

노화에 따른 무모 생쥐의 각질층 상태 변화

박선규, 김영득, 박지호, 김진준, 강세훈
(LG 생활건강 화장품 연구소)

Alterations of stratum corneum associated with aging in hairless mouse

Sun -gyoo Park, Young-deuk Kim, Ji-Ho Park, Jin-jun Kim, Se-hoon Kang
(Cosmetics research Center, LG Chemical Ltd.)

요 약

최근 *in vitro* 각질층 모델은 TEWL, 수분보유능등 피부의 상태변화를 측정하기 위한 유용한 수단으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 노화에 따른 각질층의 상태 변화를 조사하기 위하여 *in vitro* 각질층 모델을 이용한 TEWL 측정, 각질층의 지질분석, 최외각 각질세포의 크기를 측정하였다. 실험 결과, 8 주령 무모생쥐의 전체지질은 82 주령 무모생쥐보다 30%가량 많았으나 TEWL은 8 주령 무모생쥐가($2.05 \pm 0.16 \text{g/m}^2/\text{h}$) 82 주령된 무모생쥐($0.97 \pm 0.13 \text{g/m}^2/\text{h}$) 보다 더 높았다. 또한 최외각 각질세포의 크기는 82 주령의 무모생쥐($755 \pm 56 \mu\text{m}^2$) 가 8 주령($559 \pm 65 \mu\text{m}^2$) 보다 더 컸다. 따라서 각질층의 장벽기능은 노화에 따라 오히려 강화되고 있으며 이는 노화에 따른 피부의 활성저하에 대응한 일련의 현상으로 간주된다.

1. 개 요

모든 생물에 존재하는 막구조는 생존에 필수적이며, 특히 피부는 고등생물의 몸체를 둘러싸고 있는 다기능 막구조로서 사람의 경우 인체에서 가장 큰 조직중 하나이다. 피부의 최외각층에 위치한 각질층은 외부의 물리, 화학, 생물학적인 손상으로부터 피부를 보호하고, 체내의 수분증발을 억제하는 장벽 역할을 하여 피부의 건조를 막고 정상적인 생명현상을 유지시켜 줄 수 있는 환경을 제공하는 중요한 역할을 한다^{1,2}. 각질층은 주로 keratin으로 채워져 있는 죽은 세포(각질세포)와 이들 세포 사이의 공간을 메꾸어 주는 지질로 이루어져 있으며 이 외에 각질 세포간을 연결시켜 주는 단백질(Desmosome), 각질층내 수분을 잡아주는 천연보

습인자(Natural Moisturizing Factor), 각질세포를 둘러싸고 있는 각화된 막구조(Cornified envelop), 각질층의 성숙과 박리에 관여하는 각종 효소들이 존재한다^{3~5}.

일반적으로 각질층은 그 구조와 장벽기능 수행이 전체적으로 유사한 것으로 알려져 왔으나 각질층의 최외각부(outer stratum corneum)와 basal layer에 근접한 각질층(inner stratum corneum) 간에는 형태변화, 수분보유능, 각종 이온의 분포, 단백질과 지질의 조성 등이 큰 차이를 보이고 있으며⁶, 이는 각질층이 하부에서 상부로 올라가면서 물리, 화학적 변화를 통한 maturation 과정이 있음을 암시한다.

따라서 각질층은 단순히 죽은 세포와 지질로 구성되어 있는 죽은 조직이라기 보다는 끊임없이 변화하면서^{7,8,9} 체내의 생명 현상이 원활히 이루어 질 수 있도록 보호해 주는 매우 중요한 기능을 하고 있으며 특히 체내 수분의 손실을 막는 기능은 각질층의 가장 중요한 역할중 하나이다.

각질층의 수분증발억제 기능은 각질세포 사이에 존재하는 지질에 크게 의존한다. 이들 지질은 과립층에 다량 존재하는 층판소체(lamella body)로 부터 유래하여 과립층과 각질세포사이로 분비되고 각질세포 사이에서 층판상 구조(lamellar sheet)를 이루어 수분증발에 대한 장벽역할을 한다. 이들 지질은 생체막에 존재하는 지질 조성과는 달리 주로 비극성지방질, 세라마이드, 콜레스테롤 등으로 구성되어 있다¹⁰. 그러나 지질 자체만으로는 장벽역할을 할 수 없고 각질세포와 지질간의 상호작용이 필수적이며 지질의 배열도 매우 중요하다.

