

Improvement of skin barrier function using lipid mixture

Won-Seok Park, Eui-Dong Son, Gae-Won Nam, Jong-Ho Park,
Byeong-Gon Lee, Ih-Seop Chang
R&D Center Pacific corp., Kyunggi-do, Korea

Abstract

Dry skin is caused mainly by the perturbation of stratum corneum lipids which affected by ageing, change of season, excess use of surfactant and the effect of disease like atopic dermatitis and psoriasis. Intercellular lipid structures in stratum corneum are responsible for the barrier function of mammalian skin. The major lipid classes that can be extracted from stratum corneum are ceramides, cholesterol and fatty acid, which make up approximately 50, 25, 10 percent of the stratum corneum lipid mass, respectively. Small amount of cholesterol sulfate, phospholipids, glycosylceramide and cholesterol esters are also present. Recent studies have shown that application of one or two these lipids to the perturbed skin delays barrier recovery; only equimolar mixtures allow normal recovery. We observed that barrier recovery rate was improved in hairless mouse by topical application of single neutral lipids (ceramide, free fatty acid, cholesterol) and lipid mixtures. Whereas the application of single lipid didn't allow a significant enhancement comparing with normal barrier repair, the equimolar mixtures of 3 components(including synthetic pseudoceramide PC104) improved barrier repair, as assessed by the transepidermal water loss. At clinical study to the volunteers aged over sixty, skin dryness was recuperated by the increase of moisture(capacitance) and the reduction of scaling. Utilization of physiologic lipid mixture containing natural ceramides or synthetic pseudoceramide could lead to new forms of topical therapy for the dryness and dermatoses(e.g., psoriasis, atopic dermatitis and irritant dermatitis).

I. 서론

인간의 피부에서 표피(epidermis)의 stratum corneum은 피부의 구조적 유지에 필수적인 역할을 하고 있다. 화장품이 피부에 주는 많은 유익한 효과 중에서 소비자에게 바로 접근이 가능하고, 느낄 수 있는 것으로는 피부보습력 유지를 들 수 있을 것이다. 피부에 대한 꾸준한 연구에 의하여 일정수준의 수분(Moisture)의 존재는 피부 각질층(stratum corneum)의 유연성과 본래의 기능을 원활히 유지시킨다는 사실에서¹, 일반적 건조 피부의 효과적인 피부관리 방법이 많은 연구자들에 의해서 강구되었다. 초기 연구자들에 의해서 피부건조증이 각질층의 물리적 이상으로부터 기인한다는 전제

하에서 단순히 각질층을 수화(hydration)시켜 그 유연성을 증가시키는 보습물질의 탐색 및 연구가 진행되었다.

그러나, 최근 연구결과를 바탕으로 각질층의 구조가 넓은 각질형성세포와 그 사이를 주로 ceramide라는 sphingolipid로 구성된 lipid lamellae로 되어 있다는 생화학적인 특징과 그 역할이 밝혀지면서, 피부의 각질층의 중요성이 부각되고 있다.

각질층의 수분을 잘 유지하기 위해서 수분 증산을 방지하는 기구가 절대적으로 필요하며, 이를 담당하기 위해서 형성된 구조는 각질층내의 lipid lamellae이며, 이 lamellae에 각질세포들이 둘러싸여 있게 된다. 각질층에 주로 존재하는 지질은 ceramide, cholesterol, free fatty acids가 가장 많이 알려져 있으며, glucosylceramides, cholesterol sulphate, phospholipids가 소량 존재한다. 이러한 지질은 표피층(epidermis)의 분화과정(differentiation) 중에 형성되며, 주로 층판소체(lamellar body ; LB)에서 일단 저장된 다음 배출되거나, 세포막을 형성하는 성분으로부터 유리되어 생성된다.

세포간 lipid lamellae의 피부장벽형성에 있어서의 중요성은 피부수분유지에 중요한 새로운 발견이었다. 1993년 Mao-Qiang 등은 아세톤으로 처치하여 인위적으로 손상된 피부에 도포된 지질이 장벽 손상 회복에 영향을 미친다는 것과^{2,3}, 피부 장벽 항상성을 위해서는 cholesterol과 sphingolipid가 모두 필요하다고 보고하였으며, 또한 생체 지질 비율과 유사한 지질혼합물이 피부 각질세포층의 각질세포사이 지질층 형성에 효과가 우수하다고 보고한 바 있다⁴. Imokawa 등은^{5,6} 계면활성제로 유발한 건조피부에 사람 각질층의 ceramide를 도포함으로써 scaling을 감소시키고, 피부수분함유량을 증가시키는 것을 보고하였다. 또한, Elias 등은⁷ 피부수분장벽기능 회복에 ceramide, cholesterol, free fatty acid의 혼합조성물을 도포함으로써 장벽손상회복이 촉진됨을 보고하였다. 다양한 피부손상 및 자극 유발원에 의한 평가 결과, 특정한 지질 조성에 의한 효과의 차이가 있음이 밝혀지고 있으므로 외부 환경에 의한 장벽손상의 회복에 적절한 조절이 요구되며⁸, 이러한 ceramide를 함유한 지질혼합물을 통한 피부상태의 개선은 단순한 로션 제형과 피지유래의 지질을 함유한 조성물에 비하여 우수한 효과가 기대된다.

이전 연구에 의하면 각질층내 ceramide의 종류와 피부염증, TEWL 등과의 상관성이 있음을 보고하였고⁹, 유사하게 ceramide 1, 2의 도포에 의하여 피부장벽손상이 억제됨이 보고하였다. 그러므로, 이러한 ceramide의 도포는 SLS(sodium lauryl sulfate)에 의한 접촉성 피부염과 장벽기능의 개선이 필요한 피부질환에 도움을 줄 수 있을 것이다. 유사한 실험결과 아토피 피부염 환자의 피부에 있어서 낮은 ceramide의 수준이 보고되었고^{10,11}, 특히 ceramide 3의 감소가 두드러짐이 보고되었다.

Ceramide가 피부장벽 유지에 중요한 지질인 것은 분명하나, ceramide 단독으로 적용하는 것보다, 세포간지질의 주성분인 cholesterol, free fatty acid와 함께 적절하게 혼합된 경우에 장벽기능이 좀더 효율적으로 되는 것으로 알려져 있다^{1 2, 1 3, 1 4}.

Ceramide를 피부에 적용시 직면하게 되는 문제점 중의 하나는 ceramide가 매우 소수성이며 결정화 경향이 커서 이것을 함유하는 효과적인 처방을 개발하기 어렵다는 것이다. Ceramide, free fatty acids, cholesterol 혼합물을 ethanol/propylene glycol의 혼합 용제계에 분산하여 아세톤으로 손상시킨 피부에 도포하여 유효한 결과를 얻은 예가 있었다.⁹ 대부분의 liposome이 장기간 안정성이 불안한 것이 문제로 지적되고 있고, 통상의 liposome에 적용시에는 ceramide의 함량을 다량 처방하기가 어렵다는 것이 단점이 있다^{1 5}. 이것 이외에 화장품 기제로 사용되는 여러 가지 유화물의 형태로 제조하여 효과적으로 ceramide를 함유한 지질혼합물을 처방하는 것이 하나의 방법이라고 볼 수 있을 것이다.

본 연구에서는 세포간지질의 변형과 부족에서 오는 피부 건조증을 개선하고자 우선 일반 환경과 건조환경에서 노화에 따른 표피 생리를 관찰하고, 건조환경에 노출시킨 mouse와 일반환경에서 아세톤으로 장벽 손상시킨 mouse를 대상으로 표피 세포간지질의 단일 요소들을 처리하고, 동일한 molar ratio로 유사하게 맞춘 지질혼합물을 외용 도포하였을 때의 여러 가지 생리적 변화와 장벽 회복 증진 효과를 알아보는 실험을 수행하였다. 또한, 합성한 pseudoceramide(PC104, Pacific Co., Korea)가 천연 ceramide를 대체할 수 있는 가능성과 그 장벽 회복 증진을 확인하고자 한다.

