

국소도포한 각질분해효소가 흰쥐피부의 두께에 미치는 효과

황 건¹ · 장정순² · 김대중³ · 김 성¹ · 주한승² · 이승진⁴

인하대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 생화학교실², 해부학교실³, 씨·에프(주)⁴

Effect of Locally Applied Keratinase on Thickness of Rat Skin

Kun Hwang, M.D.¹, Chung-Soon Chang, Ph.D.²,
Dae Joong Kim, Ph.D.³, Sung Kim, M.D.¹,
Han Seung Joo, Ph.D.², Seung Jin Lee⁴

Department of ¹Plastic Surgery, ²Biochemistry, ³Anatomy,
College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea
⁴C.F Co., Ltd., Incheon, Korea

The aim of this study is to elucidate the effect of keratinase on epidermis of rat skin. Twenty-five male Sprague-Dolly rats were used. The hair on the back were removed and 2×2 cm area was marked. The rats were divided five groups; 1) Control group(Co), 2) Cleansing gel group(CI), 3) Cleansing gel+keratinase group, 4) Exfoliant gel group(Ex), and 5) Exfoliant gel + keratinase group(Ex + K). The solutions were applied to the back area twice a day for five days. On fifth day, the skins were harvested, fixed and prepared for histologic sections. The thickness of keratin layer, living epidermis, dermis, and cell layer number of living epidermis were measured. In the group containing keratinase(CI + K, Ex + K), the thickness of keratin layer and living layer were thinner than other groups. However, there were no significant differences of the cell layer number of living epidermis and thickness of the dermis among the five groups. We think the keratinase may have the effect thinning the keratin layer as well as the thickness of living epidermis, without effecting the living cell and dermal component. The keratinase containing soap may be of benefit to remove the excess keratin layers in human.

Key Words: Keratinase, Skin, Rat

Received January 24, 2005

Revised April 1, 2005

Address Correspondence: Kun Hwang, M.D., Ph.D., Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Inha University, 7-206 Sinheung-dong, Jung-gu, Incheon 400-711, Korea. Tel: 032) 890-3514 / Fax: 032) 890-2918 / E-mail: jokerhg@inha.ac.kr

* 본 연구는 2004년도 중소기업청 산학연공동기술개발 컨소시엄사업의 연구비로 이루어졌음.

I. 서 론

사람의 피부 중 가장 겉 층인 각질층은 주로 케라틴으로 이루어져 있다. 이 각질층이 두터워지거나 과각화증이 생길 경우 미용 상 좋지 않아 많은 사람들이 이를 해결하기 위해 화장품이나 보습제 등을 사용하고 있다. 하지만, 각질층의 주성분인 케라틴을 직접 분해하는 효소인 각질분해효소를 이용한 방법은 아직까지 널리 연구되어 있지 못하다.

Dobson 등은 *Streptomyces fradiae*로부터 얻은 각질분해효소를 생검으로 얻은 사람의 등피부의 각질층(Stratum corneum)을 녹이는 데 실패하였다고 하였으며,¹ Vignardet 등은 피부의 각질층과 *Doratomyces microsporus*로부터 얻은 각질분해효소를 반응시켜 28℃, 0.94%의 농도에서 분해 능력이 가장 높은 최적의 환경이라고 하였다.²

이러한 연구들은 실험 환경에서 피부의 각질층에 직접 각질분해효소를 반응시켜 그 결과를 확인한 것으로서 우리가 일상생활에서 쉽게 사용할 수 있는 비누나 세정을 위한 젤과 혼합된 각질분해효소의 효소가 피부의 두께에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 연구되어있지 않다.

본 연구의 목적은 젤과 혼합된 형태의 각질분해효소가 흰쥐피부의 두께에 미치는 영향을 알아보는데 있다.

II. 재료 및 방법

가. 연구대상

수컷 흰쥐 (Sprague-Dolly rat), 25마리(무게 300 g)를 대상으로 하였다.