비록 각질층내 지방질은 전체 무게비의 10% 정도를 차지하지만 이들은 수분증발을 억제하는 장벽기능에 필수적이며, 이들 지질 조성의 변화는 표피를 통한 수분증발(TEWL, Transepidermal Water Loss)에 큰 영향을 미친다. Grubauer등^{11,12}에 따르면 아세톤으로 각질층 지질의 일부를 제거하면 장벽 기능이 현저히 감소하여 TEWL이 증가되는데 이를 신호로 인식하여 표피로부터 지방질 합성이 촉진되고 장벽 기능이 원래대로 회복된다고 한다. 이때 수분증발을 인위적으로 억제시키면(차단막으로 피부를 감싸 수분증발이 일어나지 않게함) 표피로부터의 지질 합성이 일어나지 않는다. 이는 수분증발량에 따라 표피의 지질 합성이 달라짐을 암시하고 있으며, 각질층을 통한 TEWL은 피부의 장벽기능에서 가장 중요한 요소임을 알 수 있다.

본 연구에서는 무모 생쥐의 각질층 분리후 in vitro 각질층 모델을 이용하여 주령 및 지질 추출에 따른 TEWL의 변화와 최외각 각질세포의 크기변화를 측정하여 노화에 따른 각질층의 상태변화를 살펴보았다.

2. 실 험

2.1 각질층분리

무모생쥐 등 부위의 피부를 2.5% 트립신 용액에 3시간동안 반응(42°C incubator)시킨 후 각질층을 분리하여 PBS완충용액에 30분간 방치하였다. 그리고 각질층 하부에 잔존하는 과립층을

제거한 후 filter paper위에 각질층을 옮긴후 dessicator에서 24시간 건조시켰다.

2.2 지질추출 및 TLC분석

각질층내 지질은 chloroform:methanol(1:1)로 40분간 추출하였으며, 최종 300 μ l로 농축하고 이중 20 μ l를 TLC에 점적하였다(Camag Auto-TLC sampler).

TLC 전개는 3단계의 solvent system을 사용하였으며, 각각의 solvent system은 다음과 같다. solvent system I, chloroform : acetone : methanol = 76 : 4 : 24, solvent system II, chloroform : ethyl acetate : ether : methanol = 76 : 20 : 6 : 2, solvent system III, petroleum ether : ether : acetic acid = 80 : 20 : 1.

각각의 용매조건으로 전개한 TLC는 건조후 charring solution(10% cupric acetate in 8% phosphoric acid)으로 발색시켰고, 각각의 chromatogram들은 densitometer(Shimatz, CS-2000)를 이용하여 정량하였다.

2.3 in vitro TEWL측정

Dessicator에서 건조시킨 각질층을 항온항습조건(온도 22 $^{\circ}$ C, 상대습도 45%)으로 옮긴후 지름 16mm의 filter paper를 셀로판 피름위에 놓고 PBS 완충용액 50 μ l를 가한 후 각질층이 놓여 있는 filter paper를 올려놓는다. 주변으로 수분의 손실을 차단하기 위하여 접착테이프로 주변을 밀봉하고 Evaporimeter(Servo Med)로 시간경과에 따른 TEWL을 측정하였다(Fig.1).

2.4 각질세포크기 측정

분리된 각질층을 slide glass에 옮긴 후 광학현미경(Metallux 3, Leica)에서 80배 배율로 각질층의 영상을 CCD카메라로 받아 영상분석시스템에서 각질세포의 크기를 측정하였다.

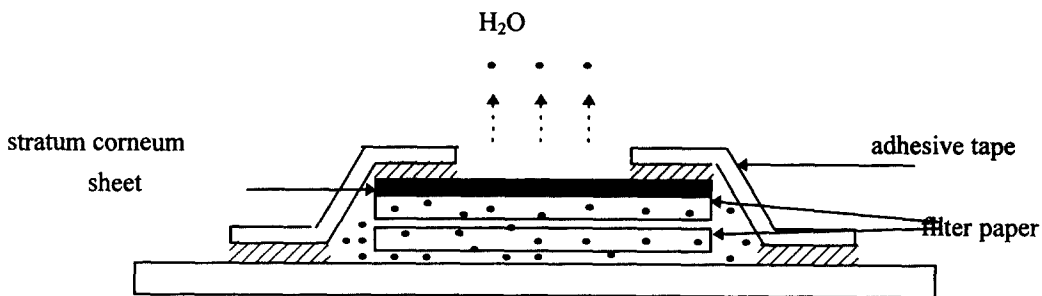


Figure 1. in vitro model of stratum corneum

3. 결과 및 고찰

3.1. 노화에 따른 각질층의 상태변화

분리된 각질층과 whole skin의 TEWL을 측정한 결과는 0.95이상의 높은 상관관계를 보였다(Fig.2). 이는 각질층을 분리하는 과정중 장벽기능이 거의 손상되지 않았음을 보여주고 있으

며, 각질층은 피부에 존재할 때나 인위적으로 분리시켜도 장벽기능의 수행에 있어서 동일함을 보여준다.