위와 같은 피부보습, 보호기능을 위한 세포간 지질혼합물(ceramide, cholesterol, free fatty acid), 친수성 성분(NMF; Natural Moisturising Factor)을 모두 함유한 유화 제품은 제조가 가능하여 아토피 피부염의 피부관리제품이나 고보습제품으로써 그 유용성과 가치가 기대된다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 시료 및 기구

동물실험을 하기 위해서 일반 주령으로 6~8 주령의 hairless mouse를 사용하고, 노화된 주령으로는 55주령의 hairless mouse를 사용하였다. 본 실험에서 사용된 단일 지질로는 cholesterol(Sigma, C8667), ceramide III, IV(Sigma, C2137, C2512), ceramide 3B(Gist Brocades), linoleic acid(Sigma, L1268), Palmitic acid(Sigma, P5585), Stearic acid(Sigma, S4751)와 태평양에서 합성한 pseudoceramide(PC104)를 이용하였다(그림 1). 또한, 지질 혼합물은 다음과 같은 4 가지의 단일 지질의 몰비(molar ratio)로 각각 조제하였다.

A(cholesterol : ceramideIII : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), B(cholesterol : ceramideIV : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), C (cholesterol : ceramide3B : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), D(cholesterol : pseudoceramide : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), E (cholesterol : stearic acid : palmitic acid =1:2:1)의 혼합물을 1%(w/w) 농도로 vehicle(propylene glycol : ethanol = 7:3)에 기체에 사용하였고, 사람을 대상으로 임상을 실시할 때는 2%(w/w) 함량으로 일반보습제에 첨가하여 조제하였다.

경피수분손실량(TEWL)을 측정하기 위해서는 Evaporimeter EP1(Servo-Med, Sweden)을 사용하였으며, 각질층 내 보유수분량은 Corneometer CM820를 이용하였다. 전자현미경(EM) 분석은 연세대 원주 피부과의 협조를 받았다.

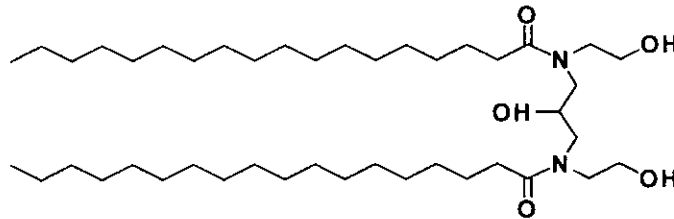


Fig. 1 . The general fomula of synthetic pseudoceramide PC104

2. 일반환경과 건조환경에서의 Young/Aged hairless mouse 표피 생리 비교

우선 8주령된 Young hairless mouse와 정상적으로 생육시킨 55주령의 hairless mouse를 5마리씩 준비하고, 각각 23~25℃ 온도조건인 일반환경(40~60% RH)과, 15%이하 상대습도의 Dry chamber에 1주일간 적응기간을 거친 후, 경피수분손실량(TEWL)을 측정하며 동시에 희생시켜 생검(biopsy)후 조직염색(histochemistry)을 실행하였다. 외부 수분환경 변화와 장벽 회복에서 각질층 수와 표피 두께를 측정하여 비교한다.

3. 일반환경에서 장벽손상 후 지질혼합물 도포에 따른 효과 측정

상대습도 38~42%, 온도가 23~25℃가 유지되는 항온항습실에서 6~8 주령의 hairless mouse를 acetone에 적신 면봉을 이용하여 4분 30초간 닦아내어 피부각질층의 장벽을 손상시킨다. 손상시킨 hairless mouse에 지질혼합물을 도포한 후 공기에 노출시키고 1, 2, 4, 6, 8 시간 경과 후에 각각 Evaporimeter EP1(Servo-Med, Sweden)을 이용하여 TEWL을 측정한다. 각질층을 분리하여 세포간 지질을 HPTLC(Camag AMD2) 방법을 이용하여 정량분석한다. 여기서 현저한 차이가 있는 시간대가 있으면 피부생검을 실시하여 RuO₄ 염색을 이용한 전자현미경 조사를 한다. 전자현미경 조사를 통하여 지질이중막이 손상 후 회복되는 과정을 관찰한다.

4. 건조환경에서의 무모생쥐 주령에 따른 장벽손상 회복력 평가

위에서 서술한 바와 같이 각 건조 환경에 hairless mouse를 적응기간 1주일 정도 설정한 뒤에, 장벽손상방법으로 아세톤 처치법을 사용하여 피부 장벽을 손상시킨다. 장벽손상을 시킨 후 지질혼합물을 도포한 후 각각 시간대별로 경피수분손실량(TEWL)을 측정한다. 또한, 피부조직상의 변화를 평가하기 위하여 H&E 염색을 이용하여 조직화학적 염색을 실시하였다. 각질층의 수, lamellae lipid 및 lacuna를 측정하기 위해서 전자현미경 관찰을 수행하였다.

5. 임상시험

수원 영통 지역 노인정 3곳과 서울 구의동 노인정 2곳의 60대에서 80대 노인 68명을 선정하였다. 피검자는 erythma나 피부 질환이 없는 노인으로 선정하였으며 각각 A, B, C의 세 group으로 나누어 각 group당 24명, 26명, 18명씩 시료를 달리하여 실험을 진행하였다. 초기 기기값 측정과 visual scoring과 문진(원주 연세대 피부과 협조)을 한 후, 시료를 제공하여 하루에 2번 왼쪽 다리에만 시료를 바르도록 하였다. 3일, 7일, 2주, 4주 경과 후에 각각의 항목에 대해서 visual scoring, 문진과 경피수분손실량(TEWL), capacitance 값을 측정하고, D-Squame을 이용한 화상분석을 실시하였다¹⁶. 또한, 시료 도포에 의한 부작용을 질문과 육안 관찰을 통해 검사하였고 시료로 인한 피부상태의 개선 효과를 구두로 조사하고, 육안으로 명확한 개선효과를 보이는 노인 3명을 선정, 6주가 경과한 시점(4주 도포 후 2주동안 사용 안한 시점) 사진 촬영 및 replica로 피부 거칠기 개선효과를 분석하였다.

III. 결과 및 토의

1. 일반환경과 건조환경에서의 Young/Aged hairless mouse 표피의 차이

그림 2과 같이 각각의 젊은 주령과 노화된 hairless mouse를 5마리씩 준비하고 나서, 앞서 기술한 바와 같이 일반환경과 건조환경에 일주일간 노출시켜 적응시킨 후에 경피수분손실량(TEWL)을 측정한 결과, 일반과 건조환경에서 젊은 주령의 경피수분손실량이 노화된 주령의 값보다 유의성 있는 높은 수치를 얻을 수 있었다. 또한, 각 주령을 일반환경과 건조환경에서 비교할 경우 건조환경에서 경피수분손실량이 증가되는 현상을 관찰할 수 있었다. 젊은 주령과 노령의 mouse를 일주간 건조환경에서 적응시킨 후에 경피수분손실량이 증가하는 것은 그만큼 외부 수분 감소 환경에서 장벽기능이 강화되지 못 하는 것으로 추측된다. 또한, 그림 3와 4에서와 같이 일반수분환경과 건조한 환경에서의 노화에 따른 각질층(stratum corneum)의 수와 표피의 두께를 측정한 결과, 젊은 주령에서는 건조환경에서 표피의

두께와 각질층 수가 증가하는 경향을 관찰할 수 있었으며, 노화 주령의 경우는 표피의 두께만 증가하는 양상을 보였다. 표피의 두께는 건조하여 수분함량이 낮아질수록 두꺼워지는 것을 관찰할 수 있었다(그림 4). 이전의 연구에 있어서도 노화의 진행에 따라서, 표피의 세포사이를 채워주는 세포간지질의 이상과 변형이 일어나 피부표면에서의 건조현상은 심화된다는 보고도 있었다¹⁷. 또한, 젊은 주령과 비교하여 볼 때 노화된 mouse의 경우, 일반환경과 건조환경에서 모두 낮은 TEWL 값을 나타내었으며, 이는 자체의 대사량의 감소와 두꺼워진 SC layer 및 epidermis 두께의 증가에 기인한 이유로 해석할 수 있을 것이다. 계속 건조환경에 노출된다면 피부건조증세가 심화되는 것이 예상되며, 이러한 건조환경은 수분환경의 변화에 대응하는 장벽 강화에 효과적인 물질을 탐색하는 좋은 모델이 될 수 있는 가능성을 시사하였다.

