

미네랄워터의 피부 장벽 보호 효과 연구

이 성 훈[†] · 민 대 진 · 나 용 주 · 심 종 원 · 권 이 경* · 조 준 철 · 이 해 광

(주)아모레퍼시픽 기술연구원 피부과학연구소, 화장품연구소*
(2012년 8월 16일 접수, 2012년 10월 19일 수정, 2012년 11월 24일 채택)

The Protective Effect of Mineral Water Against UVB Irradiation

Sung Hoon Lee[†], Dae Jin Min, Yong Joo Na, Jongwon Shim, Lee Kyoung Kwon*,
Jun-Cheol Cho, and Hae Kwang Lee

Amorepacific Corporation R&D Center, 314-1 Bora-dong, Giheung-gu,
Yongin-si, Gyeonggi-do 446-729, Korea

(Received August 16, 2012; Revised October 19, 2012; Accepted November 24, 2012)

요약: 칼슘, 마그네슘과 같은 양이온은 피부 장벽을 보호하는 기능이 있다고 알려져 있다. 본 연구의 목적은 칼슘, 마그네슘, 망간, 불소로 이루어진 미네랄워터의 피부 장벽 보호 기능을 확인하기 위한 것이다. 피부가 자외선에 노출되게 되면 밀착연접(tight junction, TJ)이 파괴되며, 밀착연접으로 이루어진 피부 장벽도 손상 받게 된다. 미네랄워터가 자외선에 의해 손상된 피부의 장벽기능을 보호할 수 있는지 평가하기 위해 인공피부 모델을 이용한 실험을 진행하였다. 인공피부에 자외선을 조사하고 미네랄워터를 처리하면 피부 장벽 손상을 막아준다. TJ permeability assay를 통하여 자외선 처리 시 손상된 밀착연접 장벽이 미네랄워터 처리에 의해 유지되는 것을 확인하였다. 각질형성세포를 이용한 실험에서 미네랄워터가 밀착연접 구조를 유지시켜 주고, 자외선에 의해 감소된 occludin 단백질의 생성량이 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 미네랄워터는 자외선에 의한 피부 장벽 파괴를 막아주는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Abstract: Bicationic minerals such as calcium and magnesium are known to protect the skin barrier. The principal objective of this study was to evaluate the skin barrier protective effects of mineral water, which is composed of calcium, magnesium, manganese, and fluorine. UVB irradiation induces a destruction of tight junction (TJ) components. The TJ permeability barrier was also disrupted by UVB irradiation. We employed a skin equivalent model to assess the efficacy of mineral water in this regard. Mineral water maintained the structure of the skin equivalents following UVB irradiation. The results of the TJ permeability assay showed that mineral water helped to maintain the TJ permeability barrier after UVB irradiation in skin equivalent model. Mineral water supported the structure of TJ components and restored the occludin protein level in differentiated normal human keratinocytes after UVB irradiation. In conclusion, we found out the protective effect of mineral water against UVB irradiation.

Keywords: mineral water, skin barrier, tight junction, skin equivalent, UVB irradiation

1. 서 론

피부 장벽은 체내에서 지나친 수분 방출을 막고 화

학물질이나 미생물처럼 해로운 물질이 우리 몸 안으로 들어오는 것을 막아준다[1]. 각질형성세포는 분화를 통한 각질화 과정을 통해 피부 장벽을 만든다[2,3]. 피부 장벽 기능은 노화가 진행되거나 외부 요소들에 의해 파괴될 수 있으며, 노화된 피부는 아세톤 또는

[†] 주 저자 (e-mail: imstrong20@amorepacific.com)

테이프 스트리핑(tape stripping)에 의해 쉽게 파괴된다 [4]. 피부 장벽의 손상은 피부 수분량 감소와 주름을 일으킬 수 있다.

