

제주용암해수의 피부 보습 효과 연구

이성훈[†] · 배일홍 · 민대진 · 김형준 · 박녹현 · 최지예 · 신진섭 · 김은주 · 이해광

(주)아모레퍼시픽 기술연구원

(2016년 9월 12일 접수, 2016년 11월 24일 수정, 2016년 12월 19일 채택)

Skin Hydration Effect of Jeju Lava Sea Water

Sung Hoon Lee[†], Il-Hong Bae, Dae Jin Min, Hyoung-June Kim,
Nok Hyun Park, Ji Hae Choi, Jin Seob Shin, Eun Ju Kim, and Hae Kwang Lee

Amorepacific Corporation R&D Center, 314-1 Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17074, Korea

(Received September 12, 2016; Revised November 24, 2016; Accepted December 19, 2016)

요약: 제주용암해수는 미네랄과 영양염류가 풍부한 물로 제주만이 보유한 지하수자원이다. 본 연구의 목적은 제주용암해수의 피부 보습효과를 확인하기 위한 것이다. 피부의 건조함을 막고 수분을 유지하기 위해서는 표피층의 장벽기능이 정상적으로 기능하고, 표피층 내 수분의 유지와 이동이 원활히 이루어져야 한다. 제주용암해수를 각질형성세포에 처리한 결과 표피층의 분화과정과 natural moisturizing factor (NMF) 생성과정에 관여하는 유전자인 필라그린과 caspase-14 유전자의 발현양이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 막관통 단백질로 수분의 이동을 조절하는 aquaporin 3 (AQP3) 유전자 발현양과 단백질 발현양도 제주용암해수 처리에 의해 증가하였다. 인공피부를 이용한 실험에서 제주용암해수를 배지에 처리하고 배양한 결과 hyaluronic acid (HA)의 수용체인 CD44의 발현양이 증가하였다. 본 연구를 통해 제주용암해수는 피부 보습과 관련된 인자들의 발현양을 증가시켜 피부의 보습기능에 도움을 주는 것으로 사료되었다.

Abstract: Many minerals and nutrient salts are abundant in Jeju lava sea water. The objective of this study was to evaluate the skin hydration effects of Jeju lava sea water. The skin barrier serves as a protective barrier that prevents the loss of moisture. The water holding capacity and water transport of the epidermis have been proposed to be important determinants of skin hydration. Jeju lava sea water increased the mRNA expression of filaggrin and caspase-14 which is related to natural moisturizing factor (NMF) formation. Aquaporins 3 (AQP3) are proteins that facilitate the transport of water across cell membranes. Jeju lava sea water increased the mRNA expression and protein expression of AQP3. We employed a skin equivalent model to assess the efficacy of Jeju lava sea water. In a skin equivalent model, Jeju lava sea water increased the CD44 (hyaluronic acid receptor) which is related to skin hydration. From these results, we found out Jeju lava sea water maybe help to skin hydration.

Keywords: Jeju lava water, skin hydration, NMF, AQP3, skin equivalent

[†] 주 저자 (e-mail: imstrong20@amorepacific.com)
call: 031)899-2683

1. 서 론

피부는 체내에서 지나친 수분 방출을 막고 화학물질, 미생물과 같이 해로운 물질이 우리 몸 안으로 들어오는 것을 막아준다[1]. 피부를 건강하게 유지하기 위해서는 각질층에 약 30% 정도의 수분이 함유되어 있어야 한다[2]. 각질층에서 수분을 유지하기 위해서는 피부 장벽 기능이 정상적으로 작동해야 하고, 수분 보유력이 뛰어난 NMF가 생성되어야 한다. NMF는 필라그린의 분해산물로 urea, pyrrolidone carboxylic acid, glutamic acid와 아미노산 등으로 구성되어 있으며 각질층 건조 중량의 20 ~ 30%를 차지한다[3]. 표피층의 각질형성세포는 일련의 분화과정 과 각질화과정을 거쳐 각질층을 형성하게 된다. 각질층은 물리적, 화학적으로 물질의 이동을 통제하여 실제적인 피부장벽의 역할을 수행하게 된다. 필라그린은 각질형성세포가 생성하는 단백질로, 피부장벽의 생성과 유지에 중요한 역할을 하여 각질형성세포의 분화와 피부장벽기능을 관찰하는 주요 마커로 사용되고 있다[4-6]. 또한 필라그린은 NMF로 분해되어 각질층의 수분유지에 중요한 역할을 담당한다[7]. 필라그린이 NMF로 분해되는 과정에는 여러 가지 단백질 분해효소들이 관여하며 caspase-14는 필라그린 단위체를 필라그린 조각으로 분해하는 효소로 caspase-14 유전자의 발현이 억제된 쥐 모델에서는 필라그린의 분해가 정상적으로 일어나지 않아 NMF 생성량이 감소하였다[8].