2. 일반환경과 건조환경에서의 장벽 손상에 따른 표피 변화

일반환경과 건조환경에서 표피 각질층의 장벽을 아세톤으로 손상시킨 후의 젊은 주령과 노화된 주령의 hairless mouse의 표피 중의 변화를 살펴 보았다. 그림 5, 6와 같이 각 두 환경에서 두가지 주령의 hairless mouse를 대상으로 아세톤으로 장벽을 손상시킨 후의 표피의 두께와 stratum corneum 층수를 측정된 결과 통계적으로 유의성 있는 결과는 얻지 못 하였지만, 경향적으로 장벽손상으로 인해 표피의 stratum corneum 층 수와 두께가 증가하는 것을 유추할 수 있었다.

3. 지질혼합물의 장벽 회복 촉진 효과(TEWL)

표피 장벽에 관련된 지질성분들 중 지질 혼합물의 장벽 회복 효과를 알아보기 위하여 단일물질 혹은 혼합물을 대상으로 아세톤으로 손상시킨 장벽이 회복되는 것을 경피수분손실량을 통하여 측정하였다. 시험군은 크게 단일지질 도포군과 지질혼합물 도포군으로 나눌 수 있는데, 혼합물 도포군은 대조군에 비해 유의하게 장벽기능의 회복이 촉진되었다. 반면, 단일지질 도포군은 대조군보다 장벽기능의 회복이 늦어지는 결과를 보여 오히려 방해하였다(그림 7, 8, 표. 1). 지질혼합물 간의 차이는 크게 나타나지 않았다. lipid mixture D의 경우 혼합물 상태에서 pseudoceramide PC104가 천연 ceramide의 대체를 하는 장벽회복 촉진효과가 있는 것을 확인하였다. Free fatty acid의 종류를 변화시켰을 때, stearic acid가 포함된 경우 회복정도 보다는 linoleic acid가 포함되었을 때 회복효과가 촉진되었다. 전체적인 장벽기능의 회복은 손상 후 1일 정도면 거의 완전한 회복이 되므로, 8시간 이후에서는 유의성 있는 수치를 얻을 수 없었다.

4. 지질혼합물의 장벽 회복 촉진 효과(EM)

장벽 회복에 따른 각질층을 전자현미경으로 관찰을 하면, 처치후 2시간 후에는 각질세포간의 지질이중막 구조가 거의 회복이 일어나지 않았으며, vehicle 도포군 역시 비슷하였다. Pseudoceramide (PC104) 도포 2시간 후에는 지질 이중막 구조가 나타나기 시작하였으며, pseudoceramide (PC104)가 함유된 lipid mixture D의 경우는 2시간 후에는 각질세포간 지질막의 회복이 부분적으로 나타났다(data omitted). 장벽 손상 후 4시간 후 vehicle 처치한 군의 회복은 무처리군에 비해 별다른 차이가 없었다. Pseudoceramide 도포군의 경우는 trilamellar 구조의 지질막이 확장되어 길게 분포되어 있는 소견을 보였으며(그림 9), pseudoceramide (PC104)가 함유된 lipid mixture D를 도포한 군에서는 부분적으로 각질세포간 지질이 두껍고 성숙된 구조가 보였다. Ceramide III, IV, 3B와 pseudoceramide와의 차이는 단독 도포군별 및 mixture 도포군별 모두에서 거의 발견하기 어려웠다. 그러나, mixture 도포군이 단독 ceramide 도포군보다 각질세포간 지질의 회복이 형태학적으로 증가된 소견을 보였다. 그림 9와 같이 건조환경에서 노령 hairless mouse의 stratum corneum 층의 lipid lamellae와 lacuna를 관찰하면, 건조에 의한 장벽 이상(그림 10, A)과 아세톤으로 처리한 후 분리된 lipid lamellae와 확장된 lacuna(그림 10, C)를 거의 정상 상태로 회복시킨 것(그림 10, B,D)을 확인할 수 있었다.

또한, 건조환경에서 각각 아세톤으로 장벽을 손상시킨 후, pseudoceramide가 함유된 lipid mixture D를 도포한 다음 젊은 주령(그림 11)과 노화된 hairless mouse(그림 12)의 stratum corneum 층 수를 관찰하면, 아세톤 처치로 인해 증가된 stratum corneum 층 수가 두 주령대에서 통계적 유의성이 있게 감소하는 경향을 나타내었으며, 건조환경에서 증가된 stratum corneum 층 수는 노화된 55주령의 hairless mouse에서 유의성 있게 감소하여 노화된 개체에서 lipid mixture가 젊은 개체에서 보다 더욱 높은 장벽 기능 강화 효과를 나타내었다.

각질층에 존재하는 지질조성물은 중성지질이 대부분으로 ceramide, cholesterol, free fatty acid의 3가지 성분이 주로 차지하고 있다. 이중 장벽기능에 가장 중요한 영향을 주는 것은 ceramide로 brick & motar 모델에서 motar 기능에 가장 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 인공적으로 각질층을 아세톤, SLS, Tape stripping 등의 방법으로 손상시켰을 때, 지질혼합물이 장벽기능 회복에 효과가 있다는 보고^{18, 19}와 같이 본 실험에서도 3가지 같은 몰비로 혼합된 중성지질 조성물이 건조에 의한 손상과 유기용매에 의한 손상을 회복시키는 데 효과가 있었다. 또한, 이러한

3가지 중성지질을 1:1:1로 혼합한 경우 화학적으로도 가장 안정한 lamellae 구조를 가진다는 것을 뒷받침 할 수 있었다.

5. 지질분석을 통한 지질혼합물의 장벽 회복 촉진 효과

그림 13에서와 같이 아세톤으로 장벽에 손상을 준 후 일반적으로 회복할 때에 lamellae lipid 성분의 시간 경과에 따른 합성된 양을 살펴보면, 전체 lamellae lipid 조성을 모두 열거하지는 않았지만 시간 경과에 따라 각질층 지질의 총량은 증가하는 경향을 보였다. 일반적 회복과 여러 ceramide를 함유한 lipid mixture를 도포한 경우(그림 14), 무처치군에 비해 지질혼합물을 도포한 군이 같은 시간대에서 지질량의 증가를 관찰할 수 있었으며, pseudoceramide가 함유된 혼합물은 비록 ceramide III가 함유된 혼합물보다는 다소 낮은 증가를 보였지만, 장벽 지질 증진 효과를 발휘하고 천연 ceramide를 대체할 수 있을 것으로 추정할 수 있었다. 또한, galactocerebroside의 증가는 ceramide의 합성 증가의 전단계로 볼 수 있으며, 이는 장벽 기능의 회복과 직접적으로 관련이 있을 것이다.

6. Lipid mixture를 함유한 고보습제품의 임상적 평가

일반 보습제와 여기에 lipid mixture D를 2% 첨가한 장벽기능 강화를 위한 보습제를 건조피부가 빈번하게 발생하는 노령의 자원자를 대상으로 시험방법에서 기술한 바와 같이 연세대 원주 피부과와 함께 공동으로 임상 평가를 수행하였다.

