pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 1, pp. 77~85 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.1.77

**Journal of Food Hygiene and Safety**
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

# 글루코실세라마이드 함유 파인애플과실추출물의 경구 투여가 아토피 피부염 동물모델의 피부 장벽기능 개선에 미치는 효과

**미야케 야스오[1] · 조호영[2] · 김영동[2] · 염명훈[2]***
[1]마루젠제약연구소, [2]마루온 주식회사 기술연구소

# Effect of Oral Administration of Pineapple Fruit Extract Containing Glucosylceramide on Skin Barrier Function Improvement in Animal Model of Atopic Dermatitis

Yasuo Miyake[1], Ho Young Jo[2], Young-Dong Kim[2], Myeong-Hun Yeom[2]*
[1]*Research Center, Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd., Hiroshima, Japan*
[2]*Research and Development Center, Maruon Co., Ltd., Seongnam, Korea*

(Received December 2, 2020/Revised December 11, 2020/Accepted February 8, 2021)

**ABSTRACT -** Glucosylceramides (GluCer) are known to play an important role in both water retention and epidermal permeability barrier function in the mammalian stratum corneum. In this study, we investigated the effects of pineapple fruit extract containing glucosylceramides (PFEG) on the maintenance and recovery of skin barrier function using atopic dermatitis-induced animal models. Five-week-old male Hos:HR-1 mice were divided into four groups fed on standard diet, unsaturated fatty acids-deficient (HR-AD) diet, and HR-AD diet supplemented with 0.01% or 0.1% pineapple-GluCer. Skin barrier function was evaluated by transepidermal water loss (TEWL), dermal moisture content, moisture content of the stratum corneum and wrinkle formation. The control group (HR-AD administration group) showed increased transepidermal water loss (TEWL), while the epidermal moisture content and the moisture content of the stratum corneum slowly decreased. However, in the PFEG groups (with 0.1% or 0.01% glucosylceramide), the TEWL levels were significantly reduced at 2 weeks. The PFEG also helped maintain skin moisturizing function by significantly suppressing the decrease of the epidermal moisture content and the moisture content of the stratum corneum. These results show that the PFEG is effective for maintaining and improving the function of the skin barrier. Therefore, this study suggests that PFEG is a potential candidate material for skin functional foods.

**Key words :** Pineapple fruit extract containing gulcosylceramide (PFEG), Glucosylceramide, Hairless mice, Skin barrier, Transepidermal water loss (TEWL)

최근, 화장품에 의한 신체 외로부터의 미용은 물론, 영양제나 미용 드링크 등 신체 내로부터의 미용을 강조한 제품이 시장에 많이 출시되고 있어 폭넓은 소비자층에 신체 내외로의 미용이 인지되고 있다. 그중에서도 세라마이드는 피부장벽기능을 높이고 피부를 깨끗하게 유지할 수 있는 소재로 주목되어 식품 분야, 화장품 분야 양쪽에서 대표적인 소재로 보고되고 있다[1,2]. 각질 세포는 지질 성분을 공급하여 피부의 장벽기능을 담당하는 것으로 보고되고 있으며[3,4], 그중에서도 세라마이드는 피부 최외층인 각층의 세포 간 지질 주성분으로써 피부장벽이나 수분 유지 기능을 담당하고 있다[5]. 또한 세라마이드는 노화에 따라 감소한다는 사실과 건조한 피부나 아토피성 피부염 환자에서 그 양이 감소한다는 사실이 보고되고 있다[6]. 세라마이드는 단순히 미용 소재로의 자리매김이 아니라 건강기능식품으로 섭취하여 피부의 항상성을 유지하는 데 매우 중요한 성분으로 인식되고 있다.

사람의 피부는 피하조직, 진피, 표피로 구성되며 표피는

*Correspondence to: Myeong-Hun Yeom, Research and Development Center, Maruon Co., Ltd., Seongnam 13488, Korea
Tel: +82-70-5147-0846, Fax: +82-31-698-4730
E-mail: mhyeom@maruon.co.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

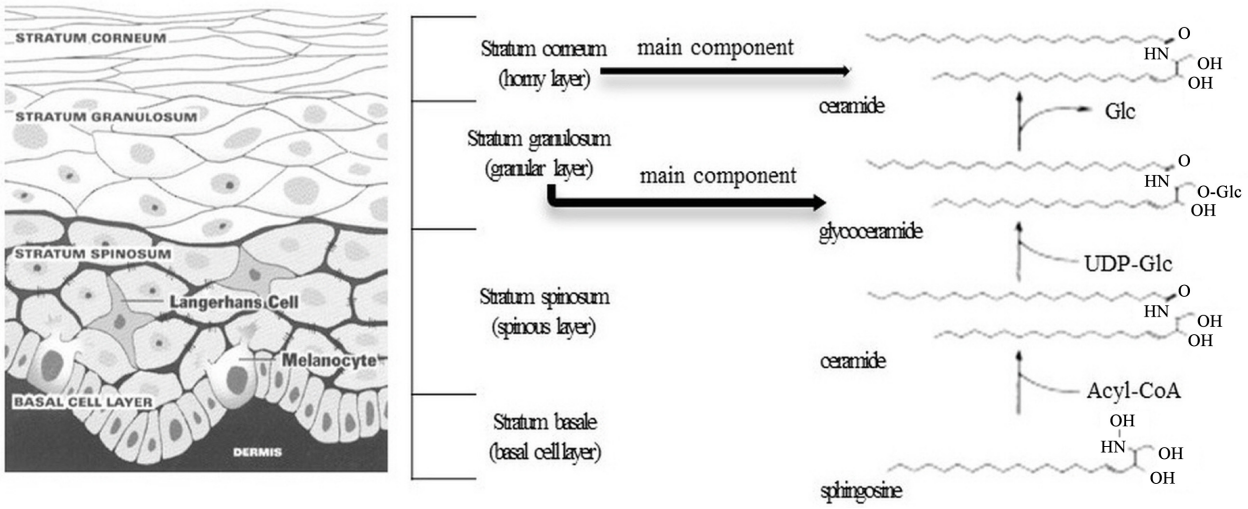



**Fig. 1.** Structure of epidermis and ceramide metabolism. The epidermis is made of four layers, depending on its location. From dermis, these layers are the stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, and stratum corneum.

