

자외선 조사와 병행된 녹차 식이 공급이 무모생쥐의 표피 산도 관련 인자 함량 및 젖산 탈수소 효소의 단백질 발현과 활성에 미치는 영향*

이보민¹ · 김종례¹ · 황재성² · 조윤희^{1†}

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과,¹ 경희대학교 생명자연과학연구원²

Dietary effect of green tea extract on epidermal levels of skin pH related factors, lactate dehydrogenase protein expression and activity in UV-irradiated hairless mice*

Lee, Bomin¹ · Kim, Jongyei¹ · Hwang, Jaesung² · Cho, Yunhi^{1†}

¹Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

²Institute of Life Sciences & Resources, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

ABSTRACT

Purpose: Skin pH, an indicator of skin health, is maintained by various organic factors, which include lactate, free amino acid (FAA), and free fatty acid (FFA). As skin ages or with illness, skin pH becomes less acidic, and functional food has been developed to maintain the acidic pH of skin. In this study, we determined the dietary effect of green tea extract (GTE) on skin pH of photo-aged mice, as measured by epidermal levels of lactate, FAA, and FFA. The protein expression and activity of lactate dehydrogenase (LDH), an enzyme of pyruvate reduction for lactate generation, was further determined. **Methods:** Albino hairless mice were fed a control diet (group UV+) or a diet with 1% GTE (group GTE) in parallel with UV irradiation for 10 weeks. A normal control group was fed a control diet without UV irradiation for 10 weeks (group UV-). **Results:** Skin pH was higher (less acidic) in group UV+ than in group UV-. In parallel, epidermal levels of lactate and FFA, as well as of LDH protein expression and activity, were reduced in group UV+. Dietary supplementation of GTE (group GTE) reduced skin pH to similar to the level of group UV-, and inversely increased epidermal levels of lactate, LDH protein expression and activity, but not of FFA. Although epidermal levels of FAA were similar in groups UV- and UV+, it was increased in group GTE to a level higher than in group UV-. In further analysis of major FFA, epidermal levels of palmitic acid [16:0], oleic acid [18:1(n-9)], and linoleic acid [18:2(n-6)], but not of stearic acid [18:0] in group GTE were similar to or lower than those in group UV+. **Conclusion:** Dietary GTE normalized skin pH with increased levels of lactate and FAA, as well as with increased protein expression and activity of LDH in the epidermis of UVB irradiated hairless mice.

KEY WORDS: green tea extract, skin pH related factors, lactate dehydrogenase, ultraviolet irradiation, hairless mice

서 론

피부 건강을 나타내는 주요 지표인 피부 산도(pH)는 피부의 최외층인 표피에서 생성되는 젖산(lactate), 유리아미노산(free amino acid, FAA), 유리지방산(free fatty acid, FFA) 등 여러 인자들의 전체 함량에 의해 결정된다.¹⁻³ 이들 인자 중 젖산은 피부 pH의 주요 결정 인자로, 젖산 생

성 효소인 젖산 탈수소 효소(Lactate dehydrogenase, LDH)는 표피에서 호기적인 상태에서도 강한 활성을 갖는 것으로 알려져 있다.⁴ 표피의 유리아미노산은 약산성 아미노산인 glutamate 및 histidine이 40% 이상을 차지하는 반면 methionine, phenylalanine, valine, isoleucine, leucine 및 cysteine은 거의 존재하지 않는다.¹ 표피에서 glutamate 및 histidine는 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)과

Received: December 17, 2015 / Revised: March 23, 2016 / Accepted: March 25, 2016

*This study was supported by a grant of the Korean Health Technology R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grant No. HN13C0076).

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-31-201-3817, e-mail: choyunhi@khu.ac.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

urocanic acid (UCA)로 대사되기도 한다.¹ 또한 표피의 여러 유리지방산에서 초래되는 약산성이 피부 산도 유지에 기여하는 것으로 알려져 있다. 건강한 피부는 pH 4-6 범위의 약산성 pH를 유지하는 반면,^{1,3} 아토피 피부염, 여드름 등의 피부 질환 발병 시 피부 pH 증가와 함께 약산성의 환경에서 활성을 나타내는 피부 장벽의 주요 지질인 세라마이드 생성 관련 효소인 glucocerebrosidase 및 sphingomyelinase의 활성이 저하된다.^{3,5,6} 또한 노화가 진행되는 피부에서는 피부 pH 증가와 함께 히알루론산, 콜라겐 등의 보습 및 주름 생체지표 활성이 저하된다.⁷

피부 노화는 자연노화와 광노화로 나뉘어 지는데 과도한 자외선 노출에 의해 초래되는 광노화는 피부의 주름 형성, 건조, 표피 과증식 뿐 아니라 피부 pH의 증가를 야기한다.⁸⁻¹¹ 자연 노화가 시간 경과에 의해 일어나는 불가피한 현상인 반면, 광노화는 자외선의 노출 정도를 방지함에 의해 예방이 가능할 뿐 아니라, 광노화의 예방 및 개선을 위해 화장품뿐 아니라 다양한 식이 소재가 개발되고 있다. 국내에서는 녹차, 소나무 껍질 추출물, 홍삼, 사상자, 산수유 복합추출물 등의 다양한 소재들이 광노화 보호를 위한 건강기능식품으로 개발되고 있으며 이 중 녹차의 피부 노화 억제 효능은 국내외적으로 활발한 연구가 이루어지고 있다.¹²⁻¹⁴ 선별된 차 잎을 고온에서 가열하여 산화와 발효를 억제한 녹차는 카테킨의 일종인 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 주요 활성 물질로 알려져 있으며, 콜라겐 생성 증가, 자외선에 의한 표피 과증식 방지 등의 피부 노화 개선 효능이 여러 연구에서 보고되었으나,¹⁴⁻¹⁶ 피부 pH 개선 효능 및 pH 관련 여러 인자들 함량 변화에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 무모생쥐에 자외선 조사와 병행하여 녹차를 식이 공급하고, 녹차 섭취가 표피의 pH를 비롯하여 젖산, 유리아미노산, 유리지방산의 함량 및 LDH의 단백질 발현과 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구방법

실험 동물

생후 6주령 암컷 무모생쥐 (Albino hairless mouse, SKH-1)를 (주)오리엔트 바이오에서 공급받아 1주 동안 일반 고형배합 사료로 적응시켰다. 실험군은 체중에 따라 난괴법을 이용해 자외선 조사를 하지 않은 정상 대조군 (UV-군, n = 5), 자외선 조사군 (UV+군, n = 5), 자외선 조사와 함께 녹차 추출물 (green tea extract: GTE)을 전체 식이의 1% 수준에서 식이 공급한 실험군 (GTE군, n = 5)으로 나누었다. 사육 기간 중 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고

온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 로 최적 환경 조건을 유지시킨 실험실에서 12 hr/day 명암 주기로 사육하였다. 본 동물 실험 프로토콜은 경기과학기술진흥원에서 운영하는 동물윤리위원회에서 승인을 득하였다 (승인번호: 2013-12-0006).