Aquaporins (AQPs)는 세포막에 존재하는 수분의 이동 통로로 현재까지 사람에서는 13개의 aquaporins (AQP0 ~ AQP12)이 발견되었다[9]. 피부 표피층에서 주로 발현되는 aquaporin은 AQP3이며 기저층과 가시층에서 주로 발현되고 각질층에서는 AQP3의 발현이 관찰되지 않는다[10]. AQP3은 세포와 세포사이의 수분과 글리세롤의 이동을 조절하는 단백질로, AQP3 유전자의 발현이 억제된 쥐 모델에서 표피층 수분유지 과정에 문제가 발생하는 것이 보고되었다[11]. 나이가 들면 AQP3의 발현이 감소하는 데 AQP3 발현양 감소가 피부 건조함을 일으키는 원인 중 하나로 생각되고 있다[12].

CD44는 세포막에 존재하는 막관통 당단백질로 수분 보유력이 뛰어난 HA의 수용체이며 세포의 증식과 이동에 관여한다[13-16]. 사람피부에서 CD44와 HA의 발현위치는 유사하며 HA 생성량이 증가하면 CD44의

Table 1. Component Analysis of Jeju Lava Sea Water

시험항목	(mg/L)
Na	11100
Mg	1410
Ca	399
K	398
Br	67.2
Si	22.6
Sr	7.47
B	3.95
Mo	0.005
V	0.01
Se	0.01 이하
Ge	0.001 이하
Mn	0.001 이하
Cu	0.002
Cl	21100
SO ₄ ²⁻	2400
F	0.64

양도 증가하는 것이 보고되었다[17-19]. 또한 CD44는 밀착연접의 구성과 장벽기능에도 중요한 기능을 하고 있다[20].

미네랄은 피부 장벽 보호 기능이 있다고 알려져 있다. Denda 그룹에서는 칼슘과 마그네슘 등의 미네랄 성분이 피부 장벽 보호 기능이 있다는 연구결과를 발표하였다. 테이프 스트리핑으로 쥐의 피부 장벽을 손상시키고 염화마그네슘과 염화칼슘을 도포하였더니 손상된 장벽의 회복 속도가 빨라졌다[21]. 마그네슘이 함유된 사해염 용액으로 목욕을 했을 때 피부 장벽기능이 강화되고 피부 수분량이 증가하는 결과도 보고되었다[22]. 이와 같은 기존의 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 각종 미네랄이 다량 함유된 제주용암해수의 피부 보습효과를 확인해 보았다.

2. 재료 및 실험

2.1. 제주용암해수 처리

제주용암해수는 바이오랜드에서 수급하여 실험에 사용하였으며 한국화학시험연구원의 성분분석결과를 Table 1에 기재하였다. 제주용암해수는 세포독성이 없

있던 농도인 150, 300, 600 ppm 으로 각질형성세포에 처리하였고 인공피부에는 300 ppm 농도로 처리하였다. 각질형성세포를 이용한 실험에서는 제주용암해수를 48 h 처리하였으며, 인공피부를 이용한 실험에서는 5일간의 공기노출 배양 뒤, 제주용암해수가 포함된 배지에서 추가로 6일간 배양하였다.