생체 내부측(진피측) 으로부터 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 분류된다. 각 층마다 지질의 구성성분이 상이하여, 기저층에서는 인지질 및 콜레스테롤이 주성분으로서 존재하고 기저층과 과립층의 사이에는 글루코실세라마이드 함량이 증가하다가 각질층에서는 거의 소실된다. 글루코실세라마이드를 전구체로서 생성되는 세라마이드는 각질층에 축적되고(Fig. 1), 각질 세포 간 지질의 주성분으로서 40-60%를 차지하게 된다. 글루코실세라마이드는 식물과 동물 등 다양한 생물종에 다량으로 함유된 성분으로 피부장벽기능에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며[7], 항노화, 아토피성 피부염 치료와 항암 효능에 대해서도 보고되고 있다[8,9]. 글루코실세라마이드는 피부 보습, 아토피성 피부염 개선, 피부장벽기능 강화 등, 다양한 효과가 있다고 보고되고 있으며, 특히 순수한 글루코실세라마이드가 피부장벽기능에 실제적인 관여를 하는지에 대한 메커니즘 연구도 다수 진행되고 있다[10].

파인애플(*Ananas comosus* (L.) Merrill)은 대표적인 열대과일 중 하나로 CAM 광합성을 하는 외떡잎식물, 벼목, 파인애플과의 식물이다. 원산지는 중미와 남미 북부로 신대륙 발견 뒤 포르투갈인과 에스파냐인들이 세계 각지에 전파하였다[11]. 파인애플은 맛이 뛰어나고 다양한 효능 성분을 함유하고 있어서 세계인의 기호식품으로 자리 잡고 있다. 특히 파인애플이 함유하고 있는 글루코실세라마이드에 대한 관심이 증가하고 있다. 현재까지 글루코실세라마이드의 원료로 사용된 재료는 밀, 쌀, 대두, 옥수수, 곤약 감자 등 곡류가 주였다. 그러나 파인애플에도 다양한 종류의 글루코실세라마이드가 존재하고 그 글루코실세라마이드의 구조가 보고되고 있다[12]. 파인애플 글루코실세라마이드의 구조는 Fig. 2와 같다.

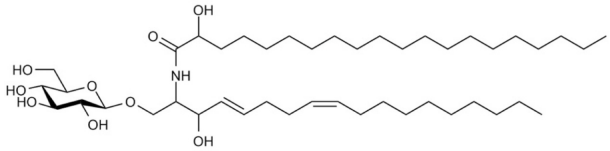


**Fig. 2.** Structure of pineapple glucosylceramide. Glucose is linked to a hydroxyl group located at the first carbon of the sphingoid base, the basic skeleton of ceramide.

곤약에서 추출한 순수 글루코실세라마이드의 경구섭취가 헤어리스 마우스에서 피부장벽기능을 강화한다는 연구가 보고되었다[13,14]. 헤어리스 마우스의 피부를 SDS 처리함으로써 마우스 피부의 표피 수분 손실을 유도하고 곤약 유래의 순수한 글루코실세라마이드를 섭취한 마우스와 비교하였다. SDS 처리를 한 마우스에서 마이크로 어레이로 평가된 mRNA의 발현 비율을 확인한 결과, 글루코실세라마이드의 경구 투여가 각질화된 외피 및 밀착연접 형성(cornified envelope and tight junction formation)과 관련된 유전자를 상향 조절하고[13], 건조 피부와 SDS 처리 시 증가하는 사이토카인인 IL-1α를 현저히 낮춤으로써 피부장벽기능을 향상시킨다고 보고하였다[14]. 또한 파인애플에서 분리한 순수한 파인애플 글루코실세라마이드(P-GluCer)를 가지고 피부장벽기능 개선에 관한 메커니즘 연구가 수행되었다. 이 연구에서는 헤어리스 마우스에 HR-AD 식이 모델로 표피 수분 손실과 주름을 유도하였으며, 이를 실험군인 P-GluCer을 동시에 투여한 마우스군과 비교하였다. 그 결과로 HR-AD 식이에 P-GluCer을 동시 투여함으로써 소장 내의 사이토카인인 Il23a의 발현이 증가함을 확인하였고[15], 피부장벽기능 약화 시 발생하는 TGF-β와 Hydroxy

proline (피부 주름 생성의 원인인 콜라겐 생성 지표)이 P-GluCer을 함께 섭취시킴으로써 정상으로 회복되는 것을 확인하였다[16]. 또한 Toya 등[17]은 글루코실세라마이드가 4% 함유된 파인애플과실추출물(PFEG: pineapple fruit containing glucosylceramide)을 사용하여 *in vitro*에서 아쿠아폴린 3(AQP3), 히알루론산 합성효소3(HAS3), 세린팔미토일트랜스퍼라아제(SPT)의 mRNA가 유의하게 증가하고, 세라마이드의 합성량도 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다.

선행연구는 곤약과 파인애플로부터 분리한 순수 글루코실세라미이드를 사용해서 얻은 피부장벽기능 개선에 관한 연구로 순수 글루코실세라마이드를 경구 섭취한 마우스에서 경피 수분 손실량(TEWL: transepidermal water loss)이 저하되어 피부장벽기능이 회복된다는 결과를 확인하였다. 그러나 글루코실세라마이드가 함유된 파인애플 과실추출물(PFEG)로 피부장벽기능 개선에 대한 *in vivo* 시험은 진행되지 않았다.

