

## 무모 생쥐에서 vinyl carbamate epoxide와 TPA로 유발된 종양과 비종양 병변의 표피지질 및 칼슘의 변화

연세대학교 원주의과대학 피부과학교실, 연세대학교 의과대학 피부과학교실\*

안성구 · 박하나 · 천승현 · 전수영 · 최응호 · 이상주\* · 이승현\*

=Abstract=

### The Changes of Epidermal Lipid and Calcium in the Lesion of Skin Tumor and Non-tumor of Hairless Mice Induced by Vinyl Carbamate Epoxide and TPA

Sung Ku Ahn, M.D., Hana Bak, M.D., Seung Hyun Chun, M.D., Soo Young Jeon, M.D., Eung Ho Choi, M.D., Sang Joo Lee, M.D.\* , Seung Hun Lee, M.D.\*

Department of Dermatology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea,

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea\*

**Background:** Chemically induced epidermal carcinogenesis is usually divided into two stages, the initiation and promotion. The initiation involves conversion of some epidermal cells into latent neoplastic cells and the promotion is proliferation of the transformed cells. Ethyl carbamate (EC) has been identified at low microgram quantities in various fermented beverages, distilled products and tobacco smoke. It has been known as a initiator of tumor. Oxidation of the ethyl group of EC is followed by dehydration to yield the carcinogen vinyl carbamate (VC). This is further oxidized to vinyl carbamate epoxide (VCO). VC and VCO proved to be much more carcinogenic than EC.

**Object:** This study is attempted to investigate the skin tumor and non-skin tumor in hairless mice induced by application of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) on the skin initiated with VCO and its relationship with calcium gradient and epidermal lipid.

**Methods:** In this experiment, the tumor induction was performed by painting the mouse skin once a week for five weeks with VCO solution, and then 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) was treated in the same manner twice a week for 40 weeks. We biopsied the skin at 5, 10, 25, 30, 35 and 40 weeks and stained the specimens with hematoxylin-eosin, RuO<sub>4</sub> postfixation and ion capture cytochemistry for calcium staining.

**Results:** The results are summarized as follows

1. Cellular proliferation, hyperkeratosis and dysplasia of the epidermis were more prominent in skin tumors than non-skin tumors. Papillomas were developed at 8 weeks after application of VCO-TPA but not TPA alone. The occurrence of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma was 33 and 39 weeks, respectively.

2. Calcium gradient was distorted in the only TPA treatment group but normal in the control

### 서 론

<접수: 2004년 5월 31일>

본 연구는 1998년 한국과학재단 특정기초 연구비(98-0403-18-01-

3) 지원으로 이루어졌음.

교신저자: 안성구

주소: 220-701 강원도 원주시 일산동 162

연세대학교 원주의과대학 피부과학교실

전화: 033)741-0621 Fax: 033)748-2650

E-mail: skahn@wonju.yonsei.ac.kr

피부암은 비교적 흔한 종양이며 치유율이 높고 병변을 쉽게 발견할 수 있어서 암유발 요인을 연구하는데 좋은 모델이 되고 있다. 실험적으로 피부에 종양을 유발시킬 때에는 생쥐가 사용되었으며 이외에 기니피, 토끼 및 햄스터 등의 동물에서 유두종, 기저세포암, 편평세포암, 각

group. Calcium deposition was increased through all layers of epidermis and the calcium gradient was disappeared in the epidermis of tumors in the VCO-TPA treatment group. These findings were similar to papilloma, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma.

3. Fragmented, incomplete lipid bilayer formation, dilated intercellular spaces and multiple lacunar domains were prominent in the VCO-TPA and TPA treatment groups but not in the control group. The VCO-TPA treatment group has shown more epidermal lipid damage than that of the only TPA treatment group.

4. Diploid DNA histogram patterns were observed in all the control and TPA treatment groups. But aneuploidy was observed in 1 of 3 keratoacanthomas and 3 of 3 squamous cell carcinomas.

**Conclusion:** From the above results, it is concluded that various skin tumors, such as papilloma, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma or non-skin tumor were produced by VCO. Skin tumors showed various, distinctive light microscopic or electron microscopic changes compared to the non-skin tumor. It is thought that intercellular lipid change and calcium gradient disappearance in the epidermis have an important role in the carcinogenesis. (Korean J Dermatol 2004;42(10):1304~1312)

**Key Words:** Vinyl carbamate epoxide, Skin tumor or non-skin tumor, TPA, Calcium, Epidermal lipid

화극세포종, 혹색종, 피지선암 및 표피낭종과 같은 다양한 피부종양이 유발되었다. 지난 50년간 이러한 고전적 실험연구를 통하여 화학적, 물리적 및 바이러스성 발암과정의 기본적인 개념이 점차 확립되었다<sup>1</sup>.