나. 연구재료

1) 각질분해효소(keratinase)의 탐색 및 제조방법

인천 연안 갯벌 1 g을 100 ml의 멸균 증류수에 현탁한 후 현탁액을 10:1 - 1000:1으로 희석한 후 각 희석액 100 μl를 1% skim milk를 포함하는 tryptic soy broth(TSB) agar plate에 도말한 다음 37℃에서 24시간 배양 후 3 mm 이상의 투명부위(clear zone)를 생성하는 콜로니를 선별하였다.

각질분해효소를 생산하기 위한 기본 배양 배지로는 대두박 1.5%, 밀가루(wheat flour) 1%, fructose 0.5%, 제 2인산칼륨 0.4%, 제 2인산나트륨 0.1%, 염화칼슘 0.005%, 탄산나트륨 0.8%를 사용하였다. 선별된 콜로니를 10 ml의 TSB 배지를 포함하는 cap tube에 접종하여 24시간 동안 32°C에서 250 rpm으로 진탕 배양하여 파종배양(seed culture)하였다. 본 배양은 상기와 동일한 조성의 배지 100 ml을 포함하는 500 ml baffled flask에 위의 파종배양 2 ml를 접종하고 250 rpm으로 32°C에서 48시간 동안 진탕 배양하였으며, 15,000×g로 20분간 원심 분리하여 배양 상층액을 회수하였다.

회수한 배양 상층액에 최종 농도가 5%(w/v) 되게 흡착제 Diaion HP20(미쯔비시사, 일본)을 첨가한 후 냉장실에서 약 16시간 동안 기계적으로 회전하여서(mechanical stirring) 효소를 흡착시킨 후, 흡입투과(suction filtration)하여 흡착제를 회수한 후 30% acetone 용액으로 흡착된 단백질을 용출, 회수하였다. 위의 용출액에 2배 부피의 아세톤을 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 15,000×g로 20분간 원심 분리하여 침전물을 회수하고 침전물을 증류수에 용해한 후 효소 용액으로 사용하였다.

2) 효소 활성 측정

분석완충액(assay buffer, 0.1 M Glycine-NaOH, pH 11)에 0.5%가 되게 카제인(casein)을 녹인 기질 용액 500 μ l와 위의 분석완충액에 적당하게 희석된 시료 100 μ l를 가하여 잘 섞었다. 50°C에서 10분간 incubation한 후 500 μ l의 stop solution(0.11 M trichloroacetic acid/0.22 M sodium acetate/0.33 M acetic acid)을 가하여 얼음에서 10분간 더 방치하였다. 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 반응하지 않은 기질을 제거하고, 상층액을 회수하여 Lowry 방법을 통하여 단백질분해효소의 작용으로 생성된 티로신(tyrosine)의 양을 측정하였으며 spectrophotometer 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)으로는 20-200 μ g의 티로신을 이용하여 티로신 표준곡선을 얻어 직선식을 얻었으며, 이 직선식으로부터 생성된 티로신의 양을 계산하였다. 효소 1 unit는 1분간 1 μ g의 티로신생산에 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

3) 운반체(carrier for keratinase); 겔(gel)

각질분해효소를 함유하는 겔의 성분은 Table I과 같다. 각각의 gel 성분에 액상효소를 첨가하고 homogenizer (Omni Mixer Int., USA)를 사용하여 균질화하였다.

4) 실험군

실험군은 대조군(Co)과 세정겔군(CI), 박피겔군(Ex)으로

나누고 세정겔군과 박피겔군은 각각 겔만 사용한 군과 각질분해효소를 첨가한 군으로 나누었다.

I. 대조군(Normal)

Co 제모만 시행

II. 세정겔(Cleansing gel)

CI 세정겔(Cleansing gel)

CI + K 세정겔(Cleansing gel) +

각질분해효소(Keratinase) 100 unit/ml

III. 박피겔(Exfoliant gel)

Ex 박피겔(Exfoliant gel)

Ex + K 박피겔(Exfoliant gel) +

각질분해효소(Keratinase) 200 unit/ml

다. 연구방법

쥐의 등의 2 × 2 cm 넓이를 제모 하였다. 제모 직후부터 오전과 오후 하루 두 차례씩 5일간 각 실험군에 해당하는 겔을 붓에 묻혀 한차례에 3번씩 제모 부위에 발랐다. 실험 동물 수는 각 실험군당 5마리씩 시행하였으며, 대조군 5마리에서는 제모만 시행하였다.

