

폐경기 노화 유도 전후의 로얄제리 식이공급이 백서 표피의 필라그린과 유리아미노산 함량 및 관련 대사 효소의 단백질 발현 변화에 미치는 영향

김예지¹ · 한상미² · 조윤희^{1*}

¹경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과
²농촌진흥청 농업생물부

The Dietary Effect of Royal Jelly Supplementation on Epidermal Levels of Filaggrin and Free Amino Acids during Menopause in Rats

Yeaji Kim¹, Sang-Mi Han², and Yunhi Cho^{1*}

¹Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

²Dept. of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Gyeonggi 441-707, Korea

Abstract

Epidermal hydration is mainly maintained by natural moisturizing factors (NMFs). Of these various NMFs, free amino acids (AAs) are major constituents generated by filaggrin degradation. The reduction of these AAs has been reported in aging skin induced during menopause. In this study, we examined whether the dietary supplementation of royal jelly (RJ) during the pre- and post-menopausal period alters epidermal levels of filaggrins, free AAs, and peptidylarginine deiminase-3 (PAD-3) (an enzyme involved in filaggrin degradation processes). Sprague Dawley rats were divided into five groups: groups fed a control diet for 12 weeks, in which an ovariectomy (OVX) or sham operation (SHAM) were underwent at week 4; groups fed a diet with 1% RJ harvested in different area of Korea (RJ1 and RJ2); and a group fed a diet with isoflavone (IF), the typical functional food for menopause prevention, for 4 weeks before and 8 weeks after an ovariectomy operation. In the epidermis of group OVX, total filaggrins (including profilaggrin and filaggrin) were reduced; these levels in groups RJ1 and IF were similar or less than in group OVX. However, total AAs, which showed no apparent difference between groups SHAM and OVX, were highly increased in groups RJ1 and IF. Specifically, aspartate (Asp) and proline (Pro), the major AAs in functioning NMF, were highly increased in group RJ1. Although total filaggrins, profilaggrin, filaggrin and PAD3 increased, total AAs (including Asp and Pro) in group RJ2 were modest or less than in group RJ1. The PAD3 alteration was not apparent among the four other groups. Taken together, we demonstrate that the diet supplementation of RJ1 enhanced filaggrin degradation (but not through the increased protein expression of PAD3), and increased total AAs, Asp and Pro. RJ1 could be a dietary supplementation for preventing the skin aging induced during menopause.

Key words: royal jelly, ovariectomy, filaggrin, free amino acids, peptidylarginine deiminase-3 (PAD3)

서 론

피부의 최외각 층인 각질층(stratum corneum, SC)은 인체의 내·외부 환경 사이의 보호 장벽으로서 미생물의 침입, 자외선 및 수분의 손실을 예방한다(1). 표피의 수분 함량은 피지막과 수용성 성분인 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF)에 의해 유지되는데 피지막이 층상 구조(intercellular lamella sheets)를 이루어 수분 손실을 억제하는 반면 천연보습인자는 수분을 직접적으로 보유하거나 흡수하여 표피의 수분을 유지시킨다.

천연보습인자는 필라그린이 분해되어 생성된 아미노산과 그 대사산물로 구성되며 이외에 각종 무기염류도 포함된다(2,3). Filaggrin은 profilaggrin으로부터 합성이 되는데 profilaggrin은 표피 과립층에서 생성되어 비활성 및 불용성인 상태로 저장되며 표피의 칼슘 수치 증가에 의해 촉진되는 탈인산화 및 단백질 분해과정 등의 여러 단계를 거쳐서 filaggrin으로 전환된다. Filaggrin은 각질층으로 방출되어 세포골격을 형성하는 keratin filaments와 결합하고 transglutaminase(TGMs)에 의한 교차 결합과 peptidylarginine deiminase-3(PAD3)에 의한 변형 과정을 통하여 견고해진

*Corresponding author. E-mail: choyunhi@khu.ac.kr
Phone: 82-31-201-3817, Fax: 82-31-201-3715

다. Filaggrin은 이후 caspase-14 등의 여러 분해효소들에 의해 유리아미노산으로 최종 분해되어 천연보습인자로서의 기능을 한다(4). 표피 전체아미노산의 40% 이상을 sericine, glycine이 차지하고 있는데 이는 표피에서 주요 천연보습인자로서 표피의 수분 유지 기능을 한다(5,6). 또한 filaggrin과 천연보습인자의 아미노산 서열의 유사성은 filaggrin이 천연보습인자의 아미노산의 유일한 근원단백질임을 증명하였다(7,8). Filaggrin의 부족은 비정상적인 피부장벽의 형성을 초래하며(7) 아미노산이 피부의 보습상태에 중요한 역할을 한다는 연구가 다수 보고되었다(9-11).

