

**Dietary supplementation of silk protein increases ceramide synthesis and moisturization of skin in the animal model of atopic dermatitis, NC/Nga mice.**

- 실크 단백질의 식이 공급이 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 및 천연 보습인자 (아미노산)의 변화에 미치는 효과 -

조윤희

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

아토피 피부염 환자의 표피에서 피부보습 유지의 기능을 하는 세라마이드와 아미노산, 특히 세린의 수치 감소가 보고되어 있다. 표피에서 단백질 및 인지질의 degradation 과정에서 제공되는 serine은 palmitoyl-CoA의 결합하여 세라마이드를 생성하며, 그 자체로서 자연보습인자의 역할을 한다. 본 연구에서는 serine을 다량 함유한 실크단백질 A (serine: 31%)와 B (serine: 12%)의 식이 급여가 아토피 피부염 동물모델 NC/Nga mice 피부의 보습에 미치는 효과를 살펴보았다. 이를 위하여 10마리의 BALB/c mice를 정상 대조군 (CB군)으로 두었고, 30마리의 NC/Nga mice를 3개 군으로 나누어 아토피 피부염군 (CA군), 실크 단백질 A (A군)와 B (B군)를 각각 1%씩 첨가 조제한 식이로 10주간 사육한 후 경표피 수분 손실량 (Trans Epidermal Water Loss: TEWL)을 측정하고 피부의 세라마이드 함량과 세라마이드 합성에 관련하는 효소인 serine palmitoyl transferase (SPT)와 분해에 관여하는 ceramidase의 mRNA 발현 및 활성을 측정하여 유의성 5% 수준에서 비교하였다. 또한 혈장과 피부 조직에서의 아미노산의 함량 변화를 측정하였다. 표피에서 측정된 TEWL 정도는 CA > B > A = CB 순으로 실크 단백질 B보다 실크단백질 A의 식이 공급에 의해 피부의 경표피 수분 손실이 정상대조군 수준으로 억제되었다. 지질 추출 후 HPLC로 분석한 세라마이드 함량은 정상 대조군과 비교하였을 때 CA군 (73.5%), A군 (116.3%), B군 (70.7%)으로 실크단백질 A 투여군에서 가장 높았고 아토피 피부염군과 실크단백질 B군에서는 유의적으로 낮았다. RT-PCR로 측정된 SPT 효소의 mRNA 발현은 정상대조군에 비해 아토피 피부염군에서 높았으나 실크 단백질 A와 B군에서는 모두 현저히 낮았다. 피부의 생검 조직을 <sup>14</sup>C-serine과 함께 배양한 후 측정된 SPT 효소의 활성 또한 A와 B군에서는 모두 현저히 낮았다. 정상대조군에 비해 아토피 피부염군에서 높았던 ceramidase mRNA 발현은 실크단백질 A와 B의 식이 공급에 의해 정상 수준으로 억제되었다. 이상의 결과는 SPT mRNA의 발현 증가에도 불구하고 감소된 아토피 피부염 동물모델 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 함량은 실크단백질 A의 식이 공급에 의해 증가되었음을 보여준다. A군과 B군 모두 SPT의 mRNA 발현과 활성이 정상 대조군 CB군에 비해 낮았는데, 이는 실크단백질 A와 B에서 공급되는 serine의 양에 상응하는 세라마이드가 생성된 후 SPT 발현과 활성의 down regulation이 이루어진 것으로 여겨지며 실크단백질 B에 함유된 serine의 양은 아토피 피부의 세라마이드 함량을 증가시키기에는 부족하였던 것으로 보여진다. 혈장내 아미노산, 특히 serine과 glycine의 농도는 실크단백질 B군에서 높았으나 피부 조직내의 serine과 glycine 농도는 실크단백질 A군에서 유의적으로 높았다. 따라서 실크단백질 A의 식이 보충은 아토피 피부염 환자의 손상된 표피 장벽의 개선에 도움을 줄 것으로 사료되고, 나아가 아토피 피부염 질환 개선용 건강기능 식품 소재로의 개발 가능성을 시사한다.