자외선 조사

UVB lamp (약 30% UVA 함유: TL 20W/12RS SLV, wave length 290 to 390 nm, Phillips, Netherlands)를 사용하여 무모생쥐의 등 부위 (등 중앙 기준, $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$)를 조사하였고 자외선 조사량은 UV meter (VARIOCONTROL, Waldmann ver. 2.03, Germany)로 측정하였다.¹⁷ 식이 공급 개시일로부터 1주일에 3회 조사하였고 1주차에는 1 minimal erythema dose (MED; $75 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, 15분)로 시작하여 2주차 2 MED ($150 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, 30분), 3주차 3 MED ($225 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, 45분), 4주차부터 10주차까지는 4 MED ($250 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, 50분)로 조사하였다.

실험 식이

UV- 및 UV+군은 GTE가 함유되지 않은 일반식이 (AIN-93G 식이)를 공급하였고, GTE군은 전체 식이 무게의 1.0%에 상응하는 GTE를 식이에 첨가하여 10주간 공급하였다.¹⁷ 전체식이에서 GTE 추출물의 1.0% 첨가 수준은 섭취 후 독성 및 산화 촉진 등의 부작용 없이^{18,19} 피부 산도 개선의 효능이 나타난 예비 연구에 기반하여 결정하였다. GTE 시료 첨가에 의해 발생하는 건분 식이 무게 차이는 옥수수 전분을 감하여 조정하였다. GTE 시료 (카테킨 50%, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 28% 함유)는 (주)아모레퍼시픽 (South Korea)에서 공급받았다. 각 실험군의 식이 조성은 Table 1과 같다.

피부 pH 측정

실험 동물의 피부 pH는 pH meter (PH905, Courage-Khazaka, Germany)를 이용하여 희생 전날 측정하였다. 측정시 실험 동물 등 부위의 중앙 부분을 가볍게 눌러 총 5회 측정하여 평균값을 기록하였다.

동물의 희생과 표피 분리

10주간의 실험식이 공급 후 경추 탈골 방법으로 희생시키고 자외선 조사가 이루어진 등 부위 (등 중앙 기준, $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$)의 피부 조직을 취하였다. 피부 조직은 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco BRL, USA)과 Dispase II ($2.4 \text{ unit}/\text{mL}$, Roche, Germany)가 1:1 (v/v)로 혼합된 용액에 담가 4°C 에서 16시간 동안 처리한 후 표피

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

| Ingredients | Experimental group ¹⁾ | | |
|---------------------------|----------------------------------|-----|-------------------|
| | UV- | UV+ | GTE ²⁾ |
| Corn starch | 372 | 372 | 362 |
| Sucrose | 200 | 200 | 200 |
| Cellulose | 50 | 50 | 50 |
| Corn oil | 100 | 100 | 100 |
| Vitamin mix ³⁾ | 10 | 10 | 10 |
| Mineral mix ⁴⁾ | 35 | 35 | 35 |
| L-Cystine | 3 | 3 | 3 |
| Casein ⁵⁾ | 230 | 230 | 230 |
| GTE | - | - | 10 |
| UV irradiation | - | + | + |

1) Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with (group UV+) UV irradiation for 10 weeks; Group GTE, hairless mice fed a diet containing 1.0% green tea extract (GTE) in parallel with UV irradiation for 10 weeks 2) GTE: green tea extract 3) AIN-93 vitamin mix #310025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA) 4) AIN-93G salt mix #210025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA) 5) Casein (nitrogen x 6.25), 870 g/kg

를 분리하였다.¹⁷⁾

표피 젖산 함량 측정

표피에 증류수를 가하고 polytron (P-8340, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용해 4°C에서 20분간 초음파 분쇄하였다. 분쇄한 조직을 12,000g, 4°C에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 젖산 함량은 단기간에 대량 분석이 가능한 EnzyChrom™ L-lactate assay kit (ECLC-100, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)을 사용하여 측정하였다.²⁰⁾ 96 well plate에 LDH 효소와 함께 NAD가 함유된 buffer 및 표피 시료를 1 µl/well의 농도로 분주하고 30분간 상온에서 방치한 후, LDH에 의해 젖산이 피루브산으로 전환시 생성되는 NADH에 비례하여 환원되는 formazan의 양을 595 nm에서 측정하여 간접적으로 젖산의 함량을 파악하였다. 표피 시료의 단백질 정량과 함께 젖산 함량을 nmol/mg protein으로 나타내었다.

표피 유리아미노산 총 함량 측정

표피 조직을 15% trichloroacetic acid (TCA) 용액과 함께 polytron으로 분쇄하고 4°C에서 16시간 동안 방치하였다.²¹⁾ 산 침전 단백질을 제거하기 위해 12,000 g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하여 0.45 µm filter (Millipore, USA)로 여과하였다. 총 유리아미노산의 농도는 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였으며, 분석 조건은 Pico Tag column (3.9 × 300 mm,

4 µm, WAT088131, Waters, USA)에서 Acetonitrile:Methanol: Water (45:45:10, v/v/v) 용액을 mobile phase로 유속 1.0 ml/min을 유지하면서 254 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표피 시료의 무게 값과 함께 총 유리아미노산 함량을 µg/g wet weight로 나타내었다.