실험일 5일에 실험부위의 피부를 얻어 통상적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후, 7 μ m 절편을 얻어 조직 슬라이드를 제작하였으며 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하였다(Fig. 1).

라. 계측

광학현미경하에서 각 조직표본의

a. 표피층의 두께(thickness of epidermis): b+c

b. 각질층의 두께(thickness of keratin layer)

c. 생존표피층의 두께(thickness of living epidermis)

d. 생존표피층의 세포층수(cell layer number of living layer)

e. 진피층의 두께(thickness of dermis)

f. 피부의 두께(thickness of skin): a+e를 계측하였다.

마. 통계처리

각 군 간의 차이를 Kruskal-Wallis 검사로 검정하였으며, p값이 0.05보다 작을 때 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

가. 표피층의 두께(Fig. 1, 2)

표피층의 두께는 대조군에서 가장 두꺼웠으며, (29.5 ± 1.8 μ m) 다음이 세정겔군(28.5 ± 0.6 μ m), 박피겔군(25.2 ± 2.6 μ m), 세정겔 + 각질분해효소군(18.2 ± 4.0 μ m) 순이었으며, 박피겔 + 각질분해효소군(17.8 ± 3.1 μ m)이 가장 얇았다(Table

Table I. Ingredients of the Gels

Cleansing gel		Exfoliant gel	
Ingredient	Contents(%)	Ingredient	Contents(%)
EDTA-2Na	0.02	EDTA-2Na	0.02
D-panthenol	0.2	D-panthenol	0.5
Merquat-550	1.5	Merquat-550	1.5
Glucam E-20	1	Glucam E-20	1
Mipearl-GS(EGMS)	2	Mipearl-GS(EGMS)	2
Amisoft LS-11	1	Polymer JR-30M	1.5
Micopol-LDE	2.3	DC-193(SF-1288)	1
Micopol 2MCA	4	BC 2105	1
Micopol-CDE	4.5	Hostapon CT Paste	5
Micolin S-430	10	Glydant 2000	0.2
Micolin ES-430	10	Nuptia 45.073/D	0.15
Mitaine CA	3	Extream feeling 225423	0.15
Micolin T-430	2	Water	85.98
Corum 3510	4		
Polymer JR-30M	1.1		
DC-193(SF-1288)	1		
BC 2105	1		
Glydant 2000	0.2		
Promois Silk-1000	0.3		
Phytokeratin	0.2		
Nuptia 45.073/D	0.15		
Water	50.53		

II).

대조군과 세정겔군 사이에는 유의한 차이가 없었으며 ($p=0.347$), 세정겔 + 각질분해효소군과 박피겔 + 각질분해효소군 사이에도 유의한 차이가 없었다($p=0.834$). 그러나 그 이외에는 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

나. 각질층의 두께(Fig. 1, 3)

각질층의 두께도 표피층의 두께와 마찬가지로 대조군에서 가장 두꺼웠으며($15.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$), 다음이 세정겔군($14.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$), 박피겔군($13.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$), 세정겔 + 각질분해효소군($9.7 \pm 2.4 \mu\text{m}$), 순이었으며 박피겔 + 각질분해효소군($9.3 \pm 1.6 \mu\text{m}$)에서 가장 낮았다(Table II).

대조군과 세정겔군 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았으며($p=0.093$), 세정겔+각질분해효소군과 박피겔 + 각질

분해효소군 사이에도 유의한 차이가 없었다($p=0.917$). 세정겔+각질분해효소군과 박피겔군 사이에도 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.065$). 그러나 그 이외 군 사이에서는 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

즉 각질분해효소군이 들어간 CI + K, Ex + K군 사이 각질이 얇았다. 각질분해효소가 들어간 군에서는 생존표피층도 얇았다.