**Dietary supplementation of silk protein increases ceramide synthesis and moisturization of skin in the animal model of atopic dermatitis, NC/Nga mice.**

- 실크 단백질의 식이 공급이 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 및 천연 보습인자 (아미노산)의 변화에 미치는 효과 -

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

조윤희

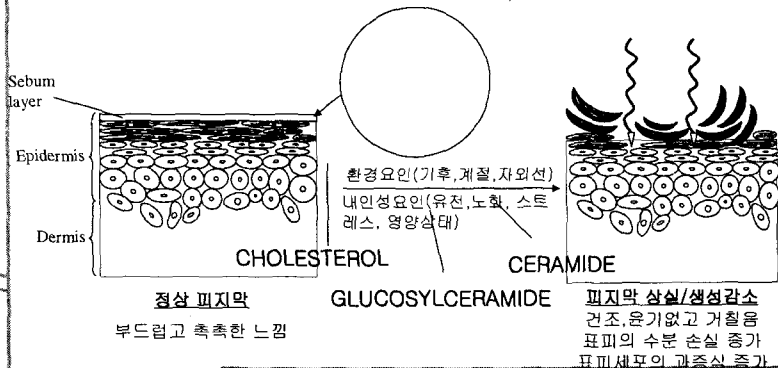
표피의 건조화와 이상 증식 및 염증의 증상을 수반하는 아토피 피부염은 전체 인구의 10~20 %에서 발생하는 대표적인 만성 피부 질환이다.

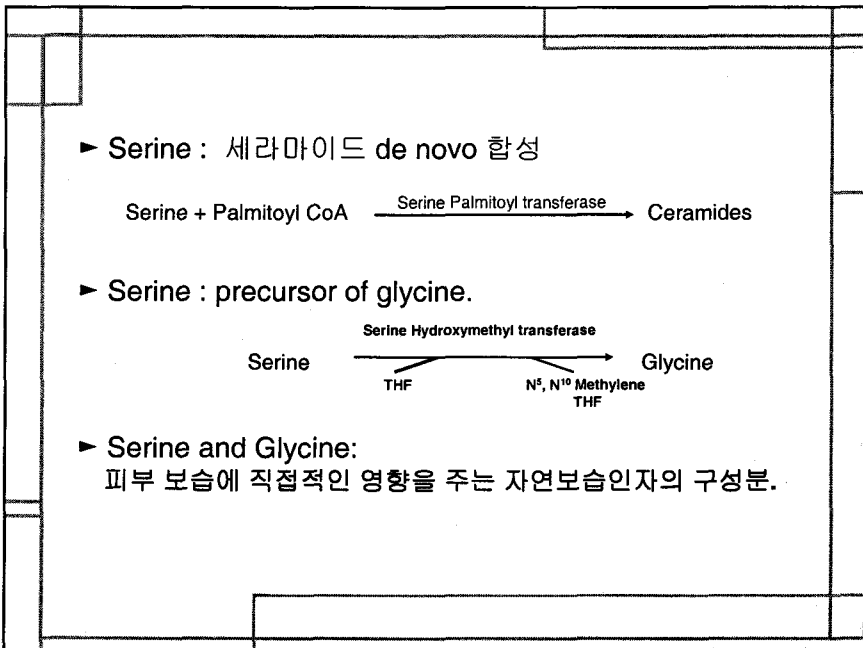
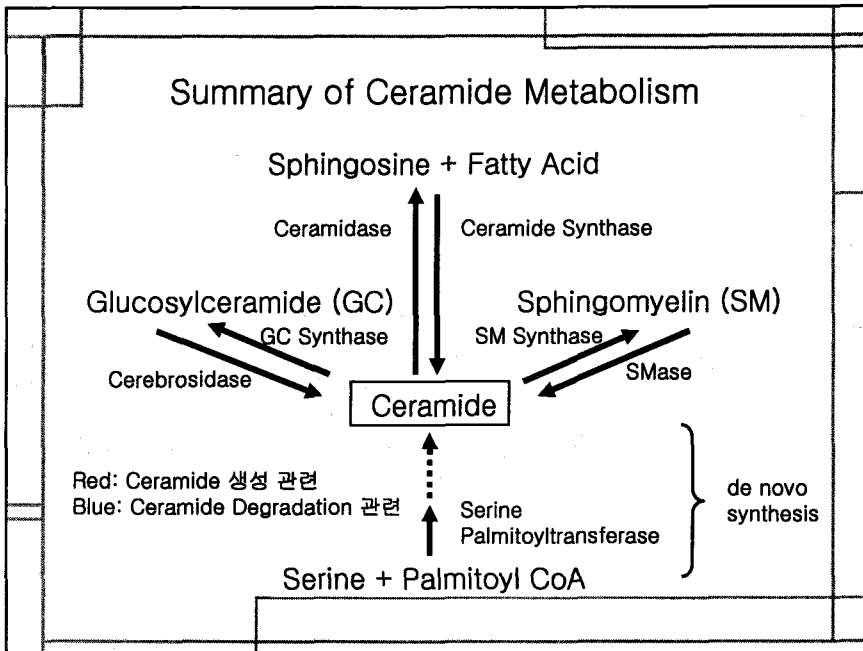
아토피 피부염의 다양한 증상은 피부 장벽 기능의 저하와 관련이 있는 것으로 여겨진다.

