

테스토스테론이 피부장벽에
미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
박 하 나

테스토스테론이 피부장벽에 미치는 영향

지도 안 성 구 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004 년 7 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 하 나

박하나의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004 년 7 월 일

감사의 글

참된 의사의 길에 첫 발을 내딛는데 가장 큰 도움을 주시고 늘 자상하고 세심하게 이 영광의 순간까지 함께 해주신 안성구 지도교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 관심과 훌륭한 조언을 주셨던 김황민 교수님과 바쁘신 와중에 훌륭한 조언을 해 주셨던 이광길 선생님께도 깊은 감사를 드립니다.

저를 피부과에 입문하도록 해 주시고 학문하는 자세를 가르쳐 주신 이원수 교수님께 감사드립니다. 옆에서 늘 격려해 주시고 도와주신 천승현 선생님, 이진욱 선생님, 오택현 선생님, 전수영 선생님, 홍승필 선생님, 구자웅 선생님을 비롯한 우리 피부과학 교실 모든 분들과 전자현미경실의 김석 선생님, 송미숙 선생님, 병리학 교실의 선생님들께도 감사를 드립니다.

저를 낳아 길러주시고 지금 이 순간에도 가장 기뻐해주실 아버지, 어머니, 그리고 사랑하는 그이와 동생들에게 큰 감사를 드리며 이 영광을 돌리고자 합니다.

저 자 씬

차 례

그림 차례	iii
국문 요약	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험 동물	4
2. 실험 방법	4
(1) 조직생검	4
(2) 면역조직화학 검사(ABC 방법)	5
(3) In situ hybridization	5
(4) 증식세포핵항원	6
1) 염색방법	6
2) 결과 판정	7
(5) 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색법	7
(6) 전자현미경 검사	8
1) RuO ₄ 후 고정법	8
2) OsO ₄ 후 고정법	8
III. 결과	10
1. 광학현미경 소견	10
2. 면역조직화학 염색소견	10
(1) Involucrin	10

(2) Loricrin	10
(3) Filaggrin	11
3. In situ hybridization 소견	11
(1) Loricrin	11
(2) Filaggrin	11
4. 증식세포핵항원	12
5. 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색소견	12
6. 전자현미경 소견	12
(1) 지질	13
(2) 층판소체	13
IV. 고찰	14
V. 결론	20
참고문헌	22
부록	27
영문요약	34

그림 차례

Fig. 1. Histopathologic findings of the epidermis	27
Fig. 2. Immunohistochemical staining of involucrin, loricrin and filaggrin	28
Fig. 3. In situ hybridization of loricrin and filaggrin in sham-operated, castrated, and testosterone-replaced castrated mice	29
Fig. 4. Immunohistochemical staining for PCNA in sham-operated, castrated, and testosterone-replaced castrated mice	30
Fig. 5. The changes of epidermal calcium gradient in sham-operated, castrated, and testosterone-replaced castrated mice	31
Fig. 6. The changes of stratum corneum lipid layers in sham-operated, castrated, and testosterone-replaced castrated mice	32
Fig. 7. The changes of lamellar bodies in sham-operated, castrated, and testosterone-replaced castrated mice	33

국 문 요 약

테스토스테론이 피부장벽에 미치는 영향

성호르몬에 해당하는 에스트로겐과 테스토스테론은 피부장벽에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다. 특히 안드로젠은 표피 성장, 분화, 유사분열, 과립세포의 증식에 의한 표피의 과증식을 유도하며, 모피지 기능에 영향을 준다. 즉 장벽기능과 각질층의 결합력에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 성호르몬은 자궁 내와 성장호르몬이 없는 배지 내에서 장벽발달의 최종적인 시기에 매우 중요한 역할을 담당한다. 즉 실험관 내에서 외부적으로 에스트로겐을 투여하면 장벽의 형성과 발달을 촉진하지만 안드로젠은 억제하는 기능이 있다. 수술적으로 고환을 적출하거나 내과적인 방법으로 안드로젠을 소실 또는 감소시키면 장벽회복이 빨라진다는 보고가 있다. 수컷 생쥐 태자는 암컷 생쥐 태자보다 장벽발달이 늦지만 테스토스테론 수용체에 대한 길항체인 flutamide 를 도포하거나 주사하면 정상으로 복귀된다.

이에 테스토스테론이 표피의 각질세포외막과 지질막 형성에 대한 영향과 기전을 살펴 보고자 3 군으로 구분하여 실험하였다. 제 1 군은 고환에 칼자국만을 낸 대조군(sham-operated), 제 2 군은 고환적출군, 제 3 군은 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군으로 구분하였다. 제 3 군은 1 일 간격으로 테스토스테론을 복강내 주사하였으며, 1 주 후 모든 군을 희생시킨 후 조직 검사와 면역조직화학 검사, in situ hybridization,

증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색, 전자현미경적 관찰을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군과 고환적출군은 조직검사상 표피가 정상 소견과 유사하였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 표피의 과각화증과 극세포증이 관찰되었다.
2. Involucrin, loricrin, filaggrin 에 대한 표피의 면역조직화학 염색상 대조군과 고환적출군은 정상적인 발현을 보였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 발현의 정도가 미약하고 표피 전반에 걸쳐 넓게 분포하였다.
3. 증식세포핵항원 표지지수는 대조군과 고환적출군은 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군의 경우 통계적으로 유의하게 증가되었다.
4. 칼슘이온 캡처 검사상 대조군과 고환적출군은 과립층에서 가장 높은 농도를 보이는 정상적인 칼슘 기울기가 관찰되었으나 고환적출 후 테스토스테론 투여군의 경우 뚜렷한 기울기의 소실을 보였다.
5. RuO₄ 후 고정법을 이용한 전자현미경 소견상 대조군과 고환적출군은 정상적인 지질막 구조를 보였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 부분적으로 지질막 구조의 단락, 불완전한 이중막, 각질세포 간격의 확대 및 열공 확장 등이 동반되었다. OsO₄ 후 고정법을 이용한 전자현미경 소견상 대조군과 고환적출군은 정상적인 층판소체

의 수와 모양을 보였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 증관소체의 변형과 숫적 감소가 관찰되었다.