노화 정도에 따른 각질층의 수분증발량을 24시간동안 측정한 결과, 8주령의 각질층은 $2.05 \pm 0.16 \text{g/m}^2/\text{h}$ 의 TEWL을 보인 반면 82주령의 각질층은 $0.97 \pm 0.13 \text{g/m}^2/\text{h}$ 의 TEWL을 보여 젊은 각질층보다 늙은 각질층이 낮은 TEWL을 보였다(Fig.3). 또한 whole skin에서도 분리된 각질층과 비슷한 TEWL을 보였으며 47주령의 각질층은 8주와 82주의 중간수치인 $1.5 \pm 0.15 \text{g/m}^2/\text{h}$ 의 TEWL을 보였다. 이는 노화가 진행되면서 각질층의 TEWL은 감소되고 있음을 보여주고 있으며 일반적으로 노화피부의 활성도와 수분보유능이 낮은것을 고려할때 TEWL의 감소는 피부의 수분증발량을 최소화 시키려는 일종의 방어 시스템을 암시한다.

3.2. 주령에 따른 최외각 각질세포의 크기변화

노화각질층의 TEWL감소원인을 규명하기 위하여 먼저 각질층의 주요 골격인 각질세포의 크기를 살펴보았다. 분리된 각질층을 현미경으로 80배 확대하여 영상분석시스템에서 각질세포의 크기를 측정한 결과 8주령의 각질세포는 $559 \pm 65 \mu\text{m}^2$ 인 반면 82주령은 $755 \pm 56 \mu\text{m}^2$ 를 보여 늙은 각질층의 최외각 각질세포가 컸으며(Fig.4) 각질세포크기와 TEWL의 상관관계를 살펴본 결과 Fig.5에서 보는 바와 같이 각질세포가 클수록 TEWL은 낮았다.

3.3. 주령에 따른 각질층내 지질변화

Chloroform과 methanol을 1:1로 혼합한 용매에 8주령 및 82주령의 각질층의 지질을 추출하여 TLC로 분석한결과 총지질양은 82주령의 각질층이 8주령보다 약 30%가량 적었다(Table 1). 이는 감소된 TEWL이 신호가되어 표피에서의 지질합성이 감소된 것으로 보이며 Grubauer등^{11,12}의 결과와 일치한다.

3.4. 지질 추출에 따른 TEWL의 변화

지질을 추출하는 용매시스템을 변화시키면서 TEWL을 측정한결과 주로 비극성지질을 추출하는 hexane사용시 젊은 각질층과 늙은 각질층의 TEWL은 정상각질층에 비해 각각 2.42배 및 2.37배가 증가하여 각질층의 지질중 약 70%이상을 차지하는 비극성지질은 수분증발억제에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다(Fig.6). 또한 methanol로 지질을 추출한 결과 젊은 각질층과 늙은 각질층의 TEWL은 모두 3.6배가 증가하여 hexane추출보다 높은 TEWL을 보였다(Fig.7). Chloroform과 methanol 혼합용매로 추출시 젊은 각질층과 늙은 각질층 모두 각질층이 없는 filter paper와 유사한 TEWL을 보여 chloroform과 methanol 혼합용매는 지질을 완전히 추출하는 것으로 보인다(Fig.8). 상기 용매시스템에서 추출된 지질을 TLC로 분석한 결과 ceramide류는 모든 용매시스템에서 추출되었으나 hexane과 methanol에서는 완전히 추출되지 않았고 chloroform과 methanol 혼합용매에서는 완전히 추출되었다(data are not shown). 따라서 ceramide는 각질층의 장벽기능수행에 필수적인 지질중의 하나이다.

Abstract

Recently, in vitro stratum corneum(SC) model was a useful tool to evaluate the skin condition such as transepidermal water loss(TEWL), skin hydration and etc.. In this study to evaluate the alterations of SC with aging in hairless mouse, we measured TEWL using in vitro SC model, SC lipid, and outer corneocytes area. Although the total SC lipid was rich about 30% in 8 week old mouse compared with that of 82 week old mouse, the TEWL values were higher in the former($2.05 \pm 0.16 \text{g/m}^2/\text{h}$) than that of the latter($0.97 \pm 0.13 \text{g/m}^2/\text{h}$). The outer corneocytes area was $559 \pm 65 \mu\text{m}^2$ in 8 week old mouse and $755 \pm 56 \mu\text{m}^2$ in 82 week old mouse. So the barrier function was reinforced with aging.

This result suggested that the reinforced barrier function is one of the defense systems against the outer environment and the decreased skin function with aging.

