인간태아와 신생아의 표피장벽

연세대학교 대학원
의 학 과
이 승 민

인간태아와 신생아의
표피장벽

지도교수 이 승 헌

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001 년 12 월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
이 승 민

이승민의 의학박사 학위논문을 인준함

심사위원________________인

심사위원________________인

심사위원________________인

심사위원________________인

심사위원________________인

연세대학교 대학원

2001 년 12 월 일

감사의 말씀

본 논문을 완성하기까지 많은 조언과 가르치심을 베풀어 주신 이승헌 교수님께 깊이 감사드립니다.

그리고 연구가 진행되는 동안 어려움을 같이하며 많은 도움을 주신 김동건 교수님과 이은희 연구원에게 진심으로 고마움의 인사를 드립니다. 또한 그동안 많은 조언과 격려로 베풀어주신 이광길 교수님, 방동식 교수님, 박형우 교수님께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

정든 학교를 떠나 새로운 길을 걸으며 많은 세월이 흘렀지만 학교시절의 감정과 마음을 잊을 수 없습니다.

지금까지 저를 이끌어주신 모든 분께 가슴속 깊은 곳으로부터 고마움을 전하며 이 논문을 계기로 좀더 새로운 미래를 그려보고자 합니다.

끝으로 오늘에 이르기까지 끝없는 사랑으로 용기를 주신 부모님과 남편에게 이 조그마한 영광을 바칩니다.

저 자 씀

목 차

표 목 차

그 림 목 차

국문요약

인간태아와 신생아의 표피장벽

각질층의 지질은 층판소체의 내용물이 세포간격으로 분비된 각질세포간 지질이며 각질세포 외막과 함께 구조적, 기능적으로 완전한 형태의 피부장벽을 형성한다.

인체태아의 표피장벽에 관한 연구는 재료수집이 제한되어있고 지질구조의 관찰 방법이 어려워 시기별 발생과정에 관한 연구가 거의 없다. 이에 본 연구에서는 발생 10 - 23 주에 속하는 태아 13 례와 신생아의 피부를 생검하여 발생시기별로 nile red 염색을 통한 지질의 분포, lanthanum 을 추적자로 사용하여 기능성 장벽형성유무, RuO_4 를 이용하여 지질판상 이중막의 구조와 층판소체의 형태, ion capture cytochemistry 방법으로 표피내 칼슘분포를 관찰하여 표피칼슘기울기형성을 살펴보았다. 그리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Nile red 염색소견에서 발생이 진행될수록 표피지질의 양이 증가하였고 발생 23 주에 이르러 선상으로 연속적인 배열을 한 지질의 분포가 관찰되었다.
2. Lanthanum 을 이용한 염색에서 발생 21 주까지 외표피와 진피에서 추적자가 모두 투과되어 기능적인 장벽이 형성되지 않았으며 발생 23 주에 중간세포층에서 희미한 추적자가 부분적으로 관찰되어 불완전한 장벽이 형성되었음을 알 수 있었다.
3. RuO_4 염색으로 발생 15 주부터 층판소체로 보이는 이중막을 가진 구조들이 관찰되고 발생 16 주부터 세포막사이에 이중막들이 형성되었으며 발생이 진행됨에 따라 판상이중막이 다층화되는 양상을 보였다.
4. Ion capture cytochemistry 를 통한 연구에서 발생 20 주에 모낭표피(follicular epidermis)에서 성인피부와 같은 칼슘기울기가 처음 관찰되었고 모낭간표피(interfollicular epidermis)에서는 23 주에 칼슘기울기가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 표피장벽의 발생은 발생 23 주경이면 거의 완성되나 아직 기능적으로는 완전하지 못하며 그 부위별 발생속도는 모낭 표피에서 더 빠른 발달을 보이는 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 표피장벽, 판상 이중막, 층판소체, 표피칼슘기울기