다. 생존표피층의 두께(Fig. 1, 4)

생존 표피층의 두께는 대조군이($13.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$) 가장 두꺼웠으며, 다음이 세정겔군($13.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$), 박피겔군($12.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$)이었으며, 세정겔 + 각질분해효소군($8.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$)이 가장 낮았다(Table II).

대조군과 세정겔군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가

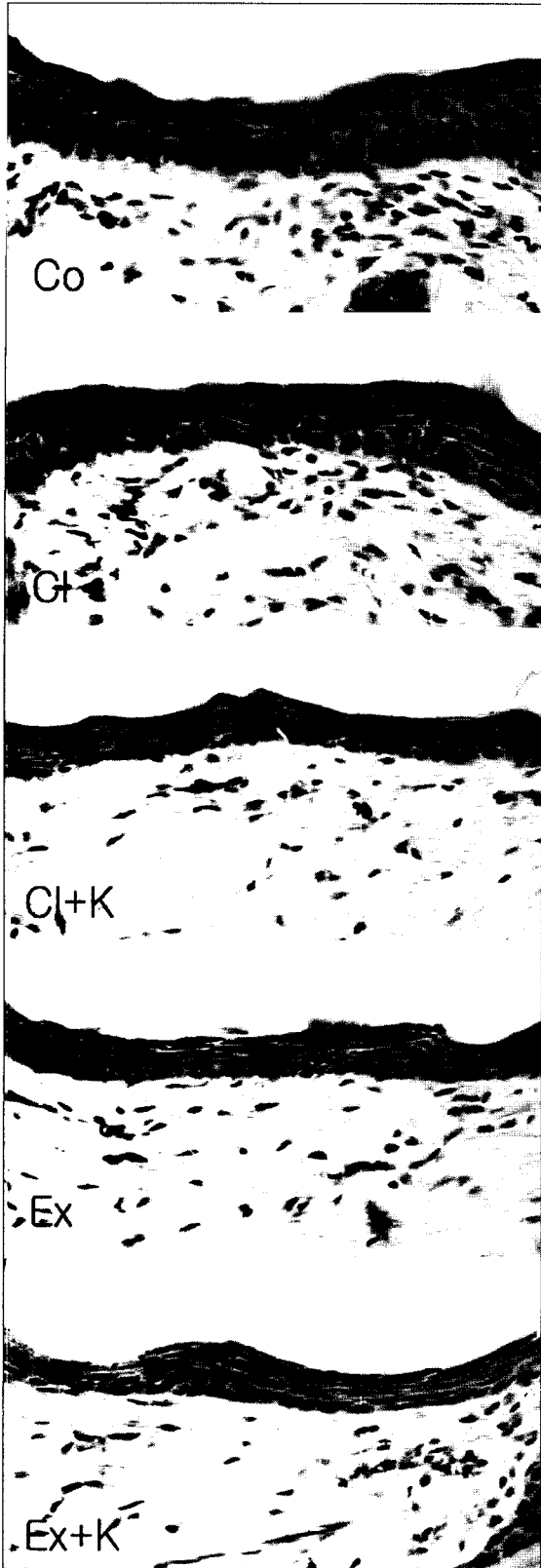


Fig. 1. Histology of each groups. Co: Control group, Cl: Cleansing gel group, Cl+K: Cleansing gel+Keratinase 100 unit/ml group, Ex: Exfoliant gel group, Ex+K: Exfoliant gel+Keratinase 200 unit/ml group. H&E stain, $\times 400$.

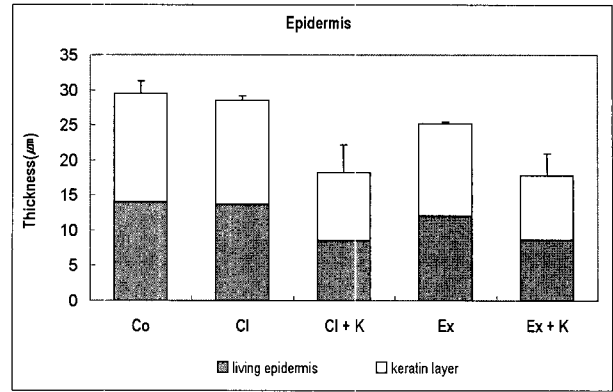


Fig. 2. Thickness of epidermis($p=0.001$).

