J Korean Soc Food Sci Nutr
36(5), 554~562(2007)

실크단백질의 식이 공급이 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga Mice 피부의 세라마이드 함량 및 관련인자 발현에 미치는 영향

박경호[1] · 최영심[1] · 김현애[1] · 이광길[2] · 여주홍[2] · 정도현[3] · 김성한[3] · 조윤희[1†]

[1]경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과
[2]농촌진흥청 농업생물부
[3](주)뉴트렉스

Dietary Effect of Silk Protein on Ceramide Synthesis and the Expression of Ceramide Metabolic Enzymes in the Epidermis of NC/Nga Mice

Kyung-Ho Park[1], Young-Sim Choi[1], Hyun-ae Kim[1], Kwang-Gill Lee[2], Joo-Hong Yeo[2], Do-Hyun Jung[3], Sung-Han Kim[3] and YunHi Cho[1†]

[1]Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
[2]Dept. of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea
[3]Nutrex Co., Ltd., Seoul 137-919, Korea

Abstract

Ceramide rich intercellular lipid lamellae are thought to be particularly important in maintaining the structural integrity of epidermal barrier. Ceramide is synthesized de novo by serine palmitoyltransferase (SPT) phospholipid intermediates, serine and palmitic acid persist within the stratum corneum. The ceramide which is synthesized is degraded with fatty acid and sphingosine by degradative enzyme ceramidase. The depletion of ceramide in stratum corneum was reported in the atopic dermatitis. As an effort to search for the dietary source for improving the level of ceramide in epidermis, the dietary effects of various-typed silk protein were compared. Seventy male NC/Nga mice, an animal model of atopic dermatitis, were divided into seven groups: group CA as an atopic control with control diet, group S: 1% crude sericin diet, group F: 1% crude fibroin diet, group PS: peptide pattern of sericin (Mw 5000), group PF: peptide pattern of fibroin (Mw 1500), group AS: manufactured the same as amino acid profile of sericin and group AF: manufactured the same as amino acid profile of fibroin. Ten male BALB/c mice were served as group C (control group) control diet. All mice were fed on diet and water ad libitum for 10 weeks. Dry skin condition was established in group CA as ceramide content was decreased. Despite a marked decrease of mRNA and prorein expression of SPT, enzyme de novo synthesis, ceramide content of group S was dramatically increased by inhibiting the mRNA and protein expression of degradative enzyme ceramidase. However, dietary supplementation of crude silk fibroin protein (group F) and in other groups that were supplemented with either amino acid or peptide type of sericin or fibroin did not increase the level of ceramide. Together, our data demonstrate that dietary supplementation of crude sericin is more effective at improving ceramide level in epidemis of NC/Nga mice.

Key words: ceramide, silk sericin protein, silk fibroin protein, serine palmitoyltransferase (SPT), ceramidase

서 론

피부의 가장 외층인 표피는 외부환경으로부터 인체를 보호하는 역할을 하며, 표피의 제일 상층부인 각질층은 표피장벽(epidermal barrier)으로서 수분 증발 및 손실을 억제하여 피부의 건조화를 방지하는 것으로 알려져 있다(1,2). 표피장벽 역할을 수행하는데 있어 각질세포간 지질이 중요한 역할을 하는데, 주로 세라마이드(50%), 콜레스테롤(25%) 및 지방산(10%) 등이 85% 이상을 차지하고 있다(3). 이중 가장 많은 부분을 차지하는 세라마이드의 역할이 특히 중요한 것으로 알려져 있다(4,5).

세라마이드는 단백질 및 인지질 분해과정에서 제공되는

†Corresponding author. E-mail: choyunhi@khu.ac.kr
Phone: 82-2-961-9231, Fax: 82-31-201-3819

serine과 palmitoyl-CoA의 결합 후 serine palmitoyl-transferase(SPT)에 의해 합성되고(6), sphingosine 대사과정을 거친 후 ceramidase에 의해 sphingosine과 fatty acid로 분해된다(7,8). 세라마이드 합성에도 필요한 serine은 그 자체로도 자연보습인자의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(9), 표피에서 피부 건조화에 따른 세라마이드 수치 감소와 더불어 serine의 수치 또한 민감하게 저하됨이 보고되어있는데(10), 이는 표피에서 적절한 serine의 수준을 유지하는 것이 표피 보습유지에 중요함을 의미한다(10,11).

피부 건조화가 일어나는 대표적인 피부질환으로 건선염과 아토피 피부염 질환이 알려져 있는데(12,13) 이중 특히 아토피 피부염은 전체 인구의 약 10~20%에게서 발병하고 있다. 아토피 피부염은 피부 건조화뿐 아니라 표피 과증식(hyperkeratosis), 염증 등의 여러 증상을 같이 수반하는 피부 질병으로 이에 대한 현행 치료법은 부신피질 호르몬 제재나 자외선 요법을 통한 DNA 합성 억제, 세포 과증식 억제 및 염증 억제에 중점을 두고 있으나 이와 같은 치료법들은 여러 부작용을 수반하고 근본적인 치유를 기대하기 어려운 실정이다(14). 최근 아토피 피부염 및 건선염 환자의 표피에서 세라마이드 수치 감소보고(8,10,15)와 더불어 피부의 건조화 방지 및 촉촉한 느낌은 피부의 건강 차원에서 영양과 밀접한 관련이 있다는 일반인들의 인식 변화에 따라 특정 영양소 성분이나 이를 다량 함유한 식이 소재의 피부에 대한 효능연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다(16-19).

피부 건조화 방지를 위한 여러 기능성 소재 중 최근 누에고치에서 만들어지는 실크단백질이 사용되고 있다. 이 실크단백질은 성질이 전혀 다른 단백질인 sericin과 fibroin이 각각 25%와 75%로 구성되어 있는데 fibroin의 표면을 감싸고 있는 sericin은 serine, aspartate, threonine, glutamate의 극성 아미노산이 전체 구성 아미노산의 약 77%를 차지하여 분해되기 쉽고, 물에 녹기 쉬우며 특히, 그 자체로서 보습성을 가지는 serine이 약 30% 함유되어 있다(9). 반면 fibroin은 glycine, alanine, serine을 주요 구성아미노산으로 함유하고 있으나 serine의 함량은 12% 내외로 sericin에 비해 낮다. 이런 피부친화형 소재인 실크단백질을 이용하여 기능성 화장품, 미용 비누 등이 개발되어 있고, 피부 도포에 의한 보습성 증가(20), 주름방지(21), tyrosinase 활성 억제 효과(22) 등이 보고되었다. 하지만 이들 실크단백질의 피부에 대한 효능은 모두 도포에 의한 것으로서 실크단백질의 섭취에 의한 피부에 대한 효능 보고는 전무한 실정이다. 따라서 실크단백질 sericin과 fibroin의 섭취 후 피부조직에서의 보습 관련인자의 변화를 검토하는 것은 중요한 의미가 있는 것으로 여겨진다.