인간태아와 신생아의 표피장벽

<지도교수 이 승 헌>

연세대학교 대학원 의학과

이 승 민

I. 서 론

표피는 여러 종류의 미생물이나 독성물질의 침투와 수분소실로부터 인체를 보호하는 장벽의 역할을 한다. 표피투과장벽(permeability barrier)은 각질층 내에 있는 것으로 알려져 있는데, 주된 역할을 담당하는 것은 각질세포사이에 있는 소수성지질(hydrophobic lipid)로 구성된 판상 이중막(lamellar bilayer)의 구조이다.[1,2] 이 구조를 전자현미경으로 보면 전자 - 투명판(소수성)과 전자 - 치밀판(친수성)이 반복되어 나타나는 특징을 보인다 [3,4]. 판상 이중막은 상부과립층에 위치한 층판소체라는 분비소기관(secretory organelle)으로부터 지질이 유리되어, 각질세포 사이로 퍼져나가면서 형성된다 [2,5]. 층판소체는 Odland 가 처음 기술하였으며 Odland body, lamellar granule, membrane coating granule 이라고도 하며 직경 0.2 - 0.3 m 의 난원형소체로서 표피의 유극층과 과립층에서 합성된다. 표피세포에서 생성된 극성지질은 점차 지질원판(lipid disk)의 형태를 이루면서 막에 둘러싸인 층판소체로 세포질내에 축적된다. 각 원판은 둥근모양의 속이 비어있는 지질 이중막(liposome)이 편평해진 모양으로 변하면서 층판원체(lamellar body)를 형성한다. 각질층의 최하부에서 표피세포가 각질화되기 전에 층판소체는 세포막에 붙어 세포외유출(exocytosis)에 의해 세포간 공간으로 지질원판을 방출한다. 세포간공간에서 지질원판은 가장자리끼리 서로 융합하여 넓은 중복된 이중막(double - bilayer)의 판을 형성하여 기본적인 층판 단위구조(lamellar unit structure)로 변하여 표피의 투과장벽을 구성한다. 층판소체의 내용물은 glycosphingolipid, 인지질, 콜레스테롤과 가수분해효소가 풍부한데 [6,7], lipid hydrolase 와 glucosidase 가 glycosphingolipid 와 인지질을 각각

ceramide 와 유리지방산으로 변환시켜 장벽의 기능을 수행하게 된다[8].

태생기의 발달과정을 대략 8 주를 경계로 하여 기관형성이 일어나는 배아기와 기관내 조직이 분화하는 태아기의 두 단계로 구분되는데, 이러한 양상은 표피의 발달과정에도 그대로 적용된다[9]. 외배엽에서 기원하는 표피는 발생 1 개월 이전에 한층의 미분화된 외배엽세포로 구성되고 발생 2 개월이전에 두층으로 구분된다. 바깥층은 태생기 표피에서만 볼 수 있는 독특한 구조인 외표피이며 안층은 기저세포로서 향후 모든 표피구조의 모체역할을 수행하게 된다[10,11]. 표피의 구조형성과 분화는 배아기 동안 거의 이루어지며 표피의 중층화는 계속 진행되어 표피의 두께가 증가하고 발생 15 주경에는 모낭주위 표피에, 발생 24 주에는 모든 표피에 각질화가 이루어진다. 한편 외표피(periderm)는 표피발생이 진행되면서 크기, 모양, 표면특성 등이 현저하게 변화하며 표면이 융기됨에 따라 불완전수포를 거쳐 하나의 수포를 형성하며 다시 다수의 복합수포및 퇴화수포 단계를 거쳐, 각질층이 형성되는 발생 6 개월 경에는 양수 내로 탈락되어 피부표면에서 관찰되지 않는다[12]. 이 시기에 이르면 표피는 한층의 기저세포, 2 - 3 층의 극세포, 각질 초자질성 과립(keratohyalin granule)을 함유한 한층의 과립세포 그리고 몇 층의 각질세포로 구성되어 성인표피의 축소판과 같은 구조를 갖추게 된다.

이전의 연구에서 evaporimeter 를 사용하여 경표피수분소실(transepidermal water loss)을 측정함으로써 34 주[13] 와 28 - 30 주 [14,15] 에 태아의 표피장벽발생을 보고한바 있고 Hardmann 등[16] 은 피부투과적분석(skin permeability assay)을 통해 이제까지 알려져 왔던 시기보다 훨씬 이른 20 - 24 주에 처음 표피장벽이 발생됨을 보고하였다. 태아의 표피지방과 표피장벽에 관한 연구들은 재료수집에 제한이 많아서 체계적인 연구가 미약하여 이의 형태학적인 미세구조관찰에 관한 연구나 장벽기능파악을 위한 연구가 거의 없는 실정이다. 태아표피장벽발생에 관한 형태 및 기능적인 연구들은 조산아에서 흔히 일어나는 장벽기능장애로 인한 수분 - 전해질 불균형, 열손실, 패혈증 등을 예방할 수 있는 시점을 제시할 수 있으며 유전성 피부질환(층판상 어린선, 사피양 어린선 태아등)의 산전진찰에도 기초자료가 될 수 있다[17].