각질층에서 지질 혼합체인 피지막의 층상 구조가 손상되어 있는 아토피 피부염은 표피를 통한 수분 증발과 감염으로 인해 표피의 건조화와 과증식 및 염증의 증상이 나타나는 것으로 해석된다.

### 피부 각질층의 지질

- 세라마이드, 지방산, 콜레스테롤 등 intercellular lamellae 구조를 이루고 있는 지질 혼합체
- 인체를 보호하는 장벽 기능을 함.

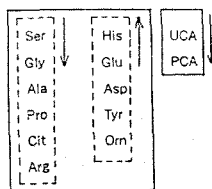




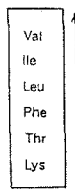
## 자연 보습 인자(NMF : Natural Moisturizing Factor)

- ▶ 아미노산, pyrrolidone carboxylic acid (PCA), urocanic acid (UCA), urea, lactate, mineral 등.
- ▶ Protein degradation 과정에서 생성됨.
- ▶ 피부 표면의 장력을 낮추고 케라틴으로부터 수분의 반발력을 막아 보습에 직접적인 영향을 줌.

## 피부 각화에 따른 자연보습인자의 변화

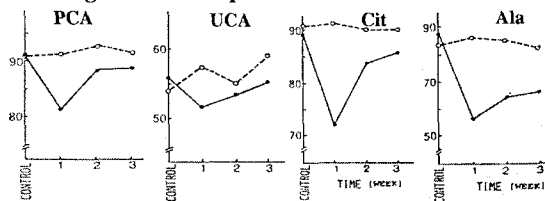


UCA  
PCA ↓



Koyama et al.  
J. Soc. Cosmet. Chem  
35:183

### Changes in the composition of free amino acid



### Changes in the composition of PCA, UCA, Cit, and Ala

: 표피의 수분 증발 - 피지막의 세라마이드 및 NMF  
함량 변화와 역의 상관관계임

: 피지막이 손상되어 있는 아토피 피부염, 건선염 등의  
표피에서 세라마이드 및 NMF 수치 감소

: 정상표피에서의 세라마이드 및 NMF 수치  
- 습도, 기온, 노화에 의해 영향을 받음

## 도포제, 보습제

: 피부 건조화 예방, 각질층의 수분 함량 증가  
빈번한 도포 / 일시적인 건조화 증상 완화의 효과

: 피부 건강은 외용제 뿐만 아니라 영양과도 밀접한  
관련이 있다는 인식 변화.

: 특정 영양소 성분이나 이를 다량 함유한 건강기능  
식품 소재 개발

## 건강한 피부를 위한 기능성 식품



본 연구에서는 serine을 다량 함유한 실크단백질 A (1% silk protein A in diet)와 B (1% silk protein B in diet)의 식이 급여가 아토피 피부염 동물모델 NC/Nga mice 피부의 천연 보습인자 (아미노산)의 함량과 세라마이드 함량, 관련 효소의 발현 및 활성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## ↓ 실험동물

- 아토피 피부염 mice : NC/Nga mice
- 정상 control mice : BALB/c mice
- 공급 : (주)중앙 실험 동물
- 식이공급 : ad libitum
- 사육실 온도 및 습도 :  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $60 \pm 5\%$
- 조명: 12시간 간격으로 명암을 바꿔줌

## 효능 Model (NC/Nga mouse)

### ✱ 특징

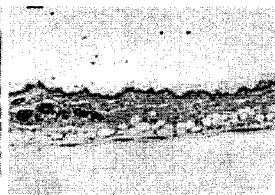
SPF (Specific Pathogen Free) 환경하에서는 정상  
Conventional 환경하(3~4주후)에서는 가려움증,  
IgE level 증가, 장벽 손상, TEWL 증가, Ceramide level 감소