이에 본 연구에서는 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에서(14,22) 실크단백질 sericin 및 fibroin의 식이 공급에 따른 피부의 세라마이드 함량 및 관련 효소의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

PCR-premix는 (주)바이오니아에서 구입하였고 AMV reverse transciptase, RNasin ribonuleas inhibitor는 (주)서린바이오사이언스에서 구입하였다. Random primer(50 pmol/μL), 100 bp DNA ladder marker는 (주)대명사이언스에서 구입하였고, protein marker는 (주)큐어바이오에서 구입하여 별다른 정제과정 없이 그대로 사용하였다.

실험동물의 사육

공기청정시설이 없는 일반 환경에서 자연적으로 아토피 피부염이 발병하는 5주령의 수컷 NC/Nga mice(14,22) 30마리와 5주령의 수컷 BALB/c mice 10마리를 (주)중앙실험동물(서울)로부터 공급받아 실험 식이로 사육하기 전 1주 동안 고형배합 사료로 적응시킨 후 난괴법으로 군을 나누어 각 식이와 물을 마음껏 섭취하도록 하였다. 면역 질환연구에 상용되고 NC/Nga mice에 대한 정상대조군으로 자주 이용되는 BALB/c mice를 본 연구에서도 정상대조군으로 하였다. 사육실의 온도는 22±1℃, 습도는 60±5%를 유지하였고, 매일 광주기와 암주기가 12시간이 되도록 조절하였다.

실크단백질 시료 준비 및 아미노산 분석

누에고치는 가잠(*Bombyx mori*)을 상엽으로 사육하여 얻은 누에고치를 정련하여 준비하였다. 실크단백질 sericin은 정련 과정에 의해 추출되었는데, 먼저 누에고치에 30배량의 물을 첨가하고 110℃에서 5시간 가열한 후 필터링(Whatman No. 2 paper)을 하여 잔유물을 제거하였으며 평균분자량은 6만~10만이었다(S군). 또한 이 sericin에 단백질 분해효소(Novo, Denmark)를 3%(v/v) 첨가한 후, 질소가스 충진 조건 및 55℃에서 12시간 처리하였다. 그 후 불활성 처리를 하여 필터링(0.45 μm, Sartorius, Germany) 및 동결 건조의 과정을 거쳐 평균 분자량(Mw) 5,000 내외의 실크단백질 sericin을 회수하였다(PS군).

또한, 위 과정에서 남은 fibroin을 Madyarov 등(23)의 방법에 따라 제조하였다(F군). 이 용액을 sephadex G-25 gel filtration chromatography(Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 fibroin과 염을 완전히 분리하였으며, 아울러 이 fibroin 용액에 3%(v/v)의 단백질 분해효소(Nove, Denmark)를 첨가하여 질소가스 충진 조건 및 55℃에서 24시간 가수분해하고, 100℃에서 5분간 효소의 불활성 처리를 한 후, 필터링(0.45 μm, Sartorius, Germany)을 하여 잔유물을 제거한 후 평균분자량(Mw)이 1,500 내외인 실크단백질 fibroin을 얻었다(PF군). 각각의 분자량은 gel permeation chromatography(GPC) 장치(Viskotec, USA)를 이용하였으며, 0.2 N NaOH를 완충용액으로 사용하여 refractive index(RI)로 환산하였다. 이러한 과정을 거쳐 얻어

진 모든 sericin과 fibroin 시료는 -5℃ 내외를 유지하는 감압 건조 장치(model: Vacuum Freeze Dryer, 삼원 냉열사)를 이용하여 수용성 분말의 형태로 얻었다(23).

이렇게 얻어진 수용성 분말의 형태의 시료를 아미노산 sodium citrate loading buffer(0.2 M, pH 2.2, Biochrom Ltd.)에 녹인 후 필터링(0.45 μm, Sartorius, Germany)하여 자동 아미노산 분석 장치(Pharmacia Biotec. Biochrom 20 Plus)를 이용하여 18종 아미노산 표준 샘플에 대한 아미노산 함량을 분석하였다.

식이조성

각 실험군의 식이조성은 Table 1과 같으며 전체 식이무게 1% 수준의 sericin과 fibroin을 공급형태를 달리하여 각 식이에 혼합하여 10주간 공급하였다. 정제된 건조 분말을 별다른 처리 없이 그대로 첨가한 sericin군(S군)과 fibroin군(F군), sericin 분자량을 5,000(PS군) 및 fibroin 분자량을 1,500(PF군)으로 조절한 저분자량의 펩타이드 형태로 식이에 첨가한 군, sericin과 fibroin의 아미노산 조성비율과 동일하게 제조하여 아미노산 형태의 sericin(AS군)과 fibroin(AF군)을 식이에 첨가하여 공급한 군으로 실험군을 나누었다. 실크단백질을 첨가하지 않은 정상식이를 10주간 공급받은 NC/Nga mice(control A군: CA군) 및 BALB/c mice(control 군: C군)는 각각 아토피 피부염대조군 및 정상대조군이었다. C군과 CA군은 전체 식이무게 중 23%에 상응하는 단백질을 casein으로부터 공급받았다. 반면, S군과 F군 그리고 PS군, PF군 및 AS군, AF군은 22%의 단백질은 casein으로 나머지 1%는 형태를 달리한 실크단백질 sericin과 fibroin으로부터 각각 공급받았다. 각 실크단백질의 아미노산 조성은 Table 2와 같으며, 전체 식이무게를 기준으로 하여 C/CA 식이에 의해 공급되는 serine은 11.27 g/kg 식이였다. S식이에서 공급된 serine은 14.31 g/kg 식이였고, F식이에 의해 공급된 serine은 12.48 g/kg 식이였다. AS식이와 PS식이 및 AF식이와 PF식이에 의해 공급된 serine의 함량은 각각 S군 및 F군과 동일하였고 공급된 형태만이 아미노산 및 펩타이드로 상이하였다.