우선 육안으로 scaling, fissure와 erythema 를 평가하면, 표 2에 나타난 것과 같이 lipid mixture를 함유한 경우가 일반 보습제의 효과보다 더 좋은 visual scoring 값을 보였으며, 제품 사용으로 인한 따가움과 화끈거림 등의 부작용을 느끼는 피검자도 없었다. 대상자들의 제품을 사용한 다리와 그렇지 않은 다리에서 경피수분손실량(TEWL)과 capacitance로 보습효과를 측정하였다. TEWL의 경우 워낙 variation이 심하고(같은 다리의 부위에 따라, 특히 scaling이 심한 다리에서 많은 차), 주위 온, 습도의 영향을 많이 받기 때문에 시료군간의 차이를 내기 힘들었으며, capacitance의 경우 사용전에 비해서 사용후에 모두 유의한 증가값을 보이며 처리 안한 부위와 비교시에도 (좌우 비교) 유의하게 증가되는 값을 가졌다(표 3). 또한, D-squame 측정에서는 탈락 각질 세포의 감소를 lipid mixture를 함유한 제품을 사용한 부위에서 관찰할 수 있었으며(data omitted), replica와 사진 촬영에서는 피구, 피문이 선명하며 정돈되는 것을 확인할 수 있었다.

IV. 결 론

1. 일반(40~60%, RH) 및 건조(<15%, RH) 환경을 조성하고 아세톤으로 무모생쥐의 표피 장벽 기능을 저하시킨 후 표피에서 전자현미경 분석을 통해 SC layer의 수와 두께를 측정하고, 경피수분손실량(TEWL)을 측정하여 외부 수분환경과 유기용매에 기인한 장벽손상을 관찰하였다.
2. 이전의 보고에서 알려진 장벽 기능 강화 지질 혼합물(cholesterol : ceramide : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1)의 조성을 근거로, 이 조성물과 합성한 pseudoceramide(PC104)로 천연 ceramide를 대체한 지질혼합물을 장벽이 손상된 무모생쥐에 도포하여 각질층 수와 lamellae layer를 확인하고, TEWL, 지질분석을 실시하였다. 그 결과 합성된 pseudoceramide가 함유된 혼합물도 유사한 장벽 기능 회복 촉진 효과를 나타내었다.
3. 동물모델에서 장벽 회복 촉진 효과가 확인된 지질혼합물을 일반 보습제에 첨가하여 만든 제형을 건조증이 심한 노령의 대상자에 임상실험을 실시하여, 피부 표면 분석(Visual scoring, D-Squame과 Replica)과 각종 보습력 평가(TEWL, Capacitance)를 수행하여 기존 보습제를 사용한 것보다 높은 장벽 기능 강화 효과를 얻었다.

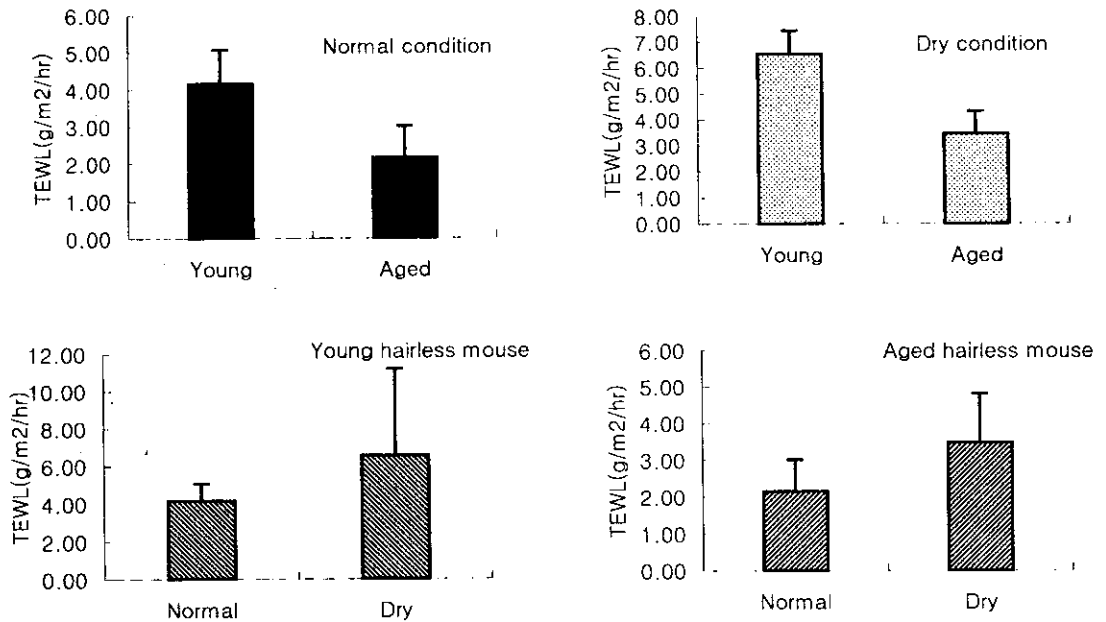


Fig. 2 . The TEWL values of Young(8week), Aged(72week) hairless mouse at normal and dry condition. Top; Comparison TEWL between young/Aged hairless mouse at normal condition(left) & dry condition(right), Bottom ; Comparison TEWL between normal/dry condition in young(left) & aged(right) hairless mouse.

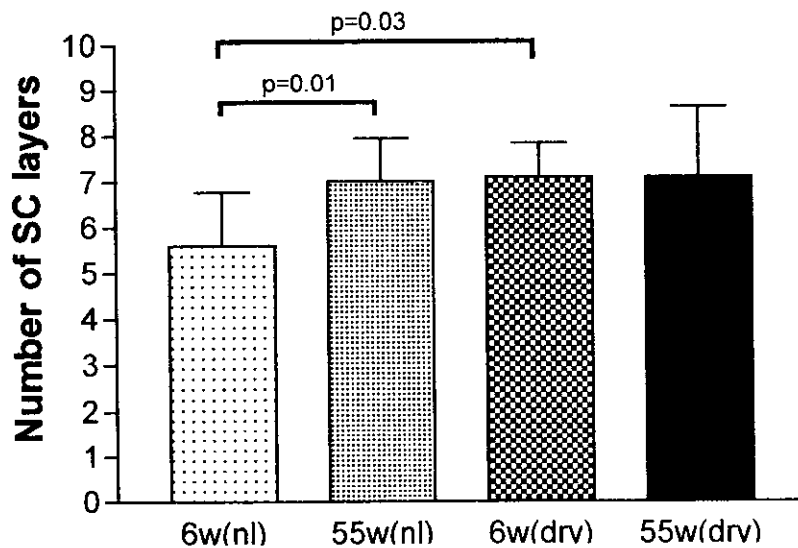


Fig. 3. The number of SC layers under normal humidity(40-60%) and dry environment (<10%). 6w(nl) : 6 weeks aged mice under normal humidity. 55w(nl) : 55 weeks aged mice under normal humidity. 6w(drv) : 6 weeks aged mice under dry environment. 55w(drv) : 55 weeks aged mice under dry environment.* The SC layers were counted under EM(x5,000).

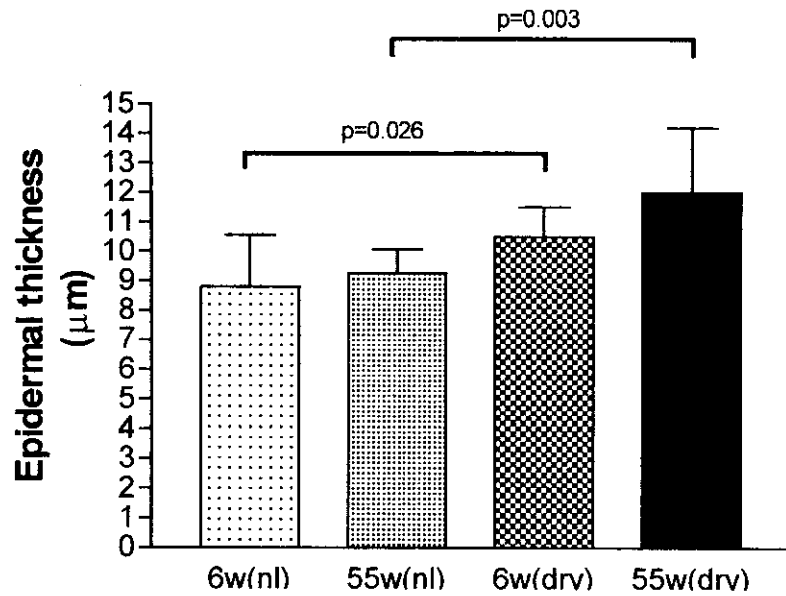


Fig. 4. The epidermal thickness under normal humidity (40-60%) and dry environment (<10%). * The epidermal thickness was measured from the top of granular layer(SG) to the bottom of basal layer(SB) under EM(x5,000).