참고 문헌

1. Elias, P.M., and Friend, D.S., The permeability barrier in mammalian epidermis *J. Cell Biol.*, 65, 180-191, 1975
2. Elias, P.M., Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J. Invest Dermatol.*, 80, 44-49, 1983
3. Masayuki Amagai, Adhesion Molecules, I : Keratinocyte-Keratinocyte Interactions ; Cadherins and Pemphigus, *J. Invest Dermatol.*, 104(1), 146-152, 1995
4. Kim B. Yancey, Adhesion Molecules, II : Interactions of Keratinocytes with Epidermal Basement Membrane, *J. Invest Dermatol.*, 104(6), 1008-1014, 1995
5. Rawlings, A.V., Scott, I.R., Harding, C.R., and Bowser, P.A., Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level, *J. Invest Dermatol.*, 103(5), 731-740, 1994
6. Warner, R.R., Bush, R.D., and Ruebusch, N.A., Corneocytes undergo systematic changes in Element Concentrations across the human Inner stratum corneum., *J. Invest Dermatol.*, 104(4), 530-536, 1995
7. Rougier, A., Lotte, C., Corcuff, P., and Maibach, H.I., Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age, and sex in man, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 39, 15-26, 1988
8. Saijo, S., Hashimoto, K., Takahashi, M., and Tagami, H., Functional changes of the Stratum Corneum associated with aging and photoaging, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 379-383, 1991
9. Leveque, J.L., Measurement of Transepidermal Water Loss(Chap.7) Cutaneous Investigation in Health and Disease, Marcel Dekker I.N.C., 135-152, 1989
10. Schurer, N.Y., and Elias, P.M., The Biochemistry and Function of Stratum Corneum Lipids., *Advanced in lipid research*, 24, 27-56, 1991
11. Grubauer, G., Elias, P.M., and Feingold, K.R., Transepidermal Water loss : the signal for recovery of barrier structure and function., *Journal of lipid Research*, 30, 323-333, 1989
12. Grubauer, G., Feingold, K.R., and Elias, P.M., Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function, *Journal of lipid Research*, 28, 746-752, 1987

Table 1. Comparison of lipid composition between young and old mouse(%)

	young mouse	old mouse
Non-polar lipid	4.9	5.2
Free fatty acid	6	6
Cholesterol	1.3	1.2
Ceramide	2.2	1.7
Other ceramide	1	6
Cholesterol sulfate	3	3
Phospholipid	6	4
Total lipid	100(94401*)	100(73501)
* : Total lipid area on TLC plate		