따라서 본 연구에서는 유산된 태아와 생후 1 개월이전의 신생아피부조직을

이용하여 발생시기별로 nile red 염색을 통한 지질의 분포, lanthanum 을 추적자

로 사용하여 표피장벽의 형성정도를 살펴보고 RuO_4 로 지질판상이중막의 구조와 층판소체의 형태를 관찰하며, ion capture cytochemistry 방법으로 표피내 칼슘의 분포를 관찰하여 피부장벽기능 역할에 중요한 표피칼슘기울기(epidermal calcium gradient)의 형성시기를 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 표본 수집 및 발생시기 산출

발생 10 주에서 생후 1 개월 까지의 인체 태아 및 신생아 16 례로부터 얻은 표본을 연구대상으로 하였다 (표 1). 발생시기는 예상 임신령(estimated genestational age, EGA)으로 표시하였는데 이는 모체의 월경주기상 마지막 정상 월경기간(last normal menstrual period, LNMP)의 시작일을 기준으로 하여 간접적으로 추산된 수정령(fertilization age)을 뜻하며, 태아의 두정부-둔부간 길이(crown-rump length)를 참고하여 추산하였다. 그러나 개체마다 구조 발달 변이가 심하므로 Moore(1988) 가 제시한 기준을 참조하였다.

모든 태아와 신생아는 자연유산 또는 임신중절등으로 얻은 것이며, 태아의 배부 조직을 사용하였다.

표 1 . 표본의 발생시기별 분포

발생시기(주)	표본수
10	1 (0)
12	2 (0)
14	2 (1)
16	3 (2)
18	2 (1)
20	1 (1)
21	1 (1)
23	1 (1)
신생아	3 (2)
계	16 (9)

( ):전자현미경으로 관찰한 표본수

2. 실험 방법

가. Nile red 염색[18]

얻어진 조직을 OCT compound(Miles Inc, Elkhart, IN)가 채워진 cryomold에 넣고 액화질소를 이용하여 급속냉동시켰다. 동결된 조직을 -70℃에 보관하였다가 염색하기 전에 6-8μm 두께로 절편을 만들어 사용했다. 아세톤에 녹인 nile red 원액(50μg/ml)을 준비하여 빛을 차단한 상태로 -20℃에 보관했다. Nile red 염색용액은 75% glycerol 1ml 당 15-25 μl 원액을 첨가하여 잘 섞어 만들었다. 준비된 조직절편에 미리 준비된 nile red 염색용액을 한방울 떨어뜨리고 덮개유리를 덮은 후 상온에서 10 분간 방치하였다가 형광현미경하에서 관찰했다. 모든 반응은 빛이 차단된 상태에서 시행하였다.

나. 전자 현미경 검사

(1) 각질세포 사이의 수분 흡수 경로[19]

0.05M Tris buffer 에 8% w/v sucrose 를 넣고 8% w/v $LaNO_3$ 가 되도록 만든 후, pH 7.5-7.6 이 되도록 하였다. 전자현미경고정액과 1:1 이 되도록 희석한 후 여기에 조직을 넣어 1 시간 동안 실온에 두었다. 변형된 Karnovsky 용액에 넣은 후 1 시간동안 실온에 두었다가 새 Karnovsky 용액에 넣어 4℃에서 하루 동안 고정시켰다. 0.1M cacodylate buffer 로 40 분 간격으로 3 회 수세했고 1% osmium tetroxide 로 2 시간을 고정하였다. 0.1M cacodylate buffer 로 10 분간 수세 후 알콜로 탈수시켰다. 10 분간 propylene oxide 로 치환했고 epon mixture 와 propylene oxide 를 1:1 로 섞어 침투한 후 포매했다. 60-90nm 로 세절한 후 uranyl acetate 와 lead citrate 염색을 실시하고 투과전자 현미경 (Philips CM 10)으로 관찰하였다.

(2) 판상이중막의 관찰[20]

얻어진 조직을 $1mm^3$ 크기로 잘게 자른 후 변형된 Karnovsky 고정액에 18-24 시간 동안 넣었다가 0.1M sodium cacodylate buffer(pH 7.4) 용액으로 수세한 후, 0.25% RUO_4 in 0.1M sodium cacodylate buffer(pH7.4)에 넣어 실온에서 45 분간 후고정하였다. 이렇게 고정된 조직을 완충액으로 헹군 후, graded ethanol 용액으로 탈수시키고 epon-epoxy mix 에 포매하였다. 60-90nm 로 세절한 후

uranyl acetate 와 lead citrate 로 염색하여 투과전자현미경 (Philips CM 10)으

로 관찰하였다.