화학적 발암물질은 우리주위에 흔히 존재하며 이와 관련된 암이 인체에서 다수 발견되어 동물실험을 통한 발암과정과 기전에 관한 많은 연구가 이루어졌다<sup>2,3</sup>. 화학적 발암물질에 의한 피부종양의 유도는 다소 복합적이나 주로 개시(initiation)와 촉진(promotion)의 2단계 과정이 있다. 개시는 발암제를 저농도로 피부에 한 번 도포하거나 단시간 내에 투여하여 유발된다. 이 과정은 발암제 투여 후 즉시 일어나며 비가역적이고 세포의 형질변화가 유전된다. 즉 개시가 유도된 후 더 이상의 자극이 없으면 종양은 발생되지 않으나 이미 일어난 세포의 변화는 유전된다. 대표적인 약물은 benzo[a]pyrene, 7-12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), azo색소물, aflatoxin B1, benzidine 및 ethylcarbamate (urethan, EC)를 포함한 다양한 종류가 알려져 있다<sup>2,3</sup>. Ethylcarbamate와 7-12-dimethylbenz[a]anthracene과 같은 다환식 탄화수소의 궁극적 발암물질은 각각 vinyl carbamate epoxide, DMBA-dihydrodiol epoxide와 같은 epoxide 계통이다<sup>4,6</sup>. Epoxide는 강한 친전자 반응물로서 표적세포의 친핵성 부위인 DNA와 RNA 및 단백질과 결합한다. 친전자 반응물은 양전하를 띠는 분자로서 전자결실 친핵원자와 공유결합하여 유전자의 변화를 초래한다. 즉 세포의 복제와 전사과정 중 발암물질과 DNA 부가화합물이 원형(template) 기능에 손상을 줌으로써 코딩 착오를 유발하고 그 결과 변이가 확대된다. 촉진은 개시가 일어난 후에만 종양을 유발시킬 수 있으며 이때 두 과정 사이에 기간이 오래 경과하여도 무방하다. 촉진 과정은 종양 촉진제를 반복 투여함으로써 유도되며 대표적으로

12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (이하 TPA로 약함) 와 phenobarbital 등이 알려져 있다. 이는 비발암성 물질로서 개시제에 의해 변형된 세포에 선택적인 증식을 일으킨다<sup>7</sup>. TPA의 경우 세포막에 있는 특이한 수용체와 선택적으로 결합하여 protein kinase C의 활성도를 증대시킴으로써 생화학적 변화를 유발한다. 또한 개시제를 전처치한 후 도포하면 표피분화는 일어나지 않으나 세포의 증식은 더욱 빨라진다.

EC는 발암작용이 있다는 사실이 밝혀져 큰 충격과 함께 관심의 대상이 되는 물질이다. 이는 알코올(소주, 과실주)과 발효 식품 등에 소량 함유되어 있으며 과거 백혈병 치료제로 사용된 바 있다. 일본의 경우 1950~1975년에 마취제로 사용되어 사회적인 문제가 되고 있다<sup>8</sup>. 실험적으로 설치류의 내부장기에서 종양발생이 보고되었으며 여러 가지 동물에서 간암, 폐암, 백혈병, 부신암 및 피부암과 같은 종양을 일으켰다. 최근 연구에 따르면 EC는 쥐의 간에서 산화되어 vinyl carbamate epoxide (이하 VCO로 약함)로 대사되면 EC보다 더욱 강력한 발암능력을 나타낸다고 하였다. VCO는 최근에 합성된 물질로서 ethyl carbamate와 vinyl carbamate에 비하여 CD-1 생쥐의 피부와 B6C3F1 생쥐의 간 종양발생이 10-50배 정도 높은 것으로 알려져 있다<sup>9,12</sup>.

피부는 외부의 환경과 항상 접하고 있는 기관으로서 주된 기능은 보호장벽, 체온조절, 감각, 분비와 배설, 흡수, 영양소 저장, 비타민 D 형성 등이 있다. 특히 피부의 가장 바깥층에 위치하여 장벽역할의 기능을 담당하는 각질층은 단백질로 이루어진 각질세포와 소수성 지질이 풍부한 각질세포간 지질로 구성되어 있다. 각질세포의 캐라틴은 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공한다. 층상구조의 지질은 세라마이드, 콜레스테롤, 지방산을 함유하며

서로 직선상의 구조를 가짐으로서 장벽역할을 담당한다. 각질세포간 지질을 구성하는 세라미이드, 콜레스테롤, 지방산은 충판소체의 분비에 의해 형성된다<sup>13</sup>. 충판소체의 분비는 표피로부터 지질합성이 증가함으로써 유지되고 새로 보충되며<sup>14</sup>, 이러한 표피층의 지질생성은 피부장벽의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하게 된다.

피부장벽의 손상시 나타나는 일련의 회복과정을 관찰한 연구들에 의하면 다양한 이온들이 피부장벽과 연관이 있음이 증명되었다. 특히 칼슘이온은 피부의 항상성, 분화 및 증식에 관여한다<sup>15-17</sup>. 칼슘이온 농도는 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에서 가장 높다. 즉 낮은 농도의 칼슘이온은 기저층에서 세포의 증식을, 높은 농도의 칼슘이온은 과립층의 세포분화와 연관된다. 피부장벽 손상은 표피의 상부에 있는 칼슘이온의 소실을 가져오고 결국 표피내 칼슘 기울기는 소실된다. 그러나 현재까지 종양 병변에서 지질과 칼슘 변화에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 VCO를 생쥐의 피부에 전처치한 후 TPA를 장기간 도포하여 유발된 피부종양의 종류와 종양발생의 시차적 관찰 및 발생빈도 등을 비교조사 하였다. 또한 종양과 비종양 병변에서 표피지질 및 칼슘의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

실험 동물은 체중 25g 내외의 무모 생쥐를 사용하였으며, 이들은 모두 시판 혼합사료를 이용하였고 동일한 조건에서 실험하였다.