Table 2. Amino acid composition of casein and silk protein

Amino acid		Casein	Silk protein	
			Sericin	Fibroin
EAA[1]	Arginine	3.5	2.8	0.5
	Histidine	2.9	0.9	0.2
	Isoleucine	5.2	1.2	0.7
	Leucine	8.9	0.6	0.5
	Lysine	7.6	10.2	0.3
	Methionine	2.8	<0.05	0.1
	Phenylalanine	4.8	0.4	0.6
	Threonine	3.9	6.0	0.9
	Tryptophan	1.2	0.0	0.2
	Valine	6.4	2.6	2.2
NEAA[1]	Alanine	2.8	4.6	29.3
	Aspartate	6.7	19.1	1.3
	Cysteine	0.5	<0.05	0.2
	Glutamate	20.2	4.1	1.0
	Glycine	1.7	12.2	44.4
	Proline	10.7	0.8	0.3
	Serine	4.9	30.4	12.1
	Tyrosine	5.3	3.8	5.2
Total (%)		100.0	100.0	100.0

[1]EAA: essential amino acid, NEAA: non essential amino acid.

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

Ingredients	Experimental groups[1] (n=10)							
	Control (C)	Control A (CA)	S	F	PS	PF	AS	AF
Corn starch	372	372	372	372	372	372	372	372
Sucrose	200	200	200	200	200	200	200	200
Cellulose powder	50	50	50	50	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Vitamin mixture[2]	10	10	10	10	10	10	10	10
Salt mixture[3]	35	35	35	35	35	35	35	35
L-Cystine	3	3	3	3	3	3	3	3
Casein[4]	230	230	220	220	220	220	220	220
Sericin	0	0	10	0	0	0	0	0
Fibroin	0	0	0	10	0	0	0	0
Sericin of peptide form (MW: 5000)	0	0	0	0	10	0	0	0
Sericin of peptide form (MW: 1500)	0	0	0	0	0	10	0	0
Sericin of amino acid form	0	0	0	0	0	0	10	0
Fibroin of amino acid form	0	0	0	0	0	0	0	10

[1]Group C: BALB/c mice fed control diet, Group CA, S and F: NC/Nga mice fed control diet (group CA), crude sericin diet (group S) or crude fibroin diet (group F), Group PF and PS: NC/Nga mice fed the fibroin or sericin peptide form which reduced a molecular weight with 1,500 (group PF) and 5,000 (group PS), Group AS and AF: NC/Nga mice fed AS diet (group AS) or AF diet (group AF) that was manufactured the same as amino acid profile of sericin and fibroin.
[2]Vitamin mix composition: AIN-93 vitamin mix #310025 (Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA).
[3]Salt mix composition: AIN-93 G salt mix #210025 (Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA).
[4]Casein (nitrogen×6.25), 870 g/kg.

세라마이드의 총 함량 변화 측정

실험동물에서 채취된 피부 생검 조직을 Tris-HCl buffer(1 M, pH 7.5)와 함께 polytron으로 분쇄하고 동량의 folch 용액(chlroform:methanol=2:1 v/v)을 가한 후 3,000×*g*, 5분 동안 원심분리하였다. 2회 반복 후 모아진 하층액을 N_2 gas로 건조시킨 후 2% isopropanol을 함유한 hexane을 첨가하여 필터링(0.45 μm, Sartorius, Germany)하였다. 이후 sample을 HPLC(waters 1525, Waters Co., USA)를 이용하여 분석하였다. 분석에 이용한 column은 type UG 120(250 mm×4.6 mm ID, Shiseido Co., Japan)을 사용하였고 mobile phase는 hexane과 2%, isopropanol(IPA)의 혼합액을 사용하였으며 flow rate는 1 mL/min, 흡광도는 230 nm에서 측정하였다(24).

Serine palmitoyltransferase(SPT)와 ceramidase의 mRNA 발현변화

피부 생검조직을 1 cm^2 크기로 잘라서 100 mm^2 plate에 dermis를 아래 방향으로 놓은 후, HBSS(Hank's Balanced Salt Solution:Gibco BRL)와 dispase solution(grade Ⅱ, 2.4 unit/mL)을 같은 비율로 10 mL 첨가하여 4℃에서 18시간 동안 반응시켜 표피를 분리하였다. 분리된 표피 조직에 trizol reagent(Gibco BRL)를 이용하여 RNA를 분리 정제하고 파장 260 nm에서 정량하였다. Total RNA(1 μg/μL)를 65℃에서 10분간 가열하고, 4℃에서 10분 동안 방치한 후 1 μL oligo(dT) 15 primer(0.5 μg/μL), 1 μL M-MLV RT(10 unit/μL: promega, USA), 1 μL RNase inhibitor(20~40 unit/μL: promega, USA), 10 μL 5 X RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 5 μL 2.5 mmol/L dNTP mixture, 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC) 증류수를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 가열하여 cDNA를 합성하였다. SPT(GeneBank accession no. D19271)(10 pmol/μL)의 sense primer(5′ GACTGAGCCTTTCTGGTGCT 3′) 및 antisense primer(5′ AATGCCATTTGGAGTGAAGG 3′)와 ceramidase(GeneBank accession no. AI662009)(10 pmol/μL)의 sense primer(5′ TGTGGAGCAGAAAATCAAGC 3′) 및 antisense primer(5′ CAACATCATGGGGCACTTAG 3′)를 각각 합성된 cDNA(1 μL)에 0.1% DEPC-Water와 함께 PCR-premix에 첨가하여 denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 65℃에서 1분, extention은 72℃에서 1분 동안 35~38 cycle(SPT: 35 cycle, ceramidase: 38)로 진행하였다. SPT와 ceramidase의 fragment size는 각각 159 bp(SPT), 103 bp(ceramidase)이며 PCR 생성물은 3.0% agarose gel에서 확인하였다. PCR 생성물의 양은 housekeeping gene인 GAPDH를 기준으로 정량하였으며 imaging densitometer(Labwork version 4.6 UVP, CA)를 사용하여 측정하였다.