폐경기 여성에게 에스트로겐의 저하는 피부의 두께 및 콜라겐의 함량을 감소하여 건조함, 탄력성 저하, 주름을 초래하며(12,13) 폐경 전후 천연보습인자도 표피의 두께 감소와 함께 감소하여 피부의 보습을 저하시킨다(14). 이러한 피부노화의 역제를 위해 많은 여성들이 폐경기 전후 다양한 건강기능식품을 섭취하고 있다(15). 이 중 로얄제리는 꿀과 화분을 일벌들이 소화 흡수한 뒤 인두부를 경유해서 만들어진 물질로서 항생물질과 항산화 효과, 혈류개선과 세포재생, 피부미용 등의 생리활성을 보이는 것으로 알려져 있다(16-19). 선행연구에서 로얄제리는 콜라겐 합성을 강화하여 광노화를 유발하는 자외선으로부터 인간의 피부섬유아세포를 보호하고(20) *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 로얄제리와 그 지방산이 에스트로겐과 같은 유사한 효과를 나타내었다(21,22). 이처럼 로얄제리의 기능성 측면에서 전반적인 노화억제 효능의 보고와 최근 사회적으로 요구도가 높아지고 있으며 피부의 항노화 및 항산화를 위한 기능성 식이소재로 사용되고 있다. 그러나 에스트로겐의 결핍으로 인한 피부 노화에 대한 로얄제리의 효과에 대한 연구는 미흡하다. 이에 본 연구에서는 폐경기 노화 유도 전후의 로얄제리 식이공급이 백서 표피의 필라그린과 유리아미노산 함량 및 관련 대사 효소의 단백질 발현 변화에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 난소절제

실험에 사용된 155 g 내외의 생후 5주차 Sprague Dawley(SD)계 암컷 백서 60마리를 ㈜두얼바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 공급받아 실험식으로 사육하기 전 1주 동안 고형배합사료로 적응시켰다. 난괴법을 이용하여 총 5군으로 분류된 실험군은 난소절제와 같은 수술 스트레스만 준 정상대조군(SHAM군), 난소절제를 시행한 난소절제군(OVX군), 난소절제와 함께 생산지가 다른 국내산 로얄제리를 공급한 로얄제리 식이공급군(RJ1군, RJ2군), 이소플라본 식이공급군(IF군)으로 나누었다. 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐(17 β -estradiol)과 구조와 분자량이 유사하며 폐경 전 여성의 경우에는 항에스트로겐 효과를, 폐경 후 여성의 경우 에스트로겐으로서의 효과를 나타내며(23,24) 이러

한 효과로 폐경기 전후 항노화, 항산화 등을 위한 건강기능식품으로서 널리 사용되고 있어 양성대조군으로 두었다.

실험식이 공급 4주 후 난소절제를 시행하였으며 난소절제 후 8주 동안 전체 12주간 실험식이를 계속 공급하였다. 난소절제는 가스 마취기계(SurgiVet, Norwell, MA, USA)를 이용하여 1.5% isoflurane(Choong-Wae Pharma Co., Seoul, Korea)과 70% N₂O와 30% O₂ 가스를 이용하여 전신 마취 후, 복부 정중앙을 절개한 다음 양측 난관을 실로 묶고 양측 난소를 칼로 제거한 후 다시 봉합하였다. 사육기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육실의 온도는 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도는 60 \pm 5%를 유지하고 매일 광주기와 암주기가 12시간이 되도록 조절하였다.

실험식이

SHAM군과 OVX군은 일반식이를 공급하였으며 RJ1군과 RJ2군은 전체 식이 무게의 1.0%에 상응하는 국내산 로얄제리 고형분을 각각 식이에 혼합하였으며 무게 차이는 corn starch의 무게에서 감하여 식이를 조정하였다. 로얄제리(2009년산)는 국내 지역인 철원과 포천의 생산자에게 직접 공급받아 RJ1군 및 RJ2군으로 나누었으며 실험수행 직전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. IF군은 ㈜폴무원홀딩스(Seoul, Korea)로부터 제공받아 이소플라본 30% glucoside type (daidzin : genistin=1:1)을 80 mg/kg body weight(BW)이 되게 첨가하였다(25). 각 실험군의 식이 조성은 Table 1과 같으며 식이 지방은 식이 무게의 10%로 고정시키고 corn oil을 공급하였다.

체중 및 실험식이 섭취량 측정

식이효율 측정을 위해 주 1회 체중과 잔여 식이량 및 공급량을 측정하였다. 식이효율은 실험기간 동안의 체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다. 그러나 사전 연구에서 체중은 SHAM군에 비해 난소절제를 시행한 군인 OVX군, RJ1군, RJ2군, IF군에서 유의적으로 증가하였으나 식이효율은 군간 유의성이 나타나지 않아 결과에 나타나지 않았다(26).

표피의 필라그린 추출 및 분석

피부 조직에 10 mM EDTA가 함유된 PBS(pH 7.4)를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 처리한 후 표피를 분리하였다. 분리한 표피는 9 M urea, 2% SDS, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail을 포함한 50 mM tris buffer와 함께 polytron(P-8340, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 분쇄하였다(27). 분쇄된 조직을 10배 희석하여 15,000 \times g에서 0 $^{\circ}$ C로 30분 동안 원심분리 후 상층액을 얻었고 단백질 정량을 하였다. 동량의 단백질(5 μ g/well)을 4% PAGE/SDS gel(profilaggrin 발현)에, 8% PAGE/SDS gel(filaggrin 발현)에 각각 전기영동 시킨 후 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. Rabbit polyclonal 1차 항체인 filaggrin antibody (GeneTex Inc., San Antonio, TX, USA)를 4 $^{\circ}$ C에서 16시간

Table 1. Diet composition of experimental groups (g/kg)

Ingredients	Experimental groups ¹⁾				
	SHAM	OVX	RJ1	RJ2	IF
Casein ²⁾	230	230	230	230	230
L-Cystine	3	3	3	3	3
Corn oil	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50	50
Vitamin mix ³⁾	10	10	10	10	10
Mineral mix ⁴⁾	35	35	35	35	35
Sucrose	200	200	200	200	200
Corn starch	372	372	362	362	372
Royal jelly	—	—	10	10	—
Isoflavone	—	—	—	—	0.08

¹⁾Groups SHAM (sham-operated group) and OVX (ovariectomy) fed a control diet; groups RJ1 and RJ2 fed an experimental diet with 1% RJ harvested in different area of Korea; group IF fed a diet with isoflavone (80 mg/kg), the typical functional food for menopause prevention, for 12 weeks. Ovariectomy was performed at week 4 and each diet was continued for 8 more weeks.