밀착연접은 세포연접의 한 종류로 occludin, claudin, tricellulin, junctional adhesion molecule (JAM), zona occluden (ZO) 등으로 구성되어 있다[5]. 밀착연접은 세포막에 포함된 부분과 세포 내 부분으로 나눌 수 있다. Occludin과 claudin은 세포막에 포함된 밀착연접 구성 단백질이다[6,7]. Occludin은 밀착연접에서 처음으로 발견된 막관통 단백질로 4개의 막관통 영역을 가지고 있다[8-10]. Occludin은 밀착연접의 구성 성분일 뿐만 아니라 밀착연접의 기능을 조절하는 것으로 알려졌다 [11]. Occludin과 함께 밀착연접 구성 단백질인 claudin도 4개의 막관통 영역을 가지고 있다[12]. 밀착연접은 세포 간의 연결고리로 이웃한 세포와 세포 사이의 간격을 메워주고 작은 물질들의 이동을 조절하는 기능을 하며[13], 세포와 세포 간의 물질투과를 조절하고 세포의 극성을 유지하는 역할도 담당한다[14]. 최근 연구결과를 통해 밀착연접이 피부 장벽 기능에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다고 보고되었다[15].

Denda 그룹에서는 칼슘과 마그네슘 등의 미네랄 성분이 피부 장벽 보호 기능이 있다는 연구결과를 발표하였다[16]. 테이프 스트리핑으로 쥐의 피부 장벽을 손상시키고 염화마그네슘과 염화칼슘을 도포하였더니 손상된 장벽의 회복 속도가 빨라졌다. 이와 같은 연구결과를 바탕으로 칼슘, 마그네슘, 망간, 불소로 구성된 미네랄워터의 피부 장벽 보호 기능을 확인하였다.

인공피부는 사람의 피부와 유사한 구조를 가지고 있으며, 진피층위에 배양된 각질형성세포가 증식과 분화 과정을 통해 각질층을 형성한다. 인공피부의 이런 특징을 이용하여 미네랄워터의 피부 장벽 보호 효과를 평가하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 미네랄워터의 제조와 처리

미네랄워터는 칼슘($197 \mu\text{g/L}$), 마그네슘($190 \mu\text{g/L}$), 망간($25 \mu\text{g/L}$), 불소($5.5 \mu\text{g/L}$)가 황산염의 형태로 들어 있는 물로, 직접 제조하여 실험에 사용하였다. 미네랄워터는 세포증식효과가 있었던 농도인 10, 20%를 인공피부와 각질형성세포에 처리하였다. 인공피부는 7

일간 공기노출을 마친 뒤, 자외선을 조사하였으며 조사 이후에 미네랄워터가 함유된 배지에서 3일간 배양하였다.

2.2. 세포 배양

신생아 유래 진피 섬유아세포(human neonatal dermal fibroblast, C-004-5C, invitrogen, USA)와 신생아 유래 표피 각질형성세포(human neonatal epidermal keratinocyte, C-001-5C, invitrogen, USA)는 invitrogen에서 구매하여 사용하였다. 섬유아세포는 low serum growth supplement (LSGS, Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin (Lonza, USA)가 함유된 106배지(M106, Gibco, USA)에서 배양하였다. 섬유아세포는 계대배양을 진행하여 실험을 진행하였고 계대수 4 ~ 8 사이의 세포를 실험에 사용하였다. 각질형성세포는 human keratinocyte growth supplement (HKGS, Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin이 함유된 EpiLife 배지(Gibco, USA)에서 배양하였다. 각질형성세포는 계대배양을 진행하여 계대수가 2인 세포를 실험에 사용하였다. 세포들은 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

2.3. 인공피부 제작

인공피부는 진피층위에 각질형성세포를 분주하고 배양하면서 분화를 유도한 후 공기노출 배양을 통해 각질층을 형성한다[17]. 먼저 섬유아세포가 들어있지 않은 진피층과 섬유아세포가 들어있는 진피층을 제작하였다. 섬유아세포가 포함되지 않는 진피층은 type I collagen solution (Sigma, USA)과 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (WelGENE, 한국), Ham's F-12 (Gibco, USA), NaHCO_3 (Sigma, USA)를 섞고 NaOH (Sigma, USA)로 중화시켜 제작하였다. 혼합액을 12-well culture insert (Corning, USA)에 분주하고 1시간 동안 37°C 배양기에 넣고 중합시켰다. 섬유아세포가 포함된 진피층은 섬유아세포가 들어있지 않은 진피층에서 사용된 혼합액에 각 well 당 1.0×10^4 개의 세포가 들어갈 수 있도록 세포를 넣고 섬유아세포가 포함되지 않은 진피층 위에 분주하여 37°C 배양기에 넣고 2시간 동안 중합시켰다. 중합을 마친 진피층에 106배지를 넣어주고 이틀에 한 번씩 배지를 교환하며 일주일간 배양했다. 각 well 당 2.0×10^5 개의 각질형성세포를 분주하고 7일 동안 배양했다. 이렇게 제작한 인

공피부를 7일 동안 공기노출 배양을 진행한 후 실험에 사용하였다. 배양 후 면역형광염색을 위하여 OCT (Optimal cutting temperature, Sakura, Japan) 용액을 이용하여 냉동표본을 제작하였다.