항체 제작

Rabbit polyclonal 1차 항체 SPT는 primer sequence (GeneBank accession no. D19271)를 기준으로 하여 whole protein(560 amino acids)의 hydrophobicity와 antigenicity를 확인한 결과 547~560 amino acid인 DRPFDETTYEETED (14mer)부분이 c-term 끝 부분에 위치하고 있고 antigenicity와 hydrophobicity가 상대적으로 높아 항원으로 사용할 peptide로 제작하였고, rabbit polyclonal 1차 항체 ceramidase는 primer sequence(GeneBank accession no. AI662009)를 기준으로 SPT와 같은 방법으로 진행하여 167~180 amino acid인 RTEYKKIRDDDLRH 부분에 carrier protein과의 conjugation을 위해 임의로 cystine을 첨가하여 RTEYKKIRDDDLRH-C(15mer)를 항원으로 사용할 peptide로 제작하여 rabbit에 주입하였다. 항체 생성여부는 효소면역측정법으로 확인하고 심장 채혈 후 얻은 total serum IgG를 affinity column(Affi-gel, Bio-Rad)을 사용하여 정제한 후 항체로 사용하였다(Lab Frontier, Korea).

Serine palmitoyltransferase(SPT)와 ceramidase의 단백질 발현변화

실험동물에서 채취된 피부 생검 조직의 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준으로 한 bio-rad protein assay를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 다음 10% PAGE/SDS gel에서 전기 영동시킨 후 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 위의 방법으로 제작된 1차 항체(SPT, ceramidase: Lab Frontier., Korea)를 4℃에서 overnight incubation 한 후 PBST로 15분씩 3회 세척하였다. Peroxidase-conjugated anti-IgG 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBST로 3회 세척하고 발색은 ECL hyperfilm으로 확인하였다. 각 band의 intensity는 β-actin의 발현을 기준으로 % control하여 imaging densitometer(Labwork version 4.6 UVP, CA)를 사용하여 정량하였다.

통계분석

실험 결과의 자료는 SPSS, Ver 12.0 program(Statistical package for social science)을 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 군별 평균과 표준오차로 나타내었고, 각 실험 군간의 비교는 one way ANOVA로 분석한 후 general linear model(GLM) test로 $p<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

실크단백질의 분자량

Gel permeation chromatography(GPC)장치를 이용하여 분석한 실크단백질의 분자량은 Fig. 1에 나타내었다. 정련과정을 통해 추출한 후 별다른 처리를 하지 않은 sericin(S군)

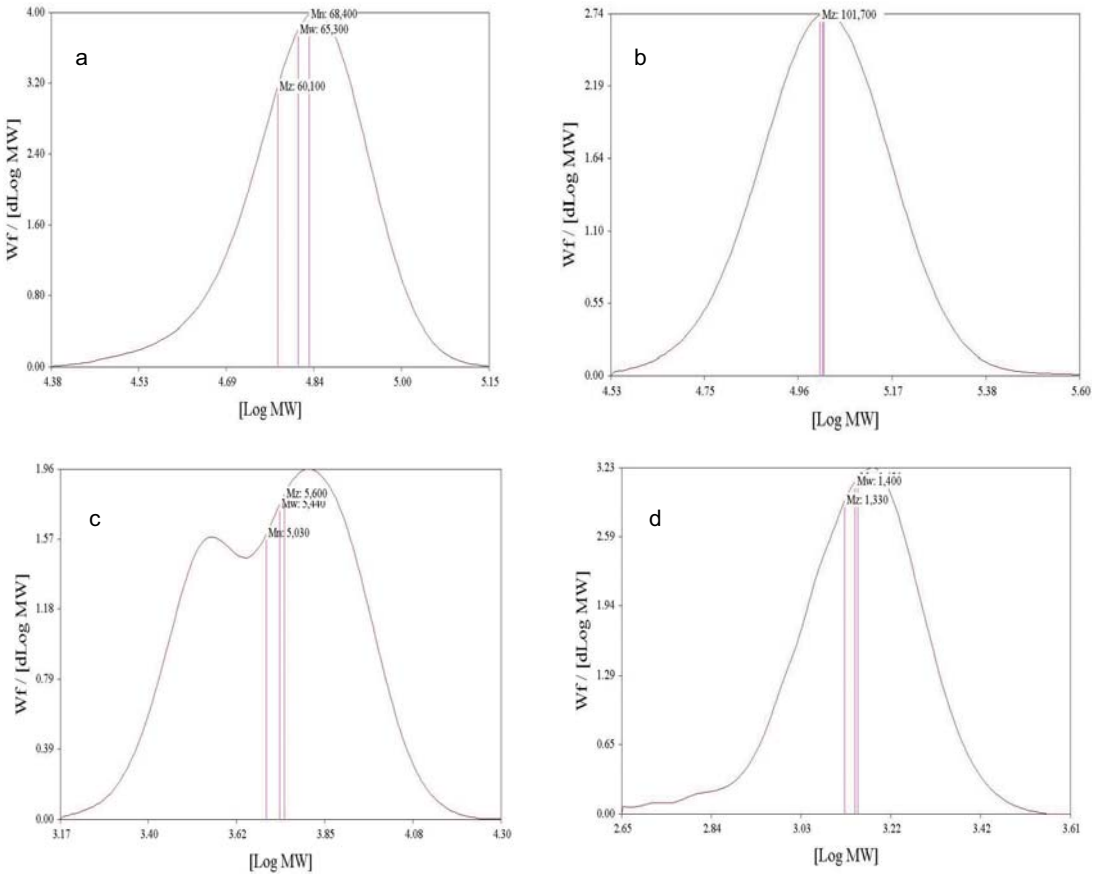

Fig. 1. Molecular weight (Mw) of silk protein by gel permeation chromatography.
a: crude sericin (group S: Mw 43,600), b: crude fibroin (group F: Mw 101,700), c: peptide pattern of sericin (group PS: Mw 5,410), d: peptide pattern fibroin (group PF: Mw 1,490).