²⁾Casein (nitrogen×6.25), 870 g/kg.

³⁾Vitamin mix composition, AIN-93 vitamin mix 310025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA): niacin 3 g/kg, calcium pantothenate 1.6 g/kg, pyridoxine HCl 0.06 g/kg, thiamine HCl 0.6 g/kg, riboflavin 0.6 g/kg, folic acid 0.2 g/kg, biotin 0.2 g/kg, vitamin E acetate (500 IU/g) 0.8 g/kg, vitamin D₃ (400,000 IU/g) 0.25 g/kg, vitamin K₁/dextrose mix (10 mg/g) 7.5 g/kg and sucrose 967.23 g/kg.

⁴⁾Mineral mix composition, AIN-93 mineral mix 210025 (Dyets Inc.): calcium carbonate 357 g/kg, potassium phosphate (monobasic) 196 g/kg, potassium citrate H₂O 70.78 g/kg, sodium chloride 74 g/kg, potassium sulfate 46.6 g/kg, magnesium oxide 24 g/kg, ferric citrate U.S.P 6.06 g/kg, zinc carbonate 1.65 g/kg, manganous carbonate 0.63 g/kg, cupric carbonate 0.3 g/kg, potassium iodate 0.01 g/kg, sodium selenate 0.01025 g/kg, ammonium paramolybdate 4H₂O 0.00795 g/kg, sodium metasilicate 9H₂O 1.45 g/kg, chromium potassium sulfate 12H₂O 0.275 g/kg, lithium chloride 0.0714 g/kg, boric acid 0.0815 g/kg, sodium fluoride 0.0635 g/kg, nickel carbonate 0.0318 g/kg, ammonium vanadate 0.066 g/kg and finely powdered sucrose 221.026 g/kg.

동안 반응시키고 PBST solution으로 세척하였다. 2차 항체인 anti rabbit IgG-HRP(Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA)로 실온에서 2시간 반응 후 PBST로 세척하고 발색은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)로 immune detection하였다. 각 band의 intensity는 cytokeratin5의 발현을 기준으로 하여 imaging densitometer(Lab work version 4.6, UVP, Upland, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

PAD3의 protein 발현 변화

피부 조직을 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, Gibco BRL, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)와 dispase II(2.4 unit/mL, Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) 혼합용액(1:1 v/v)을 가하여 4°C에서 16시간 동안 처리한 후 표피를 분리하였다. 0.5% nonidet P-40(TE-NP40 buffer extract), 10 mM EDTA, protease inhibitor가 함유된 40 mM Tris-

HCl(pH7.5)을 첨가한 후(28) polytron을 이용하여 분쇄하였다.

단백질 정량 후 40 µg/well로 8% PAGE/SDS gel에 전기영동 하여 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. Rabbit polyclonal 1차 항체 PAD3 antibody(Abcam, Cambridge, UK) 및 2차 항체 anti rabbit IgG-HRP(Cell Signaling Technology Inc.)를 이용하여 위와 동일한 방법으로 반응시키고 발색은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific)를 이용하여 immune detection하였다. 각 band의 intensity는 cytokeratin5의 발현을 기준으로 정량하여 imaging densitometer(Lab work version 4.6, UVP)를 사용하여 측정하였다.

표피의 유리아미노산 함량 분석

1:1 비율의 HBSS와 dispase II 혼합 용액을 이용하여 분리된 표피 조직에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 최종 농도가 15%가 되도록 가하여 혼합한 후 polytron으로 분쇄하여 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 12,000×g에서 10분간 원심분리 하여 단백질을 제거한 후 상층액을 분석하기 전에 0.45 µm filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하였다. 아미노산 농도 분석은 HPLC로 mobile phase(A pump, 40 mM phosphate buffer; B pump, ACN:MeOH:water =45:45:10)를 이용하여 column(Zorbax XDB-C18, Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA)에서 2.0 mL/min의 속도로 아미노산을 정성/정량 분석하였다.

통계분석

본 실험의 결과는 SPSS, ver 18.0 program(statistical package for social science, IBM SPSS, Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 실험군 별 평균(mean)과 표준오차(standard error, SEM)로 나타내었으며, 각 군 간의 비교는 one-way ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 검증하였다. 유리아미노산 함량 결과(Table 2)는 정상대조군을 기준으로 non-paired Student's t-test로 분석하여 p<0.05, p<0.01 수준에서 유의성을 나타냈다.