현재 곤약감자 유래의 글루코실세라마이드가 함유된 곤약감자추출물은 피부 보습에 도움을 주는 건강기능식품 원료로 등록되어 있다[18]. 본 연구에서는 사전연구가 진행된 파인애플 유래의 글루코실세라마이드가 함유된 파인애플과실추출물의 *in vitro* 연구결과를 토대로 *in vivo* 실험을 진행하여, 피부보습에 도움을 주는 피부 미용 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

따라서 본 연구는 글루코실세라마이드 함유 파인애플과실추출물(PFEG)의 피부보습 개선을 위한 건강식품 원료로서의 가능성을 평가하였다. 이를 확인하기 위해서 저 무기질 사료 사육의 HR-1 헤어리스 마우스 동물모델을 이용하여, 피부의 경피 수분 손실량(TEWL), 각질층 수분량, 피부의 육안적 및 병리조직학적 검사를 지표로 보습작용과 피부장벽 강화 작용에 대하여 평가하였다.

## Materials and Methods

### 파인애플과실추출물(PFEG) 제조

본 실험에 사용된 파인애플은 태국에서 재배된 파인애플을 사용하였다. 시험물질인 파인애플과실추출물은 파인애플 껍질을 제거한 파인애플 과육에 중량 대비 10배의 에탄올을 가하여 80°C에서 2시간 환류 추출하여 얻은 엑기스를 감압농축하여 건조한 분말이다. 시험에는 4% 글루코실세라마이드를 함유하고 있는 파인애플과실추출물(PFEG)을 사용하였다.

### 실험동물 사육 및 식이

본 실험에 사용된 동물은 4주령의 수컷 헤어리스 마우스(Hos: HR-1)를 시미즈 실험재료 주식회사(Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 실험식이 시작 전 일주일간 일반배합사료 Rabo MR Stock (Nosan Co., Yokohama, Japan)으로 예비 사육한 후 평균 체중이 유사하도록 난괴법(randomized complete block design)에 의해 대조군과 실험군으로 나눈 후 4주간 사육하였다. 실험 기간 중 식이는 4°C에서 보관하였다. 사육실의 온도는 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%, 상시 올후레쉬 방식 환기, 오전 6시부터 오후 6시까지 12시간/일 조명하였으며, 플라스틱 케이지에서 4마리씩 사육하였다. 식이 군은 정상군(Normal), 대조군(Control), 시험군1(0.01% GluCer)과 시험군2(0.1% GluCer)로 총 4군으로 나누어 사육하였다. 정상군은 일반배합사료 Rabo MR Stock, 대조군은 저미네

**Table 1.** Mineral compositions of normal feed and low mineral feed

| Minerals | Content (1 kg) | |
|---|---|---|
| | Normal feed (Labo MR stock) | Low mineral feed (HR-AD) |
| Calcium | 1.03% | 0.89% |
| Phosphorus | 0.83% | 0.62% |
| Manganese | 104.2 mg | 79.2 mg |
| Zinc | 90.8 mg | 113.5 mg |
| Iron | 213.7 mg | 277.4 mg |
| Copper | 14.5 mg | 21.4 mg |
| Cobalt | 0.03 mg | 0.002 mg |
| Uric acid | 1.57 mg | 1.26 mg |
| Sodium | 0.30% | 0.20% |
| Chlorine | 0.42% | 0.35% |
| Selenium | 0.15 mg | 0.00% |
| Magnesium | 0.27% | 0.02% |
| Potassium | 0.95% | 0.43% |

**Table 2.** Diet compositions of experimental groups

| Groups[1)] | Feed | Dosage[3)] (%) | Animal No. |
|---|---|---|---|
| Normal | Labo MR Stock | 0 | 8 |
| Control | HR-AD | 0 | 8 |
| 0.01% GluCer[2)] | HR-AD | 0.01 | 8 |
| 0.1% GluCer | HR-AD | 0.1 | 8 |

[1)]Normal: Labo MR Stock. Control: HR-AD (low mineral diet). 0.01% GluCer: HR-AD + 0.01% pineapple-derived glucosylceramide. 0.1% GluCer: HR-AD + 0.1% pineapple-derived glucosylceramide. [2)]Pineapple-derived glucosylceramide. [3)]dose from pineapple-derived glucosylceramide.

랄식 특수사료 HR-AD (Nosan Co., Yokohama, Japan), 시험군1은 0.01% 글루코실세라마이드 함유 파인애플 과실 추출물과 특수사료(HR-AD)를 혼합한 혼합특수사료, 시험군2는 0.1% 글루코실세라마이드 함유 파인애플 과실추출물과 특수사료(HR-AD)를 혼합한 혼합특수사료를 섭취하도록 하였다. 저미네랄식 특수사료와 일반배합사료의 무기질 함량은 Table 1에, 4군 구성은 Table 2에 기재하였다. 실험 개시 후 식이 및 식수는 자유 섭식하게 하였다. 본 동물실험은 마루젠제약주식회사 동물실험 윤리위원회의 승인(SY-100501)을 거쳐 진행하였다.

### 임상 증상 관찰 및 체중, 사료 및 음수량 측정

본 시험 기간 동안 1일 1회 임상 증상의 변화 및 사망 여부를 관찰하였다. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 시험 시작 전, 시험 기간 중 주 1회 실시하였다. 사육 상자별로 당일 사료와 음수의 급여 총량과 익일 잔량을 매주 1회 측정하였다.

### 피부의 경피 수분 손실량(TEWL: transepidermal water loss) 측정

피부의 보습 능력을 판정하기 위해 헤어리스 마우스 등 피부의 경피 수분 손실량(TEWL)을 Tewameter TM300 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Colongue, Germany)을 이용하여 무마취 구속하에 매주 측정하였다.