2.2. 세포 배양

신생아 유래 진피 섬유아세포(human neonatal dermal fibroblast, invitrogen, USA)와 신생아 유래 표피 각질형성세포(human neonatal epidermal keratinocyte, invitrogen, USA)는 invitrogen에서 구매하여 사용하였다. 섬유아세포는 low serum growth supplement (LSGS, Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin (Lonza, USA)이 함유된 106 배지(M106, Gibco, USA)에서 배양하였다. 섬유아세포는 계대배양을 진행하여 실험을 진행하였고 계대수 4 ~ 8 사이의 세포를 실험에 사용하였다. 각질형성세포는 human keratinocyte growth supplement (HKGS, Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin이 함유된 Epilife 배지(Gibco, USA)에서 배양하였다. 각질형성세포는 계대배양을 진행하여 계대수가 2인 세포를 실험에 사용하였다. 세포들은 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.3. 인공피부 제작

인공피부는 진피층 위에 각질형성세포를 분주하고 배양하면서 분화를 유도한 후 공기노출 배양을 통해 각질층을 형성한다. 먼저 섬유아세포가 들어있지 않은 진피층과 섬유아세포가 들어있는 진피층을 제작하였다. 섬유아세포가 포함되지 않는 진피층은 type I collagen solution (Sigma, USA)과 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Welgene, Korea), Ham's F-12 (Gibco, USA), NaHCO₃ (Sigma, USA)를 섞고 NaOH (Sigma, USA)로 중화시켜 제작하였다. 혼합액을 12-well culture insert (Corning, USA)에 분주하고 1 h 동안 37 °C 배양기에 넣고 중합시켰다. 섬유아세포가 포함된 진피층은 섬유아세포가 들어있지 않은 진피층에서 사용된 혼합액에 각 well 당 2 × 10⁴개의 세포가 들어갈 수 있도록 세포를 넣고 섬유아세포가 포함되지 않은 진피층 위에 분주하여 37 °C 배양기에 넣고 2 h 동안 중합시켰다. 중합을 마친 진피층에 106 배지를 넣어주고 이틀에 한

번씩 배지를 교환하며 일주일동안 배양했다. 각 well 당 2.5 × 10⁵ 개의 각질형성세포를 분주하고 7일 동안 배양했다. 이렇게 제작한 인공피부를 5일 동안 공기노출 배양을 진행한 후 실험에 사용하였다. 배양 후 면역형광염색을 위해 OCT (tissue-tek OCT, Sakura, USA) 용액을 이용하여 냉동표본을 제작하였다.

2.4. 유전자발현평가(Quantitative Real-time PCR)

각질형성세포는 각 well 당 3 × 10⁵개로 6-well 플레이트(Falcon, USA)에 분주하였다. 제주용암해수를 농도별로 48 h 동안 각질형성세포에 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 PBS로 세척하고 RNeasy kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 세포에서 RNA를 추출한다. 추출한 RNA를 Superscript III kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 cDNA를 합성한다. 합성한 cDNA를 DW, Taqman universal PCR master mix, primer와 혼합한 후 7500 fast real-time PCR machine을 이용하여 유전자의 발현 변화를 측정하였다. PCR과 관련된 시약과 장치는 모두 Applied biosystems (Life technologies, USA) 제품을 사용하였으며, kit과 PCR 방법은 제조사가 제공한 프로토콜을 따랐다. 유전자 발현평가에 사용한 primer는 다음과 같다. AQP3 : Hs00185020_m1, filaggrin : Hs00856927_g1, caspase-14 : Hs00201637_m1*.

2.5. 면역형광염색(Immunofluorescence)