### 2. 방법

#### 1) 실험군과 약물도포

실험 동물은 다음과 같은 군으로 구분하였다.

\*대조군..... 10마리

\*실험군..... TPA도포군..... 50마리

VCO와 TPA 도포군..... 50마리

개시제는 15%의 dimethylsulfoxide가 함유된 아세톤 용액 0.2ml에 VCO를 녹여 5.8 μmol이 되도록 하였다. 상기 약물을 VCO와 TPA 도포군에 주 2회씩(0.2 ml) 배부에 5주간 바른 후 TPA (0.2 ml 아세톤에 15 nmol TPA 용액, Sigma, St. Louis, U.S.A)를 40주간 도포하였다. TPA 도포군은 개시제를 전처치 하지 않고 TPA만 단독으로 40주간 도포하였다. 대조군의 경우 아세톤을 단독 도포하였다.

#### 2) 육안 및 병리조직학적 검사

희생시킨 동물의 약물 도포부위에서 피부병변의 모양,

종양의 크기 및 개수에 대하여 매주 마다 육안 조사하였다. 약물 도포 부위의 피부를 절제하여 통상의 조직 표본 제작에 따라 포르밀린에 고정, 수세 및 파라핀 포매과정을 거쳐 2 μm의 연속절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 시행한 후 광학현미경 하에서 표피증식 정도, 이형성증, 과작화증, 양성 및 악성 종양의 발생에 대해 조사하였다.

### 3. 전자현미경 검사

#### 1) Osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ), Ruthenium tetroxide ( $\text{RuO}_4$ ) 후 고정법

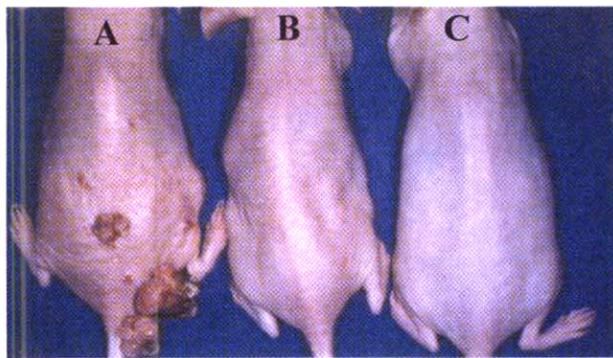
조직을 얻은 즉시 편광현미경 하에서 두께 1mm 이하로 세절한 후 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1M sodium cacodylate 완충제 pH 7.4로 조성된 modified Karnovsky 용액에 넣어 고정하였다. 고정된 조직은 실온에서 1시간 동안 방치한 후 18-24시간 동안 4°C 냉장고에 보관하였다. Karnovsky 용액을 제거한 후 0.1M cacodylate 완충제로 40분씩 3회 세척하였다. 이후 후고정을 각각 최종 농도 0.25%  $\text{RuO}_4$ , 0.1M cacodylate 완충제 용액에 빛을 차단한 상태로 실온에서 45분간 시행하였다. 후고정 후 0.1M cacodylate 완충제에서 10분간 1회 세척한 후 50% ethanol로 5분씩 2회, 70%와 95% ethanol로 각 10분씩 2회, 100% ethanol로 각 20분씩 4회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide로 각 15분간 2회 조직에 침투시키고 통상적인 방법으로 만들어진 epon에 침수시켜서 36시간 동안 78°C 배양기에서 수지를 중합시킨 후 1-5mm 두께로 절편을 만들고 다시 박편한 후 통상적인 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

#### 2) Calcium ion-capture cytochemical 쳐치

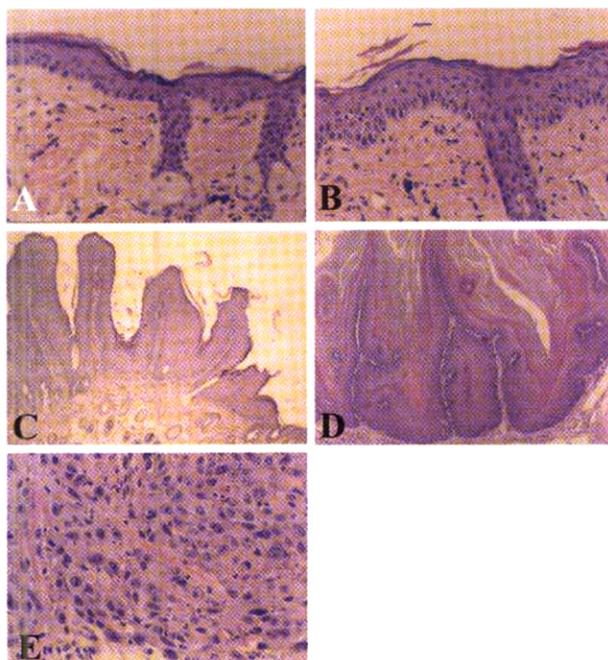
조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate (Sigma, St. Louis, U.S.A), 1.4% sucrose로 조성된 고정액에 조직을 고정한 후 stereomicroscope 하에서 냉고정액 1방울을 점적 후 0.5mm<sup>3</sup>로 세절하여 얼음 조각 위에서 하룻밤 동안 고정하였다. 고정액을 버리고 1 ml 4%  $\text{OsO}_4$ 와 3 ml 2% potassium pyroantimonate stock용액이 혼합된 후고정액으로 얼음 위에서 2시간 후 고정하였다. KOH로 pH 10으로 조절된 냉증류수에 10분 세수한 후 통상적인 방법으로 탈수, 침수하고 염색하였다. 이때 대조표본으로 10 mM EDTA에서 30분간 항온 배양하였다. 이렇게 준비된 표본은 투과 전자현미경에서 표피의 전층을 관찰하였다.

