

## 스트론튬 이온이 무모 생쥐의 표피 투과 장벽 회복에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 피부과학교실<sup>1</sup>, 서울보건대학 전자현미경실<sup>2</sup>, 연세대학교 치과대학 구강생물학교실<sup>3</sup>, 연세대학교 원주의과대학 피부과학교실<sup>4</sup>, 연세대학교 의과대학 피부생물학연구소<sup>5</sup>

김현정<sup>1</sup> · 김민정<sup>1,5</sup> · 정세규<sup>1</sup> · 최기주<sup>2</sup> · 서정택<sup>3</sup> · 최응호<sup>4</sup> · 안성구<sup>4</sup> · 이승현<sup>1,5</sup>

### The Effects of Strontium Ions on Epidermal Permeability Barrier

Hyun Jeong Kim, M.D.<sup>1</sup>, Min Jung Kim<sup>1,5</sup>, Se Kyoo Jeong<sup>1</sup>, Ki Ju Choi<sup>2</sup>, Jeong Taek Seo, M.D.<sup>3</sup>, Eung Ho Choi, M.D.<sup>4</sup>, Sung Ku Ahn, M.D.<sup>4</sup>, Sung Hun Lee, M.D.<sup>1,5</sup>

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine<sup>1</sup>, Seoul, Seoul Health College, Electron Microscope Laboratory<sup>2</sup>, Seongnam, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry<sup>3</sup>, Seoul, Department of Dermatology, Yonsei University Wonju College of Medicine<sup>4</sup>, Wonju, Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine<sup>5</sup>, Seoul, Korea

**Background:** Several ions, such as calcium or magnesium ions, are reported to have regulatory effects on epidermal permeability barrier homeostasis. Recently, it has been suggested that strontium ion can play a substitutive role for calcium ion in various cellular reactions.

**Objective:** This study was conducted to investigate the effects of strontium ion, either alone or in combination with calcium or magnesium ions, on epidermal permeability barrier homeostasis.

**Methods:** Female hairless mice were used to study the effects of various ions on epidermal permeability barrier recovery. Calcium chloride solution, magnesium chloride solution or strontium chloride solution were topically applied to barrier-disrupted skin, either alone or simultaneously. Change of transepidermal water loss, which represents permeability barrier function, was measured by TEWameter and morphological change was also observed by light and electron microscopy.

**Results:** Topical application of strontium chloride solution accelerated permeability barrier recovery rate, compared with vehicle-applied skin. Magnesium chloride solution also accelerated barrier recovery rate, as reported in previous studies. Interestingly, simultaneous application of strontium and calcium ions significantly accelerated barrier recovery rate, compared to application of strontium or calcium ion alone. Nile red staining confirmed the increased neutral lipid deposition in strontium ion applied skin. Electron microscopic observation also revealed an increased lamellar body secretion in strontium ion applied skin.

**Conclusion:** Strontium ion can play a regulatory role in epidermal permeability barrier homeostasis due to, at least in part, its competitive action on calcium ion for the same ion channel. (Korean J Dermatol 2006;44(11):1309~1316)

**Key Words:** Calcium ion, Epidermal permeability barrier, Strontium ion, Transepidermal water loss

### 서 론

피부 장벽은 피부를 통한 수분과 전해질의 이동을 제어하는 역할을 함으로써, 표피의 건조화를 막고 표피가 정상적인 생화학적 대사 반응을 수행할 수 있는 환경을 제공하는 역할을 한다. 이와 함께 외부의 자극이나 미생물, 오염원 등이 인체 내부로 침투하거나 흡수되는 것을 억제하는 인체 방어 기전의 제일선을 담당하고 있다<sup>1</sup>. 표피의 가장

<접수: 2006년 7월 7일>

교신저자: 이승현

주소: 135-720 서울시 강남구 도곡동 146-92

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 피부과

전화: 02)2019-3360, Fax: 02)3463-6136

E-mail: ydshderm@yumc.yonsei.ac.kr

외부에 존재하는 각질층은 이러한 표피 투과 장벽의 형성 및 유지에 있어 가장 중요한 역할을 하고 있다. 각질층은 단백질이 풍부한 각질세포와 세라마이드, 자유 지방산, 콜레스테롤 등의 지질이 주 성분인 각질세포간 지질로 구성되어 있다. 각질세포간 지질은 유극층의 상부와 과립층에서 유래한 층판소체에 의하여 공급되며, 각질층으로 공급된 지질은 다중 지질막 구조를 형성하면서 수분과 전해질에 대한 낮은 투과성을 지닌 막을 형성하게 된다<sup>2-5</sup>.

칼슘 이온은 세포 내 신호전달물질의 하나로서, 피부에 있어 각질형성세포의 증식과 분화를 조절하는 인자이며<sup>6,7</sup>, 표피 투과 장벽의 형성 및 유지에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8-10</sup>. 정상 표피의 경우 기저층에서 가장 낮은 칼슘 이온 농도가 관찰되고, 과립층에서 가장 높은 칼슘 이온 농도가 나타나는 표피 내 칼슘 이온 기울기가 관찰된다. 표피 투과 장벽이 손상되는 경우, 과립층 내 칼슘 이온의 농도가 감소하면서 표피 내 칼슘 이온 기울기가 소실되며, 피부의 장벽 기능 회복에 따라 표피 내 칼슘 이온은 정상적인 농도 기울기를 회복하게 된다<sup>11-13</sup>.