각질형성세포는 각 well 당 3 × 10⁴개로 μ -Slide 8-well 챔버(ibidi, Germany)에 분주하였다. 제주용암해수를 농도별로 각질형성세포에 48 h 동안 처리하였다. 각질형성세포는 4% 포름알데하이드 수용액(EMS, USA)을 이용하여 10 min 동안 고정하였으며, 고정이 끝난 후 세척액(0.05% Tween-20 in phosphate buffered saline, PBS)으로 두 번 세척하여 포름알데하이드를 제거하였다. 고정된 세포는 permeabilization buffer (0.1% Triton X-100 in PBS)를 10 min 동안 처리하여 세포막의 투과성을 확보하고, blocking solution (1% bovine serum albumin, BSA in PBS)을 30 min 동안 처리하여 항체의 비특이적 결합을 막았다. 이와 같은 방법으로 처리된 세포 내의 AQP3 단백질은 anti-AQP3 항체(Santa Cruz, USA)를 이용하여 표지하였으며, AQP3 단백질은 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (invitrogen, USA) 항체로 표지하였다. 시료는 공초점 현미경(LSM 510,

Carl-Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

OCT로 냉동표본을 제작한 인공피부는 6 μm 두께로 동결절편을 제작한 뒤에 면역형광염색을 진행하였다. 동결절편을 24 h 동안 실온에서 건조시킨 후 PBS로 FSC 용액을 세척하여 제거했다. Blocking solution (1% BSA in PBS)을 1 h 동안 처리하여 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 인공피부 동결절편에서 CD44 단백질을 관찰하기 위해 anti-CD44 항체(Santa Cruz, USA)를 이용하였다. 2차 항체로 HRP conjugated antibody (Abcam, USA)를 사용하였으며 광학현미경(Bx-53, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

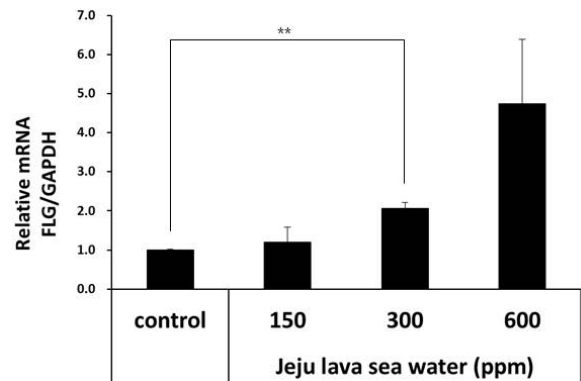
3. 결과 및 고찰

3.1. 제주용암해수 처리에 의한 필라그린, Caspase-14 유전자 발현양 증가

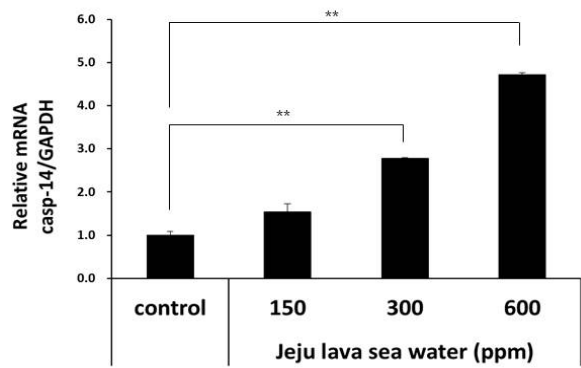
제주용암해수의 피부 보습 효과를 확인하기 위해 각질형성세포에 제주용암해수를 처리하고 NMF 생성에 관여하는 필라그린과 caspase-14 유전자의 발현양을 비교하였다. 필라그린은 피부 장벽을 구성하는 구조 단백질로서의 기능뿐만 아니라 필라그린의 분해산물인 NMF는 피부의 수분유지에 중요한 기능을 담당하고 있다[7]. Caspase-14는 필라그린 단위체를 필라그린 조각으로 분해하는 효소로 NMF 생성 과정에 관여하는 효소이다[8]. 제주용암해수를 각질형성세포에 48 h 처리한 결과 필라그린 유전자의 발현양과 caspase-14 유전자의 발현양이 제주용암해수 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1). 이를 통해 제주용암해수가 각질형성세포에서 NMF 생성을 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

3.2. 제주용암해수 처리에 의한 AQP3 발현양 증가

피부세포 간 수분이동 채널인 AQP3의 발현양 변화를 확인하기 위해 각질형성세포에 제주용암해수를 처리하고 AQP3 유전자 발현양과 세포 내 단백질 생성량의 변화를 관찰하였다. 제주용암해수를 각질형성세포에 48 h 처리한 결과 AQP3 유전자 발현양이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 각질형성세포에 300 ppm 농도로 제주용암해수를 처리한 결과 면역형광염색을 통해 AQP3 단백질 생성량이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 2).



