

# 자외선 조사와 병행된 로얄제리 식이 공급이 무모 생쥐의 표피 보습과 필라그린, 유리아미노산 함량 및 관련 대사 효소의 발현 변화에 미치는 영향\*

민지현<sup>1</sup> · 이윤주<sup>1</sup> · 한상미<sup>2</sup> · 조윤희<sup>1§</sup>

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과,<sup>1</sup> 농촌진흥청 농업생물부<sup>2</sup>

## Dietary effect of royal jelly supplementation on epidermal levels of hydration, filaggrins, free amino acids and the related enzyme expression in UV irradiated hairless mice\*

Min, Jihyun<sup>1</sup> · Lee, Yunju<sup>1</sup> · Han, Sang-Mi<sup>2</sup> · Choi, Yunhi<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea

### ABSTRACT

Ultraviolet (UV) irradiation reduces epidermal hydration, which is paralleled by the reduction of natural moisturizing factors (NMFs). Of various NMFs, free amino acids (AAs) are major constituents generated by filaggrin degradation. In this study, we attempted to determine whether dietary supplementation of royal jelly (RJ) in UV-irradiated mice can alter epidermal levels of hydration, filaggrins, and free AAs as well as of peptidylarginine deiminase-3 (PAD3), an enzyme involved in filaggrin degradation processes. Albino hairless mice were fed either a control diet (group UV+: UV irradiated control) or diets with 1% RJ harvested from different areas in Korea (groups RJ1, RJ2, and RJ3) or imported from China (group RJ4) for six weeks in parallel with UV irradiation. A normal control group (group UV-) was fed a control diet without UV irradiation for six weeks. Reduced epidermal levels of hydration, total filaggrins, and PAD3 were observed in group UV+; in group RJ1, these levels were increased to a level similar to that of group UV-. In addition, pro-filaggrins, two repeat intermediates (2RI), a precursor with two filaggrin repeats, and filaggrin were increased. Although no alteration of AAs was observed in any of the groups, and glutamate and serine, major AAs of NMF in group RJ1 were higher than in group UV+. Despite the increased levels of PAD3, epidermal levels of hydration, filaggrins, glutamate, and serine in groups RJ2, RJ3, and RJ4 were similar to those in group UV+. Dietary supplementation of RJ1 improves epidermal hydration in parallel with enhanced expression and degradation of filaggrin, but not by increased protein expression of PAD3, along with increased generation of glutamate and serine. (Korean J Nutr 2013; 46(2): 109 ~ 118)

**KEY WORDS:** royal jelly, filaggrin, peptidylarginine deiminase-3 (PAD3), free amino acid, ultraviolet irradiation.

### 서 론

피부는 자외선 등의 외부 환경 및 미생물의 침입으로부터 인체를 보호하는 방어 기능을 하며 동시에 수분 손실을 예방하여 보습 기능을 한다.<sup>1,2)</sup> 건강한 피부 유지에 중요한 피부 보

습은 표피의 가장 바깥층에 존재하는 피지막과 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF)에 의해 유지되는데,<sup>3,4)</sup> 지질 복합체인 피지막이 층상구조를 이루어 수분 손실을 억제하는 반면 천연보습인자는 흡습 능력에 의해 수분을 직접적으로 보유한다.<sup>4-6)</sup> 천연보습인자는 젖산, 요소, 구연산 및 유리 아미노산과 pyr-

접수일: 2012년 12월 13일 / 수정일: 2013년 3월 12일 / 채택일: 2013년 4월 4일

\*This work was supported by a grant from the Next-Generation BioGreen 21 Program (No. PJ0090662012), Rural Development Administration, Republic of Korea.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail: choyunhi@khu.ac.kr

© 2013 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

rolidone carboxylic acid (PCA), urocanic acid와 같은 아미노산 유도체의 혼합물로 각질층 무게의 20~30%를 차지한다.<sup>3,4,7,8)</sup> 이 중 유리 아미노산은 표피 분화의 최종 단계에서 생성되는 특정 단백질인 필라그린의 대사산물이며,<sup>9,10)</sup> 특히 serine과 glycine이 40% 이상을 차지한다.<sup>11)</sup> 표피 아미노산의 유일한 전구 단백질인 필라그린은<sup>12)</sup> 10개 이상의 필라그린 복합체인 profilaggrin으로 최초 생성되는데,<sup>2,13,14)</sup> profilaggrin은 내부 serine 잔기의 광범위한 인산화로 인하여 극도의 불용성을 띄며 불활성화 상태로 과립층 (stratum granulosum)에서 생성되어 우선 저장된다.<sup>3,15)</sup> 이후 profilaggrin은 필라그린의 중합체로 볼 수 있는 three-repeat intermediate (3RI) 또는 two-repeat intermediate (2RI)와 같은 중간 분해 산물을 거쳐 필라그린으로 대사되고<sup>15,16)</sup> 또한 peptidylarginine deiminase-3 (PAD3)에 의해 변형된 후 caspase-14, calpain-1 및 bleomycin hydrolase (BH) 등의 다양한 단백질 분해 효소에 의해 계속 분해된 후<sup>15,17,18)</sup> 최종적으로 유리 아미노산으로 대사된다.<sup>19,20)</sup> 표피의 필라그린 및 유리 아미노산 농도 감소는 피부 건조를 초래함이 보고되어 있다.<sup>21-23)</sup>

자외선은 피부의 광노화를 일으키는 주된 원인으로 피부에 주름 형성, 건조, 표피 과증식 등을 야기한다.<sup>24-26)</sup> 또한 자외선 조사는 표피 필라그린이 유리 아미노산으로 분해되는 과정의 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다.<sup>3,27)</sup> 이와 같은 자외선에 의한 피부 노화를 방지 및 개선시키기 위해 자외선 차단제의 사용뿐만 아니라 다양한 건강기능성식품의 섭취가 이루어지고 있다.<sup>25)</sup> 이 중 로얄제리는 피부 노화 억제를 위한 대표적인 건강기능성식품으로 상용되고 있다. 로얄제리는 일벌들이 인두부를 통해 분비하는 물질로 항생, 항산화, 노화 억제 및 피부 미용 등의 생리 활성 효과를 나타낸다.<sup>28-30)</sup> 선행 연구를 통해 로얄제리 식이 공급이 피지막의 주요 지질인 세라마이드의 생성을 증가시킴이 보고되었으나<sup>31)</sup> 주요 천연보습인자인 유리 아미노산과 전구 단백질인 필라그린 대사 관련 기전에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 자외선 조사와 병행된 로얄제리 식이 공급이 무모 생쥐의 표피 필라그린과 유리 아미노산, 관련 대사 효소의 발현 및 수분 함량 변화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

생후 5주된 25 g 내외의 수컷 albino SKH-1 hairless mouse 50마리를 중앙실험 동물 사육장으로부터 공급받아 실험 식이로 사육하기 전 1주 동안 고형배합 사료로 적응시켰다. 실험군은 체중에 따라 난괴법을 이용하여 자외선을 조사하지 않은 정

상 대조군 (UV - 군), 자외선 조사군 (UV + 군), 자외선 조사와 함께 국내 A 산 (RJ1군), 국내 B 산 (RJ2군), 국내 C 산 (RJ3군) 및 중국산 (RJ4군) 로얄제리를 식이 공급한 실험군으로 나누었다. 사육 기간 동안 사료와 물을 마음껏 섭취하도록 하였으며 온도는  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는  $60 \pm 5\%$ 를 유지하고 매일 광주기와 암주기가 12시간이 되도록 조절하였다. 본 동물 실험 프로토콜은 경희대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Kyung Hee University)에 의해 승인되었다 (승인번호: KHUASP-08-008).