표피 유리지방산 함량 측정

표피에 증류수를 가하고 polytron을 이용하여 분쇄하고 12,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리 후 상층액의 일부를 취하여 단백질 정량을 하였다. 남은 용액에 folch 용액 (CHCl₃:MeOH=2:1, v/v)을 가하여 지질을 추출하고 질소 가스로 건조시킨 후 100 µl의 Folch 용액에 다시 녹였다. HPTLC (high performance thin-layered chromatography: silica gel, 60Å, 200 µm thickness, Whatman, USA)에 점적하고 전개액 (hexane:diethyl ether:acetic acid = 14:16:0.2, v/v/v)을 이용하여 유리지방산을 분획하였다.^{22,23)} 모든 샘플은 automatic multiple development (AMD) apparatus (Linomat 5, CAMAG, Muttentz, Switzerland)를 이용하여 분석하였고, 분획된 유리지방산의 함량은 cupric acetate-phosphoric acid 처리 및 160°C에서 15분간 가열 후 해당 표준물질과 함께 TLC III scanner (DigiStore2, CAMAG, Muttentz, Switzerland)를 이용하여 정량하였다. 표피 시료의 단백질 정량과 함께 유리지방산의 총 함량을 mg/µg protein으로 나타내었다.

표피의 주요 개별 유리지방산 함량 측정을 위해, HPTLC에 의해 분리된 총 유리지방산 분획을 박층으로부터 긁어낸 후 Folch 용액으로 추출하고 methyl C17:0 (internal standard) 첨가 후 6% HCl를 함유한 methanol을 이용하여 지방산을 methylation하였다.²⁴⁾ Fatty acid methyl ester는 320 Fused Silica Capillary column (30 cm × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Supelco, USA)을 장착한 gas chromatograph (GC) (GC-17A, Shimadzu, Japan)에 주입하여 각 유리지방산을 분석하고, 표피 시료의 단백질 정량과 함께 mg/µg protein으로 나타내었다. GC 분석 조건은 250°C injector port와 260°C detector (flameionization detector) port에서 oven 온도를 190°C로 5분간 유지시킨 후 4°C/min 비율로 상승시켜 240°C에서 10분간 유지시켰다. 이때 Helium gas (carrier gas)는 3 ml/min의 유량으로 흘러주었고 split ratio는 20:1의 조건에서 1 µl의 시료를 주입하였다.

표피 LDH 단백질 발현 측정

표피에 0.5% nonidet P-40 (TE-NP40 buffer extract), 10 mM EDTA, protease inhibitor, 40 mM Tris-HCL (pH 7.5)

가 함유된 Tris-EDTA Buffer (P-8340, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 가하고 polytron을 이용하여 분쇄하였다.²⁵ 분쇄한 표피 조직을 12,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리 후 얻어진 상층액의 일부를 취하여 단백질 정량을 하였다. 준비된 단백질 시료 (20 µg/well)를 8% SDS/PAGE gel에 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. Membrane을 1차 항체 (anti-rabbit LDH antibody: sc-33781, Santa Cruz Biotech, Inc., USA)와 함께 4°C에서 17시간 동안 반응시키고 이어서 2차 항체 (anti-rabbit IgG-HRP, Cell Signaling Technology Inc., USA)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 ECL hyperfilm을 이용하여 발색하였다.²⁵ 해당 band의 intensity는 imaging densitometer (Labwork version 4,6 UVP., CA, USA)를 사용해 정량하였다.

표피 LDH 활성 측정

표피 LDH 활성은 LDH Activity Colorimetric Assay Kit (K726-500, BioVision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.²⁶ 표피에 LDH assay buffer를 가하고 polytron을 이용해 분쇄한 후 12,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 96 well plate에 젖산과 NAD를 함유한 buffer 및 표피 시료를 1 µl/well씩 분주하고 30분간 상온에서 방치한 후, 생성되는 NADH의 양을 450 nm에서 측정하여 간접적으로 LDH 활성을 파악하였다. 표피 시료의 단백질 정량과 함께 LDH 활성을 mU/mg protein으로 나타내었다.

통계분석

모든 실험의 결과는 SPSS 18.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 처리 하였다. 결과는 각 실험군 별 평균 (mean) 및 표준오차 (standard error mean, SEM)로 나타냈으며, 각 군간의 비교는 one-way ANOVA로 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다. 또한 자외선 조사군 (UV+군)을 기준으로 GTE군의 유리아미노산 총 함량의 유의성을 $p < 0.05$ (*) 수준에서 independent student's t-test로 재 검증하였다.

결 과

자외선 조사 및 녹차 식이 공급에 의한 피부 pH 변화

10주간 자외선을 조사한 UV+군의 피부 pH는 UV-군보다 유의적으로 증가하였는데 (Fig. 1) 이는 자외선 조사가 피부 pH의 증가를 초래하였음을 의미한다. 반면 자외선 조

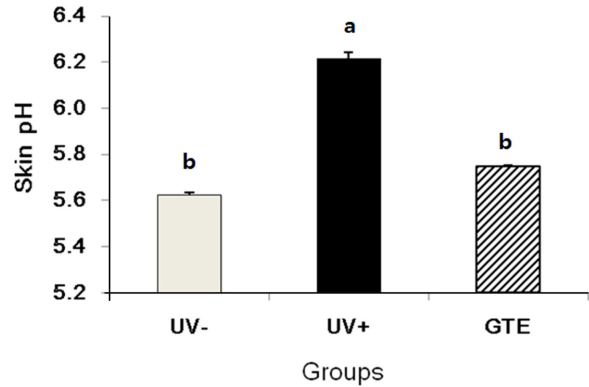


Fig. 1. Effect of UV irradiation and dietary green tea extract on skin pH. Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with UV irradiation (group UV+) for 10 weeks; Group GTE, hairless mice fed a diet containing 1.0% green tea extract (GTE) in parallel with UV irradiation for 10 weeks. Values are mean \pm SEM (n = 5). Values without a common letter are significantly different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

사와 병행하여 녹차 추출물을 10주간 식이 공급한 GTE군의 피부 pH는 UV+군에 비해 감소하였는데 그 감소 정도는 UV-군과 유사하였다. 이 결과는 자외선 조사와 병행된 GTE 식이 공급이 자외선 조사에 의해 증가되는 피부 pH를 정상화시켰음을 의미한다.