표피 투과 장벽에 칼슘 이온이 미치는 영향은, 초음파 요법(sonophoresis)이나 이온삼투요법(iontophoresis)이 피부 장벽의 손상 없이 표피 내 칼슘 이온 기울기의 변화를 유도하여 층판소체의 분비를 증가시키는 것을 통하여 확인할 수 있다<sup>14,15</sup>. 이와 함께 칼슘 이온과 킬레이트 화합물을 이루면서 표피 내 칼슘 이온의 농도를 낮추는 역할을 하는 glycolic acid를 무모 생쥐 피부에 처리하는 경우에도 경표피수분손실(transepidermal water loss)의 변화 없이 층판소체의 분비가 증가되는 것으로 보고된 바 있다<sup>16</sup>. 칼슘 이온 이외의 다가 양이온(multivalent cations)도 표피 투과 장벽에 영향을 미치며, 특히 마그네슘 이온이 무모생쥐를 이용한 동물 모델에서 피부 장벽의 회복을 촉진하는 것으로 보고된 바 있다<sup>17</sup>.

스트론튬 이온은 세포 내 칼슘 이온 채널에 미치는 영향이 칼슘 이온과 거의 유사하며, 칼슘 이온에 의하여 유발되는 탈분극화(depolarization)를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>18</sup>. 또한, 각질형성세포에서 칼슘 이온의 대체물질로서 interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  등과 같은 염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 것으로 보고된 바 있다<sup>19</sup>. 이러한 칼슘 이온과 스트론튬 이온 간의 상호 작용은 스트론튬 이온이 표피 투과 장벽의 회복 이전에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시한다. 따라서, 본 연구에서는 스트론튬 이온이 표피 투과 장벽의 회복에 미치는 영향을 무모 생쥐를 이용한 동물 모델을 통하여 관찰하였다<sup>20</sup>. 이와 함께 표피 투과 장벽에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 칼슘 이온과 마그네슘 이온을 스트론튬 이온과 동시에 도포하는 경우, 피부 장벽의 회복에 미치는 영향을 관찰하였다. 이를 위하여, 반복적인 테이프 스트리핑을 통하여 장벽을 손상시킨 피부에 스트론튬 이온 용액, 칼슘 이온 용액, 마그네슘 이온 용액을 각각 도포하여 장벽 회복 속도를 측정하고, 각각의 이온을 조합하여 도포하는 경우의 회복 속도를 측정하였다. 이와 함께, 광학 현미경과 전자 현미경

을 이용한 조직학적 관찰을 통하여 표피의 변화를 관찰하고, 배양된 각질형성세포를 이용하여 스트론튬 이온이 세포 내 칼슘 이온 농도에 미치는 영향을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 재료

생후 8~12주의 암컷 무모 생쥐(hairless mouse: Hr/Hr)를 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도 40~60%의 환경에서 동일한 표준 사료를 이용하여 사육하고 실험에 사용하였다. Calcium chloride, magnesium chloride, strontium chloride는 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 각각의 사용 농도에 맞도록 증류수에 희석하여 사용하였으며, 기타 언급되지 않은 시약은 분석용 이상의 순도로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 표피 투과 장벽 손상 및 경표피수분손실 측정

4% Chloral hydrate 용액을 복강주사를 통하여 주입하여 마취한 무모 생쥐의 배부를 반복적인 테이프 스트리핑을 통하여 경표피수분손실이  $35 \sim 40 \text{ mg/cm}^2/\text{hr}$ 가 되도록 표피 투과 장벽을 손상시켰다. 경표피수분손실은 TEWameter TM210 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany)을 이용하여 측정하였다. 표피 투과 장벽 손상 직후, 10 mM과 20 mM의 calcium chloride, magnesium chloride, strontium chloride 용액을 각각  $150 \mu\text{l}$ 씩 장벽이 손상된 부위에 도포하고, 10분간 방치한 후 paper towel을 이용하여 피부 표면에 남아있는 용액을 제거하였다. 대조군으로서 ethanol과 polyethylene glycol 400 (Sigma Chemical, St. Louis, MA, USA)을 각각 3 : 7로 혼합한 용액을 도포하였다. 피부장벽 손상 직후, 3, 6, 24시간 후 경표피수분손실을 측정하고, 각각의 시간에 피부 생검을 시행하여 조직학적 검사를 시행하였다. 모든 측정은 실내온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도 40~60% 하의 동일한 조건에서 시행하였다.

실험 결과의 통계적 유의성은 two-tailed Student's t-test를 이용하여 시행하였으며, 유의수준은 95%로 설정하였다.

#### 2) Nile red 염색

각질층 내 각질세포간 지질의 분포를 관찰하기 위하여, Nile red (9-diethyl amino-5H-benzo- $\alpha$ -phenoxazine-5-one: Sigma Chemical, St. Louis, MA, USA)를 이용하여 염색을 시행하였다.  $10 \mu\text{l}$ 의 10 mM Nile red 용액을 조직에 도포한 후, 10분간 방치하고, Confocal laser scanning microscopy 시스템(BioRad MRC 600 mounted on a Zeiss LSM510 inverted microscopy)을 이용하여 측정하였다. Excitation 파장은 488 nm였으며, emission 파장은 514 nm였다.

#### 3) 전자현미경 검사

표피 내 칼슘 이온의 분포를 관찰하기 위하여, calcium-ion capture cytochemistry를 시행하였다. 피부 조직을 생검한 후 즉시 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90 mM potassium oxalate, 1.4% sucrose로 조성된 고정액에 담가  $4^\circ\text{C}$

하에서 보관하고, 2시간 후에 조직을 0.5 mm<sup>3</sup>의 크기로 절절한 후, 냉장고에서 얼음조각 위에 하룻밤 동안 고정하였다. 이후 1 ml의 OsO<sub>4</sub> 용액(4%)과 3 ml의 potassium pyroantimonate 용액(2%)이 혼합된 후고정액으로 2시간 동안 얼음 위에서 방치하였다. 냉증류수(pH 10.0)를 이용하여 10분간 세척한 후 통상적인 방법으로 탈수 및 포매를 시행하고, 투과 전자 현미경(H-500, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

표피 내 층판소체를 관찰하기 위하여 ruthenium tetroxide 후 고정을 시행하고 전자현미경으로 관찰하였다. 조직을 생검한 후, 2% glutaldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1 M sodium cacodylate 완충액(pH 7.4)으로 조성된 modified Karnovsky 용액에 넣어 실온에서 1시간 동안 방치한 후, 4°C에서 18~24시간 동안 고정하였