과 fibroin(F군)의 평균 분자량은 각각 65,000과 101,700이었고, 정련한 sericin 및 fibroin에 단백질 분해효소를 이용하여 분해한 펩타이드의 분자량은 5,410(PS군)과 1,490(PF군)이었다. 식품 단백질 유래의 기능성 펩타이드는 구조 및 아미노산 서열에 따라 다양한 생리활성을 지니고 있어(25) 단백질의 형태에 따라 생리활성에 미치는 영향이 다를 수 있기에 고분자의 펩타이드(S군, F군) 및 저분자의 펩타이드(PS군, PF군)를 제조하여 그 효능을 비교·분석하는 것은 의미있는 것으로 여겨진다.

세라마이드의 총 함량 변화

10주간의 각 식이 공급 후 HPLC를 이용하여 측정된 CA군의 세라마이드 총 함량은 정상대조군인 C군에 비해 유의적으로 낮았다(Fig. 2). 이는 아토피 피부염 발병 등 내·외부 환경의 여러 자극에 의해 피부장벽기능이 손상되면 세라마이드 함량이 현저히 감소함을 보고한 여러 사전 보고들(8,10,15,26)과 일치하는 결과이었다. 세라마이드가 감소되어있는 NC/Nga mice에 sericin을 식이 첨가한 S군의 세라마이드 총 함량은 정상대조군인 C군 수준이상으로 높았는

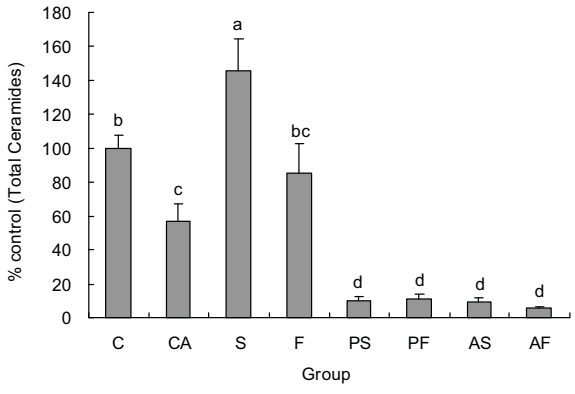

Fig. 2. Total ceramides content in the epidermis of BALB/c mice (group C) and NC/Nga mice fed the control diet (group CA), crude sericin supplemented (group S) or crude fibroin supplemented diet (group F), fibroin or sericin supplemented diet which reduced a molecular weight with 1,500 (group PF) and 5,000 (group PS), and sericin of amino acids form supplemented (group AS) or fibroin of amino acids form supplemented diet (group AF).
Values are mean±standard error (n=10). Mean with different letters differ at $p<0.05$.

데 이는 식이에 첨가한 sericin 특히, sericin의 주요 성분인 serine(약 30%이상, 14.31 g/kg diet)에 기인한 것으로 여겨진다. Serine은 에너지 대사와 관련하여서는 glycine으로 전환(27)되어 에너지원으로 사용되나, 표피에서는 에너지원으로의 역할보다는 수분유지를 위한 자연보습인자로서의 기능을 우선 수행한다. 표피에서 serine의 농도가 glycine에 비해 월등히 높다는 본 연구의 사전보고(28) 및 기니피그 피부와 인간 피부에서 현저히 높은 serine의 함량을 보고한 Tabachnick와 Labadie(29)의 연구 결과로 볼 때 본 연구에 사용된 sericin에 다량 함유되어 있는 serine이 손상된 표피의 장벽기능을 보완한 것으로 여겨진다.

하지만, 실크단백질 fibroin의 식이공급은(F군) 총 세라마이드 함량을 정상대조군인 C군 수준이상으로는 올려주지 못하였는데, 이는 fibroin에 함유되어있는 serine의 함량이 약 12%(12.48 g/kg diet)로 S 식이(약 31%, 14.31 g/kg diet)보다 낮아 손상된 피부의 장벽기능을 완벽히 보완할 수준은 아니었던 것으로 여겨진다. 또한, sericin과 fibroin을 저분자량으로 조절하여 펩타이드 형태로 식이공급한 군(PS, PF)과 sericin과 fibroin의 아미노산 비율대로 제조하여 아미노산 형태로 식이공급한 군(AS, AF)은 모두 정상대조군인 C군에 비해 세라마이드 총 함량이 현저히 낮았다.

최근 식품단백질 유래의 기능성 펩타이드에 대한 관심은 펩타이드 및 이를 함유하는 전구체를 섭취하였을 때 어떠한 형태로 흡수되어 최종적으로 어떤 생리활성을 나타내는가 하는 점이다. 지금까지 단백질 섭취 시 소화관내에서 아미노산으로 분해되어 흡수된다고 생각되어졌으나, 여러 사전 보고(30)에서 다수의 펩타이드가 소화관내에서의 분해나 장관흡수라는 장벽을 넘어 통과됨이 밝혀졌다. 또한 아미노산보다는 dipeptide 또는 tripeptide의 흡수가 효과적이었으며 흡수된 아미노산의 pattern도 유리아미노산을 혼합하여 투여한 경우보다는 펩타이드의 형태가 우세하다는 결론에 이르고 있다(31,32). 이는 인체 내에서 소화된 단백질은 주로 저분자량의 펩타이드 형태로 소장점막에 있는 펩타이드 수용체를 통하여 흡수됨이 밝혀진 후 더욱 설득력을 얻고 있다(33). 하지만, 저분자량의 펩타이드가 소화 및 흡수가 용이하더라도 여러 방법에 의해 생산된 펩타이드 섭취 시 그 활성여부는 여전히 의문이다. 이유는 단백질유래의 기능성 펩타이드는 protease류에 의해 분해되는데 활성부위 전후에 protease 절단부위가 없는 경우는 활성을 가지는 아미노산 서열과는 전혀 다른 아미노산 서열을 나타낼 수 있기 때문이다. 이와 같이 본 연구에서도 AS·AF군은 아미노산을 혼합하여 공급하였기 때문에 펩타이드 형태에 비해 체내 흡수가 불리하였고, 비록 PS·PF군은 저분자량의 펩타이드 형태로서 흡수는 용이하였을지 모르나 효소의 기질특이성에 기인한 규칙적인 아미노산 서열로 인해 생리활성을 지니는 아미노산 서열을 가지지 못했기 때문에 세라마이드 함량을 정상수준으로 올려주지 못한 것으로 여겨진다.

이후 세라마이드 총 함량이 정상대조군 및 아토피 대조군에 비해서도 현저히 낮은 PS·PF군과 AS·AF군의 다른 결과는 제시하지 않았다.