2.4. 자외선 조사

자외선 조사는 365/312 nm UV Irradiation System for Cultures (Bio-sun, Vilber Lourmat, France)를 이용하여 진행하였다. 조사기를 이용하여 UVB 40 mJ/cm²를 인공피부와 각질형성세포에 조사하였으며, 자외선차단 필름으로 가리고 자외선을 조사한 실험군은 sham-irradiation으로 표시하였다. 자외선 조사 후에는 3일 동안 매일 배지를 교환하면서 물질 처리를 진행하였다.

2.5. 면역형광염색법(Immunofluorescence)

각질형성세포는 각 well 당 3.0×10^4 개로 μ -Slide 8-well 챔버(ibidi, Germany)에 분주하였으며, 1.2 mM CaCl₂를 처리하여 분화를 유도하였다. 자외선을 조사한 뒤 미네랄워터가 함유된 배지에서 3일간 배양하였다. 각질형성세포는 4% 포름알데하이드 수용액(EMS, USA)을 이용하여 30분 동안 고정하였으며, 고정이 끝난 후 세척액(0.05% Tween-20 in phosphate buffered saline, PBS)으로 두 번 세척하여 포름알데하이드를 완전히 제거하였다. 고정된 세포는 permeabilization buffer (0.1% Triton X-100 in PBS)를 10분 동안 처리하여 세포막의 투과성을 확보하고, blocking solution (1% bovine serum albumin, BSA in PBS)을 30분 동안 처리하여 항체의 비특이적 결합을 막았다. 이와 같은 방법으로 처리된 세포 내의 occludin, claudin-1 단백질은 anti-occludin 항체(invitrogen, USA), anti-claudin-1 항체(abcam, USA)를 이용하여 표지하였으며, 표지된 단백질은 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (invitrogen, USA) 항체와 Texas Red-X goat anti-mouse IgG (invitrogen, USA) 항체와 반응시킨 후, 공초점 현미경(LSM 510, Carl-Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

OCT 용액을 이용하여 냉동표본을 제작한 인공피부는 10 μ m 두께로 동결절편을 제작한 뒤에 면역형광염색을 진행하였다. 동결절편을 하루 동안 실온에서 건조시킨 후 PBS로 OCT 용액을 세척하여 제거했다. Blocking solution (1% BSA in PBS)을 30분 동안 처리하여 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 인공피부

동결절편에서 필라그린 단백질을 관찰하기 위해 anti-filaggrin 항체(abcam, USA)를 이용하여 표지하였으며 표지된 단백질은 Texas Red-X goat anti-mouse IgG (invitrogen, USA) 항체와 반응시킨 후, 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

2.6. Tight Junction (TJ) Permeability Assay

TJ permeability assay는 세포표면의 biotinylation 방법을 이용하여 밀착연접의 기능을 관찰하는 방법이다[18]. Sulfo-NHS-LC-Biotin (tracer, Pierce, USA)을 2 μ g/mL 농도로 1.2 mM CaCl₂ 함유된 PBS에 녹인 후 인공피부에 30분 동안 처리하였다. OCT 용액을 이용하여 냉동표본을 제작한 인공피부는 10 μ m 두께로 동결절편을 제작한 뒤에 염색을 진행하였다. 하루 동안 실온에서 건조시킨 후 PBS로 OCT 용액을 세척하여 제거했다. Blocking solution (1% BSA in PBS)을 1시간 동안 처리하여 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. Streptavidin Texas Red (Calbiochem, Germany)를 1시간 동안 처리하여 단백질을 표지하고 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