이상의 연구결과를 종합해보면, 테스토스테론은 각질형성세포의 각질세포외막의 형성과 지질막 형성 장애를 초래하여 피부장벽의 기능을 저하시키는 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : 테스토스테론, 피부장벽, Involucrin, Loricrin, Filaggrin, 증식세포핵항원, 칼슘, 표피지질

테스토스테론이 피부장벽에 미치는 영향

<지도 안 성 구 교수>

연세대학교 대학원 의학과

박 하 나

I. 서 론

호르몬은 신체의 균형을 유지하기 위해 다양한 정보를 전달하고 자극하는 화학 물질이다. 호르몬은 혈액 등을 통해 신체 각 부위의 기관에 운반되어 그 기관의 특별한 기능을 조절하거나, 다른 물질을 생성하여 항상성을 유지하는데 필수적인 매개체 역할을 한다. 현재까지 인체에는 약 80 여종의 호르몬이 존재한다고 알려져 있으며, 뇌(시상하부, 뇌하수체)를 비롯한 부신, 갑상선, 부갑상선, 췌장, 성선(고환, 난소), 소화관 등 내분비 기관이라고 통칭되는 7 개의 장기에서 분비된다. 호르몬은 신경계의 신경전달물질 및 면역계의 사이토카인과 밀접한 정보전달을 하며 항상성을 유지하고 있다. 이러한 호르몬의 부족이나 과분비에 의해 피부의 비정상적 변화가 초래될 수 있다.

그 중에서도 성호르몬인 에스트로겐과 테스토스테론이 피부장벽에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다. 각질형성세포에는 안드로겐 수용체가 존재하여 효소 장치 및 5- α 리덕타아제에 의해 테스토스테론을 dihydrotestosterone 으로 전환시킨다. 이렇게 안드로겐은 표피 성장, 분화, 유사분열, 과립세포의 증식에 의한 표피의 과증식을 유도하며, 모피지 기능에 영향을 준다. 이러한 성호르몬은 자궁 내와 성장호르몬이 없는 배지 내에서 장벽발달의 최종적인 시기에 매우 중요한 역할을 담당한다. 즉 실험관 내에서 외부적으로 에스트로겐을 투여하면 장벽의 형성과 발달을 촉진하지만 안드로겐은 억제하는 기능이 있다¹. 수술적으로 고환을 적출하거나 내과적인 방법으로 안드로겐을 소실시키거나 감소시키면 장벽회복이 빨라진다는 보고도 있다². 수컷 생쥐 태자는 암컷 생쥐 태자보다 장벽발달이 늦지만 테스토스테론 수용체에 대한 길항체인 flutamide 를 도포하거나 주사하면 정상화되는 소견을 나타낸다¹. 그러나 생쥐의 경우 출생 후에는 테스토스테론을 투여하여도 장벽기능에 영향을 주지 않는다.

피부장벽의 구성성분은 두 가지로서 하나는 표피의 각질세포이며 다른 하나는 각질세포 사이에 존재하는 연속적인 층상구조를 보이는 지질이다. 각질세포는 주로 케라틴 다발로 이루어져 있으며 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공하고, 각질세포간 지질은 인지질을 함유하는 보통의 생체막과는 달리 세라마이드, 콜레스테롤, 자유

지방산을 함유하며 서로 직선적으로 잘 연결되어 물질의 투과를 방지하는 장벽역할을 수행한다. 세포화학적 연구에 따르면 피부에는 칼슘 기울기가 존재한다. 즉 기저층과 유극층에는 칼슘 이온 농도가 낮고, 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에 가장 높다. 바꾸어 말하면 낮은 농도의 칼슘 이온은 기저층에서 세포의 증식과 연관되며, 높은 농도의 칼슘 이온은 과립층의 세포 분화와 연관된다³. 따라서 피부장벽이 손상될 경우 표피내 수분이동이 증가하여 표피내 칼슘 기울기가 소실된다. 그 결과 DNA 의 합성이 증가되어 표피의 증식과 분화에 변화가 나타난다. 이러한 표피 증식의 정도를 평가하는 지표 중의 하나가 증식기 세포에서 발현되는 핵항체로서 DNA 합성에 관여하는 산성 핵단백질의 일종인 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)이다.

이에 무모생쥐에서 테스토스테론을 투여한 후 표피의 각질세포외막과 지질막 형성에 대한 영향과 기전을 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

생후 4~5 주 된 수컷 무모생쥐(Sk:h1)을 사용하며 동일한 표준사료로 사육한 후 실험하였다.

2. 실험 방법

실험 동물은 3 군으로 나누어 제 1 군은 고환에 칼자국만을 낸 대조군 5 마리, 제 2 군은 고환적출군 5 마리, 제 3 군은 고환적출 후 테스토스테론(testosterone enanthate[®], Schering)을 투여한 5 마리로 하였다. 제 3 군은 1 일 간격으로 테스토스테론을 5mg/kg 피하 주사하며 1 주 후 모두 희생시켰다.

(1) 조직생검

희생시킨 동물의 피부를 절제하여 통상의 조직 표본제작에 따라 10% 중성 포르말린에 고정, 수세 및 파라핀 포매과정을 거쳐 2 μ m 의 연속절편을 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 시행한 후 광학현미경 하에서 표피의 두께 및 변화에 대해 조사하였다.

(2) 면역조직화학 검사(ABC 방법)

파라핀 포매조직을 4 μm 로 박절하여 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 3% 과산화수소 메탄올 용액으로 5 분간 조직내 내인성 과산화 효소의 활동을 저지시키고 증류수로 행구었다. 인산염-완충 식염수에 담근 후 단백질과의 비특이성 결합을 억제시키기 위해 정상 산양 혈청과 5 분간 반응시킨 후 일차항체인 involucrin, loricrin, filaggrin(이상 Biomedical Technologies Inc., MA, USA)을 각각 1:10, 1:200, 1:70 으로 희석하여 30 분간 반응시킨 후 인산염-완충 식염수에 세척하였다. 이차항체로서 biotinylated anti-mouse IgG(DAKO, Glostrup, Denmark)를 사용하여 10 분간 인산염-완충 식염수에 수세시키고 발색제인 3-amino-9-ethylcarbazole(ACE)를 이용하여 발색시켰다. 헤마톡실린으로 대조염색하고 crystal mount 로 봉입하여 관찰하였다.