자외선 조사 및 녹차 식이 공급에 의한 피부 pH 주요 인자의 함량 변화

표피의 젖산, 유리아미노산, 유리지방산은 피부 pH를 결정하는 주요 인자이다.¹⁻³ UV+군의 젖산 함량은 UV-군에 비해 유의적으로 감소한 반면 GTE군의 젖산 함량은 UV+군에 비해 증가하였다 (Table 2). UV+군의 총 유리아미노산 함량은 UV-군과 유사하였으나 GTE군의 총 유리아미노산 함량은 UV-군보다 유의적으로 증가하였다. UV+군의 총 유리지방산 함량은 UV-군에 비해 감소하였으며, GTE군의 총 유리지방산의 함량은 UV+군과 유사하였다. 이 결과는 자외선 조사는 젖산 및 총 유리지방산 함량 감소와 함께 피부 pH를 증가시킨 반면, 자외선 조사와 병행된 GTE의 식이 공급은 젖산 및 총 유리아미노산의 함량 증가와 함께 피부 pH를 정상화시켰음을 의미한다. 반면 GTE 식이 공급은 자외선 조사에 의해 감소하는 총 유리지방산의 함량을 개선시키지 않는 것으로 여겨진다.

자외선 조사 및 녹차 식이 공급에 의한 표피 LDH의 발현 및 활성 변화

LDH는 피루브산과 젖산의 상호 전환을 촉매하는 효소로써 피부에서는 호기적인 상태에서도 강한 활성을 나타

Table 2. Effect of UV irradiation and dietary green tea extract on epidermal levels of lactate, total free amino acids and total free fatty acids

| Skin pH related factors | Experimental group ¹⁾ | | |
|--|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | UV- | UV+ | GTE |
| Lactate (nmol/mg protein) | 209.1 ± 12.7 ^{2)a} | 91.5 ± 6.6 ^b | 157.2 ± 5.9 ^a |
| Total free amino acids (µg/g wet weight) | 55.1 ± 4.0 ^b | 69.2 ± 2.3 ^{ab} | 84.6 ± 1.2 ^{a*} |
| Total free fatty acids (mg/µg protein) | 16.5 ± 0.6 ^a | 9.8 ± 0.9 ^b | 11.0 ± 1.0 ^b |

1) Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with UV irradiation (group UV+) for 10 weeks; Group GTE, hairless mice fed a diet containing 1.0% green tea extract (GTE) in parallel with UV irradiation for 10 weeks. 2) Data are mean ± SEM (n = 5). Values without a common letter are significantly different (p < 0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

*p < 0.05 versus group UV+ by non-paired student's t-test

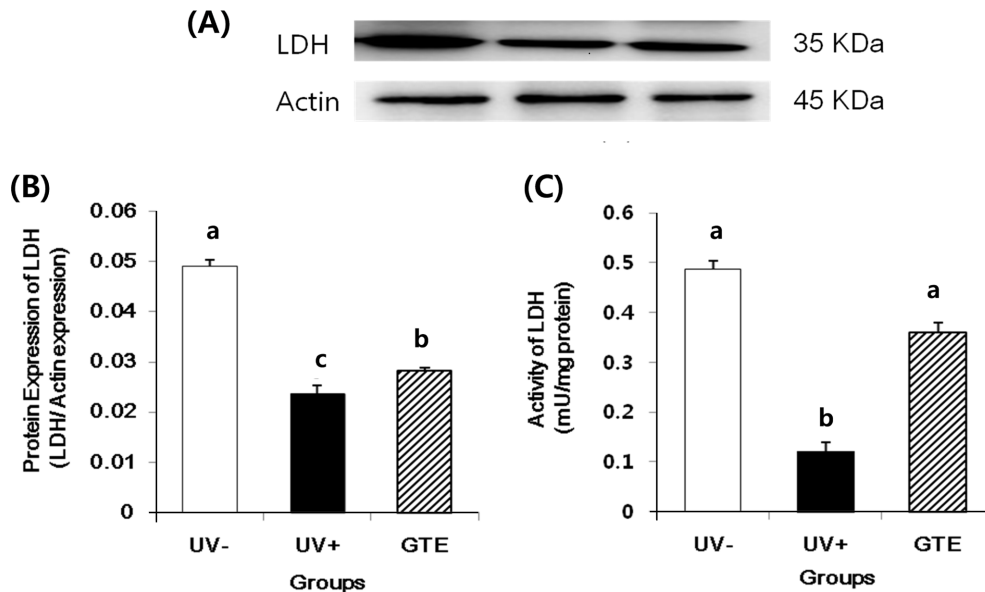


Fig. 2. Effect of UV irradiation and dietary green tea extract on lactate dehydrogenase (LDH) protein expression and activity in the epidermis of mice. Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with UV irradiation (group UV+) for 10 weeks; Group GTE, hairless mice fed a diet containing 1.0% green tea extract (GTE) in parallel with UV irradiation for 10 weeks. (A) Representative expressions of LDH and actin in the epidermis of groups. (B) Signal intensities from multiple experiments of A were quantified and the integrated areas were normalized to the corresponding value of actin (the loading control). Values are mean ± SEM (n = 5). (C) The activity of LDH was determined in the epidermis of group by LDH activity colorimetric assay kit based on NADH generation in epidermis of groups. Values are mean ± SEM (n = 5). Values without a common letter are significantly different (p < 0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

낸다.⁴ UV+군의 LDH 단백질 발현은 정상대조군인 UV-군에 비해 유의적으로 감소하였으나, GTE군에서는 UV+군보다 증가하였다 (Fig. 2A, 2B). 이는 자외선 조사에 의해 LDH 단백질 발현이 감소하는 반면 자외선 조사와 병행된 녹차 추출물의 식이 공급은 LDH 단백질 발현을 증가시켰음을 의미한다. LDH의 활성 또한 UV+군에서 감소한 반면 GTE군에서는 UV-군과 유사한 수준으로 증가하였다 (Fig. 2C). 이는 10주간의 자외선 조사가 표피의 LDH 단백질 발현과 활성을 감소시키는 반면 자외선 조사와 병행된 GTE 식이 공급은 LDH의 단백질 발현 및 활성을 증가시켜 궁극적으로 젖산 함량을 증가시킴을 의미한다.