SPT의 mRNA 및 protein의 발현

SPT의 mRNA 및 protein의 발현은 housekeeping gene에 의해 정량하여 정상대조군인 C군을 기준으로 % control로 표시하여 Fig. 3에 나타내었다. 아토피 피부염이 유발되어 피부보습 및 장벽기능이 손상되어있는 CA군이 정상대조군인 C군에 비해 SPT의 mRNA와 protein의 발현이 유의적으로 증가하였다. 이는 중 파장자외선(UVB) 노출에 의한 표피 손상 시 세라마이드 합성효소인 SPT mRNA와 protein 발현의 증가함을 보고한 Farrell 등(34)의 연구 보고와 일치하는 결과로서 아토피 피부염 유발로 인한 손상된 NC/Nga mice 피부의 장벽기능을 보완하기 위해 세라마이드의 합성이 일어나고 있음을 의미한다.

반면, sericin을 식이 첨가한 S군은 SPT의 mRNA 및 protein 발현이 정상대조군인 C군에 비해 유의적으로 낮았다. 이는 Elias와 Feingold(35)가 표피의 지질을 제거하여 피부장벽을 손상시킨 후 피부 표면을 공기와 물이 통하지 않는 막으로 밀봉하여 장벽기능을 보완한 경우 지질의 생합성이 증가하지 않았음을 보고한 것과 일치하는 결과로서 sericin의 식이공급이 손상된 표피의 장벽기능을 보완해주었기 때문에 생합성은 불필요했을 것으로 여겨진다. 하지만, SPT에 의한 생합성이 일어나지 않았음에도 불구하고 S군의 세라마이드 총 함량이 증가하였다. 이는 생합성 경로 이외에 표피의 과립층에 다량 존재하는 sphingomyelin과 glucosylceramide에서 sphingomyelinase 및 β-glucosylcerebrosidase에 의해 전환될 수 있음을 보고한 Holleran 등(36)과 Takagi 등(37)의 연구와 특히, 각질층에 존재하는 대부분의 세라마이드는 sphingomyelin과 glucosylceramide에서 전환되어 축적된 것임을 보고한 여러 사전보고(36-39)에 따라 sphingomyelin과 glucosylceramide가 전환되어 축적된 것으로 생각할 수 있으나, 이에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ceramidase의 mRNA 및 protein 발현

Ceramidase의 mRNA 및 protein의 발현은 housekeeping gene에 의해 정량하여 정상대조군인 C군을 기준으로 % control로 표시하여 Fig. 4에 나타내었다. Ceramidase는 아토피 피부염이 유발된 피부에서 세라마이드의 함량이 감소되는 하나의 기전중의 주요 효소로서 받아들여지고 있다(7,11). 아토피 대조군인 CA군은 ceramidase mRNA 발현 및 protein의 발현이 정상대조군인 C군 비해 현저히 높아 CA군은 SPT에 의한 세라마이드의 활발한 합성이 일어남에도 불구하고 세라마이드의 분해로 인해 피부에서 그 기능을 수행할 수 없었음을 의미한다.

반면, S군의 ceramidase mRNA 및 protein의 발현은 CA

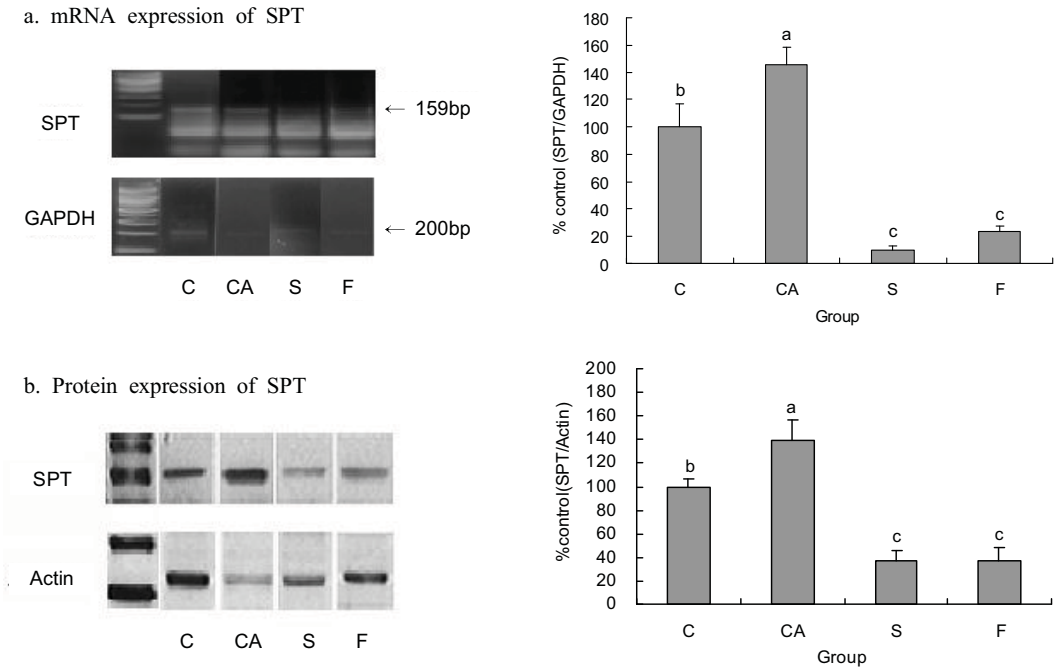

Fig. 3. mRNA expression (a) and protein expression (b) of serine palmitoyltransferase (SPT) in the Epidermis of BALB/c mice (gorup C) and NC/Nga mice fed the control diet (group CA), crude sericin supplemented (group S) or crude fibroin supplemented diet (group F).
Values are mean±standard error (n=10). Mean with different letters differ at $p<0.05$.