### 자외선 조사

UVB (약 30% 정도의 UVA를 함유하고 있음: 5 Sankyo Denki G5T5E lamps, Sankyo Denki Co., Japan)을 사용하여 처음 1주에는 매일 1회 2MED ( $200 \text{ mJ/cm}^2$ )씩 동물의 등 부위에 조사하였고 2주차부터 6주차까지 1주일에 3회 동물의 등 부위에 4MED ( $400 \text{ mJ/cm}^2$ )씩 조사하였다.<sup>32)</sup>

### 실험식이

UV - 군과 UV + 군은 로얄제리가 첨가되지 않은 일반 식이를 공급하였고, 로얄제리 식이 공급군은 전체식이 무게의 1.0%에 상응하는 국내 A 산, 국내 B 산, 국내 C 산 및 중국산 로얄제리 고형분을 각각 식이에 혼합하여 6주간 공급하였다. 로얄제리 시료 첨가에 의해 발생하는 건분 식이 무게 차이는 옥수수 전분을 감하여 조정하였다. 로얄제리 시료는 각 지역의 생산자에게 직접 공급받아 사용하였으며 사용 직전까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 각 실험군의 식이 조성은 Table 1과 같으며 식이 지방은 식이 무게의 10%로 고정시키고 corn oil을 공급하였다.

### 체중 및 실험식이 섭취량 측정

식이효율 측정을 위해 주 1회 체중과 식이 공급량 및 남은 식이량을 측정하였다. 식이효율은 실험 기간 동안의 체중 증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

### 피부 보습 측정

실험동물의 피부 수분 측정은 Corneometer CM825 (Courage&Khazaka, Cologne, Germany)를 이용하여 자외선 조사 직전, 자외선 조사 1주, 3주 및 6주차에 각각 한 번씩 총 4회 측정하였다. 측정 시 실험 동물 등의 일정한 부분을 가볍게 눌러 나타나는 수치를 기록하였다.

### 동물의 희생과 표피 분리

6주간 실험식이 후 경추탈골의 방법으로 희생시키고 피부 조직을 얻었다. 피부 조직은 Hank solution (Hank's Balanced Salt Solution)과 Dispase II ( $2.4 \text{ unit/mL}$ , Roche, Germany)

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

Ingredients	Experimental group <sup>1)</sup>					
	UV-	UV+	RJ1	RJ2	RJ3	RJ4
Corn starch	372	372	362	362	362	362
Sucrose	200	200	200	200	200	200
Cellulose powder	50	50	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100	100	100
Vitamin mix <sup>2)</sup>	10	10	10	10	10	10
Mineral mix <sup>3)</sup>	35	35	35	35	35	35
L-cystine	3	3	3	3	3	3
Casein <sup>4)</sup>	230	230	230	230	230	230
Royal jelly	—	—	10	10	10	10
UV irradiation	—	+	+	+	+	+

1) Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with (group UV+) UV irradiation for 6 weeks; Groups RJ1, RJ2, RJ3 and RJ4, hairless mice fed diets containing 1.0% Royal Jelly (RJ) harvested from different areas in Korea or from China (group RJ4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks 2) AIN-93 Vitamin Mix #310025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA): niacin, 3 g = kg; calcium pantothenate, 1.6 g = kg; pyridoxine HCl, 0.06 g = kg; thiamine HCl, 0.6 g = kg; riboflavin, 0.6 g = kg; folic acid, 0.2 g = kg; biotin, 0.2 g = kg; vitamin E acetate (500 IU = g), 15 g = kg; vitamin B12 (0.1%), 2.5 g = kg; vitamin A palmitate (500,000 IU = g), 0.8 g = kg; vitamin D3 (400,000 IU = g), 0.25 g = kg; vitamin K1=dextrose mix (10 mg = g), 7.5 g = kg; sucrose, 967.23 g = kg 3) AIN-93 G salt mix #210025 (Dyets Inc.): calcium carbonate, 357 g = kg; potassium phosphate (monobasic), 196 g = kg; potassium citrate H<sub>2</sub>O, 70.78 g = kg; sodium chloride, 74 g = kg; potassium sulfate, 46.6 g = kg; magnesium oxide, 24 g = kg; ferric citrate USP, 6.06 g = kg; zinc carbonate, 1.65 g = kg; manganous carbonate, 0.63 g = kg; cupric carbonate, 0.3 g = kg; potassium iodate, 0.01 g = kg; sodium selenate, 0.01025 g = kg; ammonium paramolybdate 4H<sub>2</sub>O, 0.00795 g = kg; sodium metasilicate, 9H<sub>2</sub>O, 1.45 g = kg; R3bromium potassium sulfate 12H<sub>2</sub>O, 0.275 g = kg; lithium chloride, 0.0714 g = kg; boric acid, 0.0815 g = kg; sodium fluoride, 0.0635 g = kg; nickel carbonate, 0.0318 g = kg; ammonium vanadate, 0.066 g = kg; sucrose (finely powdered), 221.026 g = kg 4) Casein (nitrogen × 6.25), 870 g = kg

가 1 : 1로 혼합된 용액에 담가 4℃에서 16시간 동안 처리한 후 표피를 분리하였다.<sup>31)</sup>

### 표피 필라그린 (Filaggrins) 추출 및 분석

피부 조직을 PBS (pH 7.4)에 10 mM EDTA를 혼합한 용액과 함께 4℃에서 18시간 처리하여 표피를 분리하였다. 분리된 표피는 9 M Urea, 2% SDS, 2 mM EDTA 및 protease inhibitor cocktail을 포함한 50 mM Tris buffer (P-8340, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 함께<sup>33)</sup> polytron을 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 조직을 15,000 g에서 0℃로 30분간 원심분리 후 상층액을 얻었고 단백질 정량을 시행하였다. 동량의 단백질 (5 µg/well)을 4% (Profilaggrin 발현) 또는 8% (Filaggrin 발현) SDS/PAGE gel에 전기영동 시킨 후 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다.

Membrane은 rabbit polyclonal 1차 항체인 Filaggrin antibody (GeneTex Inc., San Antonio, TX, USA)를 1/1,000농도로 희석한 PBST solution과 함께 4℃에서 18시간 동안 반응시키고 PBST solution으로 세척하였다. 연속적으로 PBST solution을 이용하여 1/4,000 농도로 희석한 2차 항체 anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA)로 실온에서 2시간 반응 후 PBST로 세척하고 발색은 Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 detection하였다. 각 band의 intensity는 cytokeratin-5의 발현을

기준으로 하여 densitometry로 정량하였다.