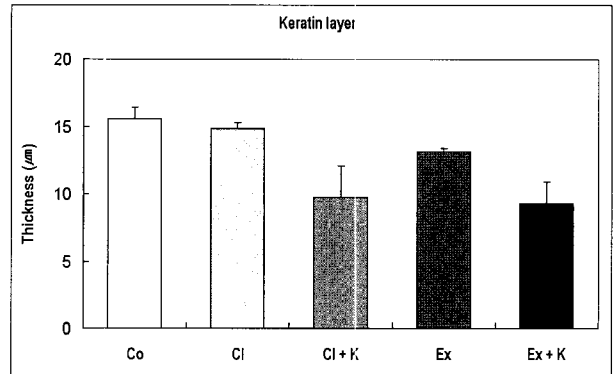


Fig. 3. Thickness of keratin layer($p=0.001$).

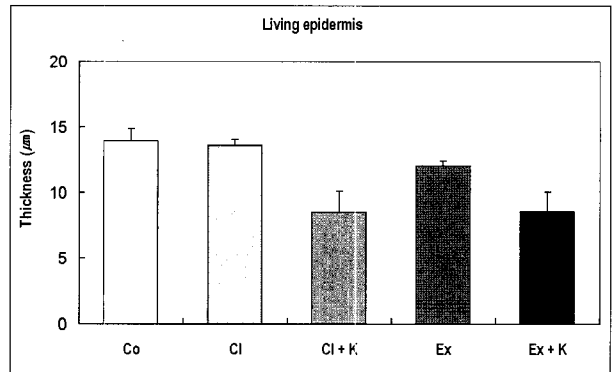


Fig. 4. Thickness of living epidermis($p=0.001$).

없었으며($p=0.456$), 세정겔 + 각질분해효소군과 박피겔 + 각질분해효소군 사이에도 유의한 차이가 없었으나, 그 이외의 군들 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

라. 생존표피층의 세포수(Fig. 5)

생존표피층의 세포수는 대조군(3.28 ± 0.11 개)에서 가장 높았으며 다음으로 세정겔군(3.18 ± 0.08 개), 박피겔군(3.12

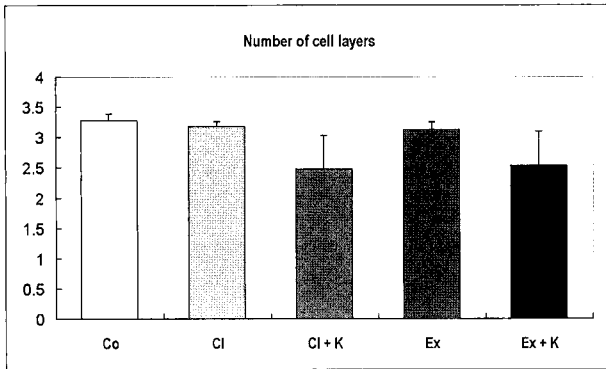


Fig. 5. Cell number of living layer(p=0.005).

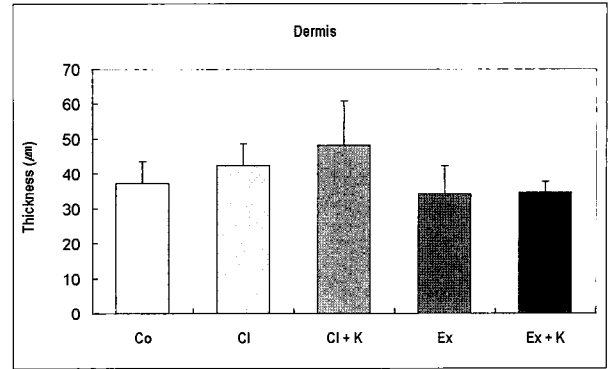


Fig. 6. Thickness of dermis(p=0.100).