(3) 칼슘이온의 표피내 분포 관찰[21]

얻어진 조직은 0.5 mm^3 로 세절하여 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate 와 1.4% sucrose 가 포함된 ice - cold fixative 에 18 - 24 시간 동안 고정시켰다. 준비된 조직을 4℃에서 2% potassium pyroantimonate 가 포함된 1% osmium tetroxide 에 어두운 곳에서 2 시간동안 후고정한 후 찬 증류수(pH10)로 수세하고 알콜로 탈수시켰다. 10 분간 propylene oxide 로 치환했고 epon mixture 와 propylene oxide 를 1:1 로 섞어 침투한 후 포매하였다. 표피내 칼슘분포를 좀 더 명확히 보기위해 60 - 90nm 로 세절한 후 uranyl acetate 와 lead citrate 염색을 실시하지 않고 투과 전자현미경(Philips CM 10)으로 관찰하였다.

IV. 고 찰

개체가 외부의 위험환경으로부터 보호 받기 위해서는 정상적으로 출생직전에 성숙된 피부장벽이 있어야 한다. 정상적인 신생아의 경우 출생시 이미 성숙한 피부장벽을 형성하여 정상성인과 같은 정도의 낮은 경표피 수분손실을 보인다. 그러나 미숙아의 경우 미성숙정도에 비례하여 경표피 수분손실이 증가되어 있으며 경피흡수도 증가되어 있다[22-25]. 특히 28 주 이전에 태어난 미숙아의 경우 불완전한 피부장벽은 저체온증, 경표피 수분손실증가에 의한 수분과 전해질 불균형, 그리고 경피감염(transcutaneous infection)의 원인이 되며 열손실에 의한 칼로리소모를 가져온다 [27]. 최근 신생아학의 발달에 따라 살릴 수 있는 미숙아의 제태기간 하한선이 점점 낮아져 24 주 미만에서도 적극적인 치료에 따라 생존하는 경우가 적지않아 많은 나라에서 생존가능 제태 하한선을 22 주로 낮추기로 하였다[28].

태아에서 각질화는 태생 14 - 15 주에 모낭을 중심으로 일어나며 발생 24 주에 모든 표피에 각질화가 이루어지고 임신 3 기가 되면 각질층을 포함한 전층의 표피층에 다층화가 이루어진다 [29]. 출생후 표피장벽은 각질층내 여러 층의 친지성 막구조를 보이는 각질세포간 지질이 담당하게 되는데 이 각질세포간 지질은 성인에서와 마찬가지로 주로 ceramide, 콜레스테롤, 그리고 유리지방산으로 이루어지며 각질층과 과립층 사이에서 층판소체의 분비에 의해 형성된다.

이전의 태아표피장벽에 관한 연구들에 대해 살펴보면, 태아의 표피두께와 세포층 수는 24 주 이후 꾸준히 증가하나 각질층의 두께와 표피능은 34 주 이후에야 관찰할 수 있었고 [13], 염료투과분석(dye permeability assay)을 통한 연구에서 20 - 24 주사이에 표피장벽이 발생하며 그 발생양상도 20 - 21 주에 두부표피(head epidermis), 23 - 24 주에 복부표피에 나타나 모낭표피에서 표피장벽발생이 먼저 일어나는 것을 간접적으로 알 수 있었다[16]. 조산아에서 low frequency impedance spectroscopy 를 이용하여 경표피 수분손실을 측정한 연구에서는 발생 30 - 32 주가 성인과 비슷한 기능을 가질 수 있는 표피장벽이 형성되는 시기라고 하였다 [30]. 본 연구에서도 지질에 대한 편광 프로브인 nile red 염색을 한 지질분포에서 15 주경에는 구슬모양의 단순한 지질분포만 보이다가 20 - 21 주에서 강한 형광을 띤 지질이 증가하고 23 주에는 비교적 연속적인 표피지질의 분포를 관찰할 수 있었다. 15 주 이전의 미세한 지질분포는 층판소체에 의한 지질이라기보다는 세포의 다른

성분에 의한 것으로 생각되며 23 주에 나타난 연속적인 지질분포도 아직은 신생아의 지질분포와는 다르게 균일하지 않은 미성숙된 모습을 보였다. RuO_4 를 이용한 전자현미경관찰에서 15 주에 층판소체로 보이는 미성숙한 구조들이 많이 보이기 시작했으며 20 주에는 거의 성숙된 층판소체들이 부분적으로 관찰되었고 21 주부터는 여러 층으로 구성된 층판구조를 가진 층판소체들이 성숙되어 가는 모습으로 많이 관찰되었다. 23 주에서는 위의 성숙된 구조와 함께 내부가 비어있는 비정형적 구조들이 관찰되어 아직 미성숙된 층판소체가 존재한다고 여겨진다.