다. 고정액을 제거한 후, 0.1 M sodium cacodylate 완충액으로 40분간 3회 세척하고, 0.25% RuO<sub>4</sub> 용액으로 실온에서 45분간 후 고정하였다. 0.1 M sodium cacodylate 완충액으로 10분간 세척한 후, 통상적인 방법으로 탈수 및 포매를 시행하고, uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과 전자현미경(H-500, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

4) 세포 내 칼슘 이온 농도 변화 측정

배양된 인체 유래 각질형성세포주(human immortalized keratinocyte cell line)인 HaCaT세포 3 ml를 포함하고 있는 용액에 최종 농도가 2μM이 되도록 Fura-2/AM을 가하고, 실온에서 30분간 산소를 제공하면서 세포 내에 축적시킨 후, 10 mM HEPES 완충액(130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucose, pH 7.4)을 분당 2 ml의 속도로

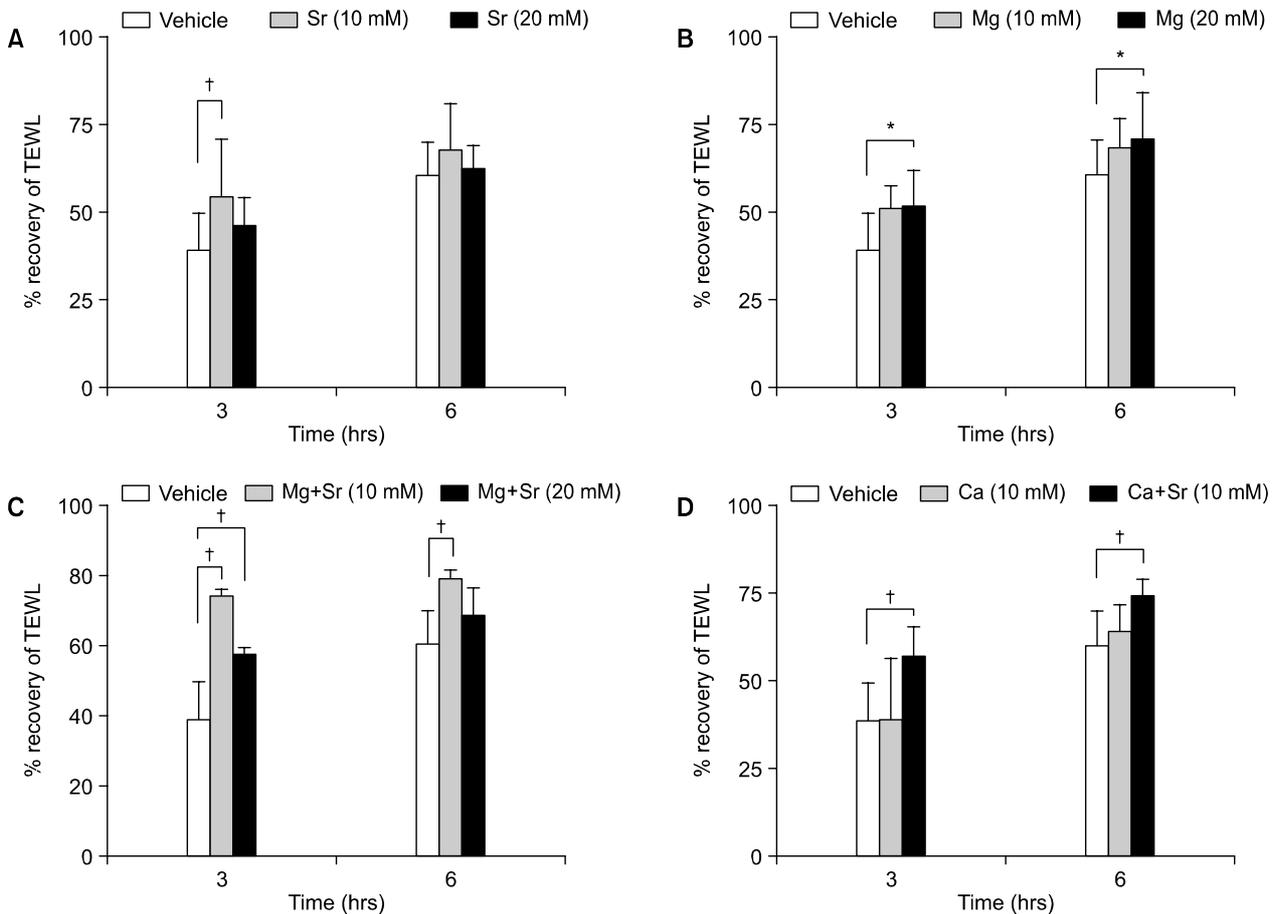


Fig. 1. Effects of strontium, magnesium, calcium ions and ion mixtures on epidermal permeability barrier recovery rate. Topical application of 10 mM strontium chloride solution (A) and 20 mM magnesium chloride solution (B) significantly accelerated the barrier recovery, compared with vehicle-applied skin. Co-application of 10 mM magnesium chloride and strontium chloride solution (C) also accelerated barrier recovery rate. While 10 mM calcium chloride solution did not induced any significant effect on the barrier recovery rate, the mixture of the calcium chloride and strontium chloride solution significantly accelerated barrier recovery rate (D)(\* :  $p < 0.05$ , † :  $p < 0.01$ ).

흘려주면서 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화를 측정하였다. 세포 내 칼슘은 spectrofluometry (Photon Technology International, Brunswick, NJ, USA)를 이용하여 측정하였으며, 흥분 파장(excitation wavelength)은 340 nm와 380 nm 가 반복되도록 해주었고, 방출파장(emission wavelength)은 510 nm에서 측정하였다. 세포 내 칼슘이온 농도는 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다<sup>21</sup>.