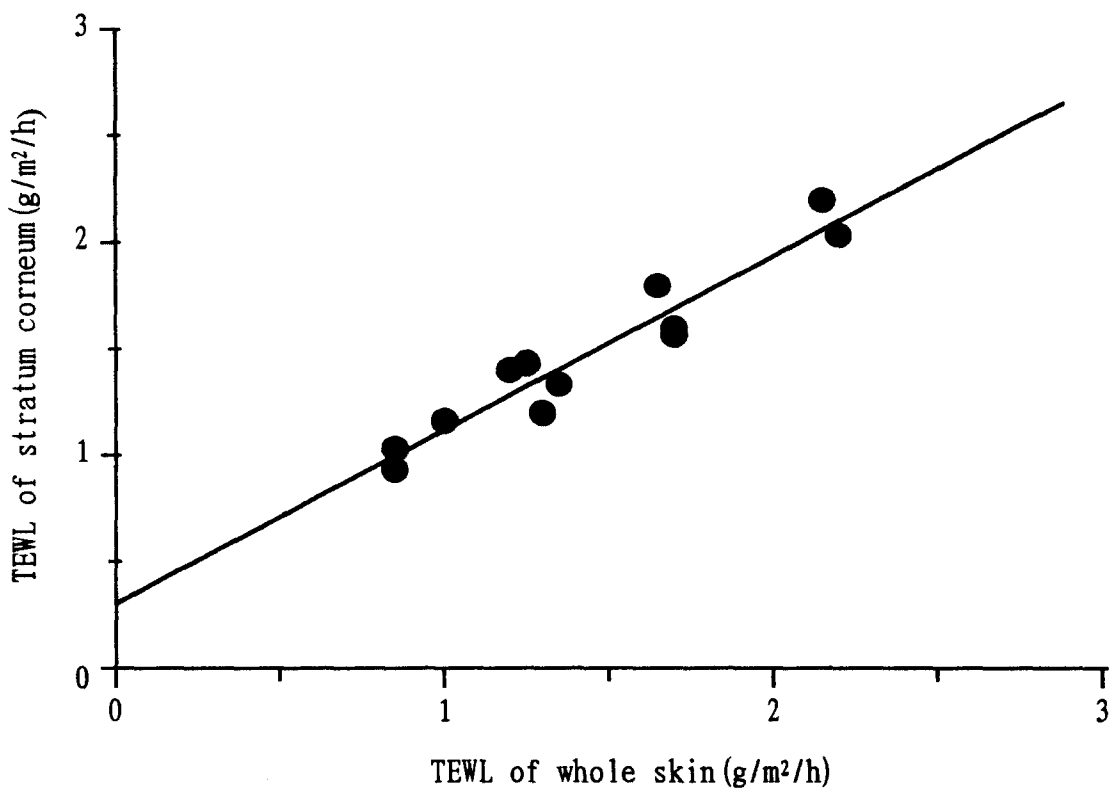


Figure 2. Correlation between TEWL of whole skin and TEWL of stratum corneum (R=0.958)

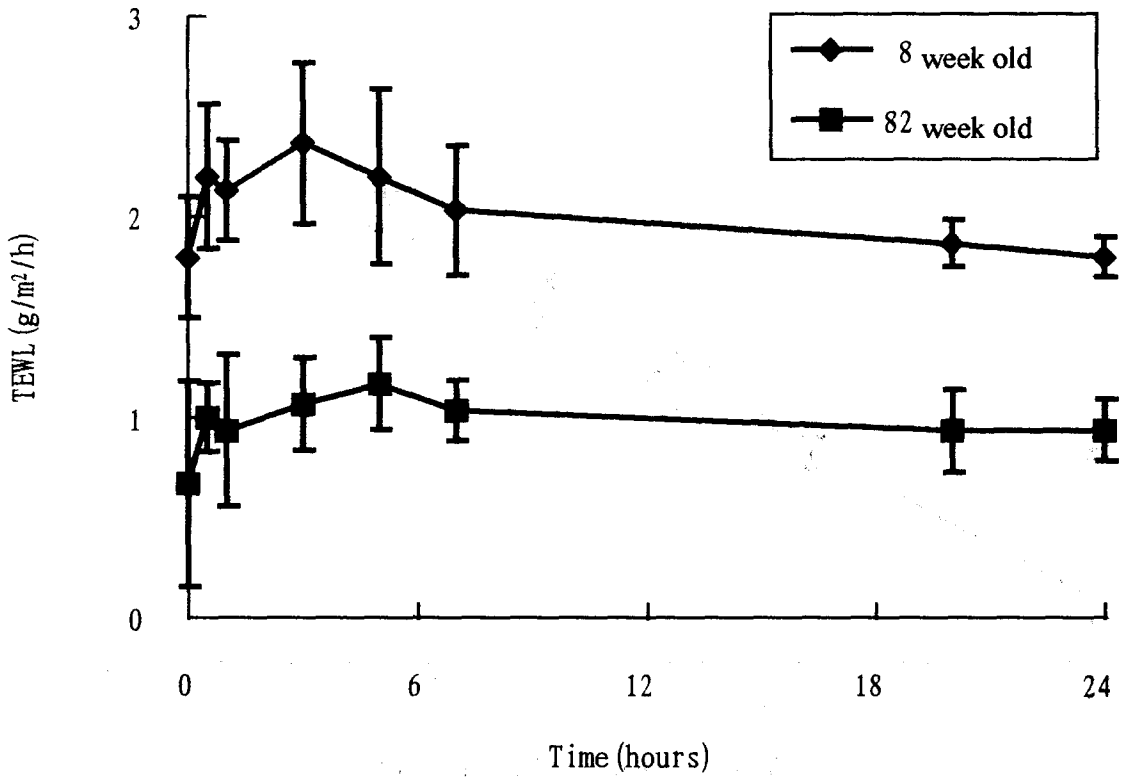


Figure 3. Transepidermal water loss of stratum corneum in 8 and 82 week old hairless mouse