(3) In situ hybridization

Loricrin(3'noncoding region, 200 bases)과 profilaggrin(coding region, 300 bases) mRNA 를 감지하는 Digoxigenin(DIG) labeled RNA probe 는 linearized cDNA sequences(미국 국립보건원, Yuspa)로 만들었다. 염색방법은 Kömüves 등⁴의 방법에 따라 시행하였다. 즉 절편은 40°C에서 보합결합하고, 내인성 mRNA 에 대한 DIG labeled probe 의 보합결합은 Boehringer-Mannheim 에서

만든 anti-DIG-alkaline phosphatase 로 감지하였다. Alkaline phosphatase 의 활성도는 2mM levan-misole 이 함유된 5-bromo-4-chloro-3-indol-yl phosphate / nitro-tetrazolium blue substrate 에 의해 결정하였다.

(4) 증식세포핵항원

1) 염색 방법

면역조직화학 염색을 위하여 모든 병변을 APAAP(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase)방법을 이용하여 시행하였다. 파라핀에 포매된 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 크실렌으로 파라핀을 제거하고 100%, 96%, 75% 알코올에 함수시킨 후 내재성 과산화수소의 활성을 억제하기 위해 과산화수소 메탄올 용액에서 10 분간 처리하여 Tri-buffered saline(TBS)으로 5 분씩 3 회 세척하였다. 단백질과의 비특이성 결합을 억제하기 위해 돼지의 정상 혈청(1:10)을 실온에서 30 분간 반응시켰다. 일차 항체인 토끼 혈청에서 만든 증식세포핵항원에 대한 항인체 항체를 1 시간 반응시킨 후 TBS 완충액에서 5 분간 3 회 세척하였다. 이차 항체인 항가토 돼지 혈청을 1 시간 반응시키고 alkaline phosphatase 와 결합된 항혈청(1:400, Dako 사)을 1 시간 동안 결합시켰다. 3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride 가 포함된 기질용액에 조직절편

을 담구어 현미경 검색 하에서 갈색이 나올 때까지 발색시킨 다음 흐르는 물에서 세척하였다. Mayer 의 헤마톡실린으로 대조 염색 후 흐르는 물에서 세척하고 글리세린 젤리로 봉입하였다.

2) 결과 판정

증식세포핵항원 항체는 광학 현미경(Olympus model, BH2) 400 배율 한 시야에서 관찰되는 기저세포층과 바로 상부 한 층에서의 각질형성세포를 세고, 세포핵이 명확히 짙게 염색되는 경우를 양성으로 하여 그 숫자를 세어 백분율을 산출하여 표지지수(labeling index, 이하 L. I.)를 구하였다. 즉 $L. I.(\%) = (\text{증식세포핵항원에 양성인 핵의 수} / \text{해당 전체 세포 수}) \times 100$ 으로 산출하였다. 한 슬라이드당 5 시야를 관찰하고 평균하여 산출하였다. 대조군, 고환적출군, 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군의 조직에서 증식세포핵항원 표지지수 변동의 비교를 위한 통계적 처리는 t-test 를 시행하였다.

(5) 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색법

조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% 포르말데하이드, 90mM potassium oxalate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1.4% 자당으로 조성되고 4℃로 냉장된 고정액에 조직을 고정하였다. 입체 현미경 하에서 냉고정액 1 방울을 점적 후 0.5 mm²로 세절하여 얼음조각 위에서 하룻밤 동안 고정하였다. 고정액을 버리고 1 ml 4%

OsO₄ 와 3 ml 2% potassium pyroantimonate stock 용액이 혼합된 후 고정액으로 얼음 위에서 2 시간 동안 후 고정하였다. 수산화칼륨 용액을 사용하여 pH 10 으로 조절된 냉증류수에 10 분간 세수한 후 통상적인 방법으로 탈수, 포매하고 염색하였다. 이때 대조 표본은 10mA 에틸렌디아민 사아세트산에서 10 분간 배양하였다. 이렇게 준비된 표본을 투과전자현미경(Joel, Tokyo, Japan) 하에서 표피세포 전층을 관찰하였다.

(6) 전자현미경 검색

1) RuO₄ 후 고정법

조직을 얻은 즉시 입체 현미경 하에서 0.1 mm로 세절하여 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% 염화칼슘, 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 로 조성된 변경된 Karnovsky 용액에 넣어 고정하고 고정된 조직을 실온에서 1 시간 동안 방치한 후 18~24 시간 동안 4℃ 냉장고에 보관하였다. Karnovsky 용액을 제거한 후 0.1M cacodylate buffer 용액에 빛을 차단한 상태로 실온에서 45 분간 시행하였다. 후 고정 후 0.1 M cacodylate buffer 에서 10 분간 1 회 세척한 후 50% 에탄올로 5 분씩 2 회, 70%와 95% 에탄올로 각 10 분씩 2 회, 100% 에탄올로 각 20 분씩 4 회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide 로 각 15 분간 2 회 조직을 침투시키고 통상적인 방법으로 만들어진 Epon 에 포매시켜

36 시간 동안 78℃ 정온기에서 레진을 중합반응 시켰다. 1-5 μm 두께로 박절하여 부위를 찾고 초박절편 후 통상적인 아세트산 우라닐과 구연산 납으로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

2) OsO₄ 후 고정법

조직을 1 mm³ 크기로 잘라서 2% glutaraldehyde 용액(pH 7.4, 0.1M, cacodylate buffer, 4℃)에 2 시간 전 고정하고 OsO₄ 용액에 2 시간 동안 고정시켰다. 다시 동일한 cacodylate buffer 로 세척하여 에칠알코올로 탈수하고 propylene oxide 를 침투시킨 다음 epon 에 포매하여 60℃에서 72 시간 열중합 시켰다. Epon 블록을 1 μm 로 박절하여 1% 툴루이딘 블루에 염색한 후 광학현미경으로 특정 부위를 박편절단기로 초박절편을 만들어 아세트산 우라닐과 구연산 납으로 이중 염색하였다. 염색후 교소체와 증판소체를 시기별로 비교 조사하였다.

Ⅲ. 결과

1. 광학현미경 소견

대조군과 고환적출군의 경우 표피와 진피에서 특별한 이상 소견이 관찰되지 않았다(Fig. 1A, 1B). 그러나 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군에서는 뚜렷한 표피의 과각화증과 극세포증이 관찰되었다(Fig. 1C).

2. 면역조직화학 염색소견

(1) Involucrin

대조군은 과립세포층과 유극세포층 일부에서 중등도의 양성 반응을 보였고(Fig. 2A), 고환적출군은 이와 유사하게 과립세포층과 유극세포층 세포 일부에서 중등도의 양성 반응을 보였다(Fig. 2B). 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군은 기저부에서부터 과립세포층까지 넓게 분포하며 중등도 내지는 약양성의 반응을 보였다(Fig. 2C).