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times S_{f2} / S_{b2} [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$$

이때, Kd는 fura-2의 Kd 값, R은 측정된 340/380 nm fluorescence 비율 값, R<sub>min</sub>은 2.5 mM EGTA에 반응한 HaCaT 세포의 340/380 nm fluorescence 비율 값, R<sub>max</sub>는 25 mM ionomycin에 반응한 HaCaT 세포의 340/380 nm fluorescence 비율 값, S<sub>f2</sub>는 R<sub>min</sub>에서 380 nm의 형광 강도

값, S<sub>b2</sub>는 R<sub>max</sub>에서 380 nm의 형광강도 값을 나타낸다.

세포 내 칼슘 이온의 변화를 유도하는 물질로서 sarco-plasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor인 thapsigargin (Sigma Chemical, St. Louis, MA, USA)을 1µM 농도로 흘려주면서 세포 내 칼슘 이온의 변화를 관찰하였으며, 이때 세포 외 칼슘이온의 농도는 1.5 mM로 유지하였다. Thapsigargin 처리 후 240초 후에 1.5 mM의 strontium chloride 용액을 주입하여 세포 내 칼슘 이온의 변화를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 경표피수분손실 회복

급성 피부장벽 손상 후 경표피수분손실의 회복은 10 mM의 strontium chloride를 도포한 군에서, 장벽 손상 후 3시

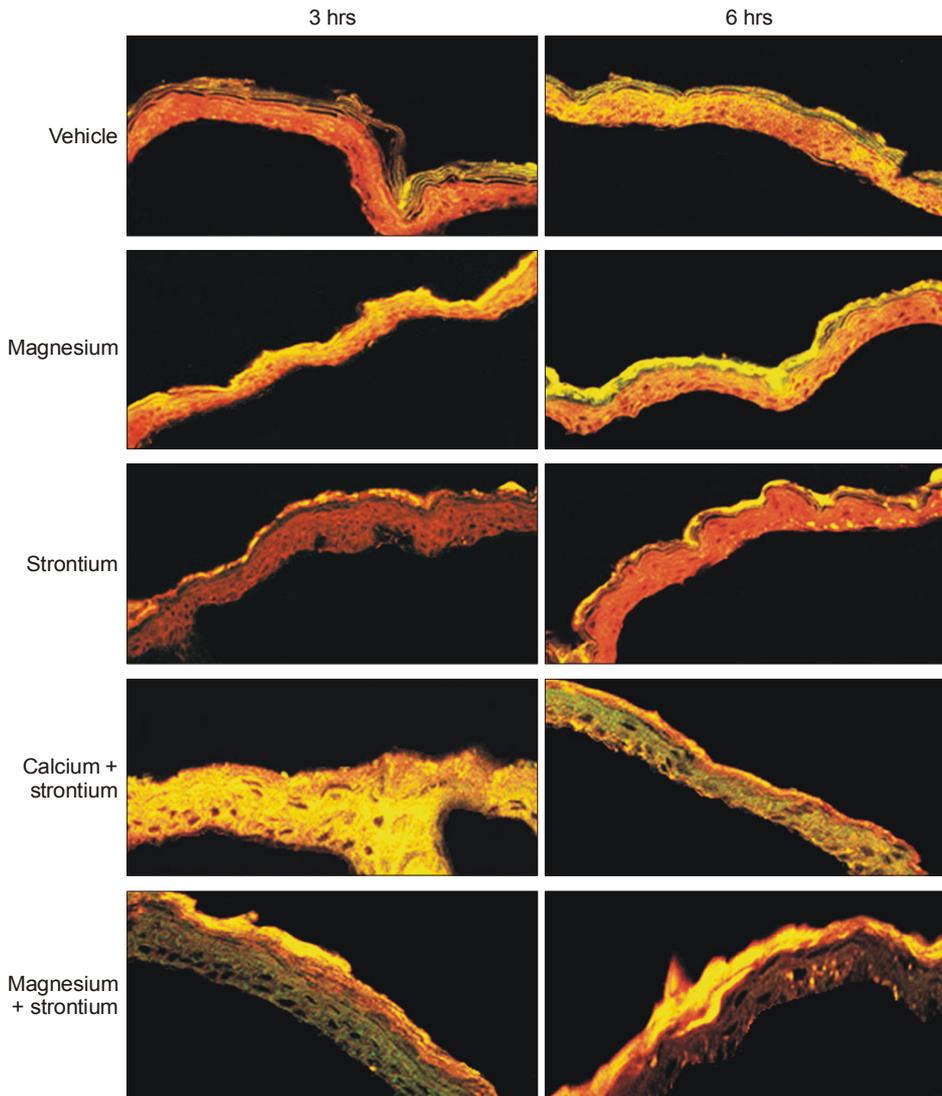


Fig. 2. Topical application of magnesium chloride solution (20 mM), strontium chloride solution (10 mM) or mixture solution (10 mM for calcium, strontium and magnesium ions, respectively) on barrier-disrupted skin showed increased neutral lipid deposition in stratum corneum, compared to vehicle applied skin. Note the yellow intense fluorescence observed in stratum corneum, which represents the SC intercorneocyte lipids.