2.7. Western Blot

신생아 유래 표피 각질형성세포를 각 well 당 25×10^4 개로 6 well plate (Corning, USA)에 분주하고 24시간 배양한 뒤 1.2 mM CaCl₂ 함유된 EpiLife 배지에서 2일 동안 배양하였다. 자외선 조사를 마치고 미네랄워터가 함유된 배지에서 3일간 배양하였다. 배양을 마친 후 세포를 mammalian cell lysis buffer (Sigma, USA)로 용출한 후에 BCA (bicinchoninic acid) 정량 방법으로 단백질량을 측정하였다. 4 ~ 12% NuPAGE Bis-Tris gels (invitrogen, USA)에 동량의 단백질을 넣고 전기영동으로 전개시킨 뒤 nitrocellulose membrane (invitrogen, USA)으로 이동시켰다. Membrane를 5% 탈지우유를 함유한 TBST (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) buffer로 1시간 동안 반응시킨 뒤, occludin (invitrogen, USA), claudin-1 (abcam, USA), β -actin (Santa Cruz, USA) 1차 항체를 반응시켰다. 2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, USA)와 donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz, USA)를 사용하여 1시간 반응시켰다. TBST buffer로 세척 후에 immunocruze (Santa Cruz, USA)를 사용하여 반응시키고

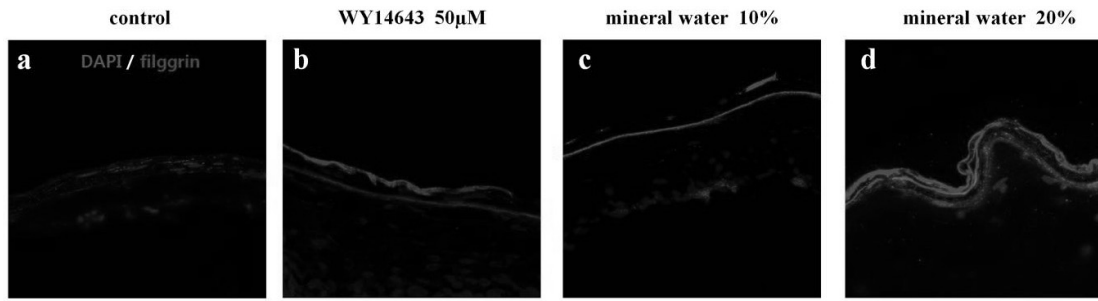


Figure 1. Mineral water increased filaggrin expression. After 7 d of air exposure, skin equivalents were incubated with mineral water and WY14643 for 3 d. Immunofluorescence was performed to examine the filaggrin expression. (b) WY14643 and (c), (d) mineral water increased the filaggrin expression.

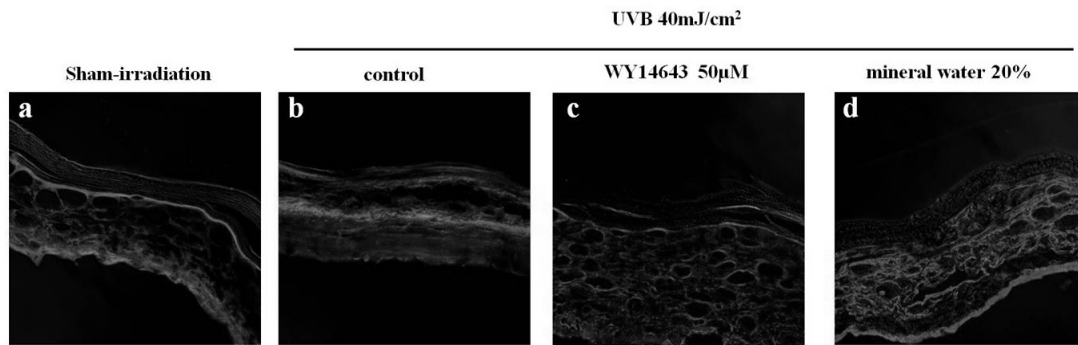


Figure 2. Mineral water maintained the permeability barrier. The skin equivalents were irradiated with a single UVB dose of 40 mJ/cm² and harvested 3 d after exposure. In the UVB exposed skin equivalents, the tracer was able to pass through the stratum corneum (b). Mineral water maintained the permeability barrier and block the diffusion of tracer (d). Data are representative images of three independent experiments.