### 4. 유세포 측정

TPA 도포군과 유두종 각각 10례, 대조군과 각화극세포



**Fig. 1.** Skin tumors were developed in the group of VCO-TPA application (A). But any skin tumors were not developed in TPA (B) and acetone treated (control, C) group.

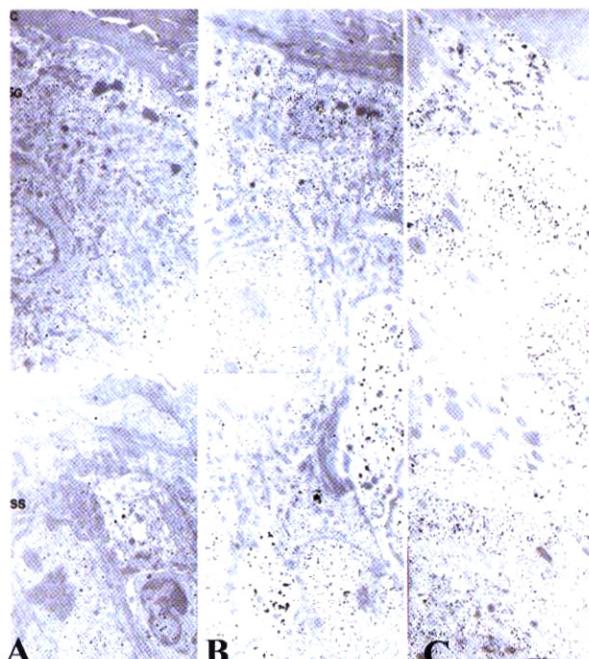


**Fig. 3.** Histopathologic finding of normal looking skin of acetone treated (control) group (A), TPA treated group (B) of 30 weeks, papilloma (C), keratoacanthoma (D) and squamous cell carcinoma (E)

종 각각 5례, 편평세포암 3례를 대상으로 하였다. 파라핀 괴에서 종양의 중심부를 50 $\mu$ m의 두께로 2~3장 잘라 사용하였다. 먼저 histoclear를 이용하여 파라핀을 제거하고 100%, 95%, 70%, 및 50% 에탄올에 단계적으로 처리하여 재수화 시켰다. 재수화의 마지막 단계로 증류수에 한시간 정도 방치하였다. 이후 0.5% pepsin용액을 첨가하여 37°C에서 한 시간 방치하여 단일세포 부유액을 얻어내었다. 이러한 조작으로 얻어낸 단일 세포 부유액은 phosphate buffered 끝 saline (PBS, pH 7.2)으로 세척한 후 세포 수를

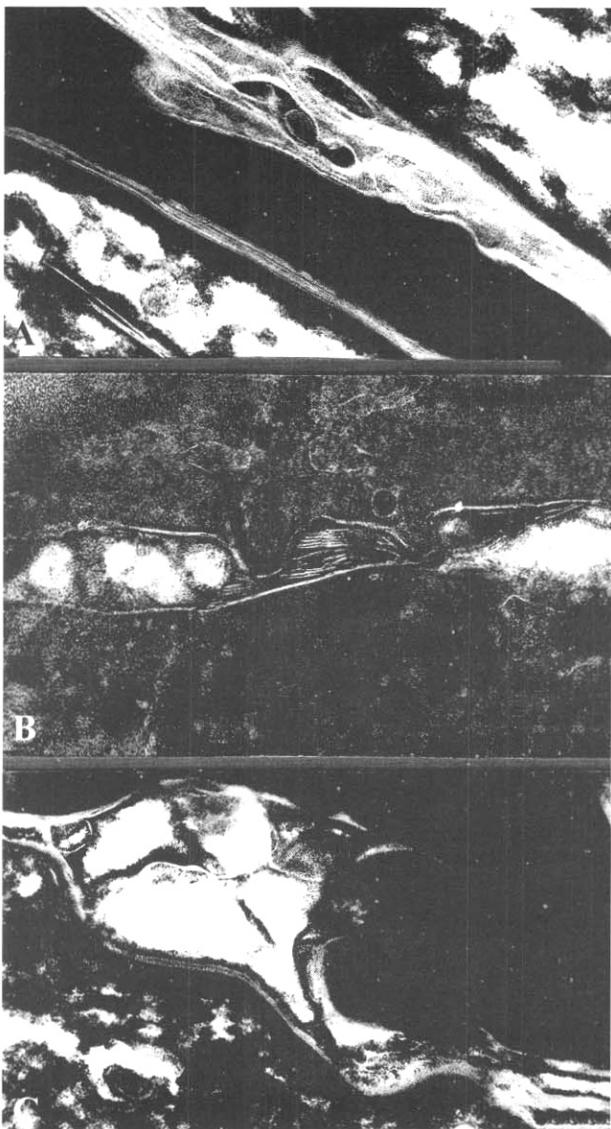


**Fig. 2.** Gross finding of papilloma (A), keratoacanthoma (B) and squamous cell carcinoma (C) The number and size of lesion were increased in relation to the duration of TPA application after initiation with VCO.