(2) Loricrin

대조군은 과립세포층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였고(Fig. 2D) 고환적출군도 유사하게 과립세포층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였다(Fig. 2E). 고환적출 후 테스토스테론을

투여한 군은 기저부에서부터 과립세포층까지 그리고 일부 각질층에서 중등도 내지 약양성의 반응을 보였다(Fig. 2F).

(3) Filaggrin

대조군의 경우 과립층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였고(Fig. 2G) 고환적출군에서도 유사하게 과립층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였다(Fig. 2H). 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 기저부에서부터 과립층까지 그리고 일부 각질층에서 아주 미약한 약양성의 반응을 보였다(Fig. 2I).

3. In situ hybridization 소견

(1) Loricrin

대조군은 과립세포층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였고(Fig. 3A), 고환적출군도 유사하게 관찰되었다(Fig. 3B). 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군은 기저부에서 과립세포층까지 그리고 일부 각질층에서 중등도 내지 약양성의 반응을 보였다(Fig. 3C).

(2) Filaggrin

대조군은 과립층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였고(Fig. 3D) 고환적출군에서도 유사하게 과립층과 일부 각질층에서 중등도의 양성 반응을 보였다(Fig. 3E). 고환적출 후 테스토스테론 투여군은

기저부에서 과립층까지 그리고 일부 각질층에서 아주 미약한 약양성의 반응을 보였다(Fig. 3F).

4. 증식세포핵항원 소견

표피의 증식세포핵항원 표지지수의 경우 대조군은 표피의 기저층 세포에서 $6.9 \pm 0.9\%$ (mean \pm SD)의 증식세포가 관찰되었다. 고환적출군은 $8.1 \pm 2.1\%$ 이었고, 고환 적출 후 테스토스테론 투여군은 $32.0 \pm 2.9\%$ 이었다(Fig. 4A, 4B, 4C). 고환적출 후 테스토스테론 투여군에서의 증식세포핵항원 표지지수는 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

5. 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색소견

칼슘이온 캡처에서 대조군의 과립층 상부는 기저층에 비해 세포질 내외부에 높은 농도의 칼슘이온이 존재하여 정상적인 칼슘 기울기를 관찰할 수 있었다(Fig. 5A). 고환적출군에서도 이와 유사하게 과립층 상부에서 기저층보다 높은 농도를 보여 정상적인 칼슘 기울기를 유지하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5B). 그러나 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 기저층부터 과립층까지 칼슘 농도가 증가되어 있고 특히 유극층과 과립층에서 높은 농도를 보이고 있었다(Fig. 5C).

6. 전자현미경 소견

(1) 지질

RuO₄ 염색 소견상 대조군과 고환적출군에서는 정상적인 지질구조가 관찰되었으나(Fig. 6A, 6B), 고환적출 후 테스토스테론 투여군에서는 지질막의 단락과 분절이 관찰되었고 열공이 뚜렷이 확장되었다(Fig. 6C).

(2) 충판소체

OsO₄ 염색상 대조군과 고환적출군에서는 충판소체가 정상적인 형태와 숫자를 나타내었다(Fig. 7A, 7B). 고환적출 후 테스토스테론 투여군에서는 충판소체의 뚜렷한 숫적 감소와 크기의 증가 및 형태의 변화가 관찰되었다(Fig. 7C).

IV. 고찰

피부장벽의 발생에 있어 호르몬의 역할에 대한 연구는 폐의 계면활성제 발생에 있어 호르몬의 역할을 연구하던 중에 시작되었다. 폐의 계면활성제와 각질세포간 지질은 각각의 구성성분(폐 계면활성제:인지질, dipalmitoylphosphatidylcholine; 각질세포간 지질:세라마이드, 콜레스테롤, 자유 지방산) 상의 차이가 있지만 같은 시기인 태생 후반기에 생성되는 점, 분비계인 층판소체를 통해 외부로 분비되는 점, 그리고 폐와 피부의 두 조직이 모두 공기에 노출되는 기관이라는 점에서 유사하다^{3,5}. 피부장벽에 영향을 주는 호르몬 중에서 당질코르티코이드는 미숙아에서 폐성숙을 촉진시키는 것과 마찬가지로 피부장벽의 발생을 촉진한다는 것이 밝혀져 있다^{6,7}. 그 외에도 갑상선 호르몬이 피부장벽의 성숙을 촉진시킨다는 보고가 있다⁷. 미숙아에게 폐의 계면활성제를 투여하는 경우 폐의 미성숙은 성별에 차이없이 호전되는데 반해, 피부의 성숙도는 남아에서 여아에 비해 느리게 성숙되는 결과를 보인다¹. 산모에게 에스트로겐 또는 안드로겐을 주사하는 자궁내 연구와 점적된 상태의 실험관 내 연구에서 에스트로겐은 피부장벽 형성을 촉진하지만, 테스토스테론은 피부장벽 형성을 지연시킨다. 테스토스테론 수용체에 대한 길항체인 flutamide 를 임신한 쥐에 투여한 결과 피부장벽의 성숙도에 있어 성에 따른 차이를

보이지 않는 것으로 보아 테스토스테론은 피부장벽 형성에 억제효과를 가지는 것으로 생각된다¹.

피부장벽의 역할을 수행하는데 있어 각질세포외막은 각질세포간 지질과 함께 중요한 요소이다. 각질세포외막은 특이한 전구 단백질의 연속적인 결합 및 다단계 과정에 의해 만들어 진다. 전구물질은 involucrin, cystatin- α , several small proline-rich proteins(SRP), cornifin, loricrin, elafin, filaggrin 등 여러 구조 단백질들이 알려져 있다⁸. 각질세포외막 형성의 초기 단계는 골격으로 작용하는 involucrin 과 cystatin- α 의 교차결합이 시작되고, 그 후에 loricrin 과 SRP 의 침착이 진행되며, 마지막 단계에서 filaggrin 이 침착되어 각질 필라멘트와 결합함으로써 각질세포외막 형성이 완성된다⁹⁻¹². Involucrin 은 cornifin 과 loricrin 에 앞서 합성이 이루어지므로 말기 분화에 있어 가장 초기의 표지자이며, 정상 표피의 과립층 및 유극층 상부에서 발견된다¹⁰. Loricrin 은 involucrin 보다 나중에 각질세포외막 형성에 관여하는 주요 단백질로서 정상적으로 각질층과 과립층에서 발견된다. Filaggrin 은 각질세포외막 형성의 마지막 단계에 관여하는 단백질로서 정상적인 표피에서는 과립층의 가장 바깥층과 각질층에 국한하여 발견된다¹¹. 본 연구의 경우 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군에서 이러한 분화에 관련된 단백질의 표현이 감소되어 넓게 분포한다는 것은 각질형성세포의 분화과정을 통한 각질화가 정상적으로

이루어지지 못했음을 의미하는 것이며, 피부장벽에 중요한 역할을 하는 각질세포외막의 형성에 장애를 초래함을 확인할 수 있었다.