결과 및 고찰

표피의 필라그린 함량 변화

난소절제 및 로얄제리 식이공급으로 인한 표피의 필라그린 함량 변화를 western blot assay로 분석하였다(Fig. 1). Profilaggrin은 포유류에서 발견되는 분자량이 큰 단백질의 일종으로 구조는 10~12개의 filaggrin이 short linker peptide로 연결되어 있다. Profilaggrin은 표피의 과립층에서 합성되어 인산화 된 상태로 존재하며 초기에 케라토히알린 과립에 비활성 및 불용성 상태로 저장되어 있다. 표피의 칼슘 수치 증가에 반응하여 중말분화 과정에서 profilaggrin은 여

Table 2. Free amino acid contents in the epidermis of rat

Amino acids	Experimental groups ¹⁾				
	SHAM	OVX	RJ1	RJ2	IF
EAA ²⁾	μmoles/100 g epidermal protein				
Arginine	nd ³⁾	19.6±18.8 ^{d)}	nd	nd	57.4±29.7
Histidine	16.2±4.1	22.7±11.7	nd	nd	nd
Isoleucine	nd	nd	nd	nd	nd
Leucine	nd	6.9±1.0 ^{b)}	nd	nd	31.2±9.5 ^{a)}
Lysine	89.5±18.7 ^{a)}	13.7±7.0 ^{b)}	nd	nd	nd
Methionine	32.8±4.9	38.5±8.3	44.3±6.0	31.2±3.0	33.1±5.0
Phenylalanine	47.2±10.4	22.8±8.7	42.0±6.8	38.3±5.0	39.6±7.8
Threonine	nd	11.2±11.3	nd	nd	nd
Tryptophan	nd	nd	nd	nd	nd
Valine	40.0±11.5	26.5±7.3	nd	nd	60.7±16.5
NEAA ²⁾					
Alanine	nd	nd	nd	nd	nd
Aspartate	2.9±0.4 ^{ab)}	1.7±0.2 ^{b*}	3.1±0.5 ^{a)}	2.6±0.2 ^{ab)}	3.0±0.5 ^{ab)}
Cysteine	nd	nd	nd	nd	nd
Glutamate	nd	nd	nd	nd	nd
Glycine	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	72.3±14.0 ^{ab)}	28.6±9.0 ^{bc**)}	112.5±16.7 ^{a)}	64.0±9.1 ^{b)}	12.5±0.5 ^{c**)}
Serine	nd	nd	nd	nd	nd
Tyrosine	15.2±2.9 ^{b)}	16.6±3.7 ^{b)}	20.5±3.1 ^{ab)}	14.5±1.4 ^{b)}	34.7±10.5 ^{a)}
Total AA	139.1±19.9 ^{ab)}	102.5±16.5 ^{b)}	197.6±36.6 ^{a)}	127.3±15.1 ^{ab)}	201.0±34.0 ^{a)}

¹⁾Groups SHAM (sham-operated group) and OVX (ovariectomy) fed a control diet; groups RJ1 and RJ2 fed an experimental diet with 1% RJ harvested in different area of Korea; group IF fed a diet with isoflavone (80 mg/kg), the typical functional food for menopause prevention, for 12 weeks. Ovariectomy was performed at week 4 and each diet was continued for 8 more weeks.

²⁾EAA, essential amino acid; NEAA, non essential amino acid.

³⁾nd: not detected.

⁴⁾Data are mean±SEM (n=10). Values without a common letter in the same row are significantly different (p<0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. *p<0.05, **p<0.01 versus SHAM by non-paired Student's t-test.

러 단백질 분해과정에 의해 filaggrin으로 탈인산화 되어 분리된다(4).

폐경을 유도한 OVX군에서 total filaggrin의 발현량이 감소하였으며, profilaggrin과 filaggrin의 양도 다른 군에 비해 OVX군에서 유의적으로 감소하였다. 이는 폐경기 유도가 천연보습인자의 전구단백질인 profilaggrin 및 filaggrin의 함량을 감소시켜 표피의 장벽이 붕괴되고 피부보습능력에 영향을 미쳐 수분 손실이 발생한 것을 의미한다.

폐경기 유도와 함께 로얄제리 식이를 공급한 군인 RJ1군과 RJ2군의 결과를 살펴보면 RJ1군에서 total filaggrin의 양이 OVX군에 비해 현저히 감소하였으며 profilaggrin 및 filaggrin의 발현도 OVX군과 유사하거나 낮은 수준이었다. 그러나 RJ1군과 생산지가 다른 로얄제리 식이를 공급한 RJ2군은 total filaggrin의 양이 폐경기 유도가 되지 않은 SHAM군보다는 낮았으나 OVX군에 비해 높았다. 폐경기 전후의 여러 노화 증상을 예방하기 위해 사용되는 이소플라본을 식이로 투여한 IF군의 profilaggrin, filaggrin을 비롯하여 total filaggrin의 양은 OVX군과 유사하였다. 이 결과를 통해 로얄제리의 식이 공급이 폐경기 노화로 인해 감소한 profilaggrin, flaggrin의 함량을 높였지만 생산지별 로얄제리의 효과가 다소 차이가 있다. 이는 산지별 로얄제리의 filaggrin 함량에 미치는 효과가 다양함을 의미하며 로얄제리의 지표성분인 10-HDA(29)를 비롯하여 그 이외 각 로얄제리의 다양한

성분(아미노산, 비타민, 펩타이드, 아세틸콜린)(30) 등의 차이에 기인하는 것으로 여겨지며 추후 각 산지별 로얄제리의 성분 분석이 필요함을 제안한다.

PAD3의 protein 발현

Profilaggrin의 발현 및 유리아미노산으로 분해되는 과정 및 관여하는 효소들이 명확하게 파악되어 있지는 않으나 activator protein-1(AP-1)(31), PPAR γ (32) 등의 regulator가 표피에서의 종말분화과정 중에 profilaggrin의 발현을 강화한다고 알려져 있다(4). Profilaggrin은 초기 phosphatase type 2A에 의해 탈인산화 되고 matriptase, protasin, kallikrein-5 등 여러 단백질 분해 효소들에 의해 filaggrin으로 분해된다. Filaggrin은 keratin filament에 결합하여 관련 효소인 transglutaminase(TGMs)와 peptidylarginine deiminase (PAD), 특히 PAD3와 함께 세포 골격을 견고하게 만든다. 궁극적으로 filaggrin은 caspase-14을 포함한 단백질 분해 효소에 의해 천연보습인자의 주요 구성 성분인 유리아미노산으로 분해가 된다(4,33).