**Fig. 4.** The changes of epidermal calcium gradient. The epidermis treated only with acetone (control group) showed normal calcium gradient (A). However the epidermis treated with TPA (B) and papilloma (C) showed increased calcium ions within whole epidermis including stratum corneum (SC: stratum corneum, SG: stratum granulosum, SS: stratum spinosum).

108 세포/ml 정도로 조정하였다. Propidium iodide 용액을 첨가하여 염색하고 RNAase를 사용하여 RNA를 제거하였

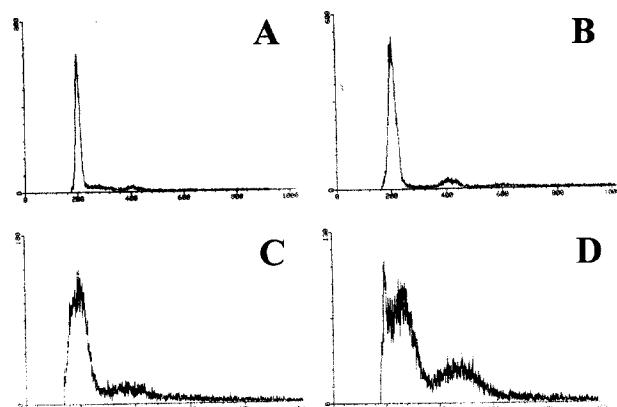


**Fig. 5.** The changes of stratum corneum lipid layers. The stratum corneum intercellular lipid layers of acetone treated (control) group (A) showed relatively normal in appearance. TPA treated group (B) and papilloma (C) showed remarkable changes including wide separation, incomplete lipid bilayer and dilatation of intercellular space.

다. 염색이난 후 세포부유액은 나일론 망으로 거른 후 분석에 들어갔다. 본 연구에 사용된 기계는 FACStar (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, U.S.A.)로 488nm의 파장을 발산하는 아르곤을 갖추고 있다.

## 결 과

### 1. 피부병변의 육안 소견



**Fig. 6.** The results of DNA histogram of acetone treated(control) group (A), papilloma (B), keratoacanthoma (C) and squamous cell carcinoma (D). Control group and papilloma specimens showed diploid pattern but keratoacanthoma and squamous cell carcinoma specimen showed an aneuploidy.

약물 도포 8주 후에 피부색 또는 얇은 홍반성 구진(직경 1~2 mm)이 VCO와 TPA 도포군에서 처음 발생하였다. 유두종 발생 수의 평균은 TPA 도포기간이 길어질수록 증가하였는데 8주 이후부터 실험종료 40주까지 VCO와 TPA 도포군과 대조군 및 TPA 도포군 사이에서 통계적 의의가 있었다( $p<0.05$ ). 한편 대조군과 TPA 도포군은 유두종이 발생하지 않았다(Fig. 1). 유두종의 크기 또한 TPA를 지속적으로 도포함에 따라 증가하였으나 통계적인 차이는 없었다. 각화극세포종과 편평세포암은 VCO와 TPA 도포군에서 각각 33주와 39주부터 발생하였으나 기타의 군은 전혀 발생되지 않았다. 편평세포암의 경우 총 5개가 발생하였고 평균 크기는 5 mm이었다. 각화극세포종은 총 9개가 발생하였는데 크기는 편평세포암과 유사하였다. 육안소견상 과각화성 구진의 형태를 보였고 기저부는 유경성의 양상을 띠었다(Fig. 2).

### 2. 종양의 발생, 개수, 종류 및 시기

개시제(VCO)와 촉진제(TPA)를 도포한 군은 종양이 발생하였으나 아세톤, 촉진제 만을 단독으로 도포한 군은 종양이 발생하지 않았다. 즉, 유두종은 8주, 각화극세포종은 33주, 편평세포암은 39주 경에 발생하였다. 유두종의 평균 발생 개수는 마리당 3.2개 였으며 각화종은 3마리에서 총 9개, 편평세포암은 5마리에서 각각 1개씩 발생하였다.

### 3. 병리조직학적 변화

H&E 염색소견상 촉진제 단독도포군은 대조군에 비해 표피가 2배 이상 두꺼워졌으나 이형성 및 이상각화소견은 관찰되지 않았다. 편평세포암은 각화극세포종, 유두종

과 유사한 표피변화를 동반하였으나 진주형성, 이상각화증, 이형성 등의 소견이 더욱 현저하였다(Fig. 3).

#### 4. 칼슘 기울기

대조군의 경우 비교적 정상적인 소견을 보였으나, TPA 도포군은 비정상적인 양상을 보였다. 종양 병변의 경우 칼슘 이온의 침착과 분포 정도는 표피 전층에 걸쳐 전반적으로 증가한 양상을 나타내었다. 종양 병변의 경우 편평세포암, 각화극세포종, 유두종에서 매우 유사한 양상을 보였다(Fig. 4).

#### 5. 지질의 변화

대조군에 비하여 TPA 도포군과 종양 발생 병변은 지질막 구조의 단락, 불완전한 이중막, 각질세포 간격의 확대 및 lacunae 형성이 더욱 현저하였다. 지질변화의 정도는 종양병변, TPA 도포군, 대조군의 순이었다(Fig. 5).