### 표피 Peptidylarginine deiminase-3 (PAD3) 발현 분석

피부 조직을 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco BRL, USA)와 Dispase II (2.4 unit/mL, Roche, Germany)의 혼합용액 (1 : 1 v/v)과 함께 4℃에서 16시간 처리한 후 표피를 분리하였다. 분리한 표피는 0.5% Nonidet P-40 (TE-NP40 buffer extract), 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, protease inhibitor가 함유된 Tris-EDTA buffer (P-8340, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 함께 polytron을 이용하여 분쇄하였다.<sup>34)</sup> 분쇄한 조직을 15,000 g에서 0℃로 30분 동안 원심분리 후 상층액을 얻었고 단백질 정량을 시행하였다. 시료 40 µg/well을 8% SDS/PAGE gel에 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다.

Membrane은 rabbit polyclonal 1차 항체 PAD3 antibody (abcam, Cambridge, UK) 및 2차 항체를 이용하여 위와 동일한 방법으로 반응시키고 발색은 Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 detection하였다. 각 band의 intensity는 cytokeratin-5의 발현을 기준으로 densitometry로 정량하였다.

### 표피 유리 아미노산 함량 분석

분리한 표피 조직을 15% Trichloroacetic acid (TCA) 용액과 함께 polytron (P-8340, Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, USA)으로 분쇄하고 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 산 침전 단백질을 제거하기 위해 12,000 g에서 10분간 원심분리한 후<sup>33)</sup> 상층액을 분리하여 0.45 µm filter (Millipore, USA)로 여과하였다. 개별 아미노산의 농도 분석은 HPLC를 사용하였으며, 분석 조건은 column (Zorbax XDB-C18)에서 40 mM phosphate buffer와 acetonitrile : Methanol : Water = 45 : 45 : 10 용액을 mobile phase로 유속 2.0 mL/min를 유지하면서 단계적으로 사용하였다.

### 통계분석

실험 결과는 SPSS, Ver 18.0 program (Statistical package for social science)을 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 실험군 별 평균 (Mean) ± 표준오차 (SEM)로 나타냈으며, 각 군 간의 비교는 one-way ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결 과

### 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이효율 (FER)

각 로얄제리를 6주간 식이 공급한 RJ1, RJ2, RJ3 및 RJ4군

의 식이 섭취량은 정상대조군인 UV - 군과 자외선 대조군인 UV - 군보다 유의적으로 증가하였다. 그러나 체중 증가량과 식이효율은 그룹 간 유의성이 없었다 (Table 2).

### 피부 보습 측정

자외선 조사와 병행된 로얄제리 식이공급 기간 동안의 피부 수분 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 자외선 조사 직전 (0주)에 측정된 수분 함량은 자외선 조사군인 UV + 군이 정상대조군인 UV - 군과 유사하였으나, 자외선 조사가 진행됨에 따라 UV + 군의 수분 함량은 UV - 군보다 점진적으로 낮아졌다. 이 결과는 지속적인 자외선 조사에 의해 UV + 군의 피부 보습이 감소하였음을 의미한다. 각 로얄제리를 6주간 식이 공급한 실험군의 경우 1주 및 3주 식이공급 시 UV + 군과 피부 보습이 유사하거나 낮았으나, 6주 식이공급 후 RJ1군의 보습은 UV + 군에 비해 증진되었다. 반면 RJ2, RJ3 및 RJ4군의 피부 보습 정도는 UV + 군과 유사하거나 낮았다. 이러한 결과는 RJ1의 식이공급이 자외선 조사에 의해 유도된 피부 건조를 완화시켰음을 제시한다.

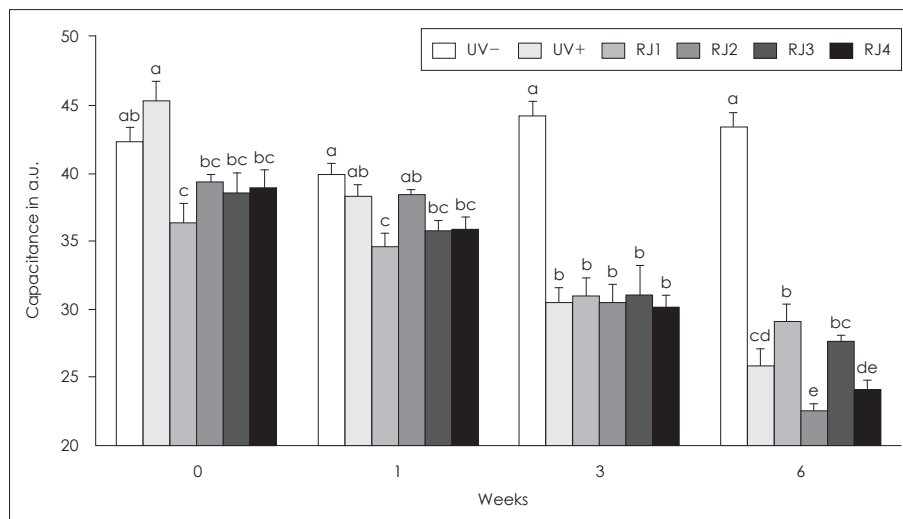
### 표피 필라그린 (Filaggrins) 함량 변화

자외선 조사와 병행된 로얄제리 식이 공급으로 인한 표피

**Table 2.** Body weight change, food intake and FER

Ingredient	Experimental groups <sup>1)</sup>					
	UV-	UV+	RJ1	RJ2	RJ3	RJ4
Weight gain (g/week)	1.15 ± 0.24 <sup>3)</sup>	1.02 ± 0.24	1.11 ± 0.29	1.03 ± 0.33	0.93 ± 0.33	0.71 ± 0.24
Food intake (g/week)	20.16 ± 0.43 <sup>c</sup>	21.00 ± 1.61 <sup>bc</sup>	22.84 ± 0.51 <sup>ab</sup>	23.96 ± 0.74 <sup>a</sup>	22.84 ± 0.51 <sup>ab</sup>	23.82 ± 0.41 <sup>a</sup>
FER <sup>2)</sup>	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01