세포막사이의 이중막들은 발생 16 주에 처음 관찰되었고 18 주에는 비교적 뚜렷한 이중막들이 보였으며 발생 21 주에는 불완전하게 형성된 판상이중막들이, 23 주에는 다층화된 불규칙한 배열을 가진 판상이중막들이 다수 관찰되었다. 미세구조로 본 이런 일련의 변화과정을 통해 층판소체는 15 주부터 발생이 시작되며 세포막사이의 이중막은 16 주부터 발생이 시작됨을 알 수 있었다.

삼가 양이온인 lanthanum 은 세포외 공간, 세포간 접합부 구조와 생물학적인 장벽의 투과도를 관찰하는 추적자로 사용된다 [19,31]. 이를 사용하여 표피장벽의 수분투과기능을 살펴본 결과 16 - 18 주에서는 추적자가 외표피 사이와 각질세포사이로 스며드는 것이 관찰되었으나 23 주에서는 부분적인 표피장벽의 발생으로 추적자가 각질 바로 아래층에서 희미하게 관찰되었다. 이는 어느 정도 기능을 하는 표피장벽의 발생으로 체내 물질이 피부 외로 자유롭게 유출되지는 않음을 시사한다.

세포화학적 연구방법으로 포유류 표피에 칼슘의 저장고 위치를 확인한 연구에 의하면 기저세포와 유극세포의 세포질, 미토콘드리아, 핵내 염색질 사이에 칼슘이 온침전물이 위치함을 보여 세포주기와 칼슘이온이 연관성이 있음을 시사하였다. 또한 표피에서는 칼슘기울기가 있어 기저층과 유극층에서 칼슘이온농도가 낮고 상층으로 갈수록 증가하여 상부 과립층에서 가장 높다 [32,35]. 어떻게 해서 이러한 칼슘기울기가 형성되는지 그 기전은 확실하지 않다. 그러나 태생기 동안 태아의 피부는 양수와 같은 등장성 환경에 노출되어 있으므로 피부를 통한 수분의 이동이 매우 적다. 정상적인 태아의 경우 출생 전에 피부장벽이 성숙되므로 칼슘기울기는 수분의 증발에 의해 수동적으로 형성되기 보다는 능동적으로 형성될 가능성이 있다 [36].

설치류에서 태생기 동안 표피칼슘기울기의 형성에 대한 ion capture cytochemistry 와 proton emission X - ray spectroscopy(PIXE)를 통한 연구에서 태생기 동안의 칼슘기울기는 피부장벽형성과 같은 시기인 출생 직전에 형성된다.