### 피부 수분량 측정

피부의 보습 능력을 판정하기 위해 헤어리스 마우스 등 피부의 피부 수분량을 Corneometer CM 825 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Colongue, Germany)와 SKICON-200EX (IBS Ltd., Ebina, Japan)을 이용하여 무마취 구속하에 매주 측정하였다.

### 피부의 육안 관찰

주름 개선 효과의 판정을 위해 4주간의 주름 선 유발 후 헤어리스 마우스의 등 피부를 육안 관찰하였다. 군별로 헤어리스 마우스의 등 쪽을 현미경(DIGITAL MICROSCOPE KE-1300, Hirox Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였다.

### 조직병리학적 관찰

조직 준비를 위해 펜토발비탈 마취 하에 채혈하고, 간장과 비장을 적출하였다. 또 헤어리스 마우스의 등 피부에 대하여는 동물을 희생시킨 후 등 쪽 피부를 떼어내어 (1 × 1 cm), filter paper에 편평하게 부착한 후 10% 중성 포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 μm 절편을 잘라 H&E (hematoxylin & eosin) 염색을 실시하였다.

### 통계처리

실험물질의 유효성 검토는 정상군(Rabo MR Stock)과 대조군(HR-AD)의 분산분석을 통해 피부장벽 붕괴 모델을 검토하였다. 유의한 차이가 있었을 경우, 대조군(HR-AD)와 시험군(PFEG 배합군)에서 Bonfferoni/Dunn의 다중비교 검정을 하고, 이때 *P*값이 0.05 미만이면 '유의하다'고 판정하였다.

## Results and Discussion

### 실험동물의 식이 섭취량과 체중

실험 기간 동안 섭취한 사료의 양을 Fig. 3과 Table 3에 나타내었다. 정상군과 대조군간에는 섭취량의 차이가 보

**Table 3.** Average amount of feed and test substance intake by groups

| Groups | Feed intake g/day | Test substance intake (Glucosylceramide) mg/day |
|---|---|---|
| Normal | 5.4 | - |
| Control | 4.5$^{###}$ | - |
| 0.01% GluCer | 4.2 | 0.42 |
| 0.1% GluCer | 4.3 | 4.33 |

All values are the mean±SE (n=8). $^{###}$; $P$<0.001 *vs* Normal.

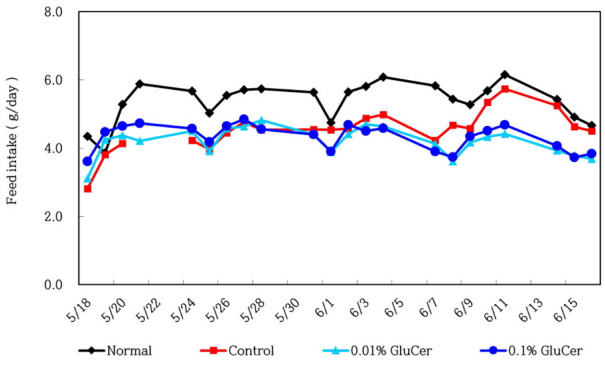



**Fig. 3.** Daily mean feed intake in hairless mice orally treated with test materials (n=8). There was a difference in intake between the normal group and the control group, but no difference between control group and 0.01% GluCer and 0.1% GluCer group.

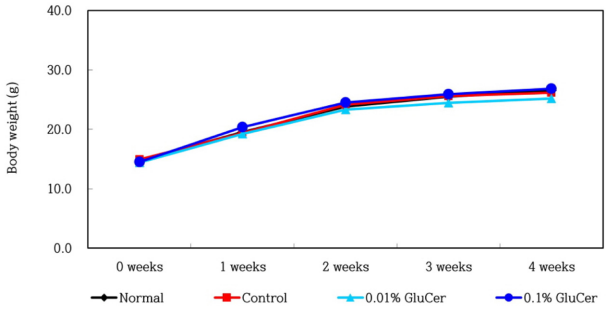



**Fig. 4.** Weight changes by groups. Hairless mice were divided into four groups and were fed a normal diet (Labo MR stock), a control diet (HR-AD), or HR-AD supplemented with 0.01%(w/w), 0.1%(w/w) pineapple glucosylceramide for 4 weeks. At 0, 1, 2, 3, and 4 weeks, the weight of each mouse in groups was measured. All values are the mean±SE (n=8).

였지만, 대조군과 시험군1 및 2 사이 차이는 나타나지 않았다. 또한, 4주 시험 기간 동안 매주 1회 실험동물의 체중을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 모든 실험동물은 시험 기간에 지속적으로 체중이 증가하여 정상적인 체중 변화를 나타내었다. 시험물질을 투여하지 않은 정상군, 대조군과 시험물질을 투여한 시험군1 및 2의 체중은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 PFEG는 실험동물의 식이 섭취량과 체중에 영향을 주지 않았다고 사료된다.

### 경피 수분 손실량(TEWL) 및 피부 수분량 측정

피부는 일생동안 끊임없이 세포분열과 분화를 통해 새로운 표피를 만들어 내는 역동적인 기관으로 여러 기능 중에 항상 강조되는 것이 방어 및 보호 기능(또는 장벽기능)인데 피부장벽은 크게 물리적인 장벽과 화학/생화학적인 장벽, 면역학적인 장벽으로 나눌 수 있다[19,20]. 건강한 피부에서의 정상적인 분화과정에 의해 생성된 각질층은 피부의 보습을 유지하고 외부환경의 자극으로부터의 보호기능이 있는데 이러한 기능을 피부장벽기능이라 하며 표피의 가장 중요한 역할이라고 할 수 있다[21].