본 연구결과 세포증식핵항원 표지지수는 대조군과 고환적출군에 비하여 고환적출 후 테스토스테론 투여군이 뚜렷하게 증가되었다. 이는 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군에서 조직학적인 극세포증을 보이는 것과 같은 맥락으로 해석될 수 있을 것이다. 기존의 연구에 의하면 급성 및 만성 피부장벽의 손상시 경표피수분소실이 증가되고 극세포증이 동반되므로 고환적출 후 테스토스테론 투여군에서 증식세포핵항원 표지지수의 증가는 피부장벽의 손상에 대한 이차적인 반응으로 생각된다.

세포화학적 연구에 따르면 피부에는 칼슘 기울기가 존재한다. 기저층과 유극층에는 칼슘이온 농도가 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 상부 과립층에 가장 높다. 즉, 낮은 농도의 칼슘이온은 기저층에서 세포의 증식을 일으키며, 높은 농도의 칼슘이온은 과립층의 세포 분화와 연관된다고 할 수 있다¹³⁻¹⁵. 칼슘이온은 *in vitro* 에서 피부장벽의 형성과 손상 후 회복 과정 그리고 각질형성세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸. Menon 등¹⁹ 은 칼슘이온 캡처 검사를 이용하여 포유류 표피에서 칼슘 저장고의 미세구조 상 위치를 전자현미경으로 확인하였다. 즉, 가장 위쪽의 과립세포는 항상 많은 세포의 침착과 세포질 내에 높은 자유 칼슘이온을 보이며 과립-각질세포 사이로 분비되는 층판소체에서 칼슘이온 침전물을 다량 발견하였다.

또한 중간 과립층 내에서 세포간 칼슘이온의 축적과 상부 과립층 내로 칼슘이온의 유입은 세포내 칼슘이온의 변화가 표피 분화를 조절할 수 있음을 제시하였다. 정상 표피의 경우 상부 과립층에서는 상대적으로 높은 칼슘 농도를 유지하나 하부 기저층에서는 낮은 칼슘 농도를 보이게 된다. 피부 장벽의 급성 손상 시 상부 표피로부터 칼슘이온의 소실에 의해서 정상적인 표피 칼슘 기울기가 소실되고 피부장벽이 회복됨에 따라 과립층의 칼슘이온의 농도가 증가하여 칼슘 기울기가 회복되고²⁰, 바깥쪽 표피의 세포의 칼슘 함유량 변화에 의해 피부장벽의 급성손상 후 장벽회복 반응이 조절될 수도 있음이 알려져 있다²¹. 본 실험에서 고환적출 후 테스토스테론을 투여한 군에서만 칼슘 기울기의 소실이 관찰되었는데 이는 피부장벽의 손상으로 인한 것으로 생각된다.

각질세포간 지질은 각질층과 과립층 사이에서 층판소체의 세포의 유출에 의해 세포간격으로 분비된다. 층판소체는 1960년 Odland가 처음 기술한 구조물로서, 상부 유극층과 과립층에서 생성되는 0.3~0.5 μm 크기의 원형 혹은 난원형의 구조로 삼층막을 가지고 있다²²⁻²⁴. 층판소체는 주로 콜레스테롤, 인지질과 glucosylceramides로 이루어져 있으며 층판소체 내의 풍부한 단백분해효소, 글리코시다아제 및 여러가지 리파제가 관여하여 각질층 내 세포간 지질의 주성분인 콜레스테롤, 자유 지방산과 세라마이드로 변환된다. 이러한 지질의 세포외 변환이 정상적인 지질이층막 구조 형성에 중요한 역할을 한다. 층판소체 내의 지질은 내부에 작은 판으로 압축되어 있다가 이 후

과립층과 각질층이 인접하는 곳에서 세포간격으로 분비된다. 분비된 다음에 이러한 작은 판들이 퍼지고 길어지기 시작하며 가수분해 효소의 작용에 의해 각질층의 중간 부위에서는 편평하고 넓은 세포간 층판상의 구조(intercellular lamellar sheets)를 나타낸다^{22,25,26}. 분화 도중 지질과 효소의 화학적인 변화와 함께 각질층에서는 작은 원판상의 구조가 점차 넓은 판으로 변하는 구조적인 변화를 가진다²⁷⁻²⁹. 피부장벽 기능을 유지하는 데에는 반복적인 소수성과 친수성 층판으로 구성된 이러한 세포간 층판구조가 가장 중요한 역할을 수행함이 알려져 있다³⁰. 본 연구에서는 특히 고환적출 후 테스토스테론 투여군에서 층판소체의 뚜렷한 숫적 감소와 크기의 증가와 함께 형태학적인 변형을 관찰할 수 있었다. 이는 테스토스테론이 층판소체의 형성과 분비에 장애를 주어 피부장벽의 기능을 손상시키는 것으로 생각된다.