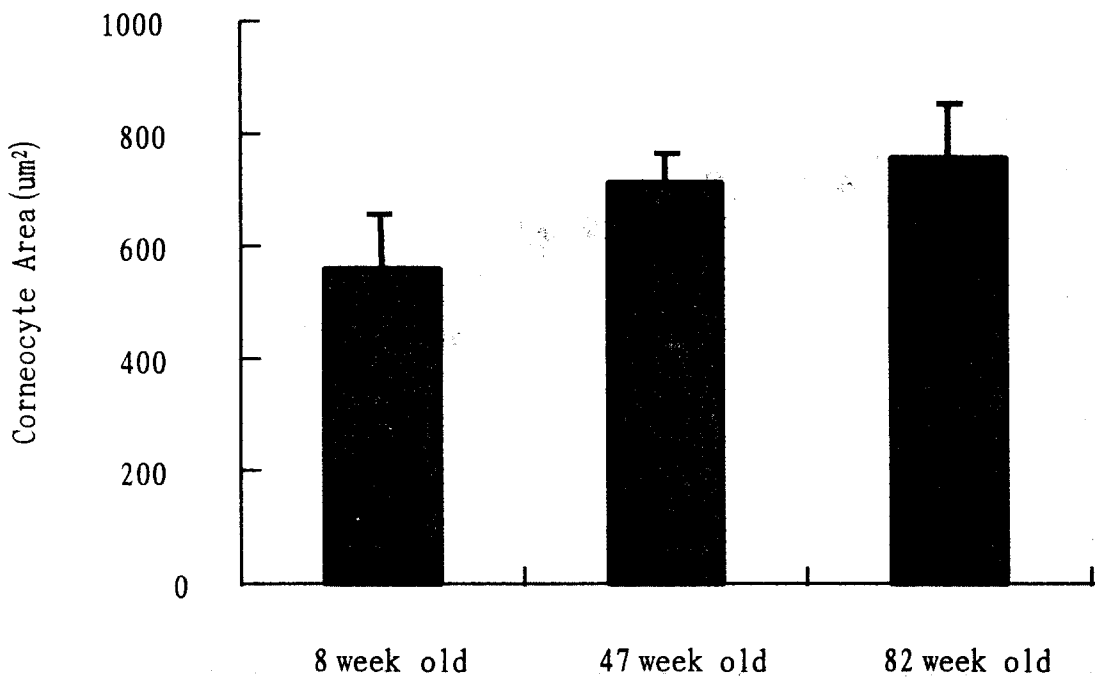


Figure 4. Outermost corneocyte area in 8,47, and 82 week old hairless mouse

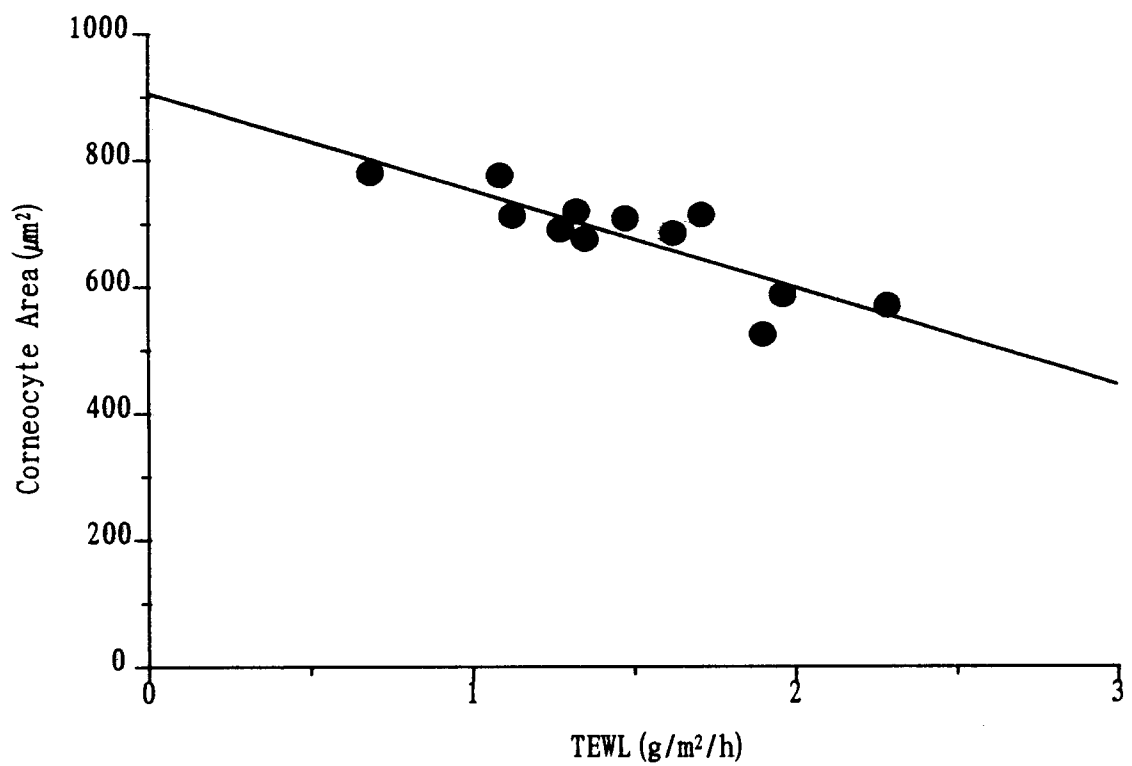


Figure 5. Relationship between corneocyte area and TEWL of stratum corneum (R=0.858)