Profilaggrin의 발현과 분해과정에는 여러 단백질 분해 효소 및 regulator가 관여되는데 그중 PAD3의 발현은 모발과 표피로 제한이 되며 표피 과립층의 각질세포에서 filaggrin과 함께 PAD3의 발현이 보고되었다(34). PAD3는 칼슘 의존형 효소로 filaggrin의 arginine residue를 citrulline으로 바

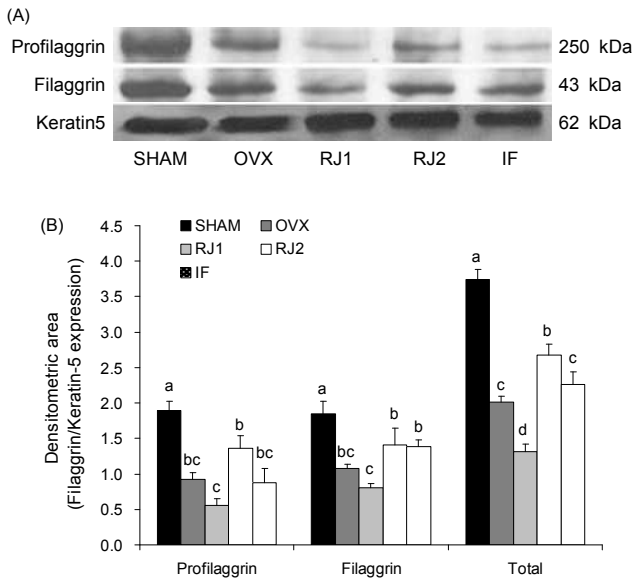


Fig. 1. Altered protein levels of profilaggrin and filaggrin in the epidermis of groups. Groups SHAM (sham-operated group) and OVX (ovariectomy) fed a control diet; groups RJ1 and RJ2 fed an experimental diet with 1% RJ harvested in different area of Korea; group IF fed a diet with isoflavone (80 mg/kg), the typical functional food for menopause prevention, for 12 weeks. Ovariectomy was performed at week 4 and each diet was continued for 8 more weeks. (A) Representative expression of profilaggrin or filaggrin protein in the epidermis of groups. (B) The signal intensities from multiple experiments of (A) were quantified and the integrated areas were normalized to the corresponding value of keratin5 (loading control). Data are mean±SEM (n=7). Values without a common letter in the same row are significantly different (p<0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

꾸어 net charge를 양성에서 중성으로 변하는 citrullination을 일으킨다(35). 이러한 filaggrin의 citrullination은 keratin과 결합하여 각질화에 필요한 fibrous matrix의 형성을 강화한다. 따라서 filaggrin의 citrullination에 PAD3가 관여되지 못하면 표피의 항상성을 손상시키고 피부의 장벽기능을 잃게 한다(36).

표피의 천연보습인자 생성에 중요한 효소인 PAD3의 protein 발현은 정상대조군인 SHAM군을 기준으로 표시하여 나타내었다(Fig. 2). PAD3의 protein 발현은 IF군을 비롯하여 SHAM군, OVX군, RJ1군에서 군간 유의성이 없었다. 그러나 RJ2군의 PAD3 발현이 가장 현저하게 높았다. Filaggrin의 생성, 성숙 및 유리아미노산으로의 분해과정에는 PAD3 이외에도 AP-1, PPAR γ , caspase-14 등과 같은 다양한 regulator 및 protease가 관여된다고 밝혀져 있다(4,31-33). 따라서 PAD3 이외에 로얄제리 식이 섭취에 의해 발현 또는 활성이 증가하는 효소의 파악에 대해 심도 있는 연구가 필요한 것으로 여겨진다.

표피의 유리아미노산 함량 변화

군 간 표피의 유리아미노산 함량을 비교하여 Table 2에 나타내었다. 전체적으로 유리아미노산의 함량은 mice를 대

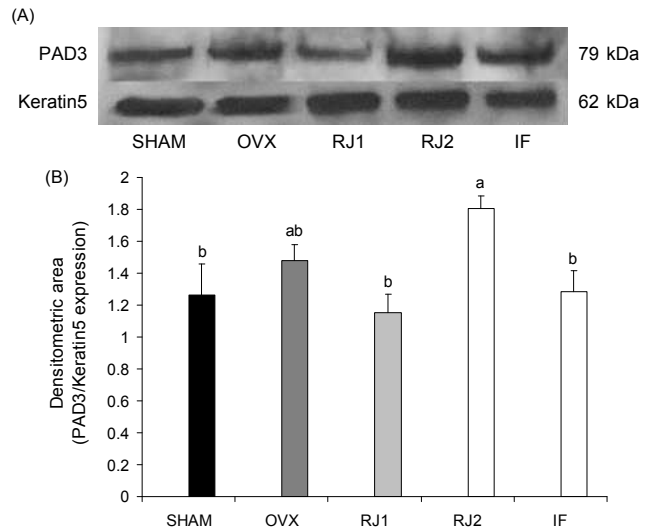


Fig. 2. Peptidylarginine deiminase type III (PAD3) protein expressions in the epidermis of groups. Groups SHAM (sham-operated group) and OVX (ovariectomy) fed a control diet; groups RJ1 and RJ2 fed an experimental diet with 1% RJ harvested in different area of Korea; group IF fed a diet with isoflavone (80 mg/kg), the typical functional food for menopause prevention, for 12 weeks. Ovariectomy was performed at week 4 and each diet was continued for 8 more weeks. (A) Representative expression of PAD3 in the epidermis of groups. (B) The signal intensities from multiple experiments of (A) were quantified and the integrated areas were normalized to the corresponding value of keratin5 (loading control). Data are mean±SEM (n=7). Values without a common letter in the same row are significantly different (p<0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