간 후에 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났다. 이에 비하여 20 mM의 strontium chloride를 도포한 경우 대조군에 비하여 장벽 손상 후 3시간과 6시간 후에 유의한 회복률의 차이가 나타나지 않았다. Magnesium chloride를 도포한 군에서는 10 mM magnesium chloride 도포군의 경우 3시간과 6시간 후에 대조군에 비하여 유의한 회복률의 차이가 나타나지 않는데 비하여, 20 mM magnesium chloride 도포군의 경우 각각 3시간과 6시간에서 대조군에 비하여 유의한 장벽 회복률의 증가가 관찰되었다(Fig. 1A, B). Magnesium chloride와 strontium chloride를 동시에 도포한 경우, 각각의 이온의 농도가 10 mM인 경우 대조군에 비하여 유의한 회복률의 증가가 관찰되었으나, 20 mM인 경우 장벽 손상 후 3시간에 유의한 증가를 나타냈다. 표피 투과 장벽을 손상시킨 후, calcium chloride를 도포한 경우 피부 장벽의 회복률에 변화가 관찰되지 않았으나, strontium chloride를 calcium chloride와 동시에 도포한 경우 대조군에 비하여 장벽 손상 후 3시간과 6시간 후 유의한 장벽 회복률의 증가가 관찰되었다(Fig. 1C, D). 모든 실험군과 대

조군에서 장벽 손상 후, 24시간 후 경표피수분손실은 90% 이상의 회복률을 나타내었으며, 각 군 간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

2. 각질층 내 각질세포간 지질 분포의 변화

장벽 손상 후 표피 내 각질세포간 지질의 분포의 변화를 Nile red 염색을 통하여 관찰하였다. 대조군의 경우 장벽 손상 후 3시간에서 각질층 내 각질세포간 지질의 감소 소견이 나타났으며, 6시간 후 조직에서는 부분적인 회복이 관찰되었다. 20 mM의 magnesium chloride와 10 mM의 strontium chloride 용액을 장벽 손상 후 도포한 조직에서는 각질세포간 지질의 증가 소견이 관찰되었으며, 10 mM의 calcium chloride와 10 mM의 strontium chloride를 동시에 도포한 조직과 10 mM의 magnesium chloride와 10 mM의 strontium chloride를 동시에 도포한 조직에서도 대조군에 비하여 각질세포간 지질의 증가가 관찰되었다(Fig. 2). 장벽 손상 후, 24시간 후 생검한 피부 조직에서는 실험군과 대조군에서 정상 피부의 각질층과 거의 유사한 각질층 내

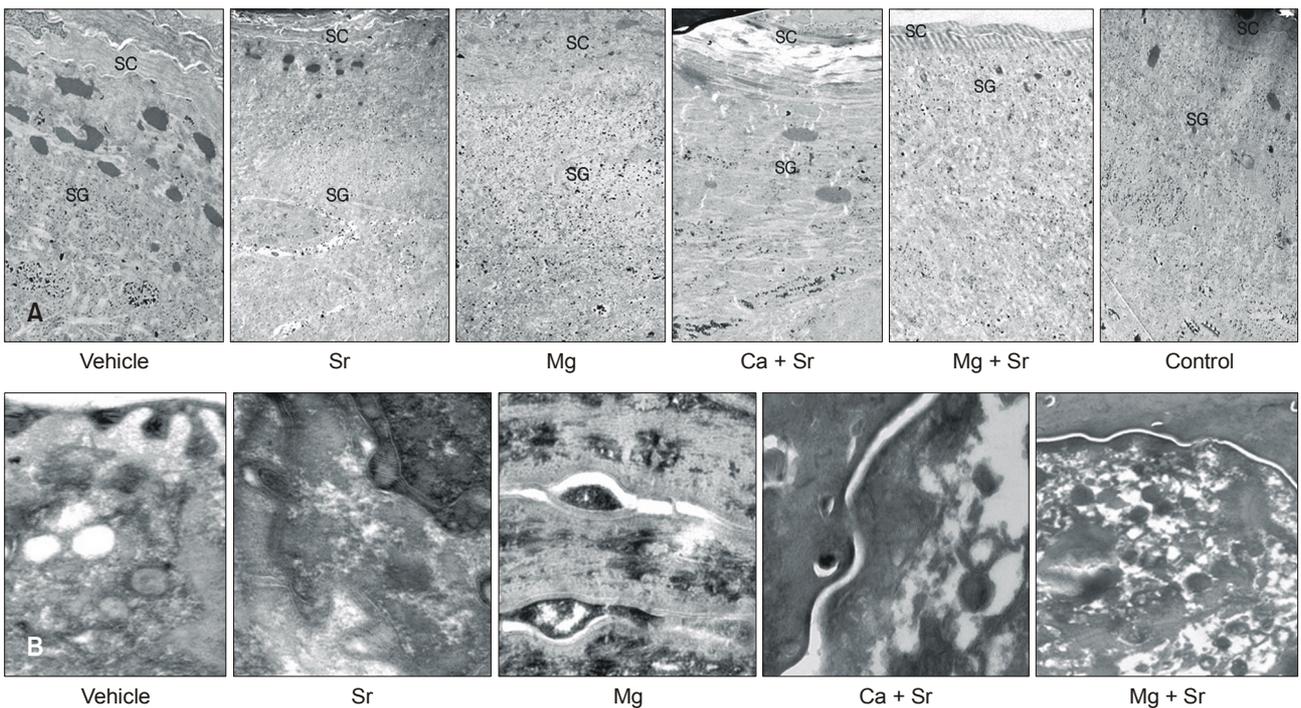


Fig. 3. Epidermal calcium gradient changes at 3 hrs after topical application of various ion solutions (A). Normal epidermal calcium gradient, with highest levels in stratum granulosum and lowest levels in stratum basale, was observed in control skin (Control). While loss of calcium gradient was observed in vehicle-applied skin (Vehicle) at 3 hrs after acute barrier disruption, partial recovery of epidermal calcium gradient, induced by increased calcium ion distribution in stratum granulosum, was observed in magnesium chloride- (Mg), strontium chloride- (Sr) only applied skin, as well as equimolar mixture of calcium chloride and strontium chloride (Ca+Sr), and magnesium chloride and strontium chloride solution (Mg+Sr). Electron microscopic findings of the stratum granulosum-stratum corneum junctions at 3 hrs after disruption (B). Increased lamellar body secretion at SG-SC junction was observed in Sr or Mg applied skin, compared to vehicle-applied skin. Similar up-regulation of LBs secretion was also observed in Ca+Sr, and Mg+Sr applied skin.