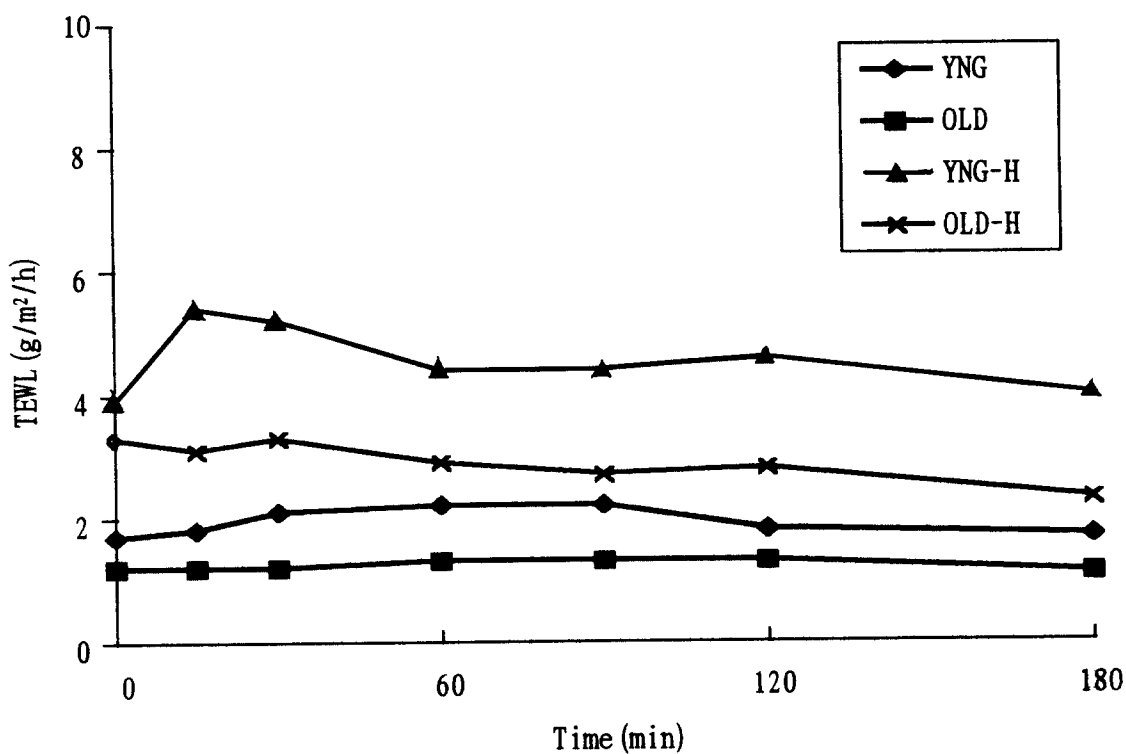


Figure 6. Changes of TEWL in young and old hairless mouse SC following hexane treatment.