자외선 조사 및 녹차 식이 공급에 의한 표피 주요 유리지방산의 함량 변화

팔미트산 (palmitic acid, PA, 16:0), 스테아르산 (stearic acid, SA, 18:0), 올레산 (oleic acid, OA, 18:1n-9) 및 리놀레산 (linoleic acid, LA, 18:2n-6)은 표피의 주요 유리지방산이다.²⁷ 체내에서 생성이 불가능한 LA는 식이 공급이 절대적으로 요구되는 필수 불포화지방산인 반면 PA 및 SA는 체내에서 생성이 가능한 불필수 포화지방산이다.²⁸ 한편 체내에서 생성된 PA는 장쇄 효소 (elongase)에 의해 SA로 전환될 수 있고, SA는 $\Delta 9$ 탈포화 효소 (desaturase)에 의해 OA로 대사될 수 있으므로,²⁸ SA 및 OA은 개별 지방산보다는 PA에서 대사 가능한 지방산의 개념에서 군간 함량

Table 3. Effect of UV irradiation and dietary green tea extract on epidermal levels of major free fatty acids

| Major FFA ¹⁾ (mg/ μ g protein) | Experimental group ²⁾ | | |
|--|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | UV- | UV+ | GTE |
| 16:0 ³⁾ | 3.2 \pm 0.1 ^{4a} | 2.1 \pm 0.1 ^b | 2.0 \pm 0.2 ^b |
| 18:0 | 1.7 \pm 0.1 ^a | 1.1 \pm 0.1 ^b | 1.7 \pm 0.2 ^a |
| 18:1n-9 | 3.3 \pm 0.3 ^a | 2.3 \pm 0.2 ^b | 0.9 \pm 0.0 ^c |
| 18:2n-6 | 3.2 \pm 0.3 ^a | 2.1 \pm 0.1 ^b | 1.7 \pm 0.2 ^b |

1) FFA: free fatty acid 2) Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with UV irradiation (group UV+) for 10 weeks; Group GTE, hairless mice fed a diet containing 1.0% green tea extract (GTE) in parallel with UV irradiation for 10 weeks 3) Only major free fatty acids (FFA) are listed. 4) Data are mean \pm SEM (n = 5). Values without a common letter are significantly different (p < 0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

을 비교함이 타당한 것으로 여겨진다. UV+군에서 PA, SA 및 OA의 개별 함량은 UV-군에 비해 유의적으로 감소하였으며 (Table 3), GTE군에서 PA 함량은 UV+군과 유사한 반면, SA 함량은 UV-군과 유사한 수준으로 증가하였고 OA 함량은 UV+군보다 더욱 현저히 감소하였는데 이는 자외선 조사와 병행된 GTE 공급이 $\Delta 9$ 탈포화 효소 (desaturase)의 억제를 초래하여 SA의 축적 및 OA 함량의 현저한 감소를 초래한 것으로 여겨진다. UV+군에서 LA의 함량은 UV-군에 비해 유의적으로 감소하였으며, GTE군의 LA 함량은 UV+군과 유사하였다. 이 결과는 총 유리지방산의 함량 변화 결과와 유사하게, 자외선 조사와 병행된 GTE 식이 공급은 자외선 조사에 의해 감소하는 표피의 주요 유리지방산의 개별 함량을 개선시키지 않았음을 제안한다. 흥미롭게도 자외선 조사와 병행된 GTE 식이 공급은 $\Delta 9$ 탈포화 효소 (desaturase)의 발현이나 활성을 억제하여 지방산 대사의 변화를 초래하는 것으로 여겨지나, 이는 추후 연구에서 심도 있게 다루어질 필요가 있다.

고 찰

본 연구는 무모생쥐에 10주간 자외선 조사와 병행하여 1.0% 수준의 녹차 추출물을 식이 공급 후 피부 산도 및 관련 인자의 함량과 LDH 효소의 단백질 발현 및 활성 변화를 자외선 비조사군 (UV-군) 및 자외선 조사군 (UV+군)과 비교 분석하였다. 식이에 첨가된 녹차 추출물의 첨가 수준은 섭취 후 독성 및 산화 촉진 등의 부작용 없이^{18,19} 피부 산도 개선 효능이 예상되는 0.3%, 0.5%, 1.0% 및 1.25% 수준에서 행해진 예비 연구에 기반하여 결정하였다. 신체의 최외각에서 자외선에 항시 노출되어 있는 피부에서 녹차 섭취에 의한 항산화 효능은 간, 폐, 및 소장의 내부 장기

보다 고용량을 필요로 하는데,²⁹ 4주간 2% 수준의 녹차 카테킨 섭취가 피부에서 산화 촉진 없이 항산화 관련 여러 효소의 활성 증가와 함께 광노화를 억제하는 반면,¹⁸ 90일간의 섭취 기간 동안 백서의 체중, 간기능 및 혈액 지표 이상 등의 독성을 유발하지 않는 녹차 추출물의 식이 첨가 수준은 0.3~1.25% 수준으로 파악되었다.¹⁹ 이를 근거로 0.3~1.25% 수준에서 예비 연구를 시행한 결과 0.3% 및 0.5%에서는 효능이 나타나지 않은 반면 1.0% 및 1.25%의 수준에서 피부 산도 개선의 효능이 나타났으며, 이 중 저용량인 1.0%를 본 연구의 식이 첨가 수준으로 결정하였다. 10주간 자외선 조사와 함께 병행된 1% 수준의 녹차 추출물의 식이 공급은 자외선 조사에 의해 증가된 피부 산도를 정상대조군과 유사한 수준으로 감소시켰다. 병행하여, 피부 산도 관련 인자 중 젖산 및 총 유리아미노산의 함량이 표피에서 증가된 반면 총 유리지방산의 함량은 자외선 조사군과 유사한 수준으로 긍정적인 효과를 나타내지 않았다. 이 결과는 녹차 추출물이 젖산의 생성 및 총 유리아미노산 함량을 증가시켜 궁극적으로 피부 산도를 정상화시켰음을 의미한다.