LAS 3000 image analyzer (Fujifilm, Japan)를 이용하여 탐지하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미네랄워터에 의한 표피 분화 촉진

미네랄워터의 피부 장벽과 관련된 기능을 알아보기 위해 인공피부에 미네랄워터를 처리하고 면역형광염색법을 진행하였다. 표피의 각질형성세포는 일련의 분화과정 및 각질화과정을 거쳐 각질층을 형성하게 된다. 각질층은 물리적, 화학적으로 물질의 이동을 통제하여 실제적인 피부 장벽의 역할을 수행하게 된다. 필라그린은 분화하는 각질형성세포가 생성하는 단백질로, 피부 장벽의 생성과 유지에 중요한 역할을 하며, 각질형성세포의 분화와 피부 장벽 기능을 관찰하는 주요 마커로 사용되고 있다[19,20]. 본 실험에서는 이러한 점에 착안하여, 인공피부에 미네랄워터를 처리하

고 면역형광염색법으로 필라그린의 변화를 관찰하였다. 또한, 실험의 대조군으로 WY14643 (Sigma, USA)을 사용하였다. WY14643은 PPAR α 활성물질로 지질 합성 증가, 피부 장벽 손상 회복 촉진 등의 기능이 보고되어있다[21-24]. 실험결과 미네랄워터 처리에 의해 표피 각질층에서 필라그린의 증가가 관찰되었으며, 필라그린 생성량은 미네랄워터의 처리농도에 따라 증가하는 농도 의존적인 결과를 보여주었다(Figure 1). 이를 통해 미네랄워터가 각질형성세포의 분화를 촉진하며 피부 장벽 생성에 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

3.2. 미네랄워터에 의한 피부 장벽 손상 회복 촉진

최근 연구결과들은 밀착연접이 사람의 표피에 존재하며 세포간 투과, 장벽기능을 담당하고 있다고 보고하고 있다[1,13,25,26]. Yuki 그룹과 Kirschner 그룹에서는 이를 바탕으로 사람 피부와 인공피부에서 장벽

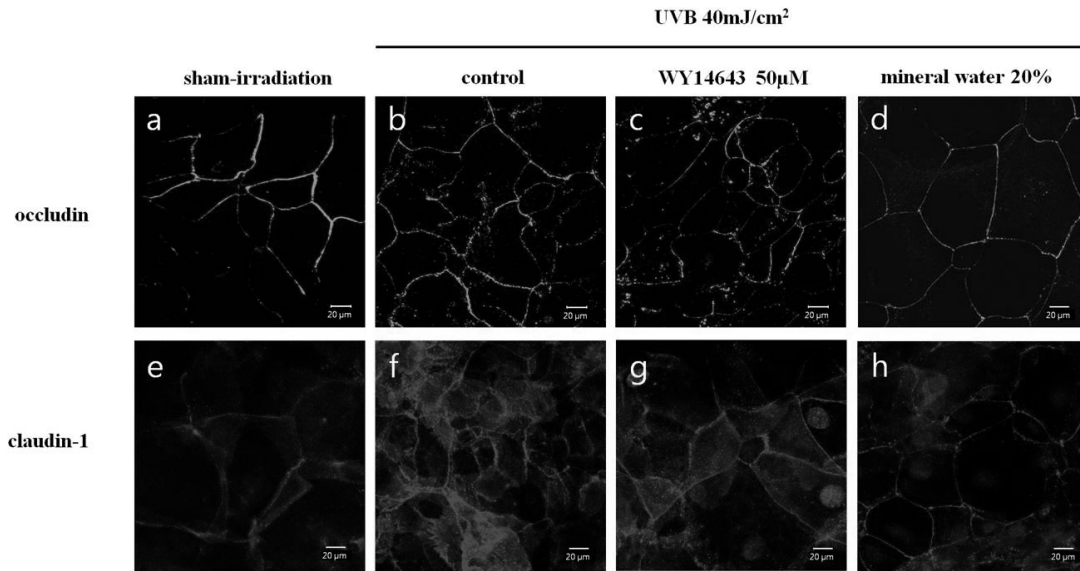


Figure 3. Mineral water maintained the organization of tight junction proteins. Human neonatal keratinocytes were incubated with 1.2 mM CaCl₂ for 2 d. The keratinocytes were incubated with mineral water for 3 d after 40 mJ/cm² UVB irradiation. In sham-irradiated keratinocytes, a continuous network of occludin, claudin-1 were found along the plasma membrane (a, e). Keratinocytes irradiated with 40 mJ/cm² UVB exhibited dispersed, fragmented occludin and claudin-1 expression (b, f). Mineral water-treated keratinocytes maintained continuous network of occludin and claudin-1 (d, h). Data are representative images of three independent experiments.