YNG : 8 week old hairless mouse

OLD : 82 week old hairless mouse

YNG-H : hexane treated YNG

OLD-H : hexane treated OLD

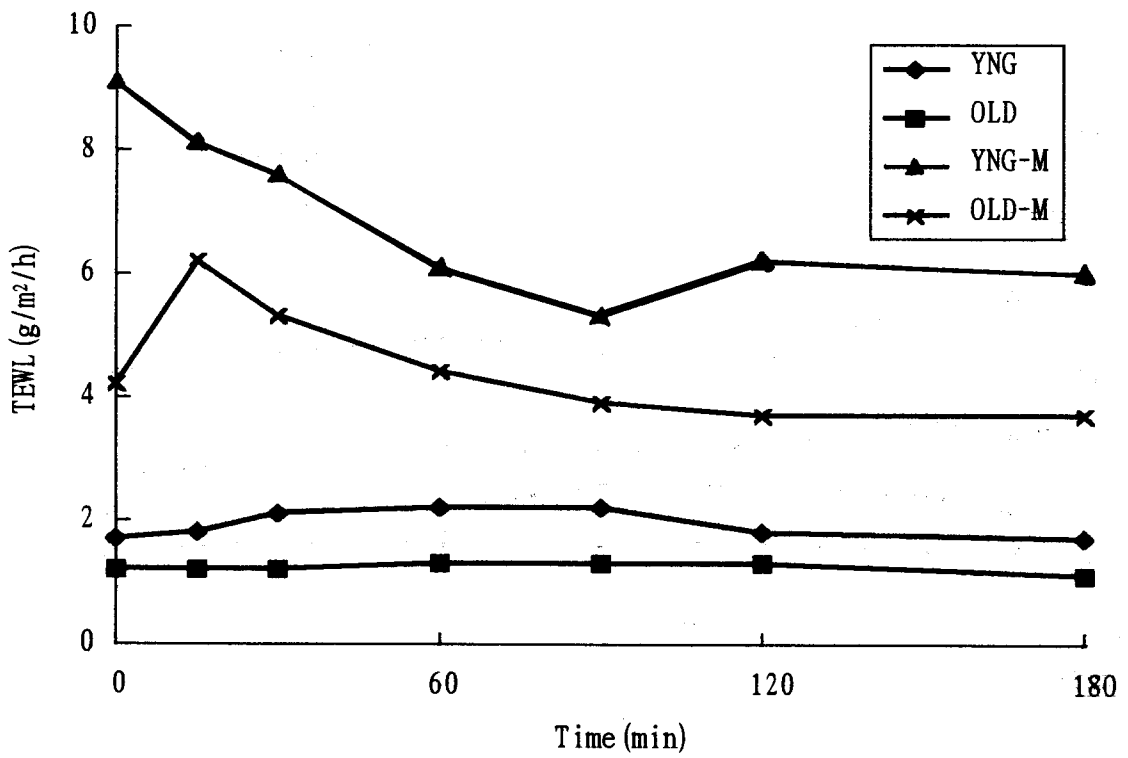


Figure 7. Changes of TEWL in young and old hairless mouse SC following methanol treatment.

YNG : 8 week old hairless mouse OLD : 82 week old hairless mouse
 YNG-M : methanol treated YNG OLD-M : methanol treated OLD

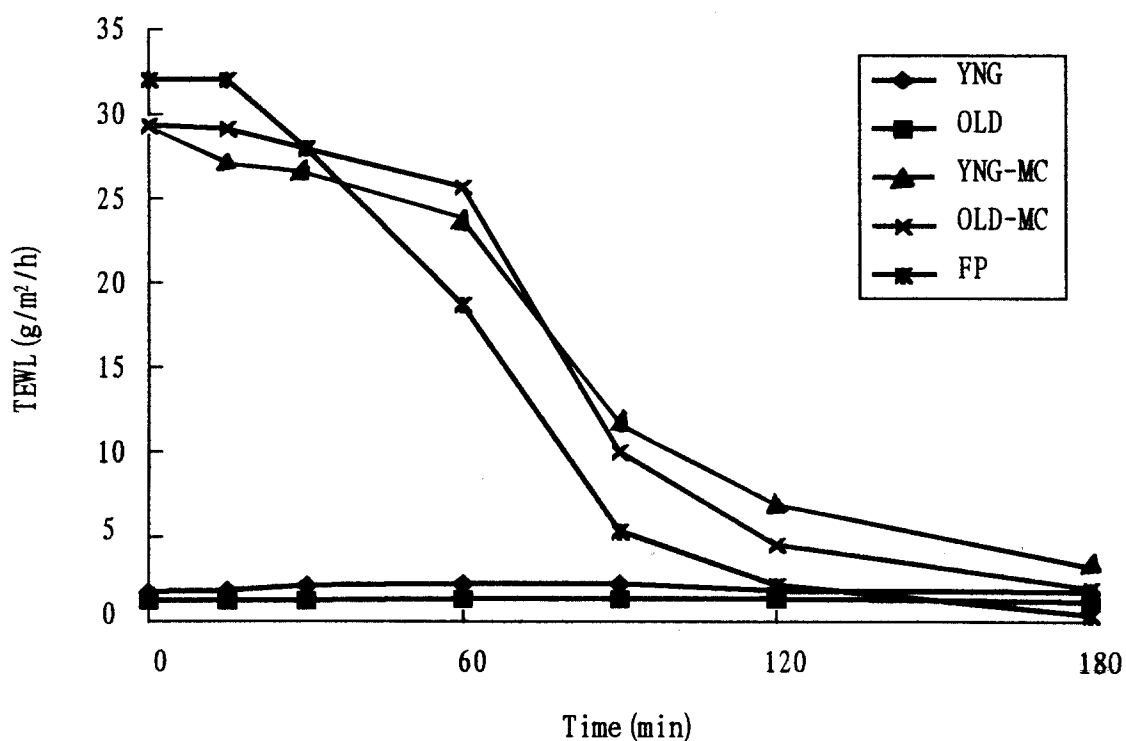


Figure8. Changes of TEWL in young and old hairless mouse SC following chloroform : methanol(1:1) treatment.

YNG : 8 week old hairless mouse OLD : 82 week old hairless mouse

YNG-MC : chloroform:methanol(1:1) treated YNG

OLD-MC : chloroform:methanol(1:1) treated OLD

FP : control filter paper without SC