상으로 표피의 유리아미노산 농도를 관찰한 다른 연구(37)에 비해 낮게 측정되었다. 전체 유리아미노산의 총량이 SHAM군에 비해 OVX군에서 감소하거나 유사하였으며 RJ1군 및 IF군에서는 SHAM군보다 현저히 높아졌다. RJ2군의 전체 유리아미노산 함량은 SHAM군과 유사하였다.

표피의 유리아미노산을 개별적으로 분석한 결과 종류에 따라 0.0~112.46 μ moles/100 g의 넓은 범위에서 측정되었으며(Table 2), 이 결과는 각 유리아미노산의 농도가 일정 범위에서 고르게 측정된 혈장과 다르게 표피의 유리아미노산 농도의 경우 종류에 따라 넓은 범위에서 다양하게 측정되었던 사전연구(37)와 비슷한 양상을 보였다.

유리아미노산을 분석한 결과 SHAM군에서 표피의 주요 유리아미노산인 glutamate, serine, glycine을 비롯하여 arginine, isoleucine, leucine, threonine, tryptophan, alanine, cysteine은 측정되지 않았다. OVX군에서는 arginine 및 threonine이 낮은 수준에서 측정된 것과 lysine의 함량이 감소한 것을 제외한 필수아미노산의 함량 변화는 없었다. 그러나 aspartate와 proline의 함량이 유의적으로 감소하였다. RJ1군, RJ2군 및 IF군에서 필수아미노산인 methionine, phenylalanine이 측정되었으나 이들은 주요 유리아미노산은 아니며 그 수준이 SHAM군 및 OVX군과 유사하였다. 반면 폐경기 유도과 함께 로얄제리 식이를 공급한 RJ1군에

서 불필수아미노산으로 피부의 보습유지기능이 탁월한 aspartate 및 proline의 함량이 폐경을 유도한 OVX군에 비해 현저히 높았으며 SHAM군과 유사하거나 높은 수준이었다. RJ1군과 생산지가 다른 로얄제리 식이를 공급한 RJ2군은 aspartate와 proline의 경우 RJ1군의 유리아미노산 함량 증가 효과에는 미치지 못하였지만 정상대조군인 SHAM군과 유사하거나 낮았다. 폐경기 증상 개선에 도움을 주는 건강기능식품으로 알려진 이소플라본 식이를 공급한 IF군의 aspartate와 proline의 함량은 RJ1군에 비해 낮았으며 OVX군과 유사하거나 이보다도 낮았는데 이소플라본은 로얄제리에 비해 유리아미노산 함량 증가 효능이 떨어지는 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 로얄제리 식이 공급이 불필수아미노산은 aspartate, proline의 함량을 증가시켜 피부의 보습을 증진시켰음을 의미한다. 그러나 피부의 유리아미노산을 분석한 다른 선행연구들에서는 피부 전체 유리아미노산의 40% 이상을 serine, glycine이 차지한다고 보고한 사전 연구와 상이한 결과이다(5,37). 이러한 결과는 종간 특이성에 의한 것으로 사료되는데 Tabachnick와 Labadie(5)의 연구에서 기니피그, 인간 및 백서의 피부 유리아미노산 농도 분석 결과 기니피그와 인간에게서는 serine이 높은 함량을 보였다. 또한 마우스를 대상으로 유리아미노산을 분석한 선행연구는 serine, glycine이 높게 측정되었다(37). 하지만 백서의 경우 serine 함량이 기니피그와 인간의 피부의 함량에 비해 낮았으며 proline이 인간에 비해 높았으며 마우스에서는 발현되지 않았다(5,37). 본 실험 결과에서는 백서에게 serine을 비롯하여 glycine이 발현되지 않았으며 proline이 발현되었다. Kim과 Son(38)의 로얄제리의 아미노산을 분석한 연구 결과에서 주요 아미노산으로 aspartate와 glutamate가, Matsuka의 연구에서는 proline, lysine이 주요 아미노산으로 보고되었다(39). Kim 등(37)의 연구에서 실크단백질 sericin의 아미노산 성분인 serine이 피부에서 발현된 것과 같이 로얄제리의 섭취에 의한 피부 아미노산의 긍정적인 변화가 로얄제리의 아미노산 배열순서, 단백질의 소화 및 대사과정 등의 복합적인 요인에도 불구하고 어느 정도 로얄제리의 aspartate, proline의 높은 함량에 의해 야기된 것인지에 대해 추후 심도 있는 연구가 필요하나, 본 연구에서 제시된 로얄제리 식이 섭취는 이소플라본을 능가하여 피부의 보습 유지 및 천연보습인자의 기능을 하는 피부 내 아미노산의 긍정적인 변화를 나타냈다.