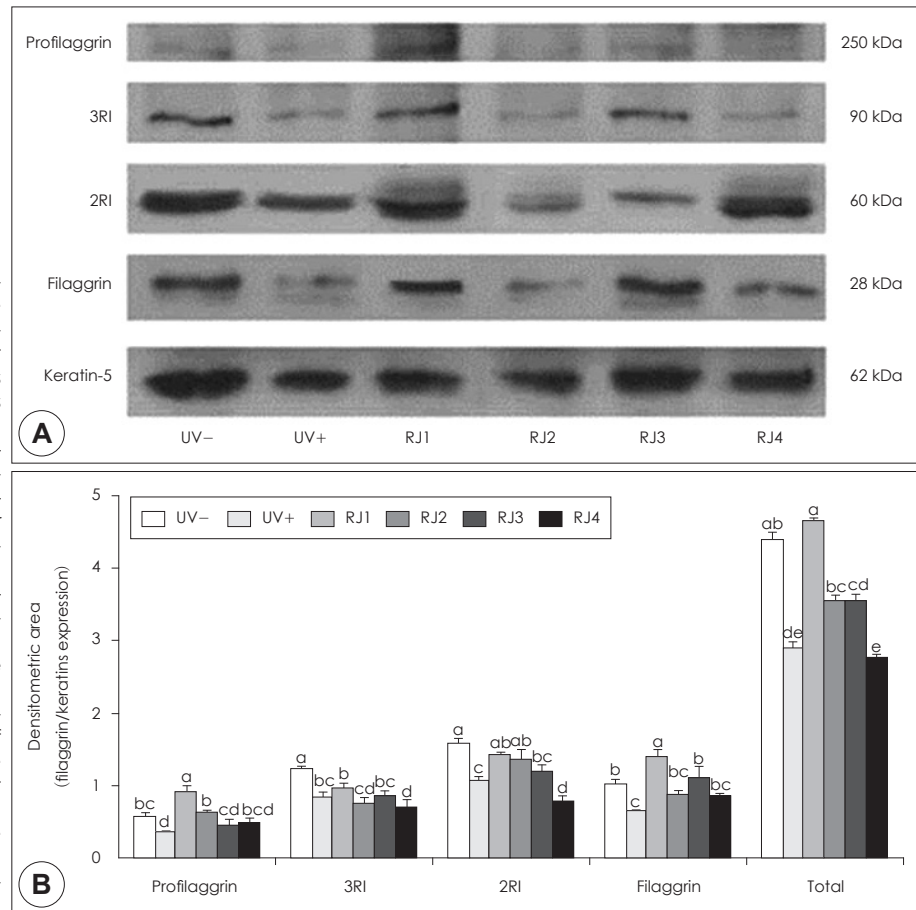
1) Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with (group UV+) UV irradiation for 6 weeks; Groups RJ1, RJ2, RJ3 and RJ4, hairless mice fed diets containing 1.0% Royal Jelly (RJ) harvested from different areas in Korea or from China (group RJ4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks 2) FER: food efficiency ratio: [weight gain (g)/week]/[food intake (g)/week] 3) All values are mean ± SEM (1 wk: n = 10 in group UV-, UV+, RJ1, RJ3, RJ4, n = 9 in group RJ2; 2 wk: n = 10 in groups UV-, UV+, RJ1, RJ3, n = 9 in groups RJ2, RJ4; 3-6 wk: n = 10 in groups UV-, UV+, RJ1, n = 9 in groups RJ2, RJ3, RJ4). Values without a common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test



**Fig. 1.** Altered epidermal hydration in the groups. Hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 6 weeks (group UV-); UV-irradiated hairless mice fed a control diet (group UV+) or diets supplemented with 1.0% royal jelly harvested from different areas in Korea or from China (group RJ4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks. Values are mean ± SEM (0-1 wk: n = 10 in groups UV-, UV+, RJ1, RJ3 and RJ4, n = 9 in group RJ2; 3-6 wk: n = 10 in groups UV-, UV+, RJ1, n = 9 in groups RJ2, RJ3, RJ4). Values without a common letter in each week are significantly different ( $p < 0.05$ ) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.



**Fig. 2.** Altered protein levels of profilaggrin, degradative intermediate and filaggrin in the epidermis of groups. Hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 6 weeks (group UV-); UV-irradiated hairless mice fed a control diet (group UV+) or diets supplemented with 1.0% royal jelly harvested from different areas in Korea or from China (group R-J4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks. A: Representative expression of profilaggrin, three-repeated intermediate (3RI), two-repeated intermediate (2RI) and filaggrin proteins in the epidermis of groups. B: The signal intensities from multiple experiments of A were quantified and the integrated areas were normalized to the corresponding value of keratin-5 (loading control). Values are mean  $\pm$  SEM (n = 6). Values without a common letter in profilaggrin, 3RI, 2RI, filaggrin and total filaggrins are significantly different (p < 0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.



의 필라그린 함량 변화를 western blot assay로 분석하였다 (Fig. 2). 필라그린은 표피의 최종 분해 단계에서 profilaggrin 으로부터 분해 과정에서 생성되는 three-repeated intermediate (3RI) 또는 two-repeated intermediate (2RI)와 같은 중간 분해 산물을 거쳐 최종적으로 생성된다.<sup>16)</sup> UV + 군의 필라그린과 중간 분해 산물 및 profilaggrin을 포함한 총 필라그린 함량은 정상대조군인 UV - 군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이는 자외선 조사가 주요 천연보습인자인 유리 아미노산 생성의 전구 단백질인 필라그린과 중간 분해 산물 및 profilaggrin의 함량을 감소시켜 궁극적으로 피부 건조를 유발함을 의미한다.

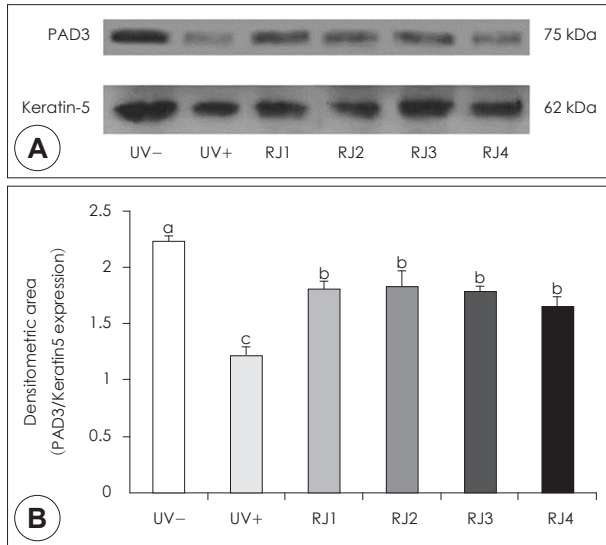
RJ1, RJ2군의 총 필라그린 함량은 UV + 군에 비해 유의적으로 높았으며 특히 RJ1군의 총 필라그린 함량의 증가 정도는 UV - 군과 유사하였다. 특히 profilaggrin과 2RI 및 filaggrin 함량이 UV + 군보다 유의적으로 높았으며 그 증가 정도는 UV - 군과 유사하거나 높았다. 반면 RJ3군과 RJ4군의 총 필라그린 함량은 UV + 군과 유사하였고, profilaggrin, 3RI 및 2RI의 함량은 UV - 군과 유사하거나 낮았다. 이 결과는 국내산 로얄제리의 식이 공급이 자외선 조사로 인한 표피 필라그린과 중간 분해 산물 및 profilaggrin 함량이 감소되는 것을 예방

함을 의미하며 특히 RJ1의 효과가 가장 우수하였다.