#### 6. 유세포 측정소견

각 군의 DNA histogram 분석결과 대조군, TPA 도포군, 유두종의 모든 예에서 이배수체 양상을 보였다. 그러나 각화극세포종 5례 중 1례, 편평세포암 3례 중 3례에서 비배수체(aneuploidy)를 나타내었다(Fig. 6). 평균 증식지수는 편평세포암과 각화극세포종에서 28.8과 28.1로서 유두종과 대조군에 비해 현저한 증가를 보였다.

### 고 찰

1918년 Yumagiwa와 Ichikawa<sup>18</sup>는 토끼의 귀에 콜타르를 도포하여 피부종양을 실험적으로 처음 유발시켰다. 이후 여러 연구자들이 쥐, 토끼, 햄스터 및 기니피 등에서 다양한 종양발생을 보고하였다. 현재까지 보고된 피부암은 유두종, 각화극세포종, 기저세포암, 악성 흑색종, 편평세포암, 피지선암 및 표피낭종 등 매우 다양하다. 이들은 실험에 사용된 동물의 종류와 발암물질에 따라 상이한 양상을 보인다<sup>1,2</sup>. 즉 햄스터는 DMBA와 TPA 도포시 유두종 외에 각화극세포종과 편평세포암 및 악성 흑색종이 호발하나 생쥐와 쥐는 유두종, 편평세포암, 기저세포암 및 피지선암이 생긴다. Benzo[a]pyrene과 DMBA 도포시 SENCAR 생쥐는 CD-1 생쥐보다 각각 2~3배, 10~20배 정도 민감하여 종양발생 정도에 큰 차이를 나타낸다. 사용된 발암 물질의 농도 또한 실험 결과에 영향을 준다. 생쥐에서 15주 이내의 유두종 발생율을 보면 DMBA 0.1 nmol 도포시 20%이나 100nmol은 100%에서 유도된다. 악성 종양의 발생의 경우 전자는 5%이나 후자의 경우 100%이다. 그 외에 발암물질의 투여방법에 따른 차이도 있는데 복강내 주사나 경구투여시 피부도포보다 종양발

생이 2~3배 정도로 높다<sup>1,3</sup>.

본 실험에 사용된 EC는 발효주와 발효음식 및 담배연기에 소량 함유되어 있으며 발암능력이 있다는 사실이 밝혀졌다<sup>9,10</sup>. 과거 최면제와 백혈병 치료제로 사용되었고 1950년부터 70년 초반까지 일본에서는 마취제로 널리 이용되었다<sup>8</sup>. 실험적으로 EC와 그 대사산물은 설치류의 내부장기에 종양을 유발시키며 그 외 다양한 동물에서 간, 폐, 부신, 유선 및 타액선의 암이 보고되었다. 또한 피부에서도 종양이 잘 생기는 것으로 알려져 있다. 최근 보고에 의하면 EC는 생쥐의 간에서 산화하여 VC로 변하고 다시 VCO로 대사되면 EC보다 10~50배 정도 강력한 발암력을 나타낸다고 하였다<sup>9,12,18</sup>.

한 등<sup>19</sup>이 시행한 DMBA와 TPA 도포의 경우 유두종은 3.5주에 발생하였다. 편평세포암은 대부분 50주 내에 8~10%의 발생 빈도를 보였다. 본 실험의 경우 유두종은 8주 경에 나타났다. 그러나 각화극세포종과 편평세포암은 33, 39주에 발생하여 기존의 보고에 비해 조기에 발생하였다. 이는 실험동물의 종류, 발암물질의 종류 및 실험방법에 따라 달라진다는 것을 의미한다.

대표적인 촉진제는 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)이다. TPA는 비발암성 물질로서 개시제에 의해 변형된 세포에 선택적인 증식을 유발한다. 특히, 세포막에 존재하는 특이한 수용체와 선택적으로 결합하여 protein kinase C의 활성도를 증대시키므로써 생화학적인 변화를 유발시킨다<sup>7</sup>. 또한 개시제를 전처치한 다음 TPA를 도포하면 표피분화는 일어나지 않으나 세포의 증식을 더욱 빠르게 유도한다.

피부는 외부의 환경과 항상 접하고 있는 기관으로서 주된 기능은 보호장벽, 체온조절, 감각, 분비와 배설, 흡수, 영양소 저장, 비타민 D 형성 등이 있다<sup>20</sup>. 특히 피부의 가장 바깥층에 위치하며 장벽역할의 기능을 담당하는 각질층은 단백질로 이루어진 각질세포와 소수성 지질이 풍부한 각질세포간 지질로 구성되어 있다<sup>21,22</sup>. 각질세포의 케라틴은 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공한다. 층상구조의 지질은 세라마이드, 콜레스테롤, 지방산을 함유하며 서로 직선상의 구조를 가짐으로써 장벽역할을 담당한다. 각질세포간 지질을 구성하는 세라마이드, 콜레스테롤, 지방산은 층판소체의 분비에 의해 형성된다. 층판소체의 분비는 표피로부터 지질합성이 증가함으로써 유지되고 새로 보충되며, 이러한 표피층의 지질생성은 피부장벽의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하게 된다<sup>23</sup>.