±0.18개), 박피젤 + 각질분해효소군(2.53 ± 0.57개) 순이었으며, 세정젤 + 각질분해효소군(2.47 ± 0.55개)으로 가장 낮았다(Table II).

대조군과 세정젤군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며(p=0.09), 세정젤군과 박피젤군 사이에도 유의한 차이가 없었다(p=0.621). 세정젤 + 각질분해효소군과 박피젤군 사이에도 유의한 차이가 없었으며(p=0.086), 세정젤 + 각질분해효소군과 박피젤 + 각질분해효소군 사이에도 유의한 차이가 없었다(p=0.834). 그 이외 군들 사이에는 유의한 차이가 있었다. 그러나 생존표피층의 세포 수는 큰 차이가 없었다.

마. 진피층의 두께(Fig. 1, 6)

진피층의 두께는 세정젤 + 각질분해효소군에서 가장 두꺼웠으며(48.2 ± 2.7 μm), 다음이 세정젤군(42.4 ± 6.2 μm), 대조군(37.3 ± 6.2 μm)순이었으며, 박피젤 + 각질분해효소군(34.8 ± 3.1 μm)과 박피젤군(34.2 ± 8.1 μm)은 상대적으로 얇았다(Table II).

그러나 위 진피층의 두께는 다섯 군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.100).

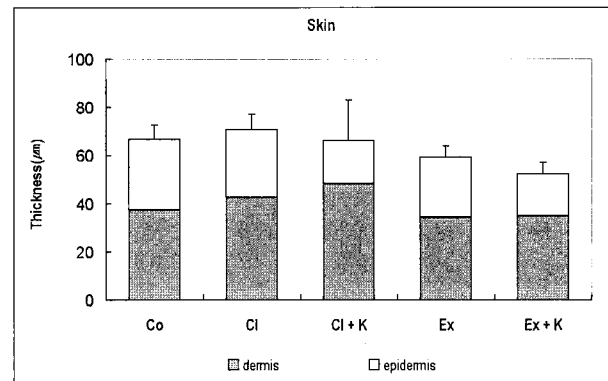


Fig. 7. Thickness of skin(p=0.011).

바. 피부전체 두께(Fig. 1, 7)

피부전체의 두께는 세정젤군(67.3 ± 6.0 μm)이 가장 두꺼웠으며, 그 다음으로 대조군(67.3 ± 6.0 μm)과 세정젤 + 각질분해효소군(67.2 ± 16.7 μm)이 비슷하였고, 다음이 박피젤군(56.2 ± 4.4 μm)이었으며, 박피젤 + 각질분해효소군(52.6 ± 4.5 μm)이 가장 낮았다(Table II).

대조군과 박피젤군 사이(p=0.043), 대조군과 박피젤 + 각질분해효소군 사이(p=0.014)에는 유의한 차이가 있었다.

Table II. Thickness of Epidermis and Number of Living Cell Layers (μm)

		Thickness of epidermis	Thickness of keratin layer	Thickness of living epidermis	Number of living layers	Thickness of dermis	Thickness of skin
Co	Control	29.5 ± 1.8	15.6 ± 0.9	13.9 ± 1.0	3.28 ± 0.11	37.3 ± 6.2	67.3 ± 6.0
Cl	Cleansing gel	28.5 ± 0.6	14.9 ± 0.4	13.6 ± 0.4	3.18 ± 0.08	42.4 ± 6.2	70.9 ± 6.4
Cl+K	Cleansing gel+Keratinase	18.2 ± 4.0	9.7 ± 2.4	8.5 ± 1.6	2.47 ± 0.55	48.2 ± 12.7	67.2 ± 16.7
Ex	Exfoliant gel	25.2 ± 2.6	13.1 ± 0.3	12.0 ± 0.4	3.12 ± 0.13	34.2 ± 8.1	56.2 ± 4.4
Ex+K	Exfoliant gel + Keratinase	17.8 ± 3.1	9.3 ± 1.6	8.5 ± 1.5	2.53 ± 0.57	34.8 ± 3.1	52.6 ± 4.5

또한 세정겔군과 박피겔군사이($p=0.014$)와 세정겔과 박피겔 + 각질분해효소군 사이($p=0.009$)에도 유의한 차이가 있었다. 그 이외에는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 피부전체의 두께도 큰 차이를 보이지 않았다.