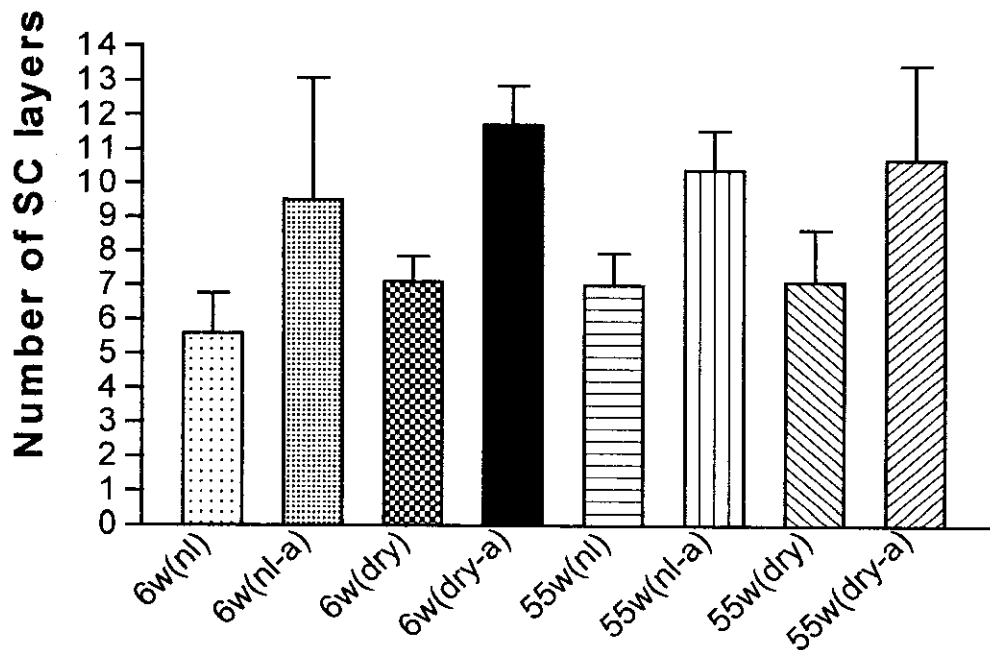


Fig. 5. Changes of the number of SC layers after barrier disruption by acetone treatment under normal humidity(40-60%) and dry environment (<10%). There were no statistical significances according to age and humidity. 6w(nl-a) : 6 weeks aged mice treated by acetone under normal humidity. 55w(nl-a) : 55 weeks aged mice treated by acetone under normal humidity. 6w(dry-a) : 6 weeks aged mice treated by acetone under dry humidity. 55w(dry-a) : 55 weeks aged mice treated by acetone under dry humidity.

Table 1. Improvement of skin barrier recovery by topical application of lipid and lipid mixtures.

Item	case	Barrier recovery rate(%) ¹¹				
		1hr	2hrs	4hrs	6hrs	8hrs
Untreat	10	141.26 ± 6.58	124.70 ± 6.07	96.64 ± 6.39	85.39 ± 5.20	75.72 ± 5.99
Vehicle ²	15	116.22 ± 9.14	116.58 ± 8.51 [†]	93.43 ± 7.68	80.21 ± 6.27	79.21 ± 2.20
Cholesterol	5	140.02 ± 15.35	122.17 ± 6.39	91.69 ± 10.16	61.55 ± 5.78	61.12 ± 7.43
Linoleic acid	5	118.81 ± 7.15	121.70 ± 14.62	69.11 ± 9.44	63.81 ± 9.02	57.87 ± 8.24
Palmitic acid	5	170.58 ± 20.27	145.34 ± 12.27	137.00 ± 2.84	102.18 ± 19.07	79.66 ± 16.76
Stearic acid	5	191.24 ± 30.51	155.49 ± 31.11	101.10 ± 12.26	91.64 ± 27.98	104.73 ± 18.56
Ceramide III	5	133.53 ± 8.21	141.27 ± 8.23	113.48 ± 10.92	87.28 ± 12.47	73.33 ± 6.94
Ceramide IV	5	119.33 ± 2.31	120.90 ± 6.27	94.04 ± 10.27	90.61 ± 5.37	64.09 ± 2.65
Pseudoceramide	10	156.10 ± 8.61	128.88 ± 11.17	116.13 ± 26.27	86.06 ± 5.85	80.12 ± 6.68
Ceramide 3B	5	130.70 ± 6.69	146.59 ± 6.67	95.28 ± 8.99	79.98 ± 4.64	77.64 ± 3.47
Lipid Mixture ³ A	5	96.53 ± 7.17 [†]	90.43 ± 11.93 [†]	70.19 ± 4.29 [†]	52.66 ± 3.31 ^{††}	50.97 ± 4.97 ^{††}
Lipid Mixture B	5	113.22 ± 8.02	82.80 ± 3.61 ^{††}	72.44 ± 3.62	47.13 ± 2.06 ^{††}	42.88 ± 3.51 ^{††}
Lipid Mixture C	10	127.62 ± 6.71	107.17 ± 10.77	88.24 ± 7.19	57.94 ± 14.52 ^{††}	56.82 ± 7.69 ^{††}
Lipid Mixture D	10	107.99 ± 9.54 [†]	78.73 ± 8.28 ^{††}	61.95 ± 5.96 ^{††}	56.28 ± 5.16 ^{††}	49.22 ± 4.39 ^{††}
Lipid Mixture E	10	151.40 ± 19.95	103.67 ± 10.13	83.95 ± 10.66	68.89 ± 11.60	58.22 ± 7.69

¹ Percent change of recovery rate indicate (TEWL grade at any time / TEWL grade at 0 hr) * 100 ± SEM

² Vehicle solution (propylene glycol : EtOH = 7:3)

³ Lipid mixture A (cholesterol : ceramideIII : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), B(cholesterol : ceramideIV : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), C (cholesterol : ceramide3B : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), D(cholesterol : pseudoceramide : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), E (cholesterol : stearic acid : palmitic acid =1:2:1)

[†] significantly lower than untreat (P<0.05) by paired T-test

^{††} significantly lower than vehicle (P<0.05) by paired T-test

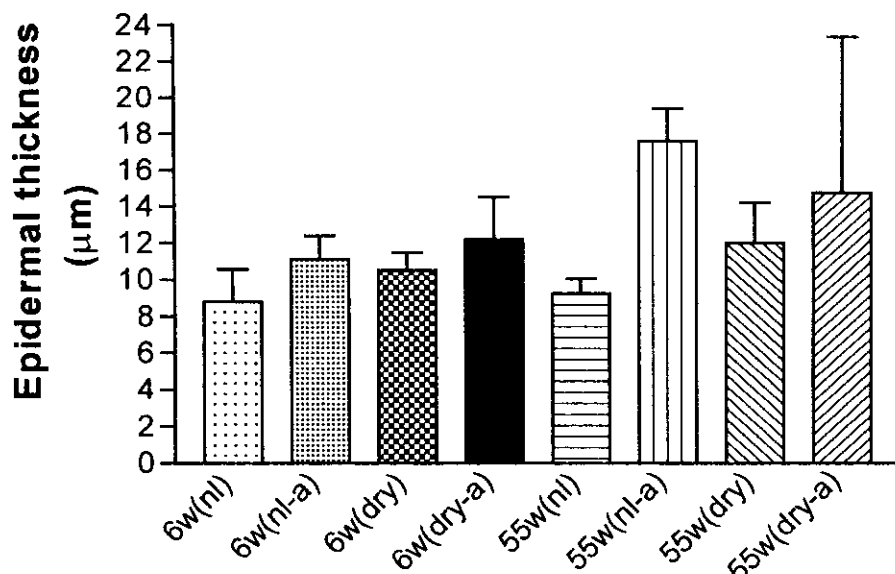


Fig. 6. Changes of epidermal thickness after barrier disruption by acetone treatment under normal humidity(40-60%) and dry environment (<10%). There were no statistical significances according to age and humidity.