V. 결론

대조군, 고환적출군 그리고 고환적출 후 테스토스테론 투여군에서 피부장벽의 기능 및 구조의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군과 고환적출군은 조직검사상 정상 소견과 유사하였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 표피의 과각화증과 극세포증이 관찰되었다.
2. Involucrin, loricrin, filaggrin 에 대한 표피의 면역조직화학 염색상 대조군과 고환적출군은 정상적인 발현을 보였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 비정상적인 소견을 나타내었다.
3. 증식세포핵항원 표지 지수 상 대조군과 고환적출군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군의 경우 통계적으로 유의하게 증가되었다.
4. 칼슘이온캡처 검사상 대조군과 고환적출군은 과립층에서 가장 높은 농도를 보이는 정상적인 칼슘 기울기가 관찰되었으나 고환적출 후 테스토스테론 투여군의 경우 뚜렷한 기울기의 소실을 보였다.
5. RuO₄ 후 고정법을 이용한 전자현미경 소견상 대조군과 고환적출군은 정상적인 지질막 구조를 보였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 부분적으로 지질막 구조의 단락, 불완전한 이중막, 각질세포 간격의 확대 및 열공 형성이 동반되었다. OsO₄ 후 고정법을 이용한 전자현미경 소견상 대조군과 고환적출군은

정상적인 증판소체의 수와 모양을 보였으나, 고환적출 후 테스토스테론 투여군은 증판소체의 변형과 숫적 감소가 관찰되었다. 이상의 연구결과를 종합해 보면, 테스토스테론은 각질형성세포의 비정상적인 분화에 의한 각질세포외막의 형성과 지질막 형성의 이상을 초래하여 피부장벽의 능력을 저하시키는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hanley K, Rassner U, Jiang Y, Vansomphone D, Crumrine D, Komuves L, et al. Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. Acceleration by estrogen and delay by testosterone. *J Clin Invest* 1996;97:2576-2584
2. Kao JS, Garg A, Mao-Qiang M, Crumrine D, Ghadially R, Feingold KR, Elias PM. Testosterone perturbs epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2001;116:443-451
3. 황상민, 안성구, 이승현. 표피 칼슘기울기 변화가 각질형성세포의 분화에 미치는 영향. *대피지* 2001;39:389-401
4. Komuves LG, Hanley K, Jiang Y, Elias PM, Williams ML, Feingold KR. Ligands and activators of nuclear hormone receptors regulate epidermal differentiation during fetal rat skin development. *J Invest Dermatol* 1998;111: 429-433
5. Rooney SA, Young SA, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 1994;8:957-967
6. Aszterbaum M, Feingold KR, Menon GK, Williams ML. Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat. *J Clin Invest* 1993;91:2703-2708

7. Hanley K, Rassner U, Elias PM, et al. Epidermal barrier ontogenesis: Maturation in serum-free media and acceleration by glucocorticoids and thyroid hormone but not selected growth factors. *J Invest Dermatol* 1996;106:404-411
8. Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung SI, Marekov LN, Steinert PM. Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* 1995;270:26382-26390
9. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 1995;270:17702-17711
10. Steven AC, Steinert PM. The protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocyte. *J Cell Sci* 1994;107:693-700
11. Reichert U, Michel S, Schmidt R. The cornified cell envelope; a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In: Darmon M, Blumenberg M, eds. *Molecular Biology of the Skin*. London: Academic Press 1993, 107-150

12. Steinert PM. A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope. *Cell Death Differ* 1995;2:33-40
13. Elias, Peter M, Ahn, Sung K, Denda, Mitsuhiro, Brown, Barbara E, Crumrine, Debra, Kimutai, Llewellyn K, Kömüves, Laszlo, Lee, Seung H & Feingold, Kenneth R. Modulations in Epidermal Calcium Regulate the Expression of Differentiation-Specific Markers. *J Invest Dermatol* 2002;119:1128-1136
14. Mitsuhiro D, Akiko T*, Hirohiko A*, Kayoko M. Altered Distribution of Calcium in Facial Epidermis of Aged Adults. *J Invest Dermatol* 2003;121:1557
15. Hohl D, Lichti U, Breitzkreutz D, Steinert PM, Roop DR. Transcription of the human loricrin gene *in vitro* is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 1991;96: 414-418
16. Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br J Dermatol* 1994;130:139-147
17. Henning H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980;19:245-254

18. Eckert RL, Crish JF, Robibson NA. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev* 1997;77:397-424
19. Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis:ultrastructural localization by ion-capture cytometry. *J Invest Dermatol* 1985;84:508-512
20. Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of permeability barrier. *Cell Tiss Res* 1992;270:503-512
21. Lee SH, Elias PM, Proksch E, et al. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
22. Schaefer H, Redelmeier TE. Structure and dynamics of the skin barrier. In: Schefer H, Redemeier TE eds. *Skin barrier ;principles of percutaneous absorption*. Basel : Karger, 1996:1-42
23. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80:44-49
24. 이승헌, 황상민, 최응호, 안성구. 피부장벽. *대피지* 1999;37:825-837
25. Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. *Cosmet Toilet* 1997;112:49-59

26. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1-26
27. Lee SH, Chung HS, Lee W. Epidermal lipid homeostasis. *Ann Dermatol* 1995;7:99-111
28. Dowing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 1991;24:1-26
29. Schurer NY, Elias PM. The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 1991;24:27-56
30. Elias PM, Feingold KR. Lipid and the epidermal water barrier : Metabolism regulation and pathophysiology. *Semin Dermatol* 1992;11:176-182

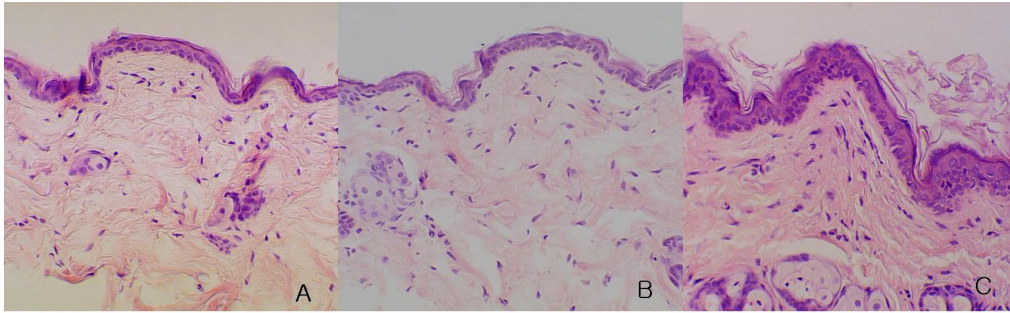


Fig. 1. Histopathologic findings of the epidermis. The sham-operated group (A) and castrated goup (B) showed normal looking epidermis. While the testosterone-replaced castrated group (C) showed marked hyperkeratosis and acanthosis (H&E, $\times 200$).