칼슘기울기 형성 전에 지질합성과 층판소체 분비는 최고조를 이루고 칼슘기울기가 형성된 후 지질합성과 층판소체 분비는 감소된다 [21,27]. 피부장벽 손상후 피부장벽 회복을 위해 1)이미 형성되어있던 층판소체의 분비, 2)콜레스테롤, 지방산, sphingolipid 와 같은 표피지질의 합성증가, 3)새로운 층판소체의 형성과 분비, 4) 이들 결과로 인한 각질층의 지질회복, 5)분비된 지질의 개조와 같은 일련의 과정이 일어난다. 피부장벽 손상후 고농도의 칼슘이온이 피부장벽의 회복을 지연시키는 것 으로 보아 칼슘이온의 변화가 피부장벽회복에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다 [37,38]. 피부장벽에 손상을 주지않고 칼슘기울기를 변화시킬 수 있는 이온영동을 이용한 연구에서 칼슘기울기의 소실이 층판소체의 분비를 증가시키는 것을 확인하였다 [39]. 최근 연구에 의하면 각질형성세포의 세포외 칼슘이온의 변화가 일부 cornified envelope 단백질과 케라틴의 발현에 영향을 준다고 하였다 [40]. 증가된 세포외 칼슘이온은 각질형성세포의 K1/10, involucrin, loricrin 및 transglutaminase1 의 발현을 증가시키며 [41] 급성 피부장벽손상에 의한 표피의 칼슘이온의 소실은 K6, K16 및 K17 의 발현과 involucrin 을 조기발현 시키므로 칼슘이온이 각질형성세포의 분화와 밀접한 관련이 있다고 하였다 [39]. 그러므로 표피칼슘기울기형성은 각질세포의 말기분화와 피부장벽의 형성에 어떤 결정적인 인자로 생각된다. 본 연구에서는 20 주경 모낭표피에서 각질화와 함께 표피칼슘기울기가 관찰되었으며 모낭간표피에서는 외표피가 아직 존재함과 동시에 칼슘기울기가 관찰되지 않았다. Hardman 등 [16] 이 투과분석을 통한 표피장벽발생연구에서 관찰했던 바와 같이 본 연구에서도 20 주에 모낭표피에서 칼슘기울기가 처음 관찰되었고 비교적 완전한 모양을 가진 층판소체들이 보였다. 모낭간 표피에서는 23 주에 칼슘기울기가 관찰되고 다층의 층판이중막과 함께 성숙된 모양과 비성숙된 모양이 섞인 층판소체들이 관찰되었다. 일련의 형태학적인 변화와 세포화학적인 연구방법을 통해 임신 2 주기부터 표피장벽발생은 시작되고 20 주와 24 주사이에 표피칼슘기울기 형성과 함께 표피장벽 발생과정이 진행되면서 표피의 각질화과정이 비슷한 시기에 일어나 좀더 성숙된 표피를 형성하여 보호장벽으로서의 역할을 수행하게 되는것 같다. 이는 Oishi 등 [42] 이 600g 미만의 신생아 치료체험에서 20 주 미만아에서는 생존자가 없었고 21 주에서는 생존율이 4%, 22 주에서는 12%, 23 주에서는 21%, 24 주에서는 34%였다는 보고와도 일맥 상통하여 상당히 근접한 이유를 제시했으리라 생각한다. 하지만 24 주 이후의 태아나 미숙아에서 완전한 표피장벽을 가졌다

고 볼 수는 없다. 아직 경표피 수분손실도 심하고, 체온조절기능도 떨어져 있으며, 독소에 대한 경피흡수도 증가되어있다[23]. 그러나 이들 미숙아의 표피장벽은 공기에 노출시 빠르게 회복되어 성숙한 피부장벽을 형성한다. 쥐의 태자피부를 이용한 실험에서 공기에 노출시 glucosyl ceramide 와 cholesterol sulfate 합성에 관여하는 glucosyl ceramide synthetase 와 cholesterol sulfonyltransferase 의 활성도가 증가되고, 장벽성숙과정의 마지막 시기에 꼭 필요한 효소인 â-glucocerebrosidase 와 steroid sulfatase 가 증가되며 filaggrin, loricrin, involucrin 의 단백질이 증가됨을 볼 수 있었다[43]. 인체태아에서도 공기에 노출 후 장벽의 빠른 회복이 이런 생화학적인 변화를 통하여 일어나리라 추측하며 24 주 이후부터 만기 40 주까지 어떤 생화학적인 반응이 일어나 장벽의 성숙이 어떻게 진행되어 완벽한 표피장벽을 형성하는지는 좀 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결　론

발생시기에 따른 인체표피장벽의 형성과정을 규명하기위해 발생 10 - 13 주 사이의 태아 13 례와 신생아의 피부에서 얻은 조직을 Nile red 염색, lanthanum 추적자

연구, RuO_4 염색, calcium ion capture cytochemistry 를 시행한 후 형광현미경과 투과전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Nile red 염색 후 형광현미경으로 관찰결과 발생 주수가 증가함에 따라 표피지방의 양이 증가하였고 발생 23 주에 이르러 선상으로 연속적인 배열을 한 지방분포 양상이 관찰되었다.

2. Lanthanum 을 추적자로 이용한 표피투과도 관찰결과 발생 21 주까지는 외표피와 진피 모두에서 투과되어 기능적인 장벽이 형성되지 않았음을 알 수 있었고 발생 23 주에 중간세포층에서 추적자가 희미하게 관찰되어 불완전한 표피장벽이 형성되었음을 알 수 있었다.

3. RuO_4 염색으로 발생 15 주에 층판소체로 보이는 이중막을 가진 구조들이 관찰되었고 발생 16 주에 세포막사이에 이중막들의 형성을 관찰할 수 있었다. 또한 발생이 진행됨에 따라 판상 이중막이 다층화되는 양상을 보였다.