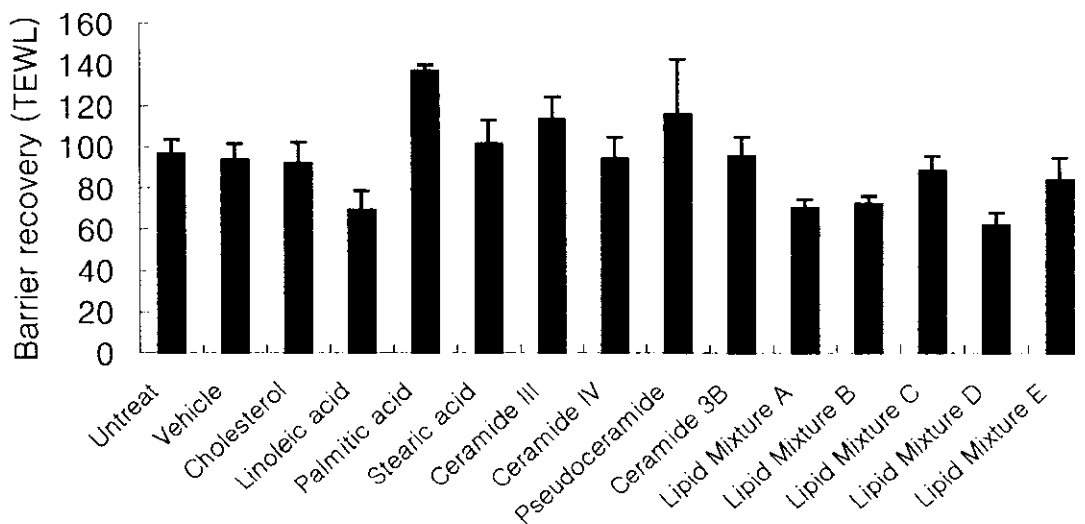


Fig. 7. The comparison of barrier recovery (TEWL) by the topical application of single lipids and lipid mixtures at 4hrs after acetone treatment. Vertical axis represent the barrier repair rate calculated by the transepidermal water loss based on the initial disruption state. Lipid Mixtures follows A (Chol : CerIII : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), B (Chol : CerIV : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), C (Chol : Cer3B : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), D (Chol : pseudoceramide : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), E (cholesterol : stearic acid : palmitic acid =1:2:1). The concentration of all applications performed at 1% (w/w).

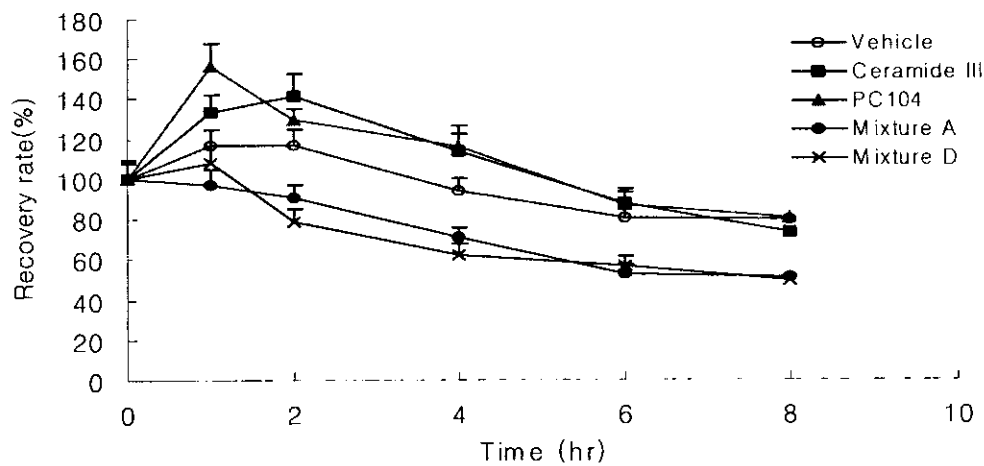


Fig. 8. The comparison of barrier recovery rate by the topical application of single lipids and lipid mixtures after acetone treatment. Vertical axis represent the barrier repair rate calculated by the transepidermal water loss based on the initial disruption state.

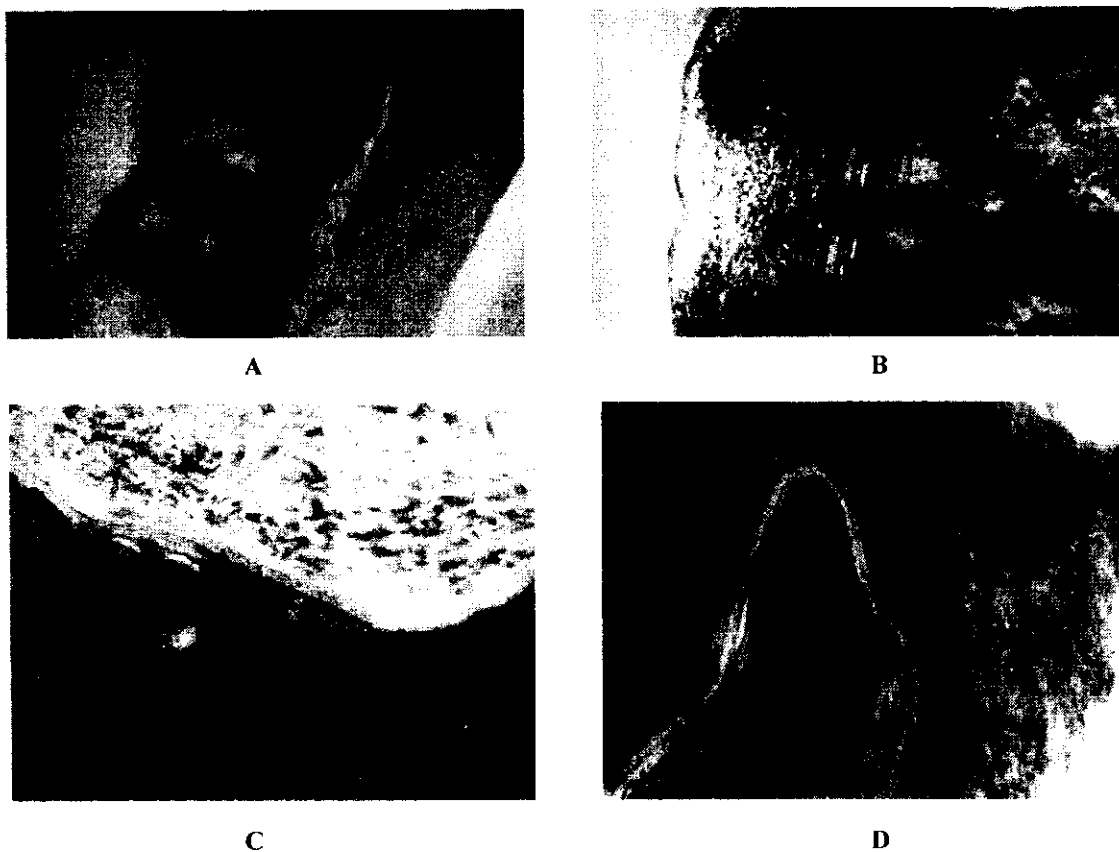


Fig. 9. Electron microscopic analysis of stratum corneum layer of hairless mouse at 4hrs after barrier disruption. A(136,660X) and B(111,150X) is the SC applied vehicle(propylene glycol : ethanol = 7:3). C(120,840X) and D(103,580X) is the case of lipid mixture (cholesterol : pseudoceramide : palmitic acid: linoleic acid = 1:1:1:1).