A

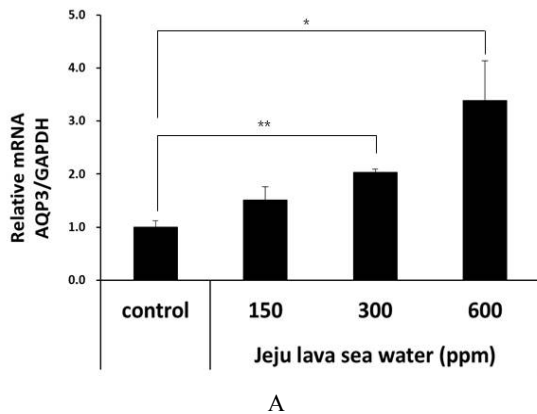


B

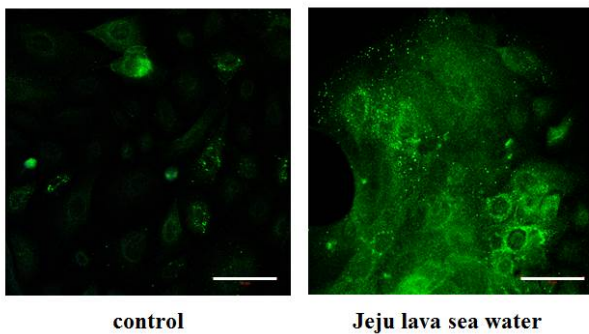
Figure 1. Jeju lava sea water increased filaggrin and caspase-14 mRNA expression. Normal human keratinocytes were treated with 150, 300 and 600 ppm of Jeju lava sea water for 48 h (** $p < 0.01$).

3.3. 제주용암해수 처리에 의한 CD44 발현양 증가

인공피부는 사람 피부와 유사한 구조를 가지고 있으며, 진피층위에서 배양된 각질형성세포가 증식과 분화 과정을 통해 각질층을 형성한다. 인공피부의 이런 특징을 이용하여 제주용암해수의 보습효과를 확인하기 위해 실험을 진행하였다. HA는 표피층 세포에서 수분 보유력이 뛰어난 물질로 피부 보습력을 평가하는데 사용되는 중요한 바이오마커이다. CD44는 HA의 수용체로 HA 생성량이 증가하면 CD44의 양도 증가하는 것이 보고되었다. 인공피부모델에서 공기노출 배양을 5일간 진행한 뒤 제주용암해수가 함유된 배지에서 6일 동안 공기노출 배양을 추가로 진행하였다. 실험을 종료하고 면역형광염색을 통해 HA 수용체인 CD44의 발현양을 인공피부에서 확인하였다. 대조군 대비 제주용



A



control

Jeju lava sea water

B

Figure 2. Jeju lava sea water increased aquaporin 3 expression. (A) mRNA expression of AQP3 (B) immunofluorescence staining of AQP3. Scale bar = 50 μm (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

암해수를 처리한 인공피부 모델에서 CD44의 생성량이 증가되어 있는 것을 확인하였다(Figure 3). 또한 제주용암해수를 처리한 인공피부 모델에서 대조군 대비 각질층의 두께가 증가하여 피부 장벽기능이 강화된 것을 관찰할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구는 다양한 미네랄이 함유된 제주용암해수의 피부 보습 효과를 확인하기 위해 진행되었다. 피부 보습을 유지하기 위해서는 피부 장벽의 발달과 함께 표피층 내 수분의 유지와 이동이 원활이 이루어져야 한다. 필라그린은 피부의 구조를 이루는 단백질일 뿐만 아니라 필라그린의 분해산물인 NMF는 피부의 수분유지에 필수적인 요소이다. 필라그린은 피부 장벽의 생성과 유지에 중요한 역할을 담당하며, 필라그린이 피부 장벽, 피부 보습에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 발