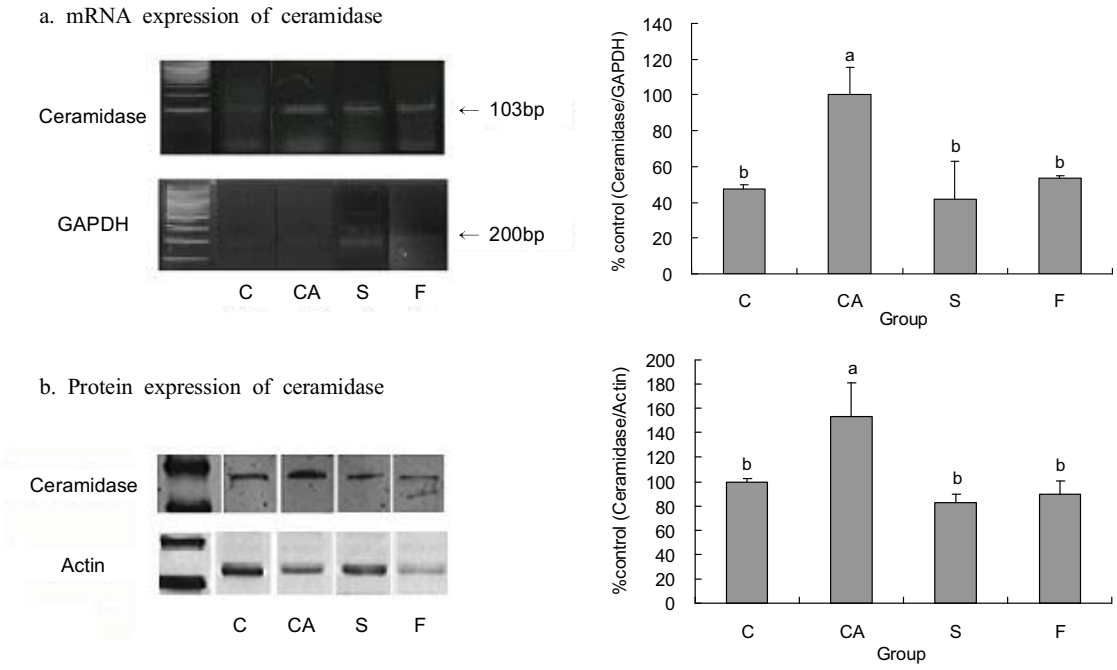

Fig. 4. mRNA expression (a) and protein expression (b) of ceramidase in the epidermis of BALB/c mice (group C) and NC/Nga mice fed the control diet (group CA), crude sericin supplemented (group S) or crude fibroin supplemented diet (group F).
Values are mean±standard error (n=10). Mean with different letters differ at $p<0.05$.

군에 비해서는 현저히 낮아 세라마이드가 ceramidase에 의해 분해되지 않고 표피에서 그 역할을 수행한 것으로 여겨진다. 하지만, F군은 SPT와 ceramidase의 mRNA 발현 및 protein의 발현이 S군과 같은 양상을 보였으나, 정상대조군인 C군 수준이상으로 세라마이드 함량을 올려주지 못한 것은 fibroin(F식이)에 함유되어있는 serine의 함량이 약 12% (12.48 g/kg diet)로 S 식이(약 31%, 14.31 g/kg diet)의 serine의 함량에 비해 낮아, 아토피 피부염으로 인해 손상된 피부의 장벽기능을 완벽히 보완할 수준의 양은 아닌 것으로 여겨진다. 또한, 아토피 피부염환자의 손상된 표피에서 sphingomyelin deacylase(SM deacylase)의 활성을 유의적으로 높여 sphingomyelin 및 glucosylceramide가 세라마이드로 전환되는 것을 저해한다는 Hara 등(38)의 연구 결과는 본 연구에서 표피의 과립층에서 SM deacylase에 의해 세라마이드로의 전환이 저해되었을 가능성도 있어, 이에 대한 추후 연구를 통해 SM deacylase의 발현정도의 확인이 필요할 것으로 생각되어진다.

비록 fibroin을 식이 첨가한 F군이 sericin을 식이 첨가한 S군 수준은 아니지만 세라마이드 함량을 어느 정도 증가시킨 것과 sericin에 의한 정상수준이상의 세라마이드 함량 증가는 실크단백질(sericin 및 fibroin)에 함유되어있는 일정 수준이상의 serine 함량이 피부의 장벽기능을 보완하여 피부 세라마이드 함량에 긍정적인 영향을 미침을 의미한다.

이상을 종합하면, 세라마이드 총 함량이 감소되어있는 아토피 피부염 동물모델에 serine이 다량 함유되어있는 실크단백질 sericin을 공급에 의해 증가되었는데, 이는 serine이 그 자체로서 보습기능을 하여 표피의 장벽기능을 보완하여 SPT에 의한 생합성은 불필요하였으며, ceramidase에 의한 세라마이드 분해는 정상수준이하로 억제하여 세라마이드의 생성보다는 분해 억제를 통한 것으로 보여진다. 증가된 세라마이드 함량에 대한 더 명확한 기전을 확립하기 위해서는 표피의 과립층에서 세라마이드 전환에 관여하는 주 효소인 SM deacylase와 sphingomyelinase 및 β-glucosylcerebrosidase에 대한 추후의 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 생각되어지나, 본 연구에서 제시된 sericin의 식이 섭취 후 증가된 세라마이드 함량은 sericin의 피부 보습 증진을 위한 건강기능식품 소재로의 개발 가능성을 제안한다.