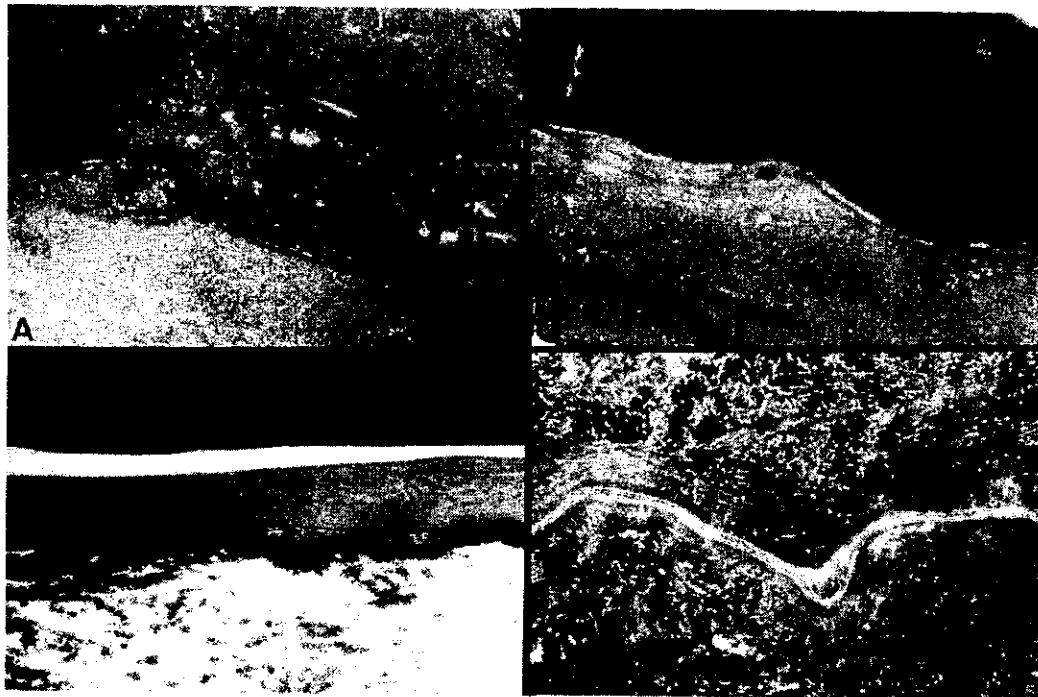


Fig. 10. The SC intercellular spaces of old hairless mice. A: under dry environment only – some separated lipid lamellae and slight expanded lacuna, B: application of lipid mixture without barrier damage – slight separated lipid lamellae, C: aceton treatment – moderately separated lipid lamellae and expanded lacuna, D: application of lipid mixture after aceton treatment – nearly normal lipid lamellae except focally separated area

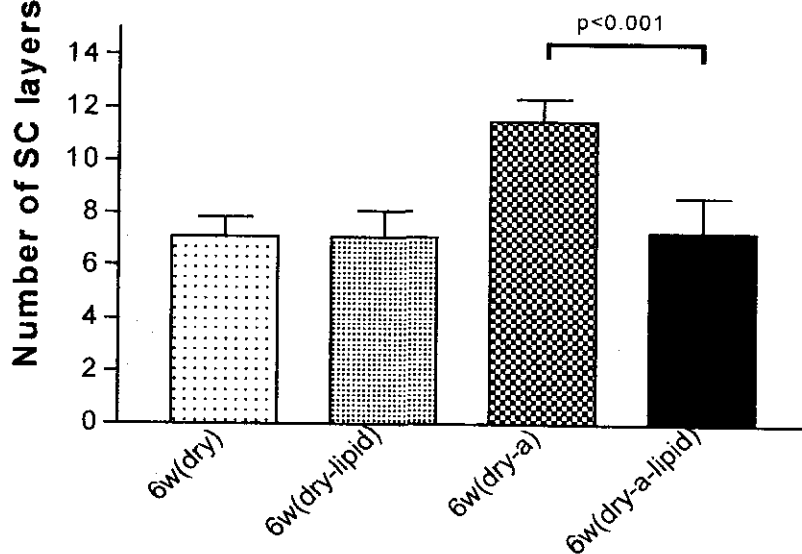


Fig. 11. The number of SC layers in young hairless mice after application of lipid mixture including synthetic ceramide under dry environment (<10%) 6w(dry-lipid) : 6 weeks aged mice after application of lipid mixture under dry environment. 6w(dry-a-lipid) : 6 weeks aged mice after aceton treatment and application of lipid mixture under dry environment.

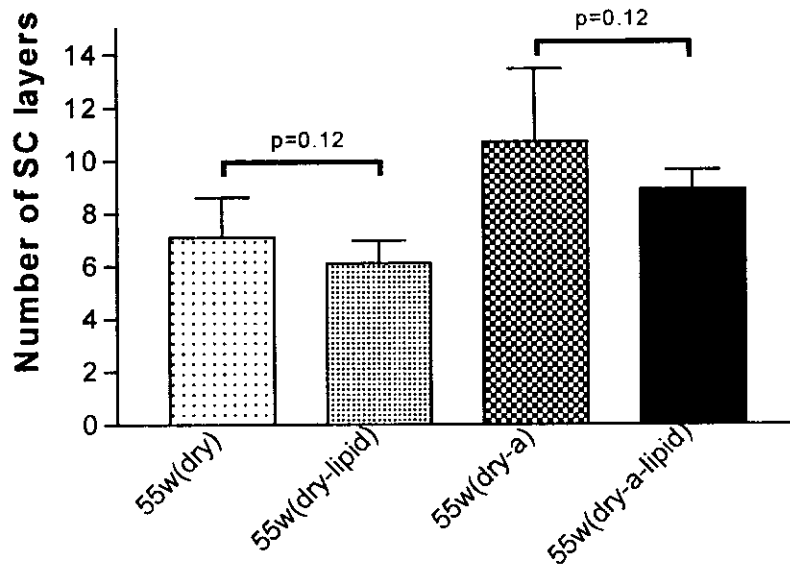


Fig. 12. The number of SC layers in old hairless mice after application of lipid mixture including synthetic ceramide under dry environment(<10%). 55w(dry-lipid) : 55 weeks aged mice after application of lipid mixture under dry environment. 55w(dry-a-lipid) : 55 weeks aged mice after acetone treatment and application of lipid mixture under dry dry environment.

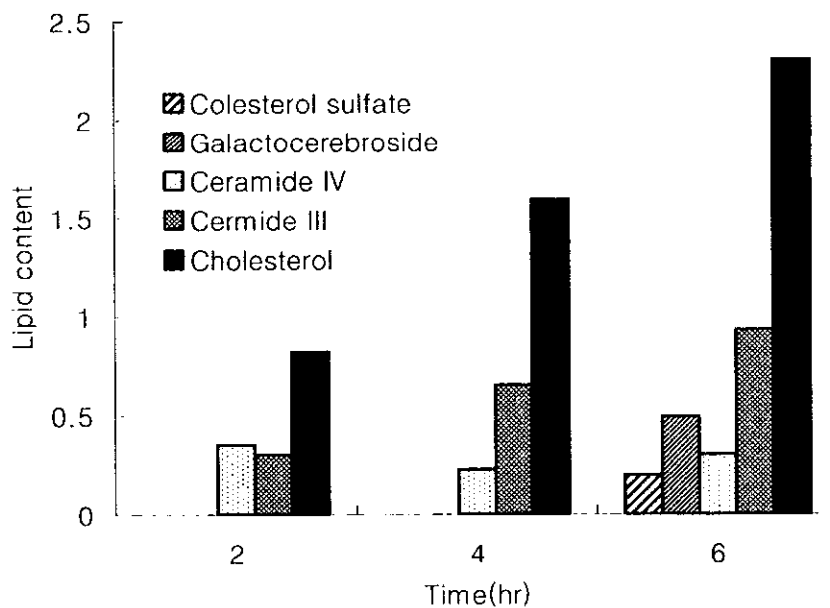


Fig. 13. The increase of some lamellae lipids during skin barrier recovery after acetone treatment. Vertical axis represent the lipid content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) per unit area.