피부의 보습은 표피의 가장 외각에 존재하고 있는 각질층의 수분함량과 밀접한 관련이 있다. 각질층은 피부장벽을 수행하는 단백질과 지질의 유기적인 복합구조로 되어 있으며, 각질층의 수분함량이 저하되면 피부의 건조증상이 유발되며 피부장벽기능의 이상이 나타난다[22,23]. 피부장벽기능 이상을 가장 쉽게 측정하는 방법으로는 경피 수분손실량(TEWL)의 증가 및 수분도의 소실이며 이는 여러 가지 피부장벽의 기능 중 가장 중요한 수분 유지의 기능이 손상되었다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 피부의 수분을 유지하고 손실량을 최소화하는지를 측정함으로써 시험군에서의 피부장벽기능이 유지되는지를 확인하였다.

피부 경피 수분 손실량(TEWL)의 4주간 측정결과는 Fig.

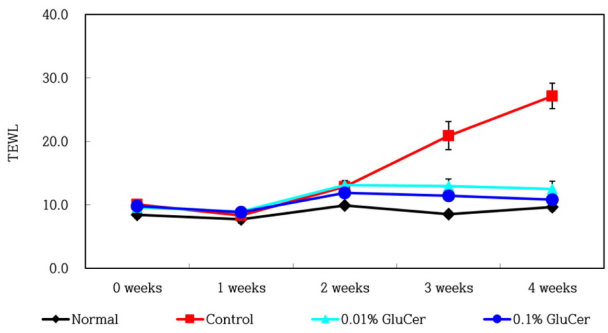



**Fig. 5.** Effect of dietary PFEG on transepidermal water loss (TEWL) in hairless mice. Hairless mice were divided into four groups and were fed a normal diet (Labo MR stock), a control diet (HR-AD), or HR-AD supplemented with 0.01%(w/w), 0.1%(w/w) pineapple glucosylceramide for 4 weeks. At 0, 1, 2, 3, and 4 weeks, the TEWL was measured in each mouse of the each groups. All values are the mean±SE (n=8).

**Table 4.** Effect of dietary PFEG on transepidermal water loss (TEWL) in hairless mice

| | 0 weeks | 1 weeks | 2 weeks | 3 weeks | 4 weeks |
|---|---|---|---|---|---|
| Normal | 8.4±0.6 | 7.7±0.6 | 9.9±0.5 | 8.5±0.5 | 9.7±0.6 |
| Control | 10.1±0.7 | 8.3±0.4 | 12.8±0.5$^{###}$ | 20.9±2.2$^{###}$ | 27.2±2.0$^{###}$ |
| 0.01% GluCer | 9.6±0.6 | 8.9±0.5 | 13.1±0.7 | 13.0±1.1$^{***}$ | 12.5±1.2$^{***}$ |
| 0.1% GluCer | 9.8±0.4 | 8.8±0.6 | 11.9±0.5 | 11.4±0.5$^{***}$ | 10.8±0.3$^{***}$ |

All values are the mean±SE (n=8). $^{###}$; $P$<0.001 *vs* Normal $^{***}$; $P$<0.001 *vs* Control.

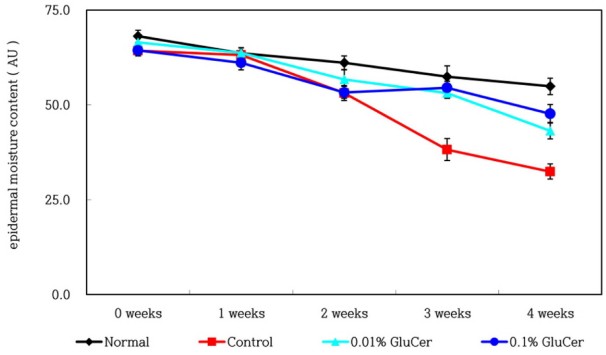



**Fig. 6.** Effect of dietary PFEG on skin moisture content in hairless mice. Hairless mice were divided into four groups and were fed a normal diet (Labo MR stock), a control diet (HR-AD), or HR-AD supplemented with 0.01%(w/w), 0.1%(w/w) pineapple glucosylceramide for 4 weeks. At 0, 1, 2, 3, and 4 weeks, the skin moisture content was measured in each mouse of the each groups. All values are the mean±SE (n=8).

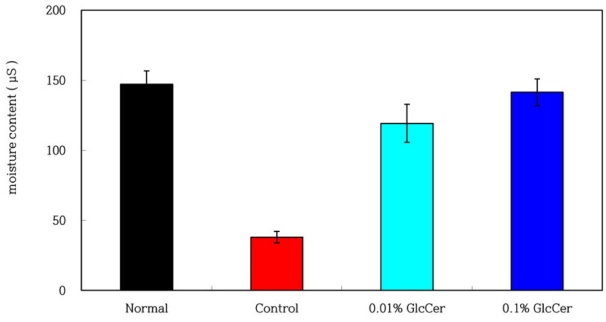



**Fig. 7.** Effect of dietary PFEG on the moisture content of the stratum corneum in hairless mice. Hairless mice were divided into four groups and were fed a normal diet (Labo MR stock), a control diet (HR-AD), or HR-AD supplemented with 0.01%(w/w), 0.1%(w/w) pineapple glucosylceramide for 4 weeks. At 4 weeks, the moisture content of the stratum corneum was measured in each mouse of the each groups. All values are the mean±SE (n=8).

**Table 5.** Effect of dietary PFEG on skin moisture content in hairless mice

| | 0 weeks | 1 weeks | 2 weeks | 3 weeks | 4 weeks |
|---|---|---|---|---|---|
| Normal | 68.1±1.6 | 63.6±0.5 | 61.1±1.8 | 57.4±2.8 | 54.9±2.2 |
| Conrtol | 64.3±1.3 | 63.2±1.9 | 53.1±1.9$^{\#\#}$ | 38.2±2.9$^{\#\#\#}$ | 32.4±2.0$^{\#\#\#}$ |
| 0.01% GluCer | 66.5±1.9 | 63.7±1.3 | 56.7±2.5 | 53.1±1.4$^{**}$ | 43.2±2.2$^{**}$ |
| 0.1% GluCer | 64.4±1.1 | 61.1±1.9 | 53.3±1.6 | 54.5±1.7$^{***}$ | 47.6±2.5$^{***}$ |

All values are the mean±SE (n=8). $^{\#\#}$; $P$<0.01, $^{\#\#\#}$; $P$<0.001 *vs* Normal, $^{**}$; $P$<0.01, $^{***}$; $P$<0.001 *vs* Control.