기능을 평가하기 위한 TJ permeability assay를 진행하였다[13,18]. TJ permeability assay는 인공피부를 배양하는 배지에 tracer를 처리하여 이동경로를 관찰하는 것으로, tracer는 인공피부 진피층에서 표피층으로 이동하며 정상 피부에서는 표피의 장벽기능에 의해 각질층 아래에서 이동이 멈추게 된다. 본 실험에서 UVB 40 mJ/cm²에 노출된 인공피부에서는 장벽기능 손상이 일어나며, tracer가 각질층 끝까지 이동하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2b). 이와는 대조적으로 자외선을 조사하고 미네랄워터를 3일 동안 처리한 인공피부에서는 자외선을 조사하지 않은 인공피부와 유사하게 tracer의 이동이 각질층 아래에서 멈추는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2d). UVB에 의해 손상된 피부 장벽이 미네랄워터 처리에 의해 회복되는 것을 알 수 있다.

3.3. 미네랄워터의 피부 장벽 보호 기전

미네랄워터의 피부 장벽 보호 기전을 확인하기 위해 각질형성세포를 이용하여 실험을 진행하였다. Yuki 그룹에서 실험한 결과 각질형성세포는 칼슘처리에 의해 48시간 뒤 밀착연접이 형성된다[27]. 각질형성세포를

1.2 mM CaCl₂ 함유 EpiLife 배지에서 48시간 배양한 뒤 UVB 40 mJ/cm²를 조사하고 미네랄워터를 3일 동안 처리하였다. 자외선에 노출된 각질형성세포에서는 occludin과 claudin-1 구조가 분절되어 있었다(Figure 3 b, f). 미네랄워터를 처리한 각질형성세포에서는 occludin과 claudin-1 구조가 손상되지 않고 연결되어 있는 구조가 관찰되었다(Figure 3 d, h). 위 결과를 통해 미네랄워터가 자외선에 의해서 손상되는 밀착연접 구성 단백질의 구조를 유지시켜 주는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 미네랄워터에 의한 밀착연접 구성 단백질의 양적 변화를 알아보기 위해 각질형성세포를 이용하여 Western blot을 진행하였다. 자외선을 조사한 각질형성세포는 밀착연접 구성 단백질인 occludin과 claudin-1 단백질량이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4). 자외선 조사 후에 미네랄워터를 처리하면 감소된 occludin 단백질 생성량이 증가된 것을 볼 수 있었다(Figure 4). 위 실험을 통해 미네랄워터는 자외선에 의해 손상 받은 밀착연접의 구조를 회복시킬 뿐만 아니라 단백질 생성량도 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

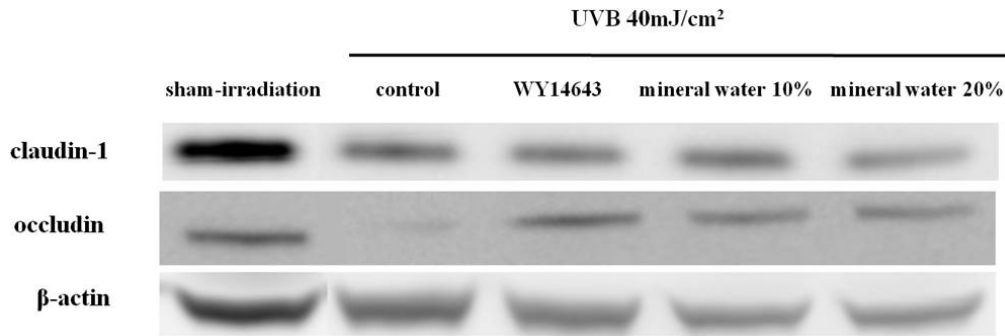


Figure 4. The protein level of occludin was restored by the treatment of mineral water in keratinocytes. After Ca²⁺ induced differentiation, keratinocytes were exposed to 40 mJ/cm² UVB irradiation. The keratinocytes were incubated with mineral water for 3d after UVB irradiation. UVB irradiation decreased the protein level of TJ components. Among TJ components, the protein level of occludin was restored by the treatment of mineral water.