### 표피 Peptidylarginine deiminase-3 (PAD3) 발현

필라그린의 분해 과정에 관여하는 효소 중 peptidylarginine deiminase-3 (PAD3)는 granular keratinocyte와 깊은 각질층의 각질세포에 존재하는 효소로써, 특히 필라그린이 많은 곳에서 주로 발견되며,<sup>17,18)</sup> intermediate filaments로부터 필라그린을 해리시키고 뒤이어 일어나는 천연보습인자의 주요 구성 성분인 유리 아미노산으로의 분해 과정을 유도한다.<sup>35)</sup>

표피의 peptidylarginine deiminase-3 (PAD3) 발현을 western blot assay로 분석한 결과 (Fig. 3), UV + 군의 PAD3 발현은 UV - 군에 비해 유의적으로 낮았다. 이 결과는 자외선 조사가 PAD3 발현 억제를 초래함을 제시하였다. RJ1과 RJ2, RJ3 및 RJ4군의 PAD3 발현은 모두 UV + 군에 비해 유의적으로 높았다. 이 결과를 통하여 로얄제리 식이 공급이 자외선 조사에 의해 발생하는 PAD3 발현 저하를 예방하는데 효과가 있음을 알 수 있다. 그러나 각 로얄제리를 섭취시킨 군간의 유의성은 없었다.



**Fig. 3.** Altered protein levels of peptidylarginine deiminase-3 (PAD3) in the epidermis of groups. Hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 6 weeks (group UV-); UV-irradiated hairless mice fed a control diet (group UV+) or diets supplemented with 1.0% royal jelly harvested from different areas in Korea or from China (group RJ4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks. A: Representative expressions of PAD3 in the epidermis of groups. B: The signal intensities from multiple experiments of A were quantified and the integrated areas were normalized to the corresponding value of keratin-5 (loading control). Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Values without a common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

### 표피 유리 아미노산 함량 변화

표피의 유리 아미노산은 천연보습인자의 주요 구성 요소로서 피부 보습에 크게 기여한다.<sup>6)</sup> 표피의 유리 아미노산 함량 변화를 분석한 결과 (Table 3, Fig. 4), 총 유리 아미노산 함량은 군간 유의적인 차이가 없었다. 개별 유리 아미노산 분석 결과, UV + 군의 표피에서는 glutamate와 serine의 함량이 UV - 군에 비해 다소 낮았다. RJ1군의 glutamate와 serine의 함량은 UV - 군에 비해 유의적으로 높았던 반면 RJ2와 RJ3군은 RJ1군보다 다소 낮았다. RJ4군은 glutamate는 검출되지 않았고 serine의 함량은 UV + 군과 유사하였다.

UV + 군의 alanine과 methionine 함량은 UV - 군에 비해 다소 낮았으며 RJ1, RJ2 및 RJ4군에서의 alanine과 methionine의 함량은 UV + 군과 유사하거나 낮았고 RJ3군은 methionine의 함량은 UV + 군과 유사하였고 alanine의 함량은 UV - 군과 유사하였다. Lysine의 함량은 UV + 군과 UV - 군 사이에 유의적인 차이가 없었으나 RJ1, RJ2, RJ3 및 RJ4군은 UV - 및 UV + 군보다 높은 경향이였다. Arginine과 leucine, proline 및 tyrosine의 함량은 모든 군에서 군간 유의성이 없었고, RJ4군은 proline이 검출되지 않았다. Aspartate의 함량은 UV - 군과 UV + 군 및 RJ3군간 유의성이 없었고 RJ1, RJ2 및 RJ4군에서는 검출되지 않았다. 표피 유리 아미노산 중 gly-

cine을 포함하여 cysteine, histidine, isoleucine, phenylalanine, threonine, tryptophan 및 valine은 모든 군에서 검출되지 않았다.

## 고찰

본 연구는 자외선 조사에 의한 피부 광노화 유도과 함께 산지 별 국내산 및 중국산 로얄제리 식이를 6주간 공급한 무모 생쥐의 표피 필라그린과 유리 아미노산 함량 및 관련 대사 효소의 발현 변화를 정상대조군인 UV - 군 및 자외선 조사군인 UV + 군과 비교 분석하였다. 자외선 조사는 피부에 주름 형성, 표피 과증식, 색소 침착 등을 야기하며<sup>24-28)</sup> 표피 필라그린이 표피의 주요 천연보습인자인 유리 아미노산으로 분해되는 과정에 변화를 일으켜 결과적으로 피부 건조를 초래하는 것으로 알려져있다.<sup>27)</sup> 자외선 조사 직전 (0주)의 피부 보습은 군간 유의적인 차이가 나타났으나 피부 보습은 인체뿐 아니라 동물에서도 개체 간의 차이가 큰 인자로서<sup>4)</sup> 실험군을 난피법을 이용하여 나눈 경우 0주차 피부 보습의 군간 차이는 불가피하다. 각 군의 0주차 피부 보습 수치를 100%로 기준하여 6주차의 각 군별 변화를 %로 파악한 경우 UV - 군에서  $102.5 \pm 2.67\%$ 로 2.5% 증가 (유의성 없음), UV + 군  $58.9 \pm 2.43\%$ 로 41.1% 감소, RJ1군  $80.2 \pm 3.38\%$ 로 19.8% 감소, RJ2군  $57.3 \pm 1.34\%$ 로 42.7% 감소, RJ3군  $72.7 \pm 2.09\%$ 로 27.3% 감소 및 RJ4군  $60.5 \pm 2.83\%$ 로 39.5% 감소하여 UV - 군을 제외한 UV +, RJ1-4군에서 피부 보습이 유의적으로 감소하였으나 그 중 RJ1군의 피부 보습 감소 정도가 가장 작았다. 즉 불가피한 개체 간 차이에 의해 초래된 0주차 피부 보습의 군간 유의적인 차이보다는 자외선 조사 및 로얄제리 섭취가 이루어진 6주간의 각 군별 보습의 변화 양상 또는 1, 3, 6주에 측정된 피부 보습의 군간 비교가 의미가 있다. 0주차를 100% 기준으로 한 % 변화가 아닌 측정된 피부 보습 실제 수치 (capacitance in au)를 비교한 경우에도 광노화 유도 후 측정된 UV + 군의 피부 보습은 UV - 군보다 크게 감소하였다. 선행 연구에서 피부의 자외선 조사는 표피의 수분 손실을 증가시키고 수분 함유량을 감소시켜 피부 건조를 유발하는 것으로 알려져 있는데,<sup>4)</sup> Fig. 1의 결과는 지속적인 자외선 조사에 의해 UV + 군의 피부 보습이 감소하였음을 재확인하였다. 6주간의 자외선 조사와 병행한 로얄제리 식이 공급 후 RJ1군의 피부 보습은 UV + 군에 비해 증진되었다. 즉 RJ1의 식이 공급은 자외선 조사에 의해 유도된 피부 건조를 완화시켰음을 제시한다.