자연 노화와 광노화로 나뉘어지는 피부 노화는 건조증, 가려움증, 피부 장벽 질의 생성 저하뿐 아니라 피부의 pH 증가를 초래한다.^{3,6,30} 특히 과다한 자외선 노출에 의한 피부의 광노화는 색소 침착, 굵은 주름 형성, 세포 사멸, 표피 과증식과 더불어 피부 pH의 증가를 일으켜 피부장벽 항상성의 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다.^{31,32} 광노화의 예방 및 개선을 위해 화장품뿐 아니라 다양한 식이 소재가 개발되고 있으며, 특히 녹차, 소나무 껍질 추출물 복합물, 홍삼, 사상자, 산수유 복합추출물 등의 여러 식품 소재들이 광노화 보호를 위한 건강기능식품으로 제품화되고 있다.¹²⁻¹⁴ 이 중 녹차 추출물 및 녹차의 주요 성분인 카테킨은 자외선 노출에 의한 피부의 DNA 손상, 멜라닌 생성 억제 등의 구체적인 피부 노화 억제 효능이 국내외적으로 알려져 있다.³²⁻³⁴ 무모생쥐에 10주간의 자외선 조사는 피부 pH를 증가시켰는데 이는 60명의 사람을 대상으로 2주 동안의 지속적인 자외선 조사가 피부 pH 증가시킴을 보고한 선행 연구와³⁵ 일치하는 결과이다. 반면 10주간의 자외선 조사와 병행된 1.0% 수준의 녹차 추출물의 식이 공급은 피부 pH를 UV-군과 유사한 수준으로 감소시켰다. 건강한 피부는 pH 4~6 범위의 약산성 pH를 유지하고 있으며 이는 피부의 항상성 유지의 지표로 여겨지고 있다.⁵ 광노화에 의한 피부 pH 증가는 피부의 여러 효소들의 활성 변화를 초래하는 것으로 보고되어 있으며 녹차 식이 공급에 의한 피부 pH 감소는 녹차의 공급이 피부의 여러 효소들의 활성을 정상화시켰음을 의미한다.

피부의 pH는 표피에서 생성되는 젖산, 유리아미노산,

유리지방산 등 여러 인자들의 전체 함량에 의해 결정된다.^{1,3} 땀에 포함되어 있는 암모니아 (NH_3) 및 중탄산이온 (HCO_3^-) 또한 피부 pH에 영향을 미치나 이들의 함량은 극소량으로 표피의 젖산, 유리아미노산 및 유리지방산이 피부 pH의 주요 결정인자로 알려져 있다. 표피에서는 호기적인 상태에서도 젖산 생성이 활발히 이루어지며,⁴ 유리아미노산 조성 또한 대부분의 아미노산이 일정한 범위에서 큰 변화 없이 유지되는 혈액의 아미노산 조성과의 상이한데,³⁶ 이는 산성 아미노산인 glutamate 및 histidine이 40% 이상을 차지하고 있는 반면 methionine, phenylalanine, valine, isoleucine, leucine 및 cysteine은 거의 존재하지 않는 것으로 설명된다.¹ 표피에서 glutamate 및 histidine는 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)과 urocanic acid (UCA)로 대사되기도 한다.¹ 표피의 여러 유리지방산 또한 피부 산도 유지에 기여하는데, 젖산과 유리지방산뿐 아니라, glutamate 등의 산성 유리아미노산 및 PCA와 UCA에 함유되어 있는 카르복실기의 수소 이온이 pKa 2~6 범위에서 해리되어 궁극적으로 pH 4~6 범위 약산성의 건강한 피부 산도를 유지한다.^{1,3} 또한 표피의 유리아미노산은 피부 산도 증가 시 젖산이나 유리지방산에 비해 완충력 (buffering capacity)이 뛰어나 피부 산도를 약산성으로 신속하게 정상화시킨다고 알려져 있다.³⁷

피부에서 lactate dehydrogenase (LDH)에 의한 피루브산의 젖산으로의 전환은 호기적인 상태에서도 활발히 이루어지는데⁴ 표피의 LDH 단백질 발현은 진피에 비해 현저히 높은 것으로 파악되었다.^{38,39} GTE군의 표피에서 LDH 단백질 발현 및 활성이 UV+군에 비해 증가되었는데, 이는 자외선 조사에 의해 감소된 LDH 단백질 발현과 활성이 녹차 추출물의 식이 공급에 의해 증가됨을 의미한다. LDH의 mRNA 전사는 protein kinase C (PKC) 경로를 통해 활성화되는데,⁴⁰ 녹차의 카테킨이 PKC 경로를 활성화 하는 것이 선행 연구에 의해 보고되었다.⁴¹ 본 연구에서는 LDH의 mRNA 발현 수준을 파악하지 않았으나 이 결과들은 녹차의 카테킨 성분들이 PKC 경로의 활성화를 초래하여 간접적으로 LDH의 mRNA 전사 및 단백질 발현을 증가시키고 활성 증가를 초래하여 궁극적으로 젖산 생성을 증가시킴을 제안한다. 표피의 주 에너지로 사용되는 젖산은 유리지방산, 탄산 및 인산 결합의 총량보다 피부 pH의 약산성 유지에 크게 기여할 뿐만 아니라 피부건조 증상을 완화시켜주는 인자이며,¹ 젖산이 포함되지 않은 환경에서 표피 세포의 성장이 현저히 감소한다는 선행연구에⁴ 의해 젖산이 피부 표면을 산성화 시킬 뿐만 아니라 피부 건강의 주요 요소임이 확인되었다. UV-군에 비해 UV+군의 젖산 함량이 현저히 감소하였으며 GTE군에서는 젖산 함량

이 UV-군과 유사한 수준으로 증가하였는데, 이 결과는 젖산 분비가 감소된 신부전 환자의 피부 pH 증가가 젖산 함량 감소와 병행된다는 사전 보고와⁴² 함께 녹차 식이 공급이 자외선 노출로 인해 감소된 LDH의 발현과 활성 증가를 초래하여 결과적으로 젖산 함량을 증가시켰음을 의미한다.