이상을 종합해보면 식이 4주차에 폐경기 노화를 유도하고 8주간의 각 식이를 계속 공급한 후 피부의 보습을 측정 한 사전 연구에서 군간 보습의 차이는 나타나지 않았으며(26) 이는 8주간 폐경기를 유도한 노화는 피부의 건조화의 임상적인 현상을 발생시키기에는 충분하지 않은 기간인 것으로 여겨지나 이 8주간의 기간 동안 피부장벽의 구성 성분이며 피부의 보습을 유지하는 필라그린 및 유리아미노산의 함량이 감소되었다. 폐경기 노화와 병행하여 로얄제리 식이를

공급한 RJ2군의 경우 폐경으로 인해 감소된 피부의 필라그린의 함량이 증가하였으며 천연보습인자 생성에 중요한 효소인 PAD3의 함량 또한 유의적으로 높았다. 반면에 RJ1군의 경우 필라그린의 함량 및 PAD3의 단백질 발현이 증가되지 않았으나 유리아미노산의 함량이 증가되었다. 이는 산지별 로얄제리의 피부 보습 기능에 미치는 영향이 다르게 나타날 수 있음을 의미하며 각 산지별 로얄제리의 지표 물질인 10-HDA(29)의 함량 차이와도 관련이 있는 것으로 여겨진다. 본 실험실의 사전 연구에서 각 산지별 로얄제리의 10-HDA 분석 결과 RJ1군의 로얄제리에서 10-HAD 함량이 RJ2군에 비해 높게 분석되었다(30). 추후 각 산지별 유효성분의 분석과 함께 관련 효능에 대한 연구가 이루어질 필요성이 있으며, RJ1군의 로얄제리 식이 공급이 천연보습인자인 유리아미노산의 전구체의 함량 및 PAD3의 발현을 높이지는 못하였으나 PAD3 이외에 PPAR γ , AP-1, caspase-14 등 관련 효소의 발현 및 활성에 대해 추후 심도 있는 연구가 필요할 것으로 여겨진다. 본 연구에서는 RJ1군의 로얄제리 식이 공급이 피부보습에 직접적으로 관여하는 천연보습인자의 구성 성분인 유리아미노산의 함량을 높여 손상된 피부장벽의 개선에 효과가 있음을 보여 피부 보습 관련 건강기능식품 개발 소재로서의 가능성이 있음을 시사한다.

요 약

본 연구에서는 난소절제를 통하여 폐경기가 유도된 백서 모델에서 생산지가 다른 국내산 로얄제리 식이와 이소플라본을 식이로 공급한 후 피부의 필라그린 및 유리아미노산의 함량과 관련 대사 효소의 발현 변화를 정상대조군인 SHAM군 및 난소절제군인 OVX군과 비교·분석하였다. Profilaggrin, filaggrin 및 total filaggrin의 발현은 SHAM군 > RJ2군 > OVX군 = IF군 > RJ1군 순으로 RJ1군의 profilaggrin, filaggrin의 발현량이 가장 낮게 나타났다. Profilaggrin에서 filaggrin으로, filaggrin에서 유리아미노산으로의 분해하는 과정에 관여하는 여러 효소 중에 PAD3의 발현은 RJ2군에서 가장 높았으나 SHAM군을 비롯하여 OVX군, RJ1군, IF군에서는 군간 유의성이 없었다. 전체 유리아미노산의 함량은 SHAM군에 비해 OVX군에서 다소 감소하였으나 RJ1군 및 IF군에서 SHAM군보다 높게 나타났다. 특히 RJ1군에서 aspartate와 proline의 함량이 SHAM군에 비해 현저히 높아졌다. 결론적으로 RJ1군에서는 filaggrin의 함량 감소가 있었지만 피부 보습 유지기능이 있는 aspartate 및 proline을 비롯한 전체 유리아미노산의 함량이 높아졌다. RJ1군의 로얄제리가 폐경으로 인해 감소되는 피부의 보습인자 중 궁극적으로 피부 보습에 관여하는 천연보습인자의 유리아미노산의 발현을 증가시켜 손상된 피부의 장벽기능 보완에 긍정적 영향을 보였다. RJ2군은 profilaggrin, filaggrin을 포함한 total filaggrin의 함량이 증가되었으나 그 분해산물인 유리