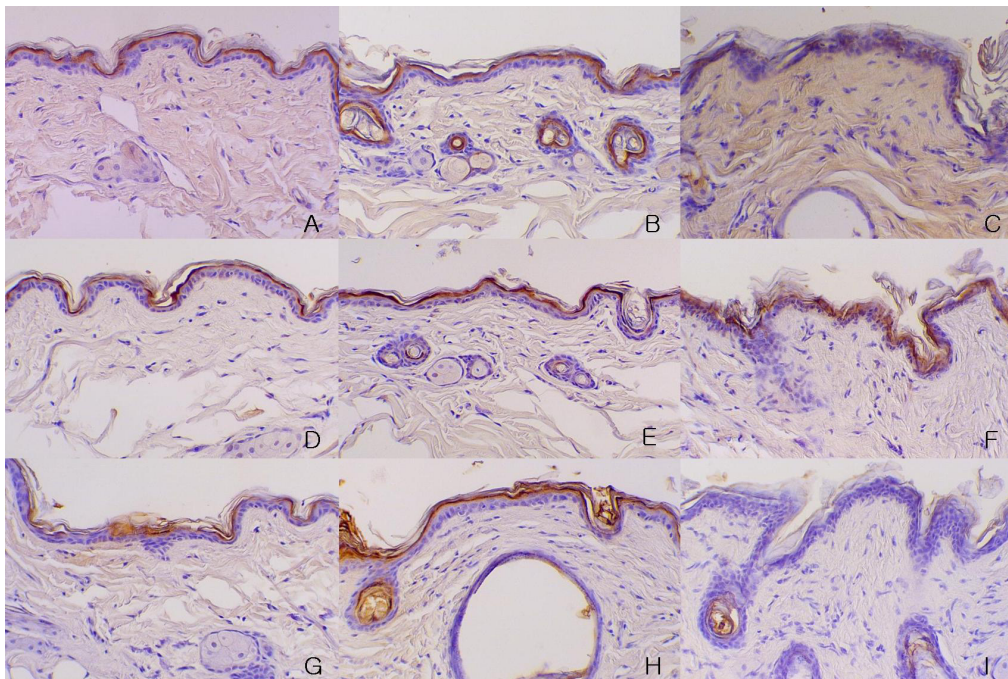


Fig. 2. Immunohistochemical staining of involucrin, loricrin and filaggrin. Immunohistochemical staining of loricrin in sham-operated group (A), castrated group (B), testosterone-replaced castrated group (C). Immunohistochemical staining of loricrin in sham-operated group (D), castrated group (E), testosterone-replaced castrated group (F). Immunohistochemical staining of filaggrin in sham-operated group (D), castrated group (E), testosterone-replaced castrated group (F). ($\times 200$)

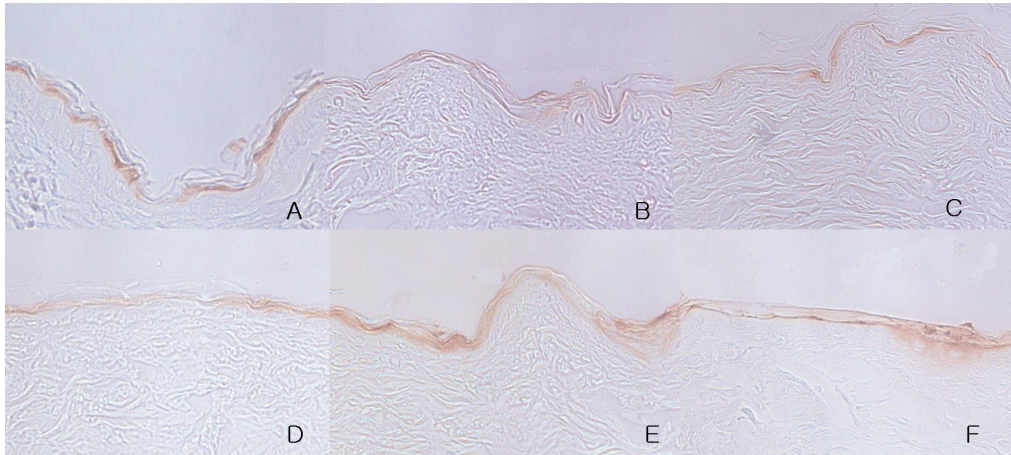


Fig. 3. In situ hybridization of loricrin and filaggrin. In situ hybridization of loricrin in sham-operated group (A), castrated group (B) and testosterone-replaced castrated group (C). In situ hybridization of filaggrin in sham-operated group (D), castrated group (E) and testosterone-replaced castrated group (F). ($\times 200$)

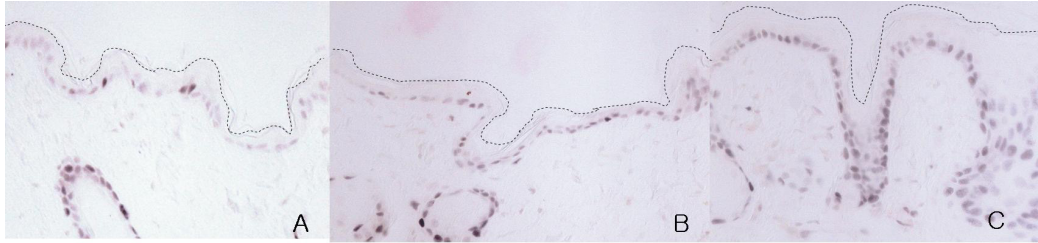


Fig. 4. Immunohistochemical staining for PCNA. Immunohistochemical staining for PCNA in sham-operated group (A), castrated group (B), testosterone-replaced castrated group (C) (Immunostaining; APAAP method, $\times 200$).