유리아미노산의 유일한 근원 단백질인 필라그린 (filaggrin)은^{43,44} peptidylarginine deiminase-3 (PAD3)에 의해 분해가 유도되고 표피 분화 최종 단계에서 caspase-14, calpain-1 및 bleomycin hydrolase (BH) 등의 다양한 단백질 분해 효소에 의해 표피의 유리아미노산으로 최종 분해되는 것으로 여겨지고 있는데 이 과정에 관여하는 효소는 아직 명확하게 파악되지 않았다.^{45,46} 필라그린의 분해 산물인 유리아미노산의 조성은 필라그린의 구성 아미노산 조성고 유사한 반면,^{45,46} 대부분의 아미노산이 일정한 범위에서 큰 변화 없이 유지되는 혈액의 아미노산 조성과의 상이한데,³⁶ 이는 산성 아미노산인 glutamate 및 histidine이 40% 이상을 차지하고 있는 반면 methionine, phenylalanine, valine, isoleucine, leucine 및 cysteine은 거의 존재하지 않는 것으로 설명된다.¹ 표피에서 glutamate 및 histidine는 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)과 urocanic acid (UCA)로 대사되기도 한다.¹ 표피에서 glutamate 등의 산성 유리아미노산 및 PCA와 UCA에 함유되어 있는 카르복실기의 수소 이온이 pKa 2~6 범위에서 해리되어 궁극적으로 pH 4~6 범위의 약산성의 건강한 피부 산도를 유지할 뿐 아니라,^{1,3} 한편으로 표피의 유리아미노산은 피부 산도 증가 시 젖산이나 유리지방산에 비해 완충력 (buffering capacity)이 뛰어나 피부 산도를 약산성으로 신속하게 정상화시킨다고 알려져 있다.³⁷ UV+군과 UV-군의 총 유리아미노산 함량이 유사한 반면 GTE군에서 현저히 증가한 총 유리아미노산 함량은 녹차 식이 공급이 표피의 총 아미노산 함량을 증가시켰음을 의미한다. 녹차 섭취에 의한 총 유리아미노산의 함량 증가가 glutamate, histidine 등의 주요 개별 아미노산 및, PCA, UCA의 함량 증가를 직접적으로 의미하지는 않으나, 이들이 표피의 주요 유리아미노산 및 대사체임이 사전 연구에서 보고되어있고,^{1,3} 피부 산도 증가 시 표피 유리아미노산은 전체적으로 젖산이나 유리지방산에 비해 완충력이 뛰어나다는 점에서,³⁷ 총 유리아미노산의 함량 증가는 피부 산도 개선에 기여하였음을 의미한다. 추후 녹차 추출물의 공급에 의한 필라그린을 비롯한 개별 유리아미노산 함량, 관련 효소들의 발현 및 활성 변화 등에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표피의 과립층과 각질층 사이에서 분비되는 phospholipase A₂ (PLA₂)에 의해 생성되는 유리지방산은 각질층의 피부 장벽을 이루는 주요 구성 성분일 뿐 아니라 피부

pH의 약산성 유지에 기여한다.⁴⁷ UV+군의 총 유리지방산 함량이 UV-군 보다 감소하였는데 이는 광노화로 인한 유리지방산 합성 효소들의 mRNA 발현 및 PLA₂의 활성이 변화하였다는 사전 보고와⁴⁸ 함께 자외선 조사에 의해 피부 지방산 함량의 감소가 초래되었음을 의미한다. 녹차 카테킨은 광노화에 의한 지방의 과산화 반응을 감소시키는 반면, 유리지방산의 생성을 저해하는 것으로 알려져 있다.⁴⁹ 즉 자외선 조사와 병행된 녹차 식이 공급은 지방산 함량에는 긍정적인 효과를 나타내지 않는 것으로 여겨진다. 결론적으로 자외선 조사와 병행된 녹차 추출물 식이 공급은 LDH 발현과 활성 증가와 함께 젖산과 유리아미노산 함량을 증가시켰으며 궁극적으로 자외선 조사에 의해 증가된 피부 pH를 정상화시켰다.

요 약

본 연구에서는 자외선 조사와 함께 녹차 추출물 식이를 10주간 공급한 무모생쥐 (GTE군)의 표피 pH 관련 인자의 함량과 LDH 효소의 단백질 발현 및 활성 변화를 자외선 비조사군 (UV-군) 및 자외선 조사군 (UV+군)과 비교 분석하였으며 결과는 다음과 같다.

UV+군의 피부 pH는 UV-군보다 유의적으로 증가한 반면 GTE군의 피부 pH는 UV+군에 비해 감소하였으며 그 감소 정도는 UV-군과 유사하였다.

UV+군의 젖산 함량은 UV-군에 비해 현저히 감소한 반면 GTE군의 젖산 함량은 UV+군에 비해 증가하였다. UV+군과 UV-군의 총 유리아미노산 함량은 군간 유사하였으나 GTE군의 총 유리아미노산 함량은 UV-군에 비해 현저히 증가하였다. UV+군 및 GTE군의 총 유리지방산 함량은 군간 차이 없이 모두 UV-군에 비해 감소하였으며, GTE군에서 주요 유리지방산인 PA, OA 및 LA의 개별 함량은 모두 UV-군과 유사하거나 감소하였다.

UV+군의 LDH 단백질 발현 및 활성은 UV-군에 비해 유의적으로 감소한 반면, GTE군의 LDH 단백질 발현 및 활성은 모두 UV+군보다 증가하였으며 특히 LDH 활성의 증가 정도는 UV-군과 유사하였다.

결론적으로 자외선 조사와 병행된 녹차 추출물 식이 공급은 LDH 발현 및 활성 증가와 함께 젖산 과 총 유리아미노산 함량을 증가시켰으며 궁극적으로 자외선 조사에 의해 증가된 피부 pH를 정상화시켰다.

References

1. Rippke F, Schreiner V, Schwanitz HJ. The acidic milieu of the

horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3(4): 261-272.

2. Nakagawa N, Sakai S, Matsumoto M, Yamada K, Nagano M, Yuki T, Sumida Y, Uchiwa H. Relationship between NMF (lactate and potassium) content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects. *J Invest Dermatol* 2004; 122(3): 755-763.

3. Elias PM. Stratum corneum acidification: how and why? *Exp Dermatol* 2015; 24(3): 179-180.

4. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(5): 359-370.

5. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol* 2013; 93(3): 261-267.

6. Choi EH, Man MQ, Xu P, Xin S, Liu Z, Crumrine DA, Jiang YJ, Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM, Mauro TM. Stratum corneum acidification is impaired in moderately aged human and murine skin. *J Invest Dermatol* 2007; 127(12): 2847-2856.

7. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55(1): 1-19.

8. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 2002; 11(5): 398-405.