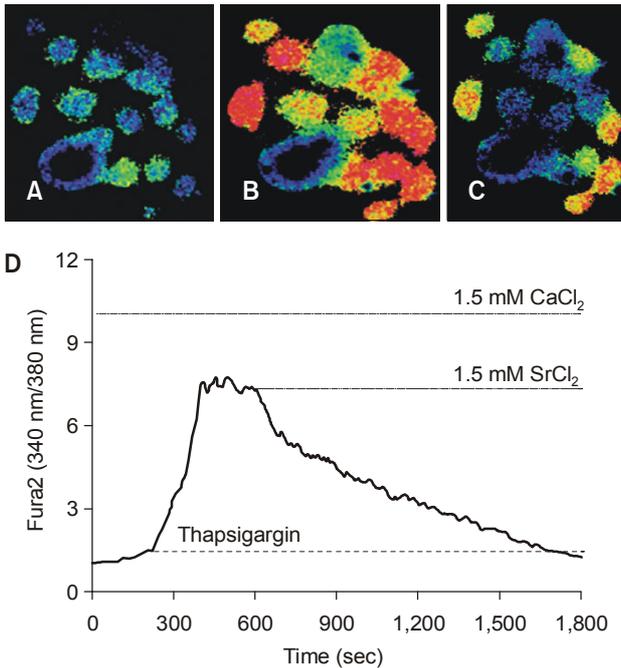


Fig. 4. Extracellular strontium ions decreased the intracellular calcium ion concentration by competing with extracellular calcium ions. Treatment of 1 $\mu$ M of thapsigargin, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor, increased the intracellular calcium concentration by inducing the release of calcium ions stored in ER. The influx of extracellular calcium ions into cytosol was observed immediately after thapsigargin treatment (B, D 200 sec). After the 1.5 mM strontium treatment, the intracellular calcium concentration was significantly decreased, possibly due to the competing influx of extracellular strontium ions (C, D 600 sec). The ratio of fluorescence intensities (Fura-2AM, 340 nm/380 nm) represents the intracellular calcium ion concentration. Cell color indicated the fura-2 AM emission ratio (340 nm/380 nm) with blue (A) representing low  $[Ca^{2+}]_i$ , and yellow/red (B, C) representing high  $[Ca^{2+}]_i$  in the cytosol.

증성 지질의 분포가 관찰되었다.

### 3. 표피 내 칼슘 이온 기울기의 변화

장벽 손상 후 3시간 경과 시 대조군에서 표피 내 칼슘 이온 기울기의 소실이 관찰되었으나, magnesium chloride와 strontium chloride를 도포한 군에서는 과립층 내 칼슘 이온의 침착이 증가하면서, 표피 내 칼슘 이온 기울기가 부분적으로 회복되는 소견이 관찰되었다. 이와 함께 calcium과 strontium, magnesium과 strontium을 동시에 도포한 군에서도 표피 내 칼슘 이온 기울기의 부분적인 회복이 관찰되었다(Fig. 3A). 표피 내 층판소체를 관찰하기 위하여 조직을 ruthenium tetroxide 후 고정 후 전자현미경으로 관찰한 결

과, strontium ion과 magnesium ion을 도포한 군에서 각질층과 과립층 사이의 부위에서 층판소체 분비의 증가가 관찰되었으며, 이온의 혼합 용액에서도 유사한 증가 소견이 관찰되었다. 또한 각각의 이온 용액을 도포한 군에서 각질층과 과립층 사이의 지질막의 확장이 관찰되어 각질세포간 지질의 증가와 경표피수분손실 회복률의 증가가 층판소체 분비의 증가에 의한 것임을 시사하였다(Fig. 3B).

### 4. 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화

스트론튬 이온이 표피 내 칼슘 이온 농도에 영향을 미치는 기전을 연구하기 위하여, 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 이온 농도 변화에 미치는 영향을 측정하였다. 세포질 내에서 칼슘 이온의 분비를 촉진하는 thapsigargin을 각질형성세포에 처리한 경우 세포 내 칼슘 이온 농도의 급격한 증가가 나타났다. 동일한 세포에 strontium 이온과 칼슘 이온이 같은 농도(각각 1.5 mM)로 포함되어 있는 용액을 흘려주는 경우, 세포 내 칼슘 이온 농도가 감소하는 결과가 관찰되었다(Fig. 4).

## 고 찰

각질층은 케라틴과 같은 단백질 성분이 풍부한 각질세포와 세라마이드, 콜레스테롤, 자유 지방산이 주 구성 성분인 각질세포간 지질로 구성되어 있다. 표피 내 각질세포간 지질은 과립층에서 분비된 층판소체 내의 지질 성분이 각질층과 과립층 사이에서 세포외유출 과정을 통하여 세포간격으로 분비되면서 보충되며, 이렇게 분비된 지질 성분의 세포외 변환 과정을 통하여 지질다중층 구조의 각질세포간 지질 구조를 나타내게 된다<sup>22</sup>. 표피의 투과 장벽이 손상 받는 경우 경표피수분손실이 증가하게 되며, 이와 함께 1) 이미 형성되어 있던 층판소체의 분비, 2) 콜레스테롤, 자유 지방산, 세라마이드와 같은 지질 성분의 표피 내 합성 증가, 3) 새로운 층판소체의 형성과 분비, 4) 각질세포간 지질의 회복, 5) 분비된 지질의 개조(remodeling) 등과 같은 일련의 회복 과정이 일어나게 되며, 피부 장벽이 회복된다<sup>1</sup>. 이러한 일련의 회복 과정은 칼슘 이온과 매우 밀접하게 연관되어 있으며, 특히 칼슘 이온은 각질세포의 증식과 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 칼슘 이온 이외에 마그네슘 이온도 피부 장벽의 항상성에 영향을 미치며, Denda 등<sup>17</sup>은 마그네슘 이온을 포함한 용액을 도포하는 경우, 피부 장벽의 회복이 촉진되는 것을 보고한 바 있다.