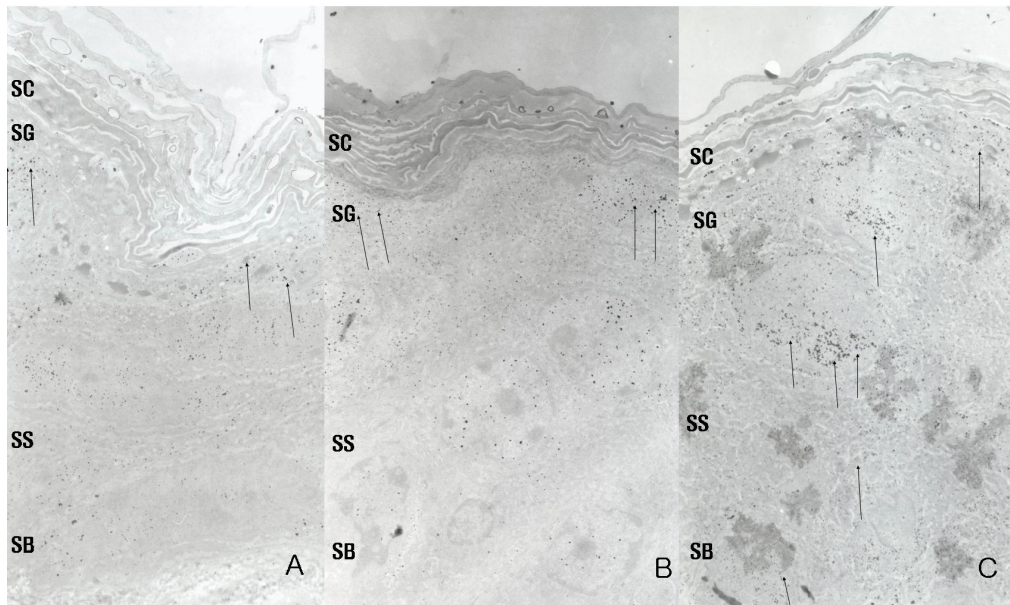


Fig. 5. The changes of epidermal calcium gradient. The changes of epidermal calcium gradient in sham-operated (A) and castrated group (B) showed normal calcium gradient. However, testosterone-replaced castrated group (C) showed increased calcium ions within whole epidermis including stratum corneum (arrow). SC: stratum corneum, SG: stratum granulosum, SS: stratum spinosum, SB: stratum basale (Calcium-capture cytochemistry x 5,000)

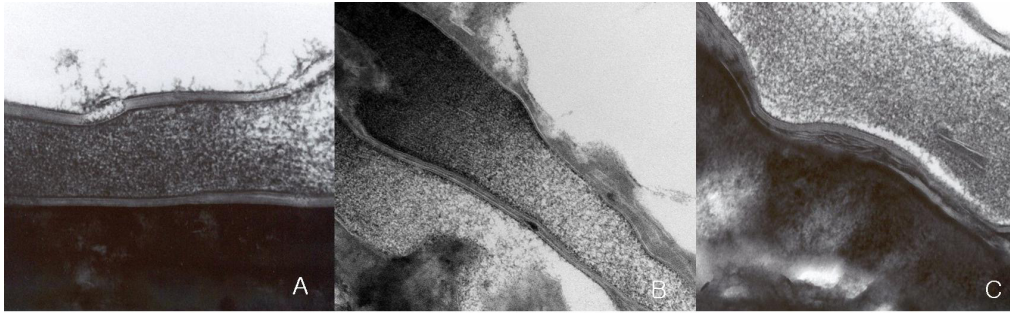


Fig. 6. The changes of stratum corneum lipid layers. The stratum corneum intercellular lipid layers of sham-operated group (A) and castrated group (B) showed normal in appearance. Testosterone-replaced castrated group (C) showed remarkable changes including incomplete bilayer including fragmentation and dilated lacunae. (RuO_4 postfixation, $\times 5,000$).

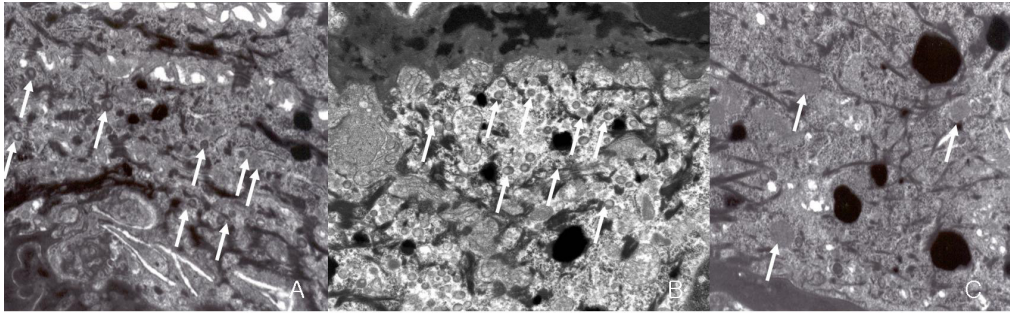


Fig. 7. The changes of lamellar bodies. The lamellar bodies of sham-operated group (A) and castrated group (B) showed normal in appearance. Testosterone-replaced castrated group (C) showed decreased number and dysmorphism of lamellar bodies (OsO₄ postfixation, x 20,000).

Abstract

The Effects of Testosterone on the Skin Barrier

Bak, Hana
Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

Although there are no known gender-related differences in permeability barrier function in adults, estrogen accelerates whereas testosterone retards barrier development in fetal skin. However, there have been few studies concerning the effects of testosterone on the skin barrier. Therefore, we evaluated the effects and mechanisms of testosterone on the skin barrier.

In this experiment, hairless mice were divided into three groups; sham-operated, castrated and testosterone-replacement castrated group. Testosterone was administered subcutaneously once a day for 7 days. We performed a skin biopsy at 7 days and performed hematoxyline-eosin staining, calcium-ion capture cytometry and the immunohistochemical examination of involucrin, loricrin, filaggrin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The specimens were prepared for electron microscopy using RuO_4 and OsO_4 postfixation.

The results are summarized as follows. Light microscopic findings of the testosterone-replacement castrated group showed apparent hyperkeratosis and acanthosis, not present in the sham-operated and castrated group. Whereas the expression of involucrin, loricrin and filaggrin of the sham-operated and castrated group were normal, it was abnormal in the testosterone-replacement castrated group. Labelling indices for PCNA in the sham-operated and castrated group were not statistically different, but the testosterone-replacement castrated group showed a marked increase of PCNA labeling index. Wherease the calcium gradient was normal in the sham-operated and castrated group, it was distorted in the testosterone-replacement castrated group. Calcium deposition was increased through all layers of the epidermis and the calcium gradient disappeared in the testosterone-replacement castrated group. Normal looking membrane structure was observed in the sham-operated and castrated group, but a membrane structure which appeared fragmented, incomplete lipid bilayer structures and prominent dilatation of lacunar domains were observed only in the testosterone-replacement castrated group.

From the above results, it is concluded that there is a functional alteration of the epidermal barrier induced by testosterone, including

the formation of an abnormal cornified envelope and also incomplete lipid synthesis.

Key Words : Testosterone, Skin barrier, Involucrin, Loricrin, Filaggrin, PCNA , Calcium, Epidermal lipid