IV. 고 찰

각질은 피부 표피세포 중 가장 바깥에 위치한 단단한 껍질 피부세포가 새로 생성될 때마다 떨어져 나가는 순환 과정을 거치는데 이런 과정이 제대로 이루어지지 않을 경우에 불필요한 피부껍질이 쌓이게 된다. 이 각질이 쌓이면, 피부색이 칙칙해지고, 하얗게 일어나게 되며 피부건조와 메이크업이 들뜨는 등 피부 트러블을 만든다. 따라서 각질의 주성분인 케라틴 및 데스모솜(desmosome)을 분해하므로 turnover를 촉진하여 피부의 재생을 도와준다.

사람의 표피세포는 약 4주간의 지속적인 분화과정을 통하여 각질세포를 만들며 최종 가장 바깥층의 오래된 각질세포가 소위 '때'로서 탈락된다. 이 각질세포의 표면이나 모발의 모낭에 남아있는 불순물 가운데 케라틴이 죽은 세포의 주요 성분으로서 피부표면에 남게 된다. 케라틴은 표피에 가장 풍부하게 존재하는 세포간 섬유상 연결 단백질로서 케라틴은 시스틴 이중황화결합(cystine disulfide bonds)에 의해서 연결되어 있기에 불용성이며 잘 분해되지 않는다. 또한 분자량이 큰 이유로 세정제 단독으로는 쉽게 제거하지 못한다.

최근, 이러한 단백질 불순물을 제거하는 효과적인 방법으로 단백질 분해효소를 이용하여 직접적으로 피부 표면에 부착된 케라틴 층을 분해 제거한 결과 피부의 전환율(turn-over)을 촉진함으로써 투명하고 부드러운 피부로 만들어준다고 보고하고 있다.¹

본 연구에서 사용한 겔은 주로 비누성분으로서 세정겔은 모공 속에 남아있는 피지나 메이크업 잔여물을 깨끗하게 제거해주는 역할을 하며 박피겔은 표피에 누적된 불필요한 각질을 분해시켜 주는 역할을 한다.

세정겔과 박피겔의 차이는 박피겔은 Hapten CT paste 5%와 Extream feeling 225423 0.15%를 함유하였으며 이중 Extream feeling 225423이 박피를 일으키는 성분이다. 본 실험에서 세정겔(CI + K)군은 각질분해효소를 ml당 100 unit 사용하였고, 박피겔(Ex + K)군에는 각 200 unit 사용하였는데, 이는 예비실험에서 이와 같은 농도가 전체 표피층의 두께를 얇게하는 효과가 컸기 때문에 이와 같이 설정하였던 것이다.

본 실험의 결과 다섯군 중 세정겔 + 각질분해효소군(CI + K, ml당 100 unit의 각질분해효소)에서 진피의 두께는 가장 두꺼웠으며, 각피층의 두께는 가장 얇게 만든 결과를 나타내어 다섯 군 중 가장 안전하며 효과적인 실험군이라 여겨진다.

V. 결 론

겔과 혼합된 형태의 각질분해효소가 흰쥐피부의 두께에 미치는 영향을 알아본 결과 각질분해효소가 포함된 겔을 바른 실험군에서는 각질층과 생존표피층의 두께가 다른 군보다 얇았다. 그러나 생존표피층의 세포수나 진피의 두께는 실험군들간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 각질분해효소가 포함된 비누의 시제품을 만들어 실제 임상에 적용하여보는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Dobson RL, Bosley L: The effect of Keratinase on human epidermis. *J Invest Derm* 41: 131, 1963
2. Vignardet C, Guillaume YC, Friedrich J, Millet J: A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates. *Int J Pharmaceutics* 191: 95, 1999
3. Joo HS, Chang CS: Production of Alkaline protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312: grown on soybean meal Optimization and some properties. *Process Biochem* 40: 1263, 2005