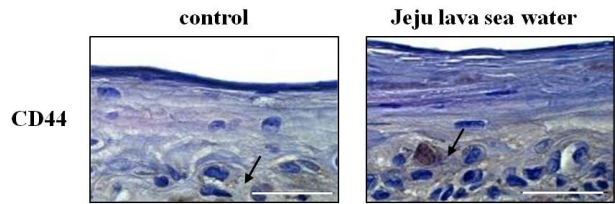


Figure 3. Jeju lava sea water increased CD44 (HA receptor) expression in a skin equivalent model. Skin equivalent model was treated with 300 ppm of Jeju lava sea water for 6 days after 5 days of air-liquid interface culture. The arrow bar indicates CD44 staining region. Scale bar = 50 μm .

표되었다[4-6]. 최근에는 필라그린을 NMF로 분해하는 과정에 관여하는 효소들과 피부 보습에 대한 연구도 이루어지고 있다[8]. 필라그린을 분해하는 효소에는 caspase-14, bleomycin hydrolase, calpain-1가 보고되어 있으며 각각의 기능 연구 및 피부 보습과의 연관성도 보고되고 있다[23,24]. 제주용암해수를 각질형성세포에 처리한 결과 필라그린과 필라그린 분해과정에 참여하는 caspase-14의 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

피부 표피층에 위치한 수분 이동통로인 AQP3는 수분뿐만 아니라 세포 내 글리세롤의 이동도 조절하며 표피층의 증식과 분화에도 영향을 미친다[11]. AQP3는 수분의 이동통로로 세포막에 위치하고 있으며 나이가 들면 발현양이 감소하여 나이가 들에 따라 일어나는 피부 수분감소의 한 원인으로 생각되고 있다[12]. 제주용암해수가 수분 이동 채널인 AQP3의 발현양에 미치는 영향을 확인하기 위해 각질형성세포에 처리한 결과 AQP3 유전자 발현양과 단백질 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

진피층과 표피층을 가지고 있어 사람피부와 유사한 인공피부를 이용한 실험에서 제주용암해수 처리에 의해 수분 보유력이 뛰어난 HA의 수용체인 CD44의 발현양이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

제주용암해수는 각질형성세포를 이용한 실험에서 필라그린과 caspase-14 유전자의 발현양을 증가시켜 피부 장벽기능 강화와 수분 보유력을 향상시킬 수 있고, AQP3의 발현을 증가시켜 표피층 세포 간의 수분이동 조절을 통해 피부 보습에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다. 또한 인공피부에 제주용암해수 처리시 CD44의 발현양을 증가시켜 피부 보습효과를 확인할 수 있었

다. 실제로 사람피부에서 보습효과를 확인하기 위해 제주용암해수를 이용한 화장품 제형을 제작하여 임상 실험을 통해 제주용암해수의 피부 보습 효과를 확인하는 실험을 추가적으로 진행할 예정이다.