4. Calcium ion capture cytochemistry 를 통한 연구에서 칼슘이온의 분포가 발생 14 - 18 주에서는 산발적으로 흩어져 있는 양상을 보였으나 주수가 증가함에 따라 칼슘이온의 양이 증가하였으며 모낭표피에서는 발생 20 주에 칼슘기울기가 관찰되었으나 모낭간 표피에서는 발생 23 주에 칼슘기울기가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해보면 발생 23 주경이면 표피장벽의 발생이 거의 완성되었는데 아직 기능적으로는 완전한 장벽이라고 할 수 없으며 그 부위별 발생속도도 모낭표피에서 먼저 발달하는 양상을 보였다.

참 고 문 헌

1. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. Adv Lipid Res 1991;24:1-26.

2. Schurer NS, Elias PM. The biochemistry and function of epidermal lipids. Adv Lipid Res

1991;24:27-56.
3. Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. J Invest Dermatol 1987;88:714-718.
4. Hou S, Mitra AK, White SH, Menon GK, Ghadially R, Elias PM. Membrane structures in normal and essential fatty acid deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction. J Invest Dermatol 1991;96:215-223.
5. Downing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. J Lipid Res 1992;33:301-313.
6. Freinkel RF, Traczyk TN. Lipid composition and hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. J Invest Dermatol 1985;85:295-298.
7. Grayson S, Johnson-Winegon AG, Wintrob BU, Epstein Jr EH, Elias PM. Lamellar body enriched fraction from neonatal mice. Preparative techniques and partial characterization. J Invest Dermatol 1985;85:289-295.
8. Wertz PW, Downing DT. Glycolipids in mammalian epidermis:structure and function in the water barrier. Science 1982;217:1261-1262.
9. Moore KL. The developing human. 4th ed. Philadelphia:WB Saunders1988 p1-11.
10. Breathnach AS. Embryology of human skin. J Invest Dermatol 1971;57:133-143.
11. Holbrook KA, Odland GF. The fine structure of developing human epidermis:light scanning and transmission electron microscopy of the periderm. J Invest Dermatol 1975;65:16-38.
12. Hashimoto K, Gross BG, Dibbella RJ, Lever WF. The ultrastructure of the skin of human embryo. J Invest Dermatol 1966;47:317-335.
13. Evans NJ, Rutter N. Development of the epidermis in the newborn. Biol Neonate 1986;49:74-80.
14. Hammarlund K, Sedin G. Transepidermal waterloss in newborn infants:relation to gestational age. Acta Paedia Scand 1979;68:795-801.
15. Wilson DR, Maibach HI. Transepidermal waterloss in vivo:premature and term infants. Biol Neonate 1980;37:180-185.
16. Hardman MJ, Moore L, Ferguson MWJ, Byrne C. Barrier formation in the human fetus is patterned. J Invest Dermatol 1999;113:1106-1113.
17. Milner ME, O'Guin WM, Holbrook KA, Dale BA. Abnormal lamellar granules in Harlequin ichthyosis. J Invest Dermatol 1992;99:824-829.

18. Vicanova J, Boelsma E, Mommaas M, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J et al. Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. J Invest Dermatol 1998;111:97-106.
19. Shaklai M, Tavassoli M. Lanthanum as an electron microscopic stain. J Histochem Cytochem 1982;30:1325-1330.
20. Swartzendruber DC, Burnett IH, Wertz PW, Madison KC, Squier CA. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide are complimentary reagents for the preparation of epidermal samples for transmission electron microscopy. J Invest Dermatol 1995;104:417-420.
21. Elias PM, Nau P, Hanley K, Cullander C, Crumrine D, Bench G et al. Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. J Invest Dermatol 1998;110:399-404.
22. Patrick C. The epidermal barrier. Semin Neonatol 2000;5:273-280.
23. Barker N, Hadgraft J, Rutter N. Skin permeability in the newborn. J Invest Dermatol 1987;88:409-411.
24. Rutter N, Hull D. Waterloss from the skin of the term and preterm babies. Arch Dis Child 1979;54:858-868.
25. Nachman RL, Esterly NB. Increased skin permeability in preterm infants. J Pediatr 1971;79:628-632.
27. Williams ML, Hanley K, Elias PM, Feingold KR. Ontogeny of the epidermal permeability barrier. J Invest Dermatol 1998;3:75-79.
28. 홍창의. 소아과진료. 4th ed. 고려의학; 1999, p407.
29. Cartlidge PHJ, Rutter N. Skin barrier function. In; Polin RA, Fox WW editors. Fetal and neonatal physiology. Philadelphia:WB Saunders:1992, p569-585.
30. Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. J Invest Dermatol 1998;111:320-326.
31. Hayword AF. The permeability of the epithelium of the skin of fetal rats demonstrated with a lanthanum-containing solution. J Anat 1983;136:379-388.
32. Schaefer H, Redelmeier TE. Structure and dynamics of the skin barrier. In:Schaefer H, Redelmeier TE eds. Skin barrier; principles of percutaneous absorption. Basel:Karger;1996, p1-42.

33. Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. Cosmet Toilet 1997;112:49-59.
34. Choi EH, Ahn SK, Jiang Y. The effect of repeated iontophoresis on the epidermal barrier of hairless mice. J Invest Dermatol 1998;110:675.
35. Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad. Acute barrier perturbation abolishes the Ca^{2+} and K^{+} gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. J Invest Dermatol 1998;111:1198-1201.
36. Hanley K, Jiang Y, Elias PM, Feingold KR. Acceleration of barrier ontogenesis in vitro through air exposure. Pediatr Res 1997;41:293-299.
37. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Quiang M, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. J Clin Invest 1992;89:530-538.
38. Lee SH, Elias PM, Feingold KR, Mauro T. A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. J Invest Dermatol 1994;102:976-979.
39. Lee SH, Choi EH, Feingold KR, Jiang S, Ahn SK. Iontophoresis itself on the haieless mouse skin induce the loss of epidermal calcium gradient without skin barrier impairment. J Invest Dermatol 1998;111:39-43.
40. Ekanayake-mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E. Expression of epidermal keratins and the cornified envelop protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. J Invest Dermatol 1998;111;517-523.
41. Eckert RL, Crish JF, Robinson NA. Epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. Physiol Rev 1997;77:397-424.
42. Oishi M, Nishida H, Sasaki T. Japanese experience with micropremies weighing less than 600grams born between 1984 to 1993. Pediatrics 1997;99:863.
43. Komuves LG, Hanley K, Jiang S, Katagiri C, Elias PM, Williams ML Feingold KR. Induction of selected lipid metabolic enzymes and differentiation-linked structural proteins by air exposure in fetal rat skin explants. J Invest Dermatol 1999;112:303-309.

Abstract

Epidermal barrier in human fetus and newborn

Seung Min Lee

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung Hun Lee)

The lipids of the stratum corneum, which originate from polar lipid precursors provided by the cells of the stratum granulosum via the exocytosis of lamellar bodies, with cornified cell envelope form competent epidermal barrier structurally and functionally.

The ontogeny of the epidermal barrier is not clearly defined because of difficulty of sampling and methodology which defines epidermal lipids.

From ultrastructural observation of skin samples obtained from human fetuses and newborn on serial developmental timings, we tried to clarify the seqential development of epidermal barrier.

Skin samples were obtained from 13 human fetuses from EGA(estimated gestational age) 10 to 23wks and 2 newborns. Specimens were observed by fluorescent confocal microscopy with nile red to identify the distribution of epidermal lipids, by transmission electron microscope with lanthanum to investigate the functional permeability barrier, with RuO_4 to observe the intercellular lipid bilayer and morphology of lamellar bodies, with ion capture cytochemistry to investigate the formation of epidermal calcium gradient.

The results are as follows ;

1. In nile red stain, the amount of epidermal lipid increased during fetal period. At EGA 23wks, the lipid distribution revealed linear and continous pattern.
2. In lanthanum tracer study, the electron dense tracer permeated all the intercellular space of the epidermis up to periderm and subepidermal space until EGA 21wks. At EGA 23wks, the tracer permeated intercellular space of

epidermis weakly. It might be predicted that incomplete epidermal barrier is present at this time.

3. In RuO_4 stain, precursor of lamellar body was observed at EGA 15wks, and intercellular lipid bilayer was observed at EGA 16wks. As gestation increases, there was a steady increase in epidermal lipid bilayers.

4. In ion capture cytochemistry, epidermal calcium gradient was first observed in follicular epidermis at EGA 20wks, and in interfollicular epidermis at EGA 23wks.

From these results, it is concluded that the basic structures of epidermal barrier are formed at EGA 23wks, but it is not complete, and epidermal barrier arises first from follicular epidermis.

Key Words: epidermal barrier, lipid bilayer, lamellar body, epidermal calcium gradient