표피의 최종 분화 단계에서 profilaggrin의 분해로부터 생성되는 필라그린은<sup>18)</sup> 표피의 주요 천연보습인자인 유리아미노산으로 최종 분해된다.<sup>15)</sup> 아미노산 구성 측면에서, 표피의 천연보

**Table 3.** Free amino acid contents in the epidermis of hairless mice<sup>1)</sup>

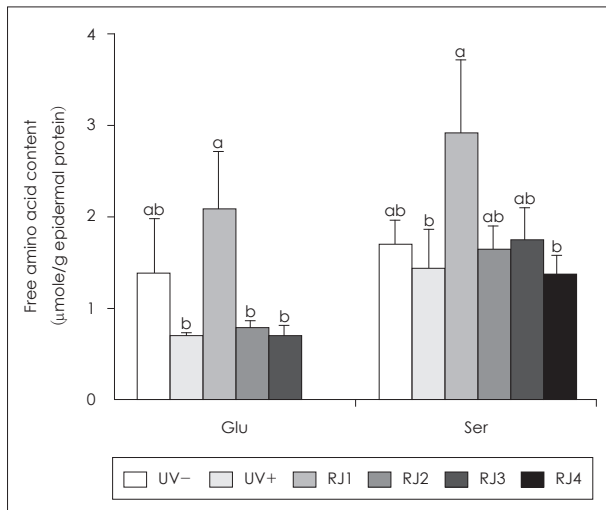
Amino acids	Experimental groups <sup>2)</sup>					
	UV-	UV+	RJ1	RJ2	RJ3	RJ4
EAA <sup>3)</sup>	$\mu\text{mole/g}$ epidermal protein					
Arginine	$6.08 \pm 0.43^a$	$5.85 \pm 0.60^a$	$6.71 \pm 0.92^a$	$9.73 \pm 2.05^a$	$6.32 \pm 0.71^a$	$7.15 \pm 0.58^a$
Histidine	nd <sup>4)</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
Isoleucine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Leucine	$11.13 \pm 1.90^a$	$12.27 \pm 1.92^a$	$10.62 \pm 1.50^a$	$7.63 \pm 1.83^a$	$10.45 \pm 1.71^a$	$12.65 \pm 2.65^a$
Lysine	$16.75 \pm 4.53^b$	$10.77 \pm 1.70^b$	$24.08 \pm 6.53^a$	$23.53 \pm 5.04^a$	$21.50 \pm 2.43^{ab}$	$19.75 \pm 2.09^{ab}$
Methionine	$22.22 \pm 2.66^a$	$15.54 \pm 0.47^{ab}$	$13.40 \pm 0.93^{ab}$	$8.96 \pm 2.24^b$	$15.09 \pm 1.49^{ab}$	$13.73 \pm 3.83^{ab}$
Phenylalanine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Threonine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tryptophan	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Valine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NEAA <sup>3)</sup>						
Alanine	$4.34 \pm 1.56^{ab}$	$2.19 \pm 0.52^b$	$2.21 \pm 0.63^b$	$1.92 \pm 0.81^b$	$3.06 \pm 0.92^{ab}$	$1.00 \pm 0.22^b$
Aspartate	$1.67 \pm 0.44^a$	$1.12 \pm 0.23^a$	nd	nd	$0.95 \pm 0.22^a$	nd
Cysteine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glutamate	$1.39 \pm 0.59^{ab}$	$0.70 \pm 0.04^b$	$2.07 \pm 0.65^a$	$0.77 \pm 0.10^b$	$0.69 \pm 0.13^b$	nd
Glycine	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Proline	$4.02 \pm 1.22^a$	$2.08 \pm 0.73^a$	$2.72 \pm 0.56^a$	$2.05 \pm 0.17^a$	$4.96 \pm 0.90^a$	nd
Serine	$1.70 \pm 0.27^{ab}$	$1.43 \pm 0.44^b$	$2.90 \pm 0.82^a$	$1.64 \pm 0.27^{ab}$	$1.74 \pm 0.37^{ab}$	$1.36 \pm 0.22^b$
Tyrosine	$13.39 \pm 1.31^a$	$18.41 \pm 1.04^a$	$13.53 \pm 1.21^a$	$15.43 \pm 2.71^a$	$18.32 \pm 2.24^a$	$11.95 \pm 1.90^a$
Total AA	$82.69 \pm 1.49^a$	$70.36 \pm 0.81^a$	$78.24 \pm 1.49^a$	$71.66 \pm 1.32^a$	$83.08 \pm 0.93^a$	$67.59 \pm 1.32^a$

1) Data are Mean  $\pm$  SEM (n = 6). Values without a common letter in the same row are significantly different (p < 0.05) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test 2) Groups UV- and UV+, hairless mice fed a control diet without (group UV-) or with (group UV+) UV irradiation for 6 weeks; Group RJ1, RJ2, RJ3 and RJ4, hairless mice fed diets containing 1.0% Royal Jelly (RJ) harvested from different areas in Korea or from China (group RJ4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks 3) EAA: Essential Amino Acid, NEAA: Non Essential Amino Acid 4) nd: Not detected

습인자와 필라그린 모두 총 유리 아미노산의 50% 이상이 glutamate와 serine 및 glycine으로 구성되어 있는 성분의 유사성은 필라그린이 표피 유리 아미노산의 유일한 전구단백질임을 증명하였다.<sup>10,12)</sup> UV + 군의 필라그린과 중간 분해 산물 및 profilaggrin을 포함한 총 필라그린 함량은 UV - 군에 비해 감소하였다. 이는 자외선 조사가 주요 천연보습인자인 유리 아미노산 생성의 전구 단백질인 필라그린과 중간 분해 산물 및 profilaggrin의 함량을 감소시켜 궁극적으로 피부 건조를 유발함을 의미한다. 기존 연구에서 저자극성 자외선 조사에 의한 주름살 유도는 표피 수분 감소 및 표피 필라그린 증가를 일으킨다고 보고되었다.<sup>36)</sup> 그러나 이는 피부 주름 형성 등에 있어서 UVB보다 약하게 관여하는 UVA 중심의 자외선 조사<sup>37)</sup>이며 본 연구에 비해 조사한 자외선의 세기가 UVB 20 mL/cm<sup>2</sup>으로 매우 약하여 주름살이 유도되는 초기 단계의 변화로 보인다. RJ1군의 총 필라그린과 profilaggrin, 2RI 및 필라그린의 함량은 UV + 군에 비해 유의적으로 높았고 그 증가 정도는 UV - 군과 유사하거나 높았다. 이 결과는 필라그린이 표피의 천연보습인자를 생성하는 전구체로서 피부 건강에 기여한다는 사전 보고와 함께<sup>3)</sup> RJ1의 식이 공급이 자외선 조사로 인

한 표피 필라그린과 중간 분해 산물 및 profilaggrin 함량이 감소되는 것을 예방함을 의미한다. 또한 이는 표피 필라그린 함량 감소는 표피 보습 감소와 관계가 있음이 보고된 선행 연구<sup>23)</sup>와 일치한다.