NC mouse

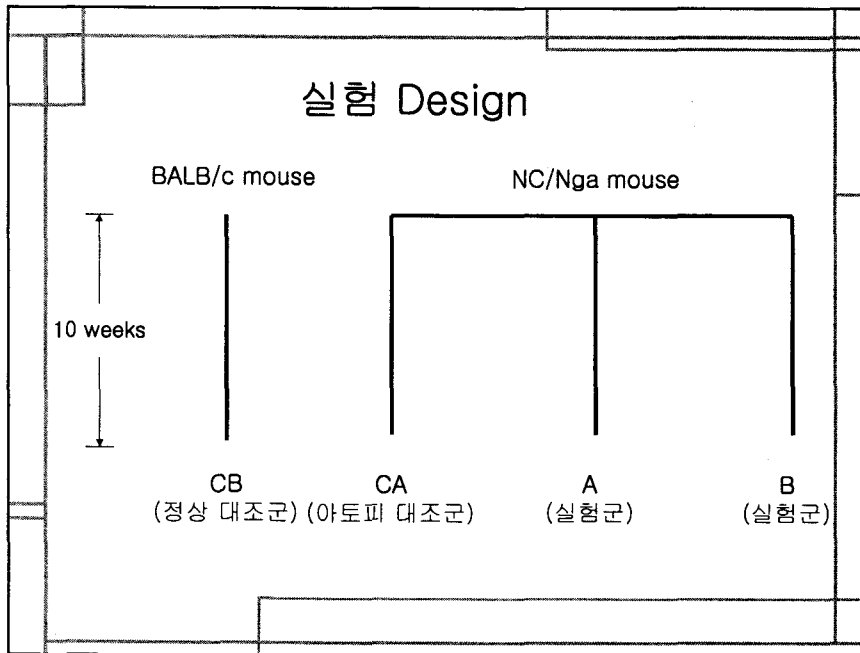


Conventional 환경



SPF 환경





### 식이 조성 (g/kg)

Group Ingredients	CA	CB	A	B
Casein	230	230	220	220
실크단백질 A	0	0	10	0
실크단백질 B	0	0	0	10
L-cystein	3	3	3	3
Corn oil	100	100	100	100
Cellulose power	50	50	50	50
Vitamin mixture	10	10	10	10
Mineral Mixture	35	35	35	35
Sucrose	200	200	200	200
Corn Starch	372	372	372	372

## 실크단백질 A와 B의 아미노산 구성

A의 아미노산 구성

amino acid	함유량	amino acid	함유량
Gly	12.2	Phe	0.4
Ala	4.6	Leu	0.6
Ser	30.4	Arg	2.8
Tyr	3.8	Lys	10.2
Val	2.6	Pro	0.8
Asp	19.1	Cys	< 0.05
Glu	4.1	His	0.9
Thr	6.0	Try	-
Iso	1.4	Met	< 0.05

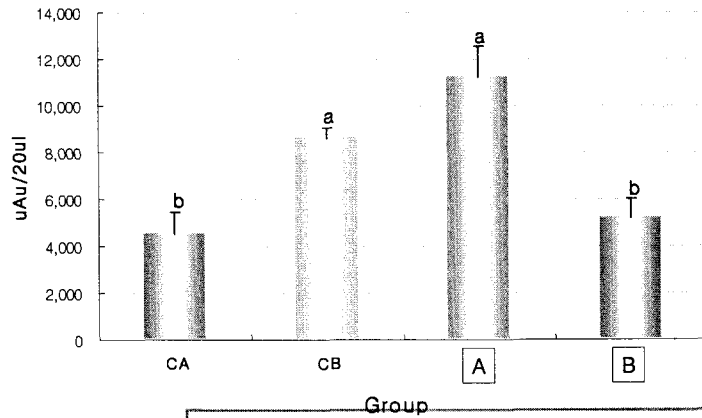
B의 아미노산 구성

amino acid	함유량	amino acid	함유량
Gly	44.5	Phe	0.6
Ala	29.3	Leu	0.5
Ser	12.1	Arg	0.5
Tyr	5.2	Lys	0.3
Val	2.2	Pro	0.3
Asp	1.3	Cys	0.2
Glu	1.0	His	0.2
Thr	0.9	Try	0.2
Iso	0.7	Met	0.1