4. 결 론

본 연구는 칼슘, 마그네슘, 망간, 불소가 함유된 미네랄워터의 피부 장벽 보호 기능을 확인하기 위해 진행되었다. 피부에서 분화된 표피의 형성은 정상 피부 장벽 발달에 중요한 기능을 담당하고 있다. 피부 장벽 기능을 세포수준에서 평가하는 어려움을 극복하기 위해 인공피부를 도입하여 피부 장벽 보호 기능을 평가하였다. 인공피부는 섬유아세포가 있는 진피층 부분과 각질형성세포가 있는 표피층으로 구성되어 있다. 인공피부를 공기에 노출시켜 배양하면 각질형성세포는 분화하여 각질층을 형성한다. 이런 인공피부의 특성으로 인하여 피부 장벽 기능과 관련된 실험은 인공피부에서 평가하기에 적당하다.

최근에 밀착연접이 장벽 기능에 중요한 기능을 담당하고 있다는 보고가 이어지고 있다. Furuse 그룹은 claudin-1-deficient 쥐 모델을 이용한 실험에서 밀착연접이 장벽기능에 있어서 중요하다고 발표했다[15]. Kurasawa 그룹에서는 밀착연접이 표피 상층부에서 칼슘이 밖으로 빠져나가지 못하도록 막아주어 장벽 기능을 유지할 수 있다고 보고하였다[28]. 밀착연접이 칼슘 농도 구배를 유지시켜 주고 이로 인해 밀착연접의 구조도 유지되는 것으로 추측된다.

이번 실험을 통해 인공피부에 자외선을 조사하면 밀착연접의 구조가 손상되어 장벽 기능에 이상이 생기는 것을 관찰할 수 있었다. TJ permeability assay를 진행한 결과 자외선에 의해 피부 장벽 기능에 손상이 일

어나고 이로 인해 tracer가 각질층까지 이동하는 것을 볼 수 있었다. 미네랄워터는 밀착연접의 구조를 회복시키고 tracer의 이동을 막아주었다. Western blot으로 확인한 결과 자외선 조사에 의해 밀착연접 구성 단백질량이 감소하는데, 미네랄워터 처리 시 occludin 단백질량이 자외선 조사군에 비해 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이를 통해 미네랄워터가 자외선에 의해 손상된 피부 장벽을 보호하는 기능이 있음을 확인할 수 있었다.

이번 실험은 인공피부를 배양하는 배지에 미네랄워터를 처리하여 효과를 확인하였다. 배지에 처리한 미네랄워터에 의해 삼투압의 변화가 예상되지만 이번 실험에서는 삼투압의 변화가 실험결과에 미치는 영향에 대해서는 확인하지 못했다. 삼투압의 변화가 실험결과에 미치는 영향에 대한 평가와 함께 양이온들을 배지에 넣고 이를 비교하는 실험도 필요할 것으로 생각된다. 이와 함께 화장품 원료로서의 가능성을 확인하기 위해 미네랄워터를 인공피부에 직접 도포하여 피부 장벽 보호 기능을 확인하는 실험이 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. J. M. Brandner, S. Kief, C. Grund, M. Rendl, P. Houdek, C. Kuhn, E. E. Tschachler, W. W. Franke, and I. Moll, Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.*, **81**(5), 253 (2002).