표피칼슘 이온 기울기의 형성은 주로 표피 투과 장벽의 형성에 의하여 칼슘 이온의 표피를 통한 이동이 제어되면서 나타나는 것으로 보고되고 있다. 즉, 표피를 통하여 수분이 이동하면서 칼슘 이온의 이동을 동반하게 되고, 각질층과 과립층의 경계 부위에서 수분의 이동이 억제되면서 칼슘 이온이 과립층의 상부에 축적되는 것으로 볼 수 있다. 이와 관련하여 Elias 등<sup>23</sup>은 실험적으로 장벽 기능이 손

상된 피부를 저온에 노출시키면서 인위적으로 수분증기투과막을 이용하여 피부장벽을 제공하였을 때, 표피 내 칼슘 이온 기울기가 회복되는 것을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 strontium ion, magnesium ion 처치군이나, 이온 혼합 용액을 처치한 군에서 표피 내 칼슘 이온의 기울기의 회복이 대조군에 비하여 빠르게 나타나는 것은 장벽기능의 회복의 촉진에 의한 것으로 볼 수 있다.

스트론튬 이온은 소양감의 지속성과 강도를 감소시키는 효능이 있는 항소양증 약물로 보고된 바 있으며<sup>24,25</sup>, 특히 칼슘 이온 채널에 대하여 칼슘 이온과 경쟁적으로 작용하여 배양된 인체 각질형성세포에서 세포 증식을 촉진하는 효능이 있는 것으로 보고된 바 있다<sup>26,27</sup>. 본 연구 결과, 스트론튬 이온을 장벽이 손상된 피부에 도포하는 경우, 피부 장벽의 회복 속도가 증가하였으며, 특히 칼슘 이온과 동시에 도포하는 경우에도 이러한 회복률의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과를 통하여 스트론튬 이온이 칼슘 이온의 장벽 회복 억제 효과를 제어할 수 있는 효능을 지닌 것으로 추정할 수 있다. 마그네슘 이온의 경우에도 단독으로 처치하거나, 칼슘 이온과 동시에 처치하는 경우 모두 장벽 회복률이 증가하는 것을 관찰하였으며, 이는 기존의 연구 결과와 동일한 것이다. 배양된 각질형성세포에 thapsigargin을 처리하면, endoplasmic reticulum에 저장된 칼슘 이온의 분비가 촉진되어 세포 내 칼슘 이온의 농도가 급격히 증가하게 되며, 세포막에 존재하는 칼슘 이온 채널이 촉진되어 세포 외 칼슘 이온이 세포 내부로 유입된다<sup>28</sup>. 스트론튬 이온이 칼슘 이온 채널에 미치는 효과를 관찰하기 위하여, thapsigargin을 처리한 후 스트론튬 이온을 처리한 결과, 세포 내 칼슘 이온의 농도 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 스트론튬이 세포 내 칼슘 이온의 농도 변화에 관여하는 때문인 것으로 생각할 수 있으며, 특히 칼슘 이온 채널에 경쟁적으로 작용하는 것으로 볼 수 있다. 스트론튬 이온이 각질형성세포 내에서 칼슘 이온과 경쟁적으로 작용하는 것으로서 장벽 손상 후 회복 과정에서 칼슘 이온의 세포 내 유입을 억제하여 증판소체의 분비와 장벽 회복을 촉진하는 기전을 설명할 수 있을 것이다.

최근 각질형성세포에서 calcium sensing receptor (CaSR)에 대한 존재와 역할이 밝혀지면서, 표피 투과 장벽의 항상성 유지 과정에서 CaSR의 역할에 대한 연구가 이루어지고 있다. CaSR은 G-Protein coupled receptor (GPCR)의 일종으로서 1993년 bovine thyroid에서 최초로 존재가 밝혀진 후, 지속적인 연구를 통하여 칼슘뿐 아니라 다양한 다가양이온(multivalent cation)에 의해서도 활성화되는 것이 보고되었다<sup>29,30</sup>. 최근 기저층 내 각질형성세포에서 CaSR이 과발현된 동물 모델을 이용한 연구 결과, 각질형성세포의 최종 분화와 표피 투과 장벽의 발생이 촉진되는 것으로 보고된 바 있으며<sup>31</sup>, CaSR이 제거된 동물 모델의 경우 표피 층이 얇아지고 분화 단백질의 발현이 감소하는 등의 소견이 나타나는 것으로 보고된 바 있다. 이와 함께 각질층 내 각질세포간 지질의 구조가 비정상적으로 나타나는 등의

소견이 보고되었다<sup>32</sup>. 이상의 연구 결과 CaSR이 표피 투과 장벽의 항상성 유지에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상되며, 스트론튬 이온의 경우 CaSR에 대하여 칼슘 이온과 유사한 potency를 나타내는 것으로 알려져 있어 이러한 CaSR의 활성화와 관련된 스트론튬 이온의 효과에 대한 추가적인 연구가 필요하다 할 수 있다.

연구자는 본 연구를 통하여 스트론튬 이온을 단독적으로 처리하거나, 칼슘 이온과 동시에 처리하는 경우 피부 장벽 손상 후 회복을 촉진할 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 배양된 각질형성세포를 이용한 실험 결과 스트론튬 이온이 각질형성세포 내 칼슘 이온 채널에 경쟁적으로 작용하여 칼슘 이온의 세포 내 유입을 억제하는 것을 관찰하였다. 이상의 연구 결과 스트론튬 이온이 세포 내 칼슘 이온 농도 변화에 영향을 미쳐 증판소체의 분비를 촉진하고, 이를 통하여 표피 투과 장벽의 회복을 촉진하는 것으로 추정할 수 있었다.