UV + 군의 PAD3 발현은 UV - 군에 비해 낮았다. 자외선 조사는 표피 필라그린의 유리 아미노산으로의 분해 과정에 변화를 초래함을 연구한 선행 연구와 관련하여,<sup>3)</sup> 이 결과는 자외선 조사가 PAD3 발현 억제를 초래함을 제시하였다. 로얄제리를 공급한 모든 실험군 (RJ1군, RJ2군, RJ3군, RJ4군)에서 PAD3 발현은 UV + 군에 비해 높아 로얄제리의 식이 공급이 자외선 조사에 의해 발생하는 PAD3 발현 저하를 예방하는데 효과가 있음을 알 수 있었으나 각 로얄제리를 섭취시킨 군 간의 유의성은 없었다. Keratin과 결합하여 불용성, 불활성화 상태로 존재하는 profilaggrin은 표피의 최종 분화 단계에서 칼슘 농도 증가에 반응하여 탈인산화되고 inatriptase, prostatic kallikrein-5 등의 다양한 단백질 분해 효소에 의해 필라그린으로 분해된다.<sup>15)</sup> 필라그린은 keratin filament와 결합한 후 transglutaminases (TGMs)와 peptidylarginine deiminases (PADs)에 의해 불용성의 keratin matrix를 형성하며, caspase-



**Fig. 4.** Comparison of glutamate and serine contents in the epidermis of groups. Hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 6 weeks (group UV-); UV-irradiated hairless mice fed a control diet (group UV+) or diets supplemented with 1.0% royal jelly harvested from different areas in Korea or from China (group RJ4) in parallel with UV irradiation for 6 weeks. Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Values without a common letter in glutamate and serine are significantly different ( $p < 0.05$ ) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

14 등의 여러 단백질 분해 효소에 의해 최종적으로 표피의 주요 천연보습인자인 유리 아미노산 및 아미노산 유도체로 분해된다.<sup>15,35)</sup> 이와 관련하여 본 연구 결과는 RJ1군의 뛰어난 보습 증진 (Fig. 1) 및 필라그린 함량 증가 (Fig. 2) 결과와 함께 산지별 로얄제리 섭취가 PAD3 이외의 다른 효소들<sup>15,18)</sup>의 발현 변화를 초래함을 의미하며, 추후 RJ1의 섭취에 의해 발현이 조절되고 활성이 변화하는 효소에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표피 천연보습인자의 주요 구성 요소로서 피부 보습에 크게 기여하는 표피 유리 아미노산은<sup>6)</sup> 특히 인체 표피의 경우 주요 보습인자로서 표피의 수분 유지 기능을 하는 glutamate와 serine 및 glycine이 전체 유리 아미노산의 40% 이상을 차지한다.<sup>22,38)</sup> 그 외 methionine, phenylalanine, threonine, valine, isoleucine 및 leucine이 미량으로 존재하며 cysteine은 거의 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.<sup>6,11)</sup> 표피에서 glutamate는 직접적으로 천연보습인자의 역할을 하기보다는 주로  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase에 의해 천연보습인자의 주성분인 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)로 대사되어 피부의 수분 유지 기능을 한다.<sup>7,39)</sup> Serine은 에너지 대사와 관련된 경우 glycine으로 전환되지만 표피에서는 천연보습인자로서 수분 유지를 위한 독특한 기능을 수행한다.<sup>38)</sup> 표피의 총 유리 아미노산 함량은 군간 유의성이 없었으나 UV + 군에서의 glutamate와 serine의 함량은 UV - 군에 비해 다소 낮았으며 RJ1군에서의 함량은 UV - 군에 비해 높았다. 표피에서 glutamate와 serine은 표

피 수분 유지에 크게 기여하고,<sup>38)</sup> glutamate, serine 등이 로얄제리에 존재하는 아미노산 중 높은 함량을 차지<sup>40)</sup>하는 것으로 볼 때, 로얄제리의 식이 공급을 표피의 주요 보습 인자인 glutamate와 serine의 함량을 증진시키고 그에 따라 피부 보습을 증진시킴을 의미한다. 표피 유리 아미노산 중 glycine을 포함하여 cysteine, histidine, isoleucine, phenylalanine, threonine, tryptophan 및 valine은 모든 군에서 검출되지 않았다. 이 결과는 표피에서 isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine, tryptophan 및 valine은 미량 아미노산으로 소량 존재하고 cysteine의 경우 거의 존재하지 않음을 보고한 선행 연구<sup>6,11)</sup>와 일치한다.

이상의 결과에서 자외선 조사와 병행된 RJ1의 식이 공급은 필라그린 생성 증가 및 표피의 주요 유리 아미노산인 glutamate와 serine의 생성 증가를 초래하여 궁극적으로 표피의 보습을 증진시킴을 보여준다. 중국산 로얄제리인 RJ4에서 로얄제리의 지표 성분으로 항산화 기능이 있는 것으로 알려진 10-HDA (10-hydroxyl-2-decenoic acid) 함량이 ( $\mu\text{g}/\text{로얄제리 g}$ )  $0.842 \pm 0.0059$  (% 함유량: 0.084%)로 국내산 로얄제리의 10-HDA 함량보다 낮았으며<sup>41)</sup> 이는 중국산 로얄제리보다 국내산 로얄제리에서의 함량이 더 높다는 기존 연구와 일치하는 결과를 보였다.<sup>42)</sup> 사용한 국내산 로얄제리의 10-HDA 함량은 ( $\mu\text{g}/\text{로얄제리g}$ ) RJ1:  $2.114 \pm 0.0065$  (0.211%), RJ2:  $2.019 \pm 0.0080$  (0.202%), RJ3:  $1.768 \pm 0.0058$  (0.177%)로 유의적인 차이가 없었다.<sup>41,43)</sup> 로얄제리 중 수분 다음으로 높은 함량을 가지는 성분은 단백질로, 로얄제리 단백질의 생리적 기능은 보고되어있다. 특히 아미노산의 조성에 따라 로얄제리의 품질이 결정될 수 있는데,<sup>40)</sup> 본 연구에서는 이에 대한 분석을 시행하지 않았다. 로얄제리의 성분은 화분의 원활한 공급 여부, 꿀벌이 이용하는 식물의 종류와 상태, 기후 및 환경 요인에 영향을 받는데,<sup>28)</sup> 본 연구에서 제시된 RJ1의 우수한 표피 보습 증진 효과는 각 국내산 로얄제리의 성분 차이에 의해 발생한 것으로 예상할 수 있으며 추후 이와 관련하여 국내 생산지별 로얄제리의 단백질 성분 분석에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 자외선 조사에 의한 피부 광노화 유도과 함께 산지별 국내산 및 중국산 로얄제리 식이를 6주간 공급한 무모 생쥐 표피의 필라그린과 유리 아미노산 함량 및 관련 대사 효소의 발현 변화를 정상대조군인 UV - 군 및 자외선 조사군인 UV + 군과 비교 분석하였고 그 결과는 다음과 같다.

1) UV + 군의 필라그린과 중간 생성물 및 profilaggrin을 포



함한 총 필라그린 함량은 UV - 군에 비하여 유의적으로 감소하였다. RJ1군의 총 필라그린 함량이 UV + 군에 비하여 유의적으로 높게 나타났고 RJ2, RJ3 및 RJ4군에서는 UV + 군과 유사하거나 낮았다.

2) PAD3 발현은 UV + 군의 발현이 UV - 군에 비하여 유의적으로 감소하였고 로얄제리 공급군의 PAD3 발현은 모두 UV + 군에 비하여 유의적으로 높았다. 다만 각 로얄제리를 섭취시킨 군 사이에서 군간 유의성은 없었다.