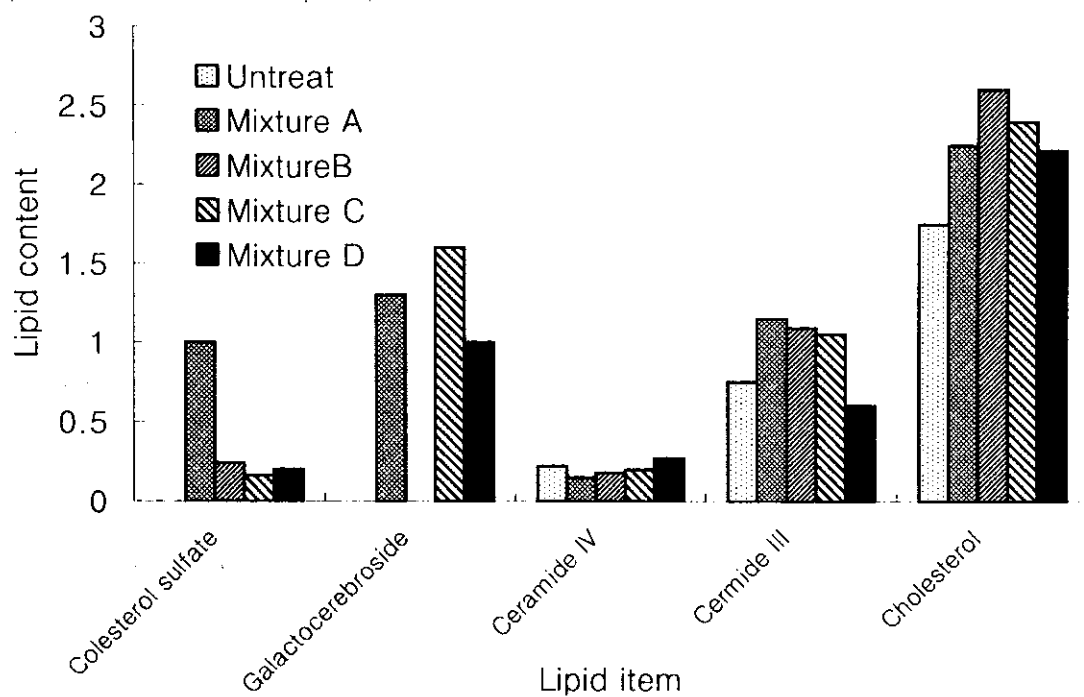


Fig. 14. The increase of some lamellae lipids by topical application of lipid mixures during skin barrier recovery. Lipid Mixtures follows A (Chol : CerIII : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), B (Chol : CerIV : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), C (Chol : Cer3B : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), D (Chol : pseudoceramide : linoleic acid : palmitic acid =1:1:1:1), E (cholesterol : stearic acid : palmitic acid =1:2:1).Vertical axis represent the lipid content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) per unit area.

Table 2. The effectiveness of lipid mixture in moisturizer formula by evaluating the visual scoring.

	Intial		1 week		6 weeks	
	Treat	Untreat	Treat	Untreat	Treat	Untreat
Normal Moisturizer	0.76	0.76	0.00	0.33	0.19	0.39
Lipid Mixture Moisturizer	1.50	1.50	0.00	0.67	0.44	1.39

Visual scoring was performed by both leg sites of treat and not. We grade the value of scaling and fissure with 3 points(0~3), and the value of erythema with 4 point(0~4) by the severances.

Table 3. The effectiveness of lipid mixture in moisturizer formula by evaluating the capacitance.

	Increase rate of capacitance(%)				
	3 days	7 days	2 weeks	4 weeks	6 weeks
Normal Moisturizer	19.83	13.89	18.60	19.86	7.28
Lipid Mixture Moisturizer	21.76	19.39	*27.86	*27.44	8.20

* Significant difference was achieved at 2, 4 weeks(one way ANOVA test).

V. 참고 문헌

- 1 . Blank I. H., Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 1952,18, 433-440
- 2 . Man Mao-Qiang, Feingold K.R., Elias P.M. Influence of exogenous lipids on permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch Dermatol.* 1993, 129, 728-738
- 3 . Man Mao-Qiang, Feingold K.R., Elias P.M. Inhibition of cholesterol and sphingolipids synthesis causes paradoxical effects on permeability barrier homeostasis.kin. *J. Invest. Dermatol.* 1993, 101, 185-190
- 4 . Man Mao -Qiang, Babara E.B., Suzanna W.P., Feingold K.R., Elias P.M. Exogenous nonphysiologic vs physiologic lipids. *Arch Dermatol.* 1995, 131, 809-816
- 5 . Imokawa G., Akasaki S., Hattori M., Yoshizuka N., Selective recovery of deranged water holding properties by stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 1986, 24, 120-130
- 6 . Imokawa G., Akasaki S., Minematsu Y., Kawai M., Importance of intercellular lipids in water retention properties of the stratum corneum : induction and recovery study of surfactan dry skin. *Arch. Dermatol. Res.* 1989, 281, 45-51
- 7 . Mao-Qiang M., Feingold K.R., Elias P.M., Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* 1993, 129, 728-738
- 8 . Zettersen E.M., Ghadially R., Feingold K.R., Crumrine D., Elias P.M., Optimal ratio of topical stratum corneum lipids improve barrier recovery in chronologically aged skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1997, 37, 403-408
- 9 . Yang L., Mao-Qiang M., Taljbeni M., Elias P.M., Feingold K.R., Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape-stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br. J. Dermatol.* 1995, 133, 679-685
- 10 . Imokawa G., Abe A., Jin K., Higaki Y. et al. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopickermatitis : An etiologic factor on atopic dry skin. *J. Invest. Dermatol.* 1991, 96, 523-526
- 11 . Melnik B. Hollmann J., Hoffman H., Yhu M.S., Plewing G., Lipid composition of outer stratum corneum and anils in atopic and control

- subjects. . *Arch. Dermatol. Res.* 1990, 282, 549-551
- 1 2 . Mao-Qiang M., Feingold K.R., Thornfeldt C.R., Elias P.M., Optimisation of physiological lipid mixtures for barrier repair. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 106, 1096-1011
- 1 3 . Farin F., Lambers H., Keuning W., Van Der Wilden W., Human skin-identical ceramides. *Cosmetics Toiletries* 1995, 3, 126-132
- 1 4 . Linter K., Mondon P., Girard F., Gibaud C., The effect of a synthetic ceramide 2 on transepidermal water loss after stripping or sodium lauryl sulfate treatment : an in vivo study. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 1997, 19, 15-25
- 1 5 . Rogiers V., Liposome in dermato-cosmetologie. *Phamakon.* 1991, 186, 52-58
- 1 6 . Serup, J., Winther, A simple method for the study of scale pattern and effect of a moisturizer. *Clin.exp.dermatol.*, 1989, 14, 277
- 1 7 . Gaadially R., Brown B.E., Sequeira-Martin S.M., et al. The aged epidermal permeability barrier : structural, fuctional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 2281-2290
- 1 8 . Mao-Qiang M., Feingold K.R., Carl R.T.,Elias P.M., Optimization of physiological lipid mixtures for barrier repair. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 106, 1096-1101
- 1 9 . Elizabeth M.Z.,Ruby G., Feingold K.R., Debra C.B., ., Elias P.M., Optimal ratios of topical stratum corneum lipids improve barrier recovery in chronologically aged skin. *J. Am . Acad. Dermatol.*, 1997, 37, 403-408