각질세포간 지질은 자체적으로 표피 내에서 합성되며 층판소체 내에 있다가 각질층의 최하부에서 각질형성세포가 각질화하기 전에 세포외 유출에 의해 세포간 공간으로 방출된다. 층판소체는 유극층과 과립층에서 합성되며 glycosphingolipid, 인지질, 콜레스테롤과 가수분해효소

가 풍부하다. 각질층의 지질은 세라마이드(45%), 콜레스테롤(25%), 지방산(15%)으로 이루어져 있고 각각 2~3%의 sphingosine, cholesterol sulfate, cholesterol esters, triglycerides로 구성되어 있으며 아주 미미한 양의 인지질과 당지질을 함유하고 있다. 이러한 각질층의 지질은 각질층 하부의 세포사이 응집력을 제공하며 이와 관련하여 각질세포 탈락에도 관여한다. 또한 수분과 이온의 소실에 대한 투과장벽으로서의 역할도 수행한다. 이러한 투과장벽기능을 수행하는데 있어서 피부 투과성의 차이는 각질층의 두께나 수보다는 지질의 양적인 차이에 의하여 더 많은 영향을 받게 된다고 알려져 있다<sup>24,25</sup>. 이 연구의 경우 종양성 병변은 세포간 지질이 분절되어 있고 세포간 간격도 넓어져 있음을 관찰하였다. 또한 OsO<sub>4</sub> 염색을 이용한 전자현미경 소견상 충판소체의 숫자 및 밀도가 감소되어 있었고 내용물이 없이 비어있는 비정상적인 충판소체도 관찰되었다. 과립층과 각질층 사이 공간으로 분비된 충판소체의 양도 현저하게 감소되었다.

피부장벽의 손상에 의한 일련의 회복과정은 다양한 이온들이 피부장벽과 연관되어 있음이 증명되었다<sup>26-30</sup>. 칼슘이온 농도는 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에서 가장 높다. 즉 낮은 농도의 칼슘이온은 기저층에서 세포증식을, 높은 농도의 칼슘이온은 과립층의 세포분화와 연관된다. 피부장벽 손상은 표피의 상부에 있는 칼슘이온의 손실을 가져오고 결국 표피내 칼슘 기울기는 소실된다<sup>31,32</sup>. 이때 칼슘기울기의 소실은 피부장벽 손상에 의한 TEWL의 증가, 즉 표피내 수분이동의 증가에 의한 파동적인 칼슘이온의 손실에 의한다. 피부장벽 손상 후 고농도의 칼슘이온 용액에 담가서 인위적으로 칼슘기울기를 만들어 주면 피부장벽의 회복이 지연되므로, 칼슘이온은 피부장벽 회복의 과정에 중요한 역할을 하는 것이 분명하다<sup>33-35</sup>. Lee 등<sup>36</sup>은 피부장벽에 손상을 주지 않고 칼슘기울기를 변화시킬 수 있는 이온영동을 이용한 연구에서 피부장벽 손상 없이 유발된 칼슘기울기의 소실이 충판소체의 분비를 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 황 등<sup>37</sup>은 칼슘이온의 변화가 케라틴과 각질세포외막(cornified cell envelope) 단백질의 발현에 변화를 가져오는 것으로 보아 칼슘이온이 각질세포의 말기분화에 중요한 역할을 수행한다고 하였다.

현재까지 종양성 병변에서 칼슘의 분포, 역할에 대한 연구조사는 거의 없는 실정이다. 본 실험의 경우 종양성 병변은 비종양성 병변에 비하여 칼슘기울기의 소실, 칼슘분포가 더욱 현저하였다.

유세포분석은 세포 혹은 핵 내의 DNA 양과 세포주기별 측정이 가능하다. 특히, 혈액종양, 폐암, 방광암, 전립선암, 뇌종양 및 유방암 분야에서 많은 연구가 이루어졌다<sup>38-40</sup>. Barlogie 등<sup>38</sup>은 7명의 악성 흑색종, 4명의 유방암,

3명의 폐암, 3명의 림프종 및 9명의 기타 종양 환자에서 얻은 78개의 조직을 이용하여 DNA 분석을 시행한 결과 1례의 유방암과 대장암을 제외한 모든 종양에서 비배수체가 관찰되었다. Newton 등<sup>41</sup>은 피부의 기저세포암과 편평세포암에서 유세포분석을 시행한 결과 비배수체가 흔히 나타났다고 하였다. 이 연구 조사결과 비배수체를 보인 각화극세포종 1예 및 편평세포암을 제외하고 모든 조직에서 이배수체 양상을 나타내었다. 이는 심한 이형성이나 악성 종양 발생시에도 염색체의 숫자 이상이 잘 생기지 않음을 시사하였다. 그러나 종식지수와 S기 분획은 대조군보다 각화극세포종과 편평세포암의 경우 의미있게 증가함을 보였다. 이는 조직학적 소견상 표피층이 비후된 곳이나 크고 농염된 핵 또는 세포분열을 보이는 세포들이 다수 관찰되는 것과 연관이 있는 것으로 생각된다.

## 결 론

VCO를 생쥐의 피부에 전처치 한 후 TPA를 장기간 도포하여 유발된 종양성 병변에서 표피지질과 칼슘의 변화를 비교 조사한 결과는 다음과 같다

1. 표피지질의 변화는 종양성 병변이 비종양성 병변에 비하여 지질막 구조의 단락, 불완전한 이중막, 열공 형성이 더욱 현저하였다.