**Table 6.** Effect of dietary PFEG on the moisture content of the stratum corneum in hairless mice

| | Normal | Control | 0.01% GluCer | 0.1% GluCer |
|---|---|---|---|---|
| 4 weeks | 147.3±9.3 | 38.1±4.1$^{\#\#\#}$ | 119.3±13.6$^{**}$ | 141.4±9.6$^{***}$ |

All values are the mean±SE (n=8). $^{\#\#\#}$: $P$<0.001 *vs* Normal, $^{**}$: $P$<0.01, $^{***}$: $P$<0.001 *vs* Control.

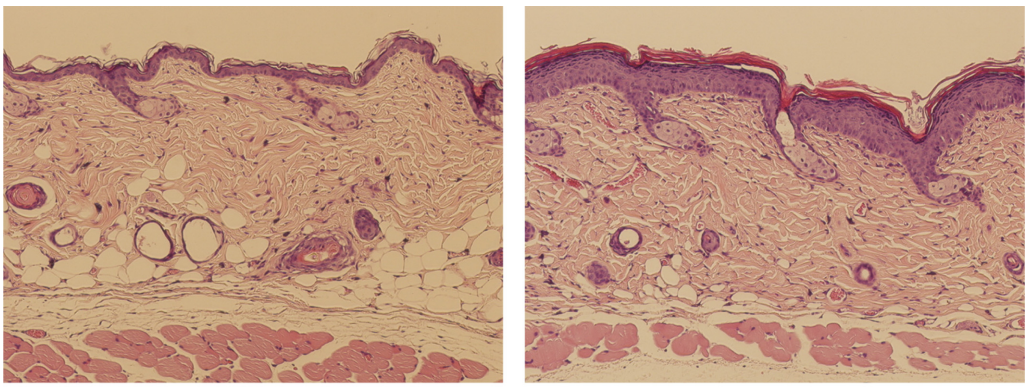
5와 Table 4에 표기하였다. 피부장벽기능의 지표가 되는 경피 수분 손실량(TEWL)은 HR-AD를 섭취시킨 대조군의 경우에 서서히 상승하여 2주째 이후부터 유의하게 수분 손실량이 증가되었다. 그러나 PFEG가 혼합된 시험군들은 2주 이후 4주까지도 정상군과 유사한 TEWL이 관찰되었다.

CORNEOMETER에 의한 피부 수분량 측정결과는 Fig. 6과 Table 5에 나타내었다. 피부 수분량은 2주 후부터 대조군(HR-AD 섭취)에서 감소되는 것이 확인되었다. 그러나 PFEG가 배합된 시험군1 및 2에서는 대조군에서 발생한 피부 수분량 저하를 억제하는 유의한 작용이 확인되었다.

SKICON-200EX로 측정한 4주 후의 각질층 수분량은 Fig. 7과 Table 6에 표기하였다. 각질층의 수분량은 대조군(HR-AD 섭취)에서 유의하게 감소되는 것을 확인하였다. 그러나 PFEG가 배합된 시험군에서는 대조군에서 발생한 각질층 수분량 저하를 억제하는 유의한 작용이 확인되었다. 특히 파인애플 유래 글루코실세라마이드가 0.1% 배합된 시험군에서는 정상군과 동등 수준으로 수분량이 측정되었다.

수분부족의 건조 피부는 각질층의 수분이 부족한 상태로 피부장벽에 이상이 생겨 경피 수분 손실량이 증가해 피부장벽기능 중 가장 중요한 수분 유지 기능이 상실된 것이다[24]. 피부장벽은 외부로부터 피부를 보호해주고 체내의 수분이 소실되지 않도록 방어하는 역할을 한다. 본 연구에서는 대조군 마우스들에게 HR-AD를 섭취시킴으로써 피부장벽기능 저하를 유도하였다. 그러나 파인애플 유래 글루코실세라마이드가 0.01% 및 0.1% 배합된 혼합사료를 섭취시킨 시험군은 경피 수분 손실량의 증가억제, 피부 수분량과 각질층 수분량이 정상군과 유사하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 PFEG가 저미네랄식 특수사료인 HR-AD에 의해서 유발되는 피부장벽기능 악화를 유효하게 억제한다고 사료된다.

**Fig. 8.** Effect of dietary PFEG on skin appearance in hairless mouse. Hairless mice were divided into four groups and were fed a normal diet (Labo MR stock), a control diet (HR-AD), or HR-AD supplemented with 0.01%(w/w), 0.1%(w/w) pineapple glucosylceramide for 4 weeks. At 4 weeks, the dorsal skins in a mouse of each group were photographed.