Reference

1. J. M. Brandner, S. Kief, C. Grund, M. Rendl, P. Houdek, C. Kuhn, E. E. Tschachler, W. W. Franke, and I. Moll, Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes, *Eur. J. Cell Biol.*, **81**(5), 253 (2002).
2. P. J. Caspers, G. W. Lucassen, E. A. Carter, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, *In vivo* confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles, *J. Invest. Dermatol.*, **116**(3), 434 (2001).
3. A. V. Rawlings and C. R. Harding, Moisturization and skin barrier function, *Dermatol. Ther.*, **17**(s1), 43 (2004).
4. B. A. Dale, K. A. Resing, and J. D. Lonsdale-Eccles, Filaggrin: a keratin filament associated protein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **455**(1), 330 (1985).
5. A. Sandilands, C. Sutherland, A. D. Irvine, and W. H. McLean, Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease, *J. Cell Sci.*, **122**(9), 1285 (2009).
6. J. A. McGrath and J. Uitto, The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease, *Trends Mol. Med.*, **14**(1), 20 (2008).
7. Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokuda, and G. Imokawa, Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Invest. Dermatol.*, **104**(5), 806 (1995).
8. E. Hoste, P. Kemperman, M. Devos, G. Denecker, S. Kezic, N. Yau, B. Gilbert, S. Lippens, P. De Groote, R. Roelandt, P. Van Damme, K. Gevaert, R. B. Presland, H. Takahara, G. Puppels, P. Caspers, P. Vandenameele, and W. Declercq, Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin, *J. Invest. Dermatol.*, **131**(11), 2233 (2011).
9. M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, and P. Agre, Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels, *Annu. Rev. Biochem.*, **68**(1), 425 (1999).
10. M. Boury-Jamot, R. Sougrat, M. Tailhardat, B. Le Varlet, F. Bonte, M. Dumas, and J. M. Verbavatz, Expression and function of aquaporins in human skin: is aquaporin-3 just a glycerol transporter?, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**(8), 1034 (2006).
11. T. Ma, M. Hara, R. Sougrat, J. M. Verbavatz, and A. S. Verkman, Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3, *J. Biol. Chem.*, **277**(19), 17147 (2002).
12. J. Li, H. Tang, X. Hu, M. Chen, and H. Xie, Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing, *Australas. J. Dermatol.*, **51**(2), 106 (2010).
13. W. Knudson, D. J. Aguiar, Q. Hua, and C. B. Knudson, CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis, *Exp. Cell Res.*, **228**(2), 216 (1996).
14. B. P. Toole, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nat. Rev. Cancer*, **4**(7), 528 (2004).
15. R. F. Thorne, J. W. Legg, and C. M. Isacke, The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in coordinating adhesive and signalling events, *J. Cell Sci.*, **117**(3), 373 (2004).
16. P. Heldin, E. Karousou, B. Bernert, H. Porsch, K. Nishitsuka, and S. S. Skandalis, Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis, *Connect. Tissue Res.*, **49**(3), 215 (2008).
17. C. Wang, M. Tammi, and R. Tammi, Distribution of hyaluronan and its CD44 receptor in the epithelia of human skin appendages, *Histochemistry*, **98**(2), 105 (1992).
18. R. Tammi, U. M. Agren, A. L. Tuhkanen, and M. Tammi, Hyaluronan metabolism in skin, *Prog. Histochem. Cytochem.*, **29**(2), 1 (1994).
19. S. Karvinen, V. M. Kosma, M. I. Tammi, and R. Tammi, Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal

- keratinocyte tumours, *Br. J. Dermatol.*, **148**(1), 86 (2003).
20. N. Kirschner, M. Haftek, C. M. Niessen, M. J. Behne, M. Furuse, I. Moll, and J. M. Brandner, CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function, *J. Invest. Dermatol.*, **131**(4), 932 (2011).
21. M. Denda, C. Katagiri, T. Hirao, N. Maruyama, and M. Takahashi, Some magnesium salts and a mixture of magnesium and calcium salts accelerate skin barrier recovery, *Arch. Dermatol. Res.*, **291**(10), 560 (1999).
22. E. Proksch, H. P. Nissen, M. Bremgartner, and C. Urquhart, Bathing in a magnesium-rich Dead Sea salt solution improves skin barrier function, enhances skin hydration, and reduces inflammation in atopic dry skin, *Int. J. Dermatol.*, **44**(2), 151 (2005).
23. E. D. Son, Y. Kim, K. M. Joo, H. J. Kim, E. Lee, G. W. Nam, E. G. Cho, M. Noh, J. H. Chung, S. Y. Byun, and T. R. Lee, Skin dryness in apparently healthy human skin is associated with decreased expression of bleomycin hydrolase in the stratum corneum, *Clin. Exp. Dermatol.*, **40**(3), 247 (2015).
24. C. Y. Hsu, J. Henry, A. A. Raymond, M. C. Mechin, V. Pendaries, D. Nassar, B. Hansmann, S. Balica, O. Burlet-Schiltz, A. M. Schmitt, H. Takahara, C. Paul, G. Serre, and M. Simon, Deimination of human filaggrin-2 promotes its proteolysis by calpain 1, *J. Biol. Chem.*, **286**(26) 23222 (2011).