEWL)간의 차이는 없었으나 이마의 경우 남성이 수분증발력(TEWL)은 유의적으로 높고, 반대로 아미노산량은 낮은 것으로 측정되었으나 측정 예가 충분치 않아 명확한 결과 해석을 위해서는 추가연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

이상의 결과로써 NMF의 주성분인 아미노산의 함량은 보습과 관련한 각질 생리기능과 밀접한 관련을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며 본 연구를 통해 얻은 각질층의 아미노산의 통합적인 분석법은 보습, 노화, 미백, 피부 염증질환 등 다양한 피부 상태와 아미노산류들의 변화와의 관계를 깊이 이해하고 피부 기능과 관련된 새로운 분자적 타겟을 발굴하고 증명하는 데 기초적인 방법으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. N. Nakagawa, S. Sakai, M. Matsumoto, K. Yamada, M. Nagano, T. Yuki, Y. Sumida, and H. Uchiwa, Relationship between NMF (lactate and potassium) content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects, *J. Invest Dermatol.*, **122**, 755 (2004).
2. G. Imokawa, H. Kuno, and M. Kawai, Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator, *J. Invest Dermatol.*, **96**, 845 (1991).
3. J. P. Sylvestre, C. C. Bouissou, R. H. Guy, and M. B. Delgado-Charro, Extraction and quantification of amino acids in human stratum corneum *in vivo*, *Br. J. Dermatol.*, **163**, 458 (2010).
4. I. Horii, Y. Nakayama, M. Obata, and H. Tagami, Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin, *Br. J. Dermatol.*, **121**, 587 (1989).
5. S. Marstein, E. Jellum, and L. Eldjarn, The concentration of pyroglutamic acid (2-pyrrolidone-5-carboxylic acid) in normal and psoriatic epidermis determined on a microgram scale by gas chroma-

- tography, *Clin. Chim. Acta.*, **49**, 389 (1973).
6. A. V. Rawlings, I. R. Scott, C. R. Harding, *et al.*, Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J. Invest Dermatol.*, **103**, 731 (1994).
 7. M. Tanaka, M. Okada, Y. X. Zhen, *et al.*, Decreased hydration state of the stratum corneum and reduced amino acid content of the skin surface in patients with seasonal allergic rhinitis, *Br. J. Dermatol.*, **139**, 618 (1998).
 8. M. Denda, J. Hori, J. Koyama, *et al.*, Stratum corneum sphingolipids and free amino acids in experimentally-induced scaly skin, *Arch. Dermatol. Res.*, **284**, 363 (1992).
 9. S. Kezic, P. Kemperman, E. S. Koster, *et al.*, Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum, *J. Invest Dermatol.*, **128**, 2117 (2008).
 10. S. Kezic, A. Kammeyer, F. Calkoen, *et al.*, Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods, *Br. J. Dermatol.*, **161**, 1098 (2009).
 11. J. Koyama, I. Horii, K. Kawasaki, *et al.*, Free amino acids of stratum corneum as a biochemical marker to evaluate dry skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **35**, 183 (1984).
 12. M. Watanabe, H. Tagami, I. Horii, *et al.*, Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis, *Arch. Dermatol.*, **127**, 1689 (1991).
 13. M. Hara, K. Kikuchi, M. Watanabe, *et al.*, Senile xerosis: Functional, morphological, and biochemical studies, *J. Geriatr. Dermatol.*, **1**, 111 (1993).
 14. C. Katagiri, J. Sato, J. Nomura, *et al.*, Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice, *J. Dermatol. Sci.*, **31**, 29 (2003).
 15. Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokuda, *et al.*, Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Invest Dermatol.*, **104**, 806 (1995).
 16. P. Caspers, G. Lucassen, E. Carter, *et al.*, *In vivo* confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles, *J. Invest Dermatol.*, **116**, 434 (2001).
 17. G. O'Regan, P. Kemperman, A. Sandilands, *et al.*, Raman profiles of the stratum corneum define 3 filaggrin genotype-determined atopic dermatitis endophenotypes, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **126**, 574 (2010).