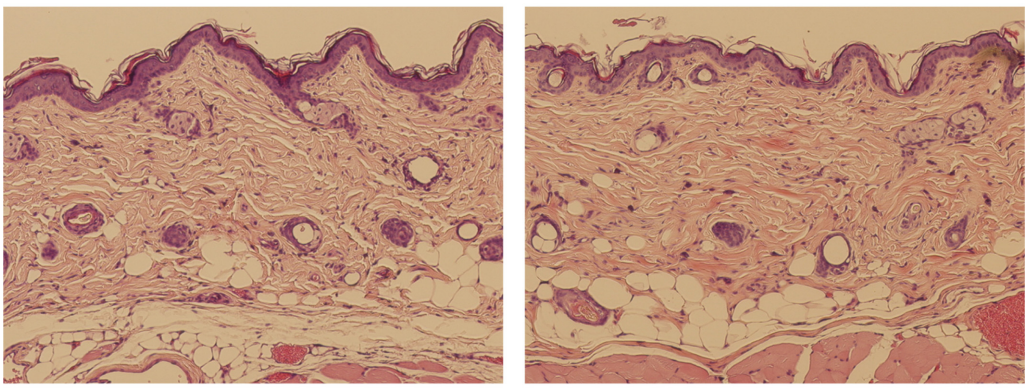




**Fig. 9.** Effect of dietary PFEG on epidermal thickening in hairless mouse. Hairless mice were divided into four groups and were fed a normal diet (Labo MR stock), a control diet (HR-AD), or HR-AD supplemented with 0.01%(w/w), 0.1%(w/w) pineapple glucosylceramide for 4 weeks. At 4 weeks, the section of hairless mouse dorsal skin was stained with H&E (Hematoxylin-eosin).

### 피부 육안 관찰 및 피부조직의 병리학적 관찰

피부장벽 기능의 이상은 피부 건조를 유발시키며 아토피 피부염과 같은 피부질환을 발생시킬 수 있다[25]. 아토피 피부의 표피층은 정상 피부보다 두꺼워져 있으며 동시에 피부 자극인자에도 민감한 것으로 보고되고 있다[26]. 본 연구에서는 아토피 피부염 모델 마우스(HR-1)에서 파인애플 유래 글루코실세라미이드의 효과를 확인하고자 하였다.

시험물질 섭취 개시 4주 후 헤어리스 마우스의 등 피부 현미경사진을 Fig. 8에 나타내었다. 대조군에서는 굵은 주름이 형성되었으나 파인애플 유래 글루코실세라미드가 0.01%와 0.1% 배합된 시험군에서는 모두 주름이 나타나지 않았다. 따라서 시험군에서는 모두 정상군과 동일한 피부의 육안적 소견을 보였다.

피부조직의 병리학적 관찰을 위한 시험물질 섭취 개시 4주 후 헤어리스 마우스 등 피부의 H&E (hematoxylin & eosin) 염색 사진은 Fig. 9에 각각 나타냈다. 대조군(HR-AD 섭취군)에서는 표피의 비후나 각화 항진이 나타났으나 파인애플 유래 글루코실세라미드가 0.01%와 0.1% 배합된 시험군에서는 표피의 비후나 각화 항진은 확인되지 않았으며 정상군과 같은 소견을 보였다.

이상의 실험 결과 PFEG가 아토피 피부염 모델 마우스(HR-1)에서 발생되는 피부 주름과 피부 두께 증가를 억제함을 확인할 수 있었다. 아토피 피부염은 피부장벽기능이 손실되었을 때 나타나는 대표적인 증상이다. PFEG가 배합된 시험군을 섭취한 헤어리스 마우스에서는 이러한 증상이 관찰되지 않는 것으로 보아, PFEG가 피부장벽기능 강화에 우수한 효과가 있는 것으로 사료된다. 이러한 피부장벽기능이 강화되면 피부의 수분이 유지되고 피부보습이 개선되어 건강한 피부를 만들 수 있다. 따라서 PFEG의 섭취는 피부 내 수분량 손실을 최소화하고 유지시킴으로써 피부보습 개선에 효과를 미치는 것으로 판단된다.

## 국문 요약

본 연구는 PFEG(글루코실세라마이드 4.0% 함유)가 저미네랄 특수사료(HR-AD)를 섭취시킨 헤어리스 마우스에서 발생하는 피부장벽 붕괴에 대한 억제작용이 있는지를 확인하고자 하였다. 4주간의 투여를 통해 정상군(Rabo MR Stock)과 비교하여 대조군(HR-AD)에서는 경피 수분 손실량(TEWL)이 서서히 상승하여 피부장벽기능의 붕괴가 발생함과 동시에 표피 수분량 및 각층 수분량도 서서히 저하되는 것이 확인되었다. 육안적으로는 깊은 주름 형성이 확인되었으며 조직학적 소견에서는 표피의 비후와 각화 항진이 확인되었다. 그러나 PFEG를 섭취시킨 시험군에서는 대조군에서 유발되는 피부장벽기능 붕괴에 대한 억제 효과가 확인되었다. 즉, 글루코실세라마이드 0.01% 배합군 및 0.1% 배합군에서는 섭취 시작 2주일째 이후 야기되는 TEWL 상승을 완전히 억제하였다. 또한, 저하되는 표피 수분량, 각층 수분량에 대해서도 유의하게 억제하여 피부 보습 기능을 유지하고 있었다. 육안적으로도 깊은 주름 형성은 억제되었으며, 조직학적인 검토에서도 표피의 비후나 각화 항진은 확인되지 않았다. 이러한 결과는 HR-1 마우스의 피부 세라마이드 생산 개선에 기인한 결과라고 예상된다. 즉, HR-AD 섭취에 의해 HR-1 마우스는 세라마이드를 포함한 피부 지질의 함량 및 구성에 이상이 생기고, 피부 수분량이 급격히 줄어들어 피부 보습 능력이 저하된다. 그런데 PFEG의 혼합 투여는 손상된 피부의 세라마이드 함량 및 구성을 정상과 가깝게 만들어, 대조군에서 나타나는 증상의 발현을 억제하는 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 PFEG의 섭취는 피부장벽기능의 손상으로 발생하는 다양한 피부 수분 손실을 억제함으로써 피부 보습 개선에 우수한 효능이 있음을 알 수 있었다. 따라서 PFEG가 피부 보습에 도움을 주는 건강기능성 원료로서 이용 가능성이 높음을 확인할 수 있다.

## Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

## ORCID

Yasuo Miyake https://orcid.org/0000-0002-7481-2525
Ho Young Jo https://orcid.org/0000-0003-1477-8983
Young-Dong Kim https://orcid.org/0000-0001-6931-5543
Myeong-Hun Yeom https://orcid.org/0000-0002-5381-6519

## Reference

1. Kwon, M.S., Choi, T.B., Kim, G.Y., The effect on the skin barrier function of ceramide. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*., **3**, 131-137 (2005).
2. Kim, T. S., Lee, S.P., Yang, W.S., Kang, M.H., Murai, H., Okada, T., Lee, J.H., Park, I.B., Park, H.J., Improvement of skin moisture capacity through dietary beauty supplement containing ceramides derived from rice. *Korean J. Food Sci. Technol*., **44**, 434-440 (2012).
3. Matoltsy, A.G., Downes, A.M., Sweeney, T.M., Studies of the epidermal water barrier. *J. Invest. Dermatol*., **50**, 19-26 (1968).
4. Elias, P.M., Lipids and the epidermal permeability barrier. *Arch. Dermatol. Res*., **270**, 95-117 (1981).
5. Kahraman, E., Kaykin, M., Bektay, H.S., Gungor, S., Recent advances on topical application of ceramides to restore barrier function of skin. *Cosmetics*, **6**, 52 (2019).
6. Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kwashima, M., Hidano, A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry

skin?. *J. Invest. Dermatol*., **96**, 523-526 (1991).
7. Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., **6**, 328-340 (2005).
8. Shimada, E., Aida, K., Sugawara, T., Hirata, T., Inhibitory effect of topical maize glucosylceramide on skin photoaging in UVA-irradiated hairless mice. *J. Oleo Sci*., **60**, 321-325 (2011).
9. Inamine, M., Suzui, M., Morioka, T., Kinjo, T., Kaneshiro, T., Sugishita, T., Okada, T., Yoshimi, N., Inhibitory effect of dietary monoglucosylceramide 1-O-beta-glucosyl-N-2'-hydroxyarachidoyl-4,8-sphingadienine on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Cancer Sci*., **96**, 876-881 (2005).
10. Takatori, R., Vu, P.L., Iwamoto, T., Satsu, H., Totsuka, M., Chida, K., Shimizu, M., Effects of oral administration of glucosylceramide on gene expression changes in hairless mouse skin: comparison of whole skin, epidermis, and dermis. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **77**, 1882-1887 (2013).
11. Doopedia, (2021, January 21). Pineapple. Retrieved from https://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/master.do?_method=view&MAS_IDX=101013000865575
12. Nakano, F., Iwasaki, D., Nojima, J., Ohto, N., Kuwahara, H., Glucosylceramides from the fruits of pineapple. *Japanese J. Pharm.*, **69**, 66-67 (2015).
13. Uchiyama, T., Nakano, Y., Ueda, O., Mori, H., Nakashima, M., Noda, A., Ishizaki, C., Mizoguchi, M., Oral intake of glucosylceramide improves relatively higher level of transepidermal water loss in mice and healthy human subjects. *J. Health Sci*., **54**, 559-566 (2008).
14. Ideta, R., Sakuta, T., Nakano, Y., Uchiyama, T., Orally administered glucosylceramide improves the skin barrier function by upregulating genes associated with the tight junction and cornified envelope formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **75**, 1516-1523 (2011).
15. Kuwata, T., Hashimoto, T., Ohto, N., Kuwahara, H., Lee, J.W., Bamba, T., Mizuno, M., A metabolite of dietary glucosylceramide from pineapples improves the skin barrier function in hairless mice. *J. Funct. Foods*, **30**, 228-236 (2017).
16. Oka, S., Ohto, N., Kuwahara, H., Mizuno, M., Oral administration of pineapple glucosylceramide improves defective epidermal barrier function by restoring diminished level of TGF-β in the skin. *Eur. Food Res. Technol*., **246**, 867-874 (2020).
17. Toya, K., Kawashima, Y., Ohto, N., Nojima, J., Ikeoka, S., Tanabe, M., Kiso, A., Beautifying efficacies of pineapple fruit extract containing glucosylceramides. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn*., **50**, 306-313 (2017).
18. Ministry of Food and Drug Safety, 2020, Standards and specifications for health functional foods (No. 2020-92). Cheongju, pp. 132.
19. Jin, S.P., Lee, D.H., Epidermal structure and skin barrier. *J. Skin Barrier Res*., **16**, 5-12 (2014).
20. Seo, Y.J., Epidermal structure and differentiation. *J. Skin Barrier Res*., **11**, 3-12 (2009).
21. Nam, J.J., Effect of Chrysanthemum zawadskii and Mentha arvensis on skin barrier function via keratinocytes differentiation. Master's thesis, Dong-Kuk University, Seoul, Korea (2012).
22. Kwon, S.B., Lee, G.T., Choi, S.J., Lee, N.K., Park, H.W., Lee, K.S., Lee, K.K., Ahn, K.J., An, I.S., The effect of glycerin, hyaluronic acid and silicone oil on the hydration, moisturization and transepidermal water loss in human skin. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*., **11**, 761-768 (2013).
23. Chang, M.Y., Kim, J.J., Lee, C.K., Moisturizers in cosmetics -classification of moisturizers by action mechanism-. *J. Skin Barrier Res*., **9**, 18-26 (2007).
24. Rudolph, R., Kownatzki, E., Corneometric, sebumetric and TEWL measurements following the cleaning of atopic skin with a urea emulsion versus a detergent cleanser. *Contact Dermatitis*, **50**, 354-358 (2004).
25. Kim, H.J., Jeong, S.K., New in trends skin barrier research. *J. Skin Barrier Res*., **14**, 15-28 (2012).
26. Kim, D.S., Analyses of ethnic variations and physico-chemical factors that affect skin barrier functions. Master's thesis, Dong-Kuk University, Seoul, Korea (2010).