아미노산의 함량은 SHAM군과 유사하였다. RJ2군의 로얄제리가 유리아미노산의 전구단백질의 발현 증가를 야기하나 유리아미노산으로의 분해는 촉진시키지 못하였음을 시사한다. 이는 산지별 로얄제리의 피부 보습 기능에 미치는 영향이 다르게 나타날 수 있음을 의미하며 추후 각 산지별 유효성분의 분석과 함께 관련 효능에 대한 연구가 이루어질 필요성이 있다. 본 연구에서 국내산 로얄제리의 식이 공급이 피부 보습 관련 건강기능식품 개발 소재로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21사업(과제번호: PJ0090662012)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Richard LE. 1989. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiological Review* 69: 1316-1346.
- Elias PM, Ahn SK, Denda M, Brown BE, Crumrine D, Kimutai LK, Kömüves L, Lee SH, Feingold KR. 2002. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation specific markers. *J Invest Dermatol* 119: 1128-1136.
- Prealand RB, Kuechle MK, Lewis SP, Fleckman P, Dale BA. 2001. Regulated expression of human filaggrin keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest. *Exp Cell Res* 270: 199-213.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 122: 1285-1294.
- Tabachnick J, Labadie JH. 1970. Studies on the biochemistry of epidermis. *J Invest Dermatol* 54: 24-31.
- Steven AC, Steinert PM. 1994. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107: 693-700.
- Rawlings AV, Harding CR. 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17(Suppl 1): 43-48.
- Scott IR, Harding CR, Barrett JG. 1982. Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Bochim Biophys Acta* 719: 110-117.
- Koyama J, Horii I, Kawasaki K, Nakayama Y, Morikawa Y, Mitsui T, Kumagai H. 1984. Free amino acids of stratum corneum as a biochemical marker to evaluate dry skin. *J Soc Cosmet Chem* 35: 183-195.
- Watanabe M, Tagami H, Horii I, Takahashi M, Kligman AM. 1991. Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis. *Arch Dermatol* 127: 1689-1692.
- Hara M, Kikuchi K, Watanabe M, Denda M, Koyama J, Nomura J, Horii I, Tagami H. 1993. Senile xerosis: functional, morphological, and biochemical studies. *J Geriatr Dermatol* 1: 111-120.
- Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Nakajima Y, Minegishi T, Ishikawa O, Kurabayashi M. 2004. Effects of aging and postmenopausal hypoestrogenism on skin elasticity and bone mineral density in Japanese women. *Endocr J* 51: 159-164.
- Stevenson S, Nelson LD, Sharpe DT, Thornton MJ. 2008. 17 β -estradiol regulates the secretion of TGF- β by cultured human dermal fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed* 19: 1097-1109.
- Schmidt JB. 2001. Perimenopausal influence on skin, hair and appendages. In *Menopause-Andropause: Hormone replacement therapy through the ages: New cognition and therapy concepts*. 1st ed. Krause&Pachernegg, Mozartgasse, Gablitz, Austria. p 145-151.
- Cho YH. 2005. Skin, nutrition and functional foods. *Food Science and Industry* 38(2): 8-15.
- Krell R. 1996. *Value-added products from beekeeping*. FAO Agricultural Services Bulletin. Rome, Italy. No 124.
- Fujii A, Kobayashi S, Kobayama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, Yamamoto H, Tamura T. 1990. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 53: 331-337.
- Liu JR, Yang YC, Shi LS, Peng CC. 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *J Agric Food Chem* 56: 11447-11452.
- Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. 2003. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* 3: 1313-1324.
- Park HM, Hwang E, Lee KG, Han SM, Cho Y, Kim SY. 2011. Royal jelly protect against UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts via enhancing collagen production. *J Med Food* 14: 899-906.
- Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, Miyata T. 2005. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 101: 215-220.
- Moutasatsou P, Papoutsis Z, Kassi E, Heldring N, Zhao C, Tsiapara A, Melliou E, Chrousos GP, Chinou I, Karshikoff A, Nilsson L, Dahlman-Wright K. 2010. Fatty acids derived from royal jelly are modulators of estrogen receptor functions. *PLoS One* 5: e15594.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. 1994. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 60: 333-340.
- Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC. 1999. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutr* 2: 489-504.
- Byun JS, Rho SN, Park JS, Park HM. 2005. Effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats at different ages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1350-1356.
- Lee JS, Cho YH. 2011. The dietary effect of royal jelly supplementation for the pre and post-menopausal period on sphingolipid contents and the related enzyme expression in the epidermis of rats. *Korean J Apiculture* 26: 285-293.
- Ginger RS, Blachford S, Rowland J, Rowson M, Harding CR. 2005. Filaggrin repeat number polymorphism is associated with a dry skin phenotype. *Arch Dermatol Res* 297: 235-241.
- Nachart R, Mechin MC, Takahara H, Chavanas S, Charveron M, Serre G, Simon M. 2005. Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deamination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol* 124: 384-393.
- Antinelli JF, Zeggane S, Davico R, Rognone C, Faucon JP, Lizzani L. 2003. Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food Chem* 80: 85-89.

30. Cho YH. 2009. Production and characteristic analysis of royal jelly from *Apis mellifera*. Rural Development Administration BioGreen 21 Project (20090801-060-001-001-02-00).
31. Jang SI, Steinert PM, Markova NG. 2006. Activation protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem* 271: 24105-24114.
32. Mao-Qiang M, Fowler AJ, Schmutz M, Lau P, Chang S, Brown BE, Moser AH, Michalik L, Desvergne B, Wahli W, Li M, Metzger D, Chambon PH, Elias PM, Feingold KR. 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 123: 305-312.
33. Prealand RB, Joseph A, Lawrence OT. 2006. Profilaggrin and the fused S100 family of calcium-binding proteins. In *Skin Barrier*. Elias PM, Feingold KR, eds. Taylor & Francis Group, New York, NY, USA. p 111-140.
34. Kanno T, Kawada A, Yamanouchi J, Yosida-Noro C, Yoshiki A, Shiraiwa M, Kusakabe M, Manabe M, Tezuka T, Takahara H. 2000. Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *J Invest Dermatol* 115: 813-823.
35. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Puijn GJ. 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25: 1106-1118.
36. Chavanas S, Adoue V, Mechin MC, Ying S, Dong S, Duplan H, Charveron M, Takahara H, Serre G, Simon M. 2008. Long-range enhancer associated with chromatin looping allows AP-1 regulation of the peptidylarginine deiminase 3 gene in differentiated keratinocyte. *PLoS One* 3: e3408.
37. Kim HA, Lim YJ, Park JH, Cho Y. 2012. Dietary silk protein, sericin, improves epidermal hydration with increased levels of filaggrins and free amino acids in NC/Nga mice. *Br J Nutr* 16: 1-10.
38. Kim JG, Son JH. 1991. Analysis of amino acids in royal jelly. *Korean J Apiculture* 6: 76-80.
39. Matsuka M. 1980. Royal jelly. *Honeybee Sci* 1: 31-41.

(2012년 11월 6일 접수; 2013년 1월 29일 채택)