## 결 론

스트론튬 이온을 표피 투과 장벽이 손상된 무모 생쥐의 피부에 도포하여 피부 장벽 회복률의 변화를 측정하고, 표피 내 칼슘 이온의 분포와 배양된 각질형성세포에서 세포 내 칼슘 이온의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

10 mM의 스트론튬 이온을 단독적으로 도포한 결과, 손상된 피부 장벽의 회복이 촉진되는 것을 관찰하였다. 10 mM의 스트론튬 이온과 10 mM의 칼슘 이온을 동시에 도포한 결과 피부 장벽 회복이 촉진되는 것을 관찰하였으며, 각질층과 과립층간 경계 부위에서 증판소체의 분비가 촉진되는 소견이 관찰되었다. 표피 내 칼슘 이온의 분포를 calcium-ion capture cytochemistry로 관찰한 결과, 스트론튬 이온을 도포한 군에서 장벽 손상 후 3시간이 경과된 뒤, 대조군에 비하여 표피 내 칼슘 이온이 증가된 소견을 관찰할 수 있었다. 시험관 내에서 스트론튬 이온이 각질형성세포의 세포 내 칼슘 이온 농도 변화에 미치는 영향을 측정 한 결과, 칼슘 이온 채널에 경쟁적으로 작용함으로써 세포 내 칼슘 이온 농도의 증가를 억제하는 것으로 관찰할 수 있었다.

이러한 실험 결과를 통하여 스트론튬 이온이 손상된 피부 장벽의 회복을 촉진하는 것을 확인하고, 이를 통하여 스트론튬 이온을 피부 장벽 기능의 회복을 촉진하는 제제로 사용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Lee SH, Hwang SM, Choi EH, Ahn SK. Skin barrier. Korean J Dermatol 1999;37:825-837
2. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. Dermatol Ther 2004;17:6-15

3. Elias P. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 2005;125:183-200
4. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Medical Journal* 2006;47:293-306
5. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003;121:231-241
6. Hennings 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
7. Rosenthal DS, Steinert PM, Chung S, Huff CA, Johnson J, Yuspa SH, et al. A human epidermal differentiation-specific keratin gene is regulated by calcium but not negative modulators of differentiation in transgenic mouse keratinocytes. *Cell Growth Differ* 1991;2:107-113
8. 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
9. 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
10. Menon GK, Price LF, Bommannan B, Elias PM, Feingold KR. Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J Invest Dermatol* 1994;102:789-795
11. Menon GK, Elias PM. Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol* 1991;127:57-63
12. Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 1992;270:503-512
13. Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, Feingold K, Elias P, Cullander C. Acute barrier perturbation abolishes the  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol* 1998;111:1198-1201
14. Lee SH, Choi EH, Feingold KR, Jiang S, Ahn SK. Iontophoresis itself on hairless mouse skin induces the loss of the epidermal calcium gradient without skin barrier impairment. *J Invest Dermatol* 1998;111:39-43
15. Choi EH, Kim MJ, Yeh BI, Ahn SK, Lee SH. Iontophoresis and sonophoresis stimulate epidermal cytokine expression at energies that do not provoke a barrier abnormality: lamellar body secretion and cytokine expression are linked to altered epidermal calcium levels. *J Invest Dermatol* 2003;121:1138-1144
16. Jeong SK, Ko JY, Seo JT, Ahn SK, Lee CW, Lee SH. Stimulation of epidermal calcium gradient loss and increase in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  expressions by glycolic acid in murine epidermis. *Exp Dermatol* 2005;14:571-579
17. Denda M, Katagiri C, Hirao T, Maruyama N, Takahashi M. Some magnesium salts and a mixture of magnesium and calcium salts accelerate skin barrier recovery. *Arch Dermatol Res* 1999;291:560-563
18. Hahn GS. Strontium is a potent and selective inhibitor of sensory irritation. *Dermatol Surg* 1999;25:689-694
19. Celerier P, Richard A, Rougier A, Litoux P, Dreno B. Modulatory effects of selenium and strontium salts on keratinocyte-derived inflammatory cytokines. *Eur J Dermatol* 2002;12:LVI-LVIII
20. Ahn SK, Jiang SJ, Hwang SM, Choi EH, Lee JS, Lee SH. Functional and structural changes of the epidermal barrier induced by various types of insults in hairless mice. *Arch Dermatol Res* 2001;293:308-318
21. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450
22. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80(Suppl):44S-49S
23. Elias P, Ahn S, Brown B, Crumrine D, Feingold KR. Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. *J Invest Dermatol* 2002;119:1269-1274
24. Zhai H, Hannon W, Hahn GS, Harper RA, Pelosi A, Maibach HI. Strontium nitrate decreased histamine-induced itch magnitude and duration in man. *Dermatology* 2000;200:244-246
25. Zhai H, Hannon W, Hahn GS, Pelosi A, Harper RA, Maibach HI. Strontium nitrate suppresses chemically-induced sensory irritation in humans. *Contact Dermatitis* 2000;42:98-100
26. Trollinger DR, Isseroff RR, Nuccitelli R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2002;193:1-9
27. Furukawa F, Huff JC, Lyons MB, Weston WL, Norris DA. Characterization and practical benefits of keratinocytes cultured in strontium-containing serum-free medium. *J Invest Dermatol* 1988;90:690-696
28. Harmon CS, Ducote J, Xiong Y. Thapsigargin induces rapid, transient growth inhibition and c-fos expression followed by sustained growth stimulation in mouse keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol* 1996;107:188-194
29. Breitwieser GE, Miedlich SU, Zhang M. Calcium sensing receptors as integrators of multiple metabolic signals. *Cell Calcium* 2004;35:209-216
30. Chang W, Shoback D. Extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptors - an overview. *Cell Calcium* 2004;35:183-196
31. Turksen K, Troy TC. Overexpression of the calcium sensing receptor accelerates epidermal differentiation and permeability barrier formation in vivo. *Mech Dev* 2003;120:733-744
32. Tu CL, Oda Y, Komuves L, Bikle DD. The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium* 2004;35:265-273