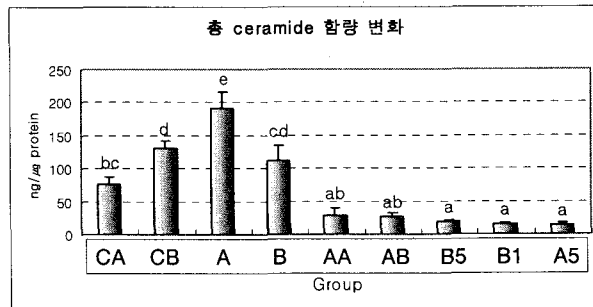
## 표피의 수분손실량 측정 (TEWL)

Group	TEWL(g/m <sup>2</sup> /hr)
CA(아토피대조군)	8.0±1.5 <sup>a</sup>
CB(정상대조군)	5.9±0.8 <sup>b</sup>
A	6.3±1.1 <sup>b</sup>
B	7.5±1.0 <sup>ab</sup>

## Ceramide 총 함량 변화 측정

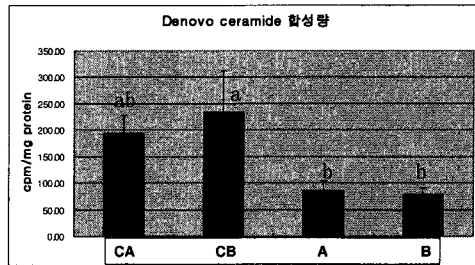
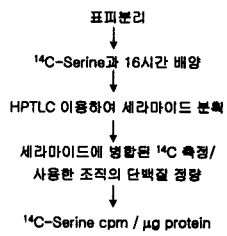


## Crude Extract, 아미노산 및 저분자 형태의 실크단백질 섭취에 의한 Ceramide 총 함량 변화 비교

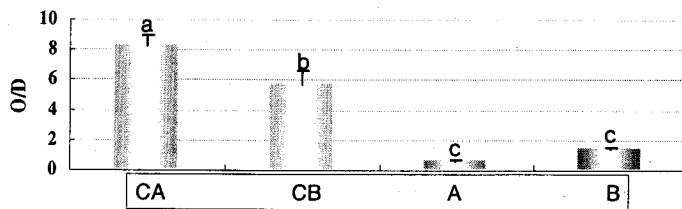
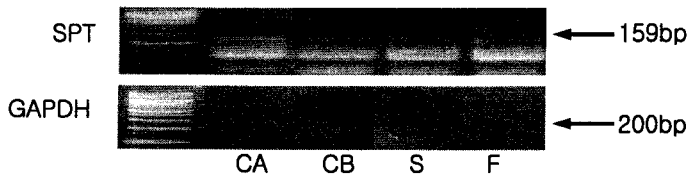


AA/AB: 아미노산 형태의 실크단백질 A와 B  
 B5/B1: 분자량 500, 1500의 실크단백질 B  
 A5: 분자량 5000의 실크단백질 A

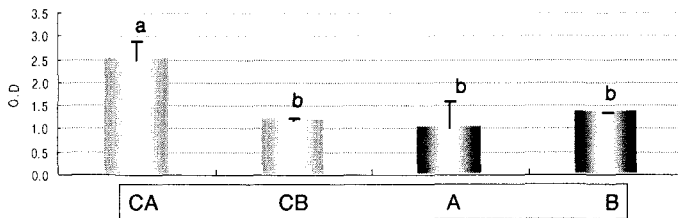
## De novo ceramide 합성능 (Serine palmitoyl Transferase Activity 측정)



## Ceramide의 de novo 합성효소 SPT의 발현변화(RT-PCR)



### Ceramide의 degradation 효소인 ceramidase의 발현변화(RT-PCR)



### 혈액에서의 아미노산 함량 변화

Group	Asp	Glu	Tyr	His
CA	38.17 ± 3.04	30.80 ± 4.26 <sup>c</sup>	22.87 ± 2.16 <sup>b</sup>	5.58 ± 0.53 <sup>d</sup>
CB	21.95 ± 10.35	50.31 ± 8.62 <sup>b</sup>	25.10 ± 1.04 <sup>b</sup>	18.02 ± 4.09 <sup>c</sup>
A	44.88 ± 6.84	51.54 ± 5.80 <sup>b</sup>	21.96 ± 2.70 <sup>b</sup>	25.59 ± 2.19 <sup>b</sup>
B	37.25 ± 11.05	68.39 ± 4.14 <sup>a</sup>	33.27 ± 1.62 <sup>a</sup>	35.00 ± 0.96 <sup>a</sup>