3) 총 유리 아미노산 함량은 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 개별 유리 아미노산 함량 변화를 분석한 결과, UV + 군에서 glutamate와 serine의 함량이 UV - 군에 비해 낮은 경향을 보였다. 반면 RJ1군의 glutamate와 serine의 함량은 UV + 군에 비해 유의적으로 높았으며 RJ2와 RJ3군은 serine의 함량이 UV + 군에 비해 다소 높았다.

결론적으로 RJ1의 식이는 표피의 필라그린 함량과 관련 대사 효소의 발현을 높이고 그에 따라 표피에서 천연보습인자로서 보습 증진에 크게 기여하는 glutamate와 serine의 함량을 증가시킴으로써 자외선 조사로 인해 저하된 피부 보습 능력을 회복시키는 역할을 하는 것으로 여겨진다.

#### Literature cited

- 1) Brown SJ, McLean WH. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *J Invest Dermatol* 2009; 129(3): 543-552
- 2) Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 2005; 125(2): 183-200
- 3) Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 43-48
- 4) Verdier-Sévrain S, Bonté F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6(2): 75-82
- 5) Coderch L, López O, de la Maza A, Parra JL. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4(2): 107-129
- 6) Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 1994; 107(Pt 2): 693-700
- 7) Clar EJ, Fourtanier A. Pyrrolidone carboxylic acid and the skin. *Int J Cosmet Sci* 1981; 3(3): 101-113
- 8) Kezic S, Kammeyer A, Calkoen F, Fluhr JW, Bos JD. Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods. *Br J Dermatol* 2009; 161(5): 1098-1104
- 9) Katagiri C, Sato J, Nomura J, Denda M. Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *J Dermatol Sci* 2003; 31(1): 29-35
- 10) Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 1994; 103(5): 731-741
- 11) Tabachnick J, LaBadie JH. Studies on the biochemistry of epidermis. IV. The free amino acids, ammonia, urea, and pyrrolidone carboxylic acid content of conventional and germ-free albino guinea pig epidermis. *J Invest Dermatol* 1970; 54(1): 24-31
- 12) Scott IR, Harding CR, Barrett JG. Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 1982; 719(1): 110-117
- 13) Jacobson TM, Yüksel KU, Geesin JC, Gordon JS, Lane AT, Gracy RW. Effects of aging and xerosis on the amino acid composition of human skin. *J Invest Dermatol* 1990; 95(3): 296-300
- 14) Fleckman P, Dale BA, Holbrook KA. Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1985; 85(6): 507-512
- 15) Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 9): 1285-1294
- 16) Presland RB. Function of filaggrin and caspase-14 in formation and maintenance of the epithelial barrier. *Dermatol Sin* 2009; 27(1): 1-14
- 17) Senshu T, Akiyama K, Nomura K. Identification of citrulline residues in the V subdomains of keratin K1 derived from the cornified layer of newborn mouse epidermis. *Exp Dermatol* 1999; 8(5): 392-401
- 18) Kanno T, Kawada A, Yamanouchi J, Yosida-Noro C, Yoshiki A, Shiraiwa M, Kusakabe M, Manabe M, Tezuka T, Takahara H. Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *J Invest Dermatol* 2000; 115(5): 813-823
- 19) Thulin CD, Walsh KA. Identification of the amino terminus of human filaggrin using differential LC/MS techniques: implications for profilaggrin processing. *Biochemistry* 1995; 34(27): 8687-8692
- 20) McGrath JA, Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14(1): 20-27
- 21) Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci* 2000; 22(1): 21-52
- 22) Koyama J, Horii I, Kawasaki K, Nakayama Y, Morikawa Y, Mitsui T. Free amino acids of stratum corneum as a biochemical marker to evaluate dry skin. *J Soc Cosmet Chem* 1984; 35(4): 183-195
- 23) Kim H, Lim YJ, Park JH, Cho Y. Dietary silk protein, sericin, improves epidermal hydration with increased levels of filaggrins and free amino acids in NC/Nga mice. *Br J Nutr* 2012; 108(10): 1726-1735
- 24) Legat FJ, Wolf P. Photodamage to the cutaneous sensory nerves: role in photoaging and carcinogenesis of the skin? *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5(2): 170-176
- 25) Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* 2008; 20(3): 177-183
- 26) Haratake A, Uchida Y, Schmuth M, Tanno O, Yasuda R, Epstein JH, Elias PM, Holleran WM. UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *J Invest Dermatol* 1997; 108(5): 769-775
- 27) Horii I, Nakayama Y, Obata M, Tagami H. Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin. *Br J Dermatol* 1989; 121(5): 587-592
- 28) Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73(9): R117-R124
- 29) Kim JK, Son JH, Oh HS. Analysis of organic acids in honey and royal jelly. *Korean J Apic* 1989; 4(2): 105-111
- 30) Kim JG, Son JH. Analysis of amino acids in royal jelly. *Korean J Apic* 1991; 6(2): 76-80
- 31) Kim J, Lee Y, Cho Y. Effects of dietary royal jelly on epidermal generation of ceramides from acidic sphingomyelin and gluco-

- sylceramides in UV-irradiated hairless mice. *Curr Top Nutraceutical Res.* Forthcoming 2013
- 32) Kang TH, Park HM, Kim YB, Kim H, Kim N, Do JH, Kang C, Cho Y, Kim SY. Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *J Ethnopharmacol* 2009; 123(3): 446-451
- 33) Ginger RS, Blachford S, Rowland J, Rowson M, Harding CR. Filaggrin repeat number polymorphism is associated with a dry skin phenotype. *Arch Dermatol Res* 2005; 297(6): 235-241
- 34) Nachat R, Méchin MC, Takahara H, Chavanas S, Charveron M, Serre G, Simon M. Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol* 2005; 124(2): 384-393
- 35) Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 1996; 271(48): 30709-30716
- 36) Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci* 2001; 27 Suppl 1: S19-S25
- 37) Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195(3): 298-308
- 38) Kim H, Park KH, Yeo JH, Lee KG, Jeong DH, Kim SH, Cho Y. Dietary effect of silk protein sericin or fibroin on plasma and epidermal amino acid concentration of NC/Nga mice. *Korean J Nutr* 2006; 39(6): 520-528
- 39) Wolfersberger MG, Tabachnick J, Finkelstein BS, Levin M. L-pyrrolidone carboxylic acid content in mammalian epidermis and other tissues. *J Invest Dermatol* 1973; 60(5): 278-281
- 40) Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. *J Funct Foods* 2012; 4(1): 39-52
- 41) Cho Y. Development of royal jelly as a functional dietary source for anti-aging and anti-oxidation of skin. Suwon: Rural Development Administration; 2009
- 42) Kim JG, Son JH, Lee SH. Comparative research on the ingredient or royal jelly produced in south and north Korea. *Korean J Apic* 1993; 8(2): 170-178
- 43) Park HM, Cho MH, Cho Y, Kim SY. Royal jelly increases collagen production in rat skin after ovariectomy. *J Med Food* 2012; 15(6): 568-575