2. E. Fuchs, Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell. Biol.*, **111**, 2807 (1990).
3. R. L. Eckert, J. F. Crish, and N. A. Robinson, The epidermal keratinocytes as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol. Rev.*, **77**, 397 (1997).
4. R. Ghadially, B. E. Brown, S. M. Sequeira-Martin, K. R. Feingold, and P. M. Elias, The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest.*, **95**(5), 2281 (1995).
5. Saima Ajjaz, S. Maria, Balda, and Karl Matter, Tight junctions: molecular architecture and function. *Int. Rev. Cytol.*, **248**, 261 (2006).
6. G. Bazzoni and E. Dejana, Pores in the sieve and channels in the wall: control of paracellular permeability by junctional proteins in endothelial cells. *Microcirculation*, **8**(3), 143 (2001).
7. B. R. Stevenson and B. H. Keon, The tight junction: morphology to molecules. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **14**, 89 (1998).
8. M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita, Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell. Biol.*, **123**, 1777 (1993).
9. Y. Ando-Akatsuka, M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura, M. Furuse, and S. Tsukita, Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell. Biol.*, **133**(1), 43 (1996).
10. K. Fujimoto, Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell. Sci.*, **108**(11), 3443 (1995).
11. R. Rao, Occludin Phosphorylation in Regulation of Epithelial Tight Junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1165**(1), 62 (2009).
12. M. Furuse, H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita, A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell. Biol.*, **143**(2), 391 (1998).
13. T. Yuki, A. Hachiya, A. Kusaka, P. Sriwiriyant, M. O. Visscher, K. Morita, M. Muto, Y. Miyachi, Y. Sugiyama, and S. Inoue, Characterization of tight junctions and their disruption by UVB in human epidermis and cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **131**(3), 744 (2011).
14. S. Tsukita, M. Furuse, and M. Itoh, Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**(4), 285 (2001).
15. M. Furuse, M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita, Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell. Biol.*, **156**(6), 1099 (2002).
16. M. Denda, C. Katagiri, T. Hirao, N. Maruyama, and M. Takahashi, Some magnesium salts and a mixture of magnesium and calcium salts accelerate skin barrier recovery. *Arch. Dermatol. Res.*, **291**(10), 560 (1999).
17. P. Gangatirkar, S. Paquet-Fifield, A. Li, R. Rossi, and P. Kaur, Establishment of 3D organotypic cultures using human neonatal epidermal cells. *Nat. Protoc.*, **2**(1), 178 (2007).
18. N. Kirschner, P. Houdek, M. Fromm, I. Moll, and J.M. Brandner, Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur. J. Cell. Biol.*, **89**(11), 839 (2010).
19. 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).
20. J. A. McGrath and J. Uitto. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends. Mol. Med.*, **14**(1), 20 (2008).
21. L. G. Komuves, K. Hanley, A. M. Lefebvre, M. Q. Man, D. C. Ng, D. D. Bikle, M. L. Williams, P. M. Elias, J. Auwerx, and K. R. Feingold, Stimulation of PPARalpha promotes epidermal keratinocyte differentiation *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **115**(3), 353 (2000).

22. L. G. Komuves, M. Schmuth, A. J. Fowler, P. M. Elias, K. Hanley, M. Q. Man, A. H. Moser, J. M. Lobaccaro, M. L. Williams, D. J. Mangelsdorf, and K. R. Feingold, Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **118**(1), 25 (2002).
23. M. Mao-Qiang, A. J. Fowler, M. Schmuth, P. Lau, S. Chang, B. E. Brown, A. H. Moser, L. Michalik, B. Desvergne, W. Wahli, M. Li, D. Metzger, P. H. Chambon, P. M. Elias, and K. R. Feingold, Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **123**(2), 305 (2004).
24. M. Schmuth, C. M. Haqq, W. J. Cairns, J. C. Holder, S. Dorsam, S. Chang, P. Lau, A. J. Fowler, G. Chuang, A. H. Moser, B. E. Brown, M. Mao-Qiang, Y. Uchida, K. Schoonjans, J. Auwerx, P. Chambon, T. M. Willson, P. M. Elias, and K. R. Feingold, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **122**(4), 971 (2004).
25. L. Langbein, C. Grund, C. Kuhn, S. Praetzel, J. Kartenbeck, J. M. Brandner, I. Moll, and W. W. Franke, Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell. Biol.*, **81**(8), 419 (2002).
26. H. Schluter, R. Wepf, I. Moll, and W. W. Franke, Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *Eur. J. Cell. Biol.*, **83**(11), 655 (2004).
27. T. Yuki, A. Haratake, H. Koishikawa, K. Morita, Y. Miyachi, and S. Inoue, Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp. Dermatol.*, **16**(4), 324 (2007).
28. M. Kurasawa, T. Maeda, A. Oba, T. Yamamoto, and H. Sasaki, Tight junction regulates epidermal calcium ion gradient and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**(4), 506 (2011).