9. Bissett DL, Hannon DP, Orr TV. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 1987; 46(3): 367-378.

10. Holleran WM, Uchida Y, Halkier-Sorensen L, Haratake A, Hara M, Epstein JH, Elias PM. Structural and biochemical basis for the UVB-induced alterations in epidermal barrier function. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1997; 13(4): 117-128.

11. Sterenborg HJ, de Gruijl FR, van der Leun JC. UV-induced epidermal hyperplasia in hairless mice. *Photodermatol* 1986; 3(4): 206-214.

12. Sime S, Reeve VE. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Photochem Photobiol* 2004; 79(2): 193-198.

13. Kang TH, Park HM, Kim YB, Kim H, Kim N, Do JH, Kang C, Cho Y, Kim SY. Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *J Ethnopharmacol* 2009; 123(3): 446-451.

14. Pazyar N, Feily A, Kazerouni A. Green tea in dermatology. *Skinmed* 2012; 10(6): 352-355.

15. Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, Elmets CA, Katiyar SK. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J Invest Dermatol* 2004; 122(6): 1480-1487.

16. Li YH, Wu Y, Wei HC, Xu YY, Jia LL, Chen J, Yang XS, Dong GH, Gao XH, Chen HD. Protective effects of green tea extracts on photoaging and photomunosuppression. *Skin Res Technol* 2009; 15(3): 338-345.

17. Min J, Lee Y, Han SM, Choi Y. Dietary effect of royal jelly supplementation on epidermal levels of hydration, filaggrins, free amino acids and the related enzyme expression in UV irradiated hairless mice. *Korean J Nutr* 2013; 46(2): 109-118.

18. Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Kwon

- SB, Park KC. Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19(5): 235-241.
19. Takami S, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Onose J, Hirose M. Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(6): 2224-2229.
 20. Senadheera D, Krastel K, Mair R, Persadmehr A, Abranches J, Burne RA, Cvitkovitch DG. Inactivation of VicK affects acid production and acid survival of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2009; 191(20): 6415-6424.
 21. Nachat R, Méchin MC, Takahara H, Chavanas S, Charveron M, Serre G, Simon M. Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol* 2005; 124(2): 384-393.
 22. Hamanaka S, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Suzuki A, Uchida Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol* 2002; 119(2): 416-423.
 23. Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, Suzuki A, Elias PM, Holleran WM, Hamanaka S. Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* 2000; 41(12): 2071-2082.
 24. Tang W, Ziboh VA. Reversal of epidermal hyperproliferation in essential fatty acid deficient guinea pigs is accompanied by rapid generation of inositol triphosphate. *Arch Dermatol Res* 1988; 280(5): 286-292.
 25. Takagi Y, Nakagawa H, Yaginuma T, Takema Y, Imokawa G. An accumulation of glucosylceramide in the stratum corneum due to attenuated activity of beta-glucocerebrosidase is associated with the early phase of UVB-induced alteration in cutaneous barrier function. *Arch Dermatol Res* 2005; 297(1): 18-25.
 26. Beamer CA, Holian A. Silica suppresses Toll-like receptor ligand-induced dendritic cell activation. *FASEB J* 2008; 22(6): 2053-2063.
 27. Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 1983; 24(2): 120-130.
 28. Cook HW. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings Pub. Co.; 1985. p.181-203.
 29. Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res* 1992; 52(14): 4050-4052.
 30. Kim EJ, Jin XJ, Kim YK, Oh IK, Kim JE, Park CH, Chung JH. UV decreases the synthesis of free fatty acids and triglycerides in the epidermis of human skin in vivo, contributing to development of skin photoaging. *J Dermatol Sci* 2010; 57(1): 19-26.
 31. Bhawan J, Andersen W, Lee J, Labadie R, Solares G. Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. *J Cutan Pathol* 1995; 22(2): 154-159.
 32. Hsu S. Green tea and the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(6): 1049-1059.
 33. Kim DS, Park SH, Kwon SB, Li K, Youn SW, Park KC. (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. *Arch Pharm Res* 2004; 27(3): 334-339.
 34. Katiyar SK, Elmetts CA. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (Review). *Int J Oncol* 2001; 18(6): 1307-1313.
 35. Di Cerbo A, Laurino C, Palmieri B, Iannitti T. A dietary supplement improves facial photoaging and skin sebum, hydration and tonicity modulating serum fibronectin, hyaluronic acid and carbonylated proteins. *J Photochem Photobiol B* 2015; 144: 94-103.
 36. Kim H, Park KH, Yeo JH, Lee KG, Jeong DH, Kim SH, Cho Y. Dietary effect of silk protein sericin or fibroin on plasma and epidermal amino acid concentration of NC/Nga mice. *Korean J Nutr* 2006; 39(6): 520-528.
 37. Levin J, Maibach H. Human skin buffering capacity: an overview. *Skin Res Technol* 2008; 14(2): 121-126.
 38. Ronquist G, Andersson A, Bendsoe N, Falck B. Human epidermal energy metabolism is functionally anaerobic. *Exp Dermatol* 2003; 12(5): 572-579.
 39. Lewis C Jr, Schmitt M, Hershey FB. Heterogeneity of lactic dehydrogenase of human skin. *J Invest Dermatol* 1967; 48(3): 221-225.
 40. Huang D, Jungmann RA. Transcriptional regulation of the lactate dehydrogenase A subunit gene by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 108(1-2): 87-94.
 41. Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotection and neurorescue against A β toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J* 2003; 17(8): 952-954.
 42. Yosipovitch G, Tur E, Morduchowicz G, Boner G. Skin surface pH, moisture, and pruritus in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8(10): 1129-1132.
 43. Scott IR, Harding CR, Barrett JG. Histidine-rich protein of the keratohyalin granules: source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 1982; 719(1): 110-117.
 44. Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 1994; 103(5): 731-741.
 45. Thulin CD, Walsh KA. Identification of the amino terminus of human filaggrin using differential LC/MS techniques: implications for profilaggrin processing. *Biochemistry* 1995; 34(27): 8687-8692.
 46. McGrath JA, Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14(1): 20-27.
 47. Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol* 2003; 121(2): 345-353.
 48. Tyrrell RM. Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight--from models to reality. *BioEssays* 1996; 18(2): 139-148.
 49. Wang X, Song KS, Guo QX, Tian WX. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(10): 2039-2047.