요 약

본 연구에서는 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에 실크단백질 sericin과 fibroin을 식이 공급 후 피부의 세라마이드 함량 및 관련인자 발현 변화를 정상대조군인 BALB/c mice 및 아토피 피부염 대조군과 비교·분석하였다. 세라마이드 함량은 아토피 대조군인 CA군이 정상대조군 C군보다 현저히 낮았으나, 정제된 건조 분말을 별다른 처리 없이 그대로 실크단백질 sericin을 식이공급한 S군은 정상대조군인 C군 이상의 수준으로 높였으며, 실크단백질 fibroin(F군)은 세라마이드 함량을 정상대조군 수준이상으로 올려주지는 못하였다. 세라마이드 합성효소인 SPT의 mRNA 및 protein 발현은 아토피 대조군인 CA군은 정상대조군인 C군보다 높았으나, 실크단백질 공급군인 S군 및 F군은 모두 정상대조군 C군보다 현저히 낮았다. 반면, 세라마이드 분해효소인 ceramidase의 mRNA 및 protein 발현은 아토피 대조군인 CA군은 정상대조군인 C군보다 높았으나, 실크단백질을 식이섭취한 S군 및 F군에서는 정상대조군인 C군과 유사한 수준으로 CA군에 비해서는 유의적으로 낮았다. 결론적으로 실크단백질 sericin의 10주간 식이섭취는 아토피 피부염 동물모델 NC/Nga mice 표피의 세라마이드 함량을 정상대조군 수준 이상으로 증가시켰으며, 궁극적으로 표피의 장벽기능을 정상대조군의 수준으로 변화시켰다. 이는 serine이 다량 함유되어있는 실크단백질 sericin을 공급에 의해 증가되었는데, serine은 그 자체로서 보습기능을 하여 표피의 장벽기능을 보완하였기 때문에 SPT에 의한 생합성은 불필요하였으며 또한, ceramidase에 의한 세라마이드 분해를 정상수준이하로 억제하여 세라마이드의 생성보다는 분해억제에 의한 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 (주)뉴트렉스테크놀러지에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Loden M. 2003. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment dry skin barrier disorder. *Am J Clin Dermatol* 4: 771-788.
2. Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. 2003. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 48: 352-358.
3. Law S, Wetrz PW, Swartzendruber DC, Squier CA. 1995. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. *Arch Oral Biol* 40: 1085-1091.
4. Dowing DT. 1992. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 33: 310-313.
5. Schurer NY, Elias PM. 1991. Biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 24: 27-56.
6. Holleran WM, Mao-Qiang M, Gao WN, Lee JM, Elias PM. 1991. Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function, inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest* 88: 1338-1345.
7. Yada Y, Higuchi K, Imokawa G. 1995. Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin. *J Biol Chem* 270: 12677-12684.

8. Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S. 1998. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 78: 27-30.
9. Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Woo SO, Han SM, Kim JH. 2003. Studies on industrial utilization of silk protein. *Food Science and Industry* 36: 25-37.
10. Koyame J, Horii I, Kawasaki K, Nakayama Y, Morikawa M, Mitsui T. 1984. Free amino acids of stratum corneum as a biochemical marker to evaluate dry skin. *J Soc Cosmet Chem* 35: 183-195.
11. Ohnishi Y, Okino N, Ito M, Imayama S. 1999. Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 101-104.
12. Yamamura T, Tezuka T. 1989. The water-holding capacity of the stratum corneum measured by 1H-NMR. *J Invest Dermatol* 93: 160-164.
13. Bikowski J. 2001. The use of therapeutic moisturizers in various dermatologic disorders. *Cutis* 68: 3-11.
14. Aioi A, Tonogaito H, Suto H, Hamada K, Ra CR, Ogawa H, Maibach H, Matsuda H. 2001. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 144: 12-18.
15. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. 1991. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 96: 523-526.
16. Seong K, Kim JY, Lee JH, Park SK, Cho Y. 2003. Arctii Fructus is a prominent dietary source of linoleic acid for revrsing epidermal hyperproliferation of guinea pigs. *Korean J Nutr* 36: 819-827.
17. Chung S, Kong S, Seong K, Cho Y. 2002. γ-Linoleic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs. *J Nutr* 132: 3090-3097.
18. Taniguchi Y, Kohno K, Inoue SI, Koya MS, 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.
19. Masumoto M, Kotani M, Fujita A, Higa S, Kishimoto T, Suemura M, Tanaka T. 2002. Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis model, NC/Nga. *Br J Dermatol* 146: 221-227.
20. Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Kim JH. 2001. Bioactive and skin-compatible properties of silk sericin. *Korean J Seric Sci* 43: 109-115.
21. Engel W. 1987. The effect of sericin shampoos. *Arztl Kosmetol* 17: 91-110.
22. Kato, N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. 1998. Silk protein, sericin inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotech Biochem* 62: 145-147.
23. Madyarov S, Lee KG, Yeo JH, Nam J, Lee YW. 2000. Improved method for the preparation of silk fibroin hydrolysates. *Korean J Seric Sci* 41: 102-110.
24. Tohyama J, Oya Y, Ezoe T, Vanier MT, Nakayasu H, Fujita N, Suzuki K. 1999. Ceramide accumulation is associated with increased apoptotic cell death in cultured fibroblasts of sphingolipid activator protein-deficient mouse but not in fibroblasts of patients with Farber disease. *J Inher Metab Dis* 22: 649-662.
25. Fiat AM, Migliore SD, Jolles P, Drouet L, Bal dit Sollier C, Caen J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J Dairy Sci* 76: 301-310.
26. Holleran WM, Feingold KR, Mao-Qoang M, Gao WN, Lee JM, Elias PM. 1991. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J Lipid Res* 32: 1151-1158.
27. Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. 1994. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103: 731-741.
28. Kim HA, Park KH, Yeo JH, Lee KG, Jeong DH, Kim SH, Cho YH. 2006. Dietary effect of silk protein sericin or fibroin on plasma and epidermal amino acid concentration of NC/Nga mice. *Korean J Nutr* 39: 520-528.
29. Tabachnick J, Labadie JH. 1970. Studies on the biochemistry of epidermis. *J Invest Dermatol* 54: 24-31.
30. Hara H, Funabiki R, Iwata M, Yamazaki K. 1894. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J Nutr* 114: 1122-1129.
31. Groff JL, Gropper SS. 2000. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 3rd ed. Wadsworth and Thomson learning, Connecticut. p 178-204.
32. Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. 2001. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2181-2186.
33. Ganapathy V, Leibach FH. 1996. Peptide transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 395-400.
34. Farrell AM, Uchida Y, Nagiec MM, Harris IR, Dickson RC, Eloas PM, Holleran WM. 1998. UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *J Lipid Res* 39: 2031-2038.
35. Elias PM, Feingold KR. 1992. Lipids and the epidemal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. *Semin Dermatol* 11: 176-182.
36. Holleran WM, Takagi Y, Imokawa G, Jackson S, Lee JM, Elias PM. 1992. Beta-glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relation to differentiation. *J Lipid Res* 33: 1201-1209.
37. Takagi Y, Kriehuber E, Imokawa G, Elias PM, Holleran WM. 1990. Beta-glucocerebrosidase activity in mammalian stratum corneum. *J Lipid Res* 40: 861-869.
38. Hara J, Hoguchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G. 2000. High expression of sphingomyelin deacylase is important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 115: 406-413.
39. Brwser PA, Gray GM. 1978. Sphingomyelinase in pig and human epidermis. *J Invest Dermatol* 70: 331-335.

(2007년 1월 23일 접수; 2007년 4월 26일 채택)