Group	Ser	Gly	Ala	Arg
CA	22.16 ± 1.46 <sup>c</sup>	35.94 ± 2.13	70.45 ± 4.75	11.97 ± 2.90 <sup>c</sup>
CB	36.63 ± 1.47 <sup>ab</sup>	37.21 ± 6.32	71.10 ± 4.22	22.81 ± 1.13 <sup>b</sup>
A	35.56 ± 3.78 <sup>b</sup>	45.21 ± 3.37	59.62 ± 6.11	20.43 ± 2.74 <sup>b</sup>
B	44.33 ± 2.42 <sup>a</sup>	48.2 ± 7.01	60.54 ± 13.82	30.49 ± 2.23 <sup>a</sup>

피부 건조시 증가하는 아미노산 : **Asp, Glu, His, Tyr**  
 피부 건조시 감소하는 아미노산 : Ser, Gly, Ala, Arg

## 피부 조직에서의 아미노산 함량 변화

Group	Asp	Glu	Tyr	His
CA	32.4±10.8	0	8.5±1.0 <sup>b</sup>	59.8±7.9
CB	27.2±8.0	1383.3±456.4	5.9±1.8 <sup>b</sup>	35.4±11.3
A	26.2±8.1	487.9±408.2	11.7±2.4 <sup>b</sup>	88.8±31.4
B	0	0	1308.2±160.7 <sup>a</sup>	37.1±9.1

Group	Ser	Gly	Ala	Arg
CA	714.6±203.4 <sup>ab</sup>	44.5±9.9 <sup>b</sup>	40.4±11.4	12.2±5.2 <sup>b</sup>
CB	857.08±270.6 <sup>ab</sup>	49.0±16.4 <sup>b</sup>	18.8±5.7	10.0±2.4 <sup>b</sup>
A	1167.1±391.5 <sup>a</sup>	152.5±52.8 <sup>a</sup>	63.6±42.4	164.4±35.7 <sup>a</sup>
B	52.1±8.3 <sup>b</sup>	0	0	21.8±10.7 <sup>b</sup>

피부 건조시 증가하는 아미노산 : Asp, Glu, His, Tyr

피부 건조시 감소하는 아미노산 : Ser, Gly, Ala, Arg

## 결과 요약

- (1) 표피에서 측정된 TEWL과 증식 정도는 CA > B > A = CB순으로 실크 단백질 B보다 실크단백질 A의 식이 공급에 의해 피부의 보습 상태가 정상대조군 수준으로 증가되었다.
- (2) 정상대조군인 CB에 비해 아토피 피부염 대조군인 CA군 표피의 세라마이드 함량은 낮았으며 실크단백질 A의 식이 공급은 표피의 세라마이드 함량을 증가시켰다. 그러나 실크단백질 B의 식이 공급은 표피의 세라마이드 함량을 증가시키지 않았다.
- (4) A군과 B군 모두 세라마이드 de novo 합성에 관여하는 SPT의 mRNA 발현과 활성이 CB군에 비해 낮았다. 이는 실크단백질 A와 B에서 공급되는 serine의 양에 상응하는 세라마이드를 생성한 후 SPT 발현과 활성의 down regulation이 이루어진 것으로 여겨지며 실크단백질 B에 함유된 serine의 양은 아토피 피부의 세라마이드 함량을 증가시키기에는 부족한 수준이었던 것으로 여겨진다.
- (5) 혈장내 Serine과 Glycine의 농도는 B의 식이 급여에 의해 증가되었으나 피부 조직 내의 Serine과 Glycine 농도는 A군에서 유의적으로 증가되었다. 피부 건조시 증가하는 Tyrosine의 함량은 B군에서 현저히 높았다.

## 결론

- ▶ 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에서 실크 단백질 A의 식이 공급은 피부 조직 내의 천연 보습인자인 serine 및 세라마이드 함량을 증가시켜 피부의 보습을 증가시켰다.
- ▶ 반면에 실크단백질 B에 함유된 Serine의 농도는 NC/Nga mice 피부의 세라마이드 및 serine의 함량을 증가시키기에는 충분하지 않았던 것으로 여겨진다.
- ▶ 실크단백질 A의 식이 보충은 아토피 피부염 환자의 손상된 표피 장벽의 개선에 도움을 줄 것으로 사료되고, 나아가 아토피 피부염 질환 개선용 건강기능 식품의 소재로의 개발 가능성을 시사한다.