2. 칼슘 변화는 종양성 병변이 비종양성 병변에 비하여 표피 전층에 걸쳐 전반적으로 증가된 양상을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 종양 병변의 경우 각질세포간 지질막의 변화 및 표피내 칼슘이온의 분포가 비종양 병변과 비교하였을 때 현저한 차이를 나타내었다. 종양성 병변은 p53, 랑개르ハン스 세포, 표피증식증, DNA 변화 등과 밀접한 연관성을 보이므로 각질세포간 지질의 변화와 표피내 칼슘의 변화는 피부종양형성 과정에서 중요한 요인으로 작용할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Yuspa SH. Cutaneous chemical carcinogenesis. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:1031-1044
- Bicker DR, Lowy DR. Carcinogenesis: a fifty-year historical perspective. *J Invest Dermatol* 1989;92:121-131
- Stenback F. Characteristics of neoplastic progression and tumor behavior in skin carcinogenesis by different methods: an experimental study. *Oncology* 1980;37:163-168
- Fossa AA, Baird WM, Carlson GP. Distribution of urethane and its binding to DNA, RNA and protein in SENCAR and BALB/c mice following oral and dermal administration. *J Toxicol Environ Health* 1985;15:635-654

5. Park KK, Surh YJ, Stewart BC, Miller JA. Synthesis and properties of vinyl carbamate epoxide, a possible ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;29:169:1094-1098
6. Park KK, Liem A, Stewart BC, Miller JA. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis* 1999;14: 441-450
7. Raick AN, Thumm K, Chivers BR. Early effect of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on the incorporation of tritiated precursor into DNA and the thickness of the interfollicular epidermis and their relation to tumor promotion in mouse skin. *Cancer Res* 1972;32:1562-1568
8. Ough CS. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. *J Agric Food Chem* 1976;24:323-328
9. Hennings H, Michael D, Patterson E. Enhancement of skin tumorigenesis by a single application of croton oil before or soon after initiation by urethane. *Cancer Res* 1973;33:3130-3134
10. Miller JA. The need for epidemiological studies of the medical exposures of Japanese patients to the carcinogen ethyl carbamate (urethane) from 1950 to 1975. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:1323-1324
11. Dahl GA, Miller JA, Miller EC. Vinyl carbamate as a promutagen and a more carcinogenic analog of ethyl carbamate. *Cancer Res* 1978;38:3793-3804
12. Dahl GA, Miller EC, Miller JA. Comparative carcinogeneities and mutagenecities of vinyl carbamate, ethyl carbamate and ethyl N-hydroxy carbamate. *Cancer Res* 1980;40:1194-1203
13. Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 1991;24:57-82
14. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992;98:279-289
15. 황상민, 안성구, 이승현. 표피 칼슘기울기 변화가 각 질형성세포의 분화에 미치는 영향. *대피지* 2001;39: 389-401
16. Lee SH, Choi EH, Feingold KR, Jiang S, Ahn SK. Iontophoresis itself on the hairless mouse skin induces the loss of the epidermal calcium gradient without skin barrier impairment. *J Invest Dermatol* 1998;111:39-43
17. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Man MQ, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
18. Yamagiwa K, Ichikawa K. Experimental study of pathogenesis of carcinoma. *J Cancer Res* 1918;3:1-29
19. 한창숙, 박영년, 이광길, 최인준. 7,12-dimethylbenzanthracene으로 유발된 생쥐 표피의 증식성 변화와 Langehans 세포 수의 변동. *대한병리학회지* 1993;27:590-604
20. Grubauer G, Elias PM, Feingold KR. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res* 1989;30:323-333
21. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1-26
22. Downing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 1992;33:301-313
23. Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 1991;24:57-82
24. Proksch E, Feingold KR, Elias PM. Epidermal HMG-CoA reductase activity in essential fatty acid deficiency: barrier requirements rather than eicosanoid generation regulate cholesterol synthesis. *J Invest Dermatol* 1992;99: 216-220
25. Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 1991;87:1668-1673
26. Menon GK, Gayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 1985;84: 508-512
27. 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
28. 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
29. 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
30. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Qiang M, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
31. Menon GK, Price LF, Bommanan B, Elias PM, Fein-

- gold KR. Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J Invest Dermatol* 1994;102:789-795
32. Menon GK, Price LF, Bommanan B, Elias PM, Feingold KR. Selective obliteration of epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J Invest Dermatol* 1994;102:789-795
33. 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
34. Elias PM, Ahn SK, Brown BE, Crumrine D, Feingold KR. Origin of the epidermal calcium gradient: Regulation by barrier status and role of active vs passive mechanism. *J Invest Dermatol* 2002;119:1296-1274
35. Ahn SK, Whang SM, Jiang SJ, Choi EH, Lee SH. The changes of epidermal calcium gradient and transitional cells after prolonged occlusion following tape stripping in the murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1999;113: 189-195
36. Lee SH, Choi EH, Feingold KR, Jiang SK, 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
37. 황상민, 안성구, 이승현. 표피 칼슘 기울기 변화가 각질형성세포의 분화에 미치는 영향. *대피지* 2001;39: 389-401
38. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983;43:3982-3997
39. Herzberg AJ, Kerns BJ, Pollack SV, Kinney RB. DNA image cytometry of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 1991;97:495-500
40. Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O. DNA content in human cancer. Application in pathology and clinical medicine. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:619-626
41. Newton JA, Camplejohn RS, McGibbon DH. A flow cytometric study of the significance of DNA aneuploidy in cutaneous lesions. *Br J Dermatol* 1987;117:169-174