

급성 피부장벽 손상 후  
회복에 대한  
Protein Kinase C의 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김희성

급성 피부장벽 손상 후  
회복에 대한  
Protein Kinase C의 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김희성

급성 피부장벽 손상 후  
회복에 대한  
Protein Kinase C의 영향

지도 이 승 현 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 희 성

# 김희성의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성하기까지 학문에 대한 올바른 자세를 일깨워 주시고 모든 방면에서 지도를 아끼지 않으신 은사 이승현 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에도 많은 조언과 교정의 노고로 격려해주신 이민걸 교수님, 유욱 교수님, 서정택 교수님, 김혜영 교수님께 깊이 감사를 드립니다. 연구진행중에 여러 가지 많은 도움을 주신 정세규 선생님과 피부과 학교실 여러분께도 감사의 마음을 전합니다.

그리고 부족한 저를 끝없는 사랑으로 보살피 주시고 지원해주신 양가 부모님에게 감사와 기쁨을 드립니다. 늘 곁에서 사랑과 격려로써 힘이 되어준 남편과 저의 아들 덕형에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

# 차 례

그림 차례	
국문요약-----	1
I. 서론-----	3
II. 재료 및 방법-----	8
1. 실험재료 -----	8
2. 실험방법 -----	8
가. 급성피부장벽 손상 -----	8
나. PKC 억제제의 피부 도포 -----	9
다. Western blot -----	9
라. 면역조직화학염색 -----	11
마. 전자현미경 분석 -----	12
(1) RuO <sub>4</sub> 후고정 -----	12
(2) Calcium ion capture cytochemistry ----	12
바. Intracellular Ca <sup>2+</sup> 의 측정 -----	13
사. Statistical analysis -----	14
III. 결과 -----	15
1. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리하였을 때 피부장벽 회복율의 변화 -----	15
2. 급성 피부장벽 손상 후 Western blot으로 확인한 PKC 단백질의 발현 -----	17
3. 급성 피부장벽 손상 후 면역조직화학염색법으로 확인한 PKC 단백질의 발현 -----	18
4. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리했을 때 Nile red 염색상 각질층의 지질의 변화 -----	19
5. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리했을 때 전자현미경 검사상 각질층의 지질의 변화 -----	21

6. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리했을 때 표피 내 칼슘 기울기의 변화 -----	23
7. PKC 억제제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향 -----	25
8. PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향 -----	27
9. 급성 피부장벽 손상 후 회복에 PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 미치는 영향 -----	28
IV. 고찰 -----	29
V. 결론 -----	36
참고문헌 -----	38
영문요약 -----	45

## 그림 차례

그림 1. 급성 피부장벽 손상 후 회복에 PKC 억제제가 미치는 영향 -----16

그림 2. 급성 피부장벽 손상 후 Western blot상 발현된 PKC 단백질 -----17

그림 3. 급성 피부장벽 손상 후 면역조직화학염색상 발현된 PKC 단백질 -----18

그림 4. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제가 각질층 내 중성 지질에 미치는 영향-----20

그림 5. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제가 층판소체와 각질세포간 지질의 구조에 미치는 영향 ----22

그림 6. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제가 표피 내 칼슘 기울기에 미치는 영향 -----24

그림 7. PKC 억제제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향 ----- 26

그림 8. PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향 -- 27

그림 9. 급성 피부장벽 손상 후 회복에 PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 미치는 영향 ----- 28



## 국문요약

### 급성 피부장벽 손상 후 회복에 대한 Protein Kinase C의 영향

피부는 생물체와 외부 환경 사이에 존재하는 물리적, 화학적, 기계적, 미생물 방어 장벽으로서 외부로의 과도한 수분과 전해질의 손실을 억제하고, 다양한 외부의 공격으로부터 인체를 보호하는 장벽 기능을 수행한다. 이러한 장벽 기능은 주로 피부 표피층 최외각의 각질층에 의하여 수행되며, 특히 각질세포 사이에 존재하는 각질세포간 지질은 표피 내 투과장벽 기능의 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 각질세포간 지질의 공급은 주로 표피 과립층에 있는 층판소체가 과립층과 각질층의 경계 부위에서 세포 외 유출작용을 통하여 분비되면서 이루어진다. 피부에는 표피 내 칼슘 기온기가 존재하며, 칼슘 이온은 피부장벽 기능의 항상성 유지에 매우 중요한 신호전달 인자로 작용한다. 각질형성세포의 증식과 분화에 있어 핵심적인 역할을 수행하는 효소인 protein kinase C (PKC)는 serine/threonine kinase 에 속하는 효소로서 각질형성세포를 포함한 많은 종류의 세포에서 다양한 세포 내 반응을 조절한다. 각질형성세포의 분화 과정에서 칼슘에 의한 PKC의 활성화는 involucrin, loricrin, filaggrin 등과 같은 분화 단백질의 발현에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 배양된 각질형성 세포에서 PKC의 활성화가 각질세포간 지질 성분중 하나인 세라마이드(ceramide)의 합성에 관여하는 효소의 활성화와 연관되어 있다는 보고가 있으나 아직까지 PKC와 피부장벽 기능간의 연관성에 대한 연구는 이루어진 바 없다. 본 연구에서는 무모 생쥐의 동물실험 모델을 이용하여 PKC가 피부장벽의 회복에 미치는 영향을 관찰하였다. 이를 위하여 반복적인 테이프 스트리핑 방법을 이용하여 8-12 주의 무모 생쥐의 피부장벽을 급성 손상시킨 후 Western

blot과 면역조직화학염색을 시행하여 피부에서의 PKC 단백질 발현 양상을 관찰하였다. 또한 피부장벽을 급성 손상시킨 후 PKC 억제제를 도포하여 피부장벽의 회복율을 측정하고, 각질층내 지질의 변화를 관찰하였으며, 이들 억제제가 표피 내 칼슘 기울기에 미치는 영향을 관찰하였다. 이와 함께 배양된 각질형성세포에 PKC 억제제를 처리하여 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화를 측정하였다. 실험 결과, 표피에서 PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$ 의 발현을 관찰할 수 있었다. PKC 억제제를 도포한 피부에서 급성 손상 후 피부장벽의 회복율이 저하되었으며, 충관소체의 분비가 억제되고 각질층의 지질구조의 변형이 나타나는 것을 관찰하였다. 또한, PKC 억제제가 피부장벽 손상 후 나타나는 정상적인 표피 내 칼슘 기울기의 소실을 억제하였고, 배양된 각질형성세포에서 세포 내 칼슘 이온의 농도를 증가시켰다. 이러한 세포 내 칼슘 이온의 증가는 칼슘 통로 차단제에 의하여 억제되었다. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제만을 처리한 경우 피부장벽의 회복이 저해되었으나, 칼슘 통로 차단제를 함께 도포한 후에는 피부장벽 회복의 저해가 억제되었다. 결론적으로 PKC 억제제는 과립 세포 내의 칼슘의 농도를 증가시켜, 급성 피부장벽 손상 후 나타나는 피부장벽의 회복 과정을 억제한다. 그러므로 PKC의 각 아형별 역할은 알 수 없으나 일부 아형이 세포 내로의 칼슘 이동에 영향을 미쳐 피부장벽 기능의 급성 손상 후 회복 과정에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.



핵심되는 말 : 피부장벽, Protein kinase C, 칼슘

# 급성 피부장벽 손상 후 회복에 대한 Protein Kinase C의 영향

<지도교수 이 승헌 교수>

연세대학교 대학원 의과학과

## 김 희 성

### I. 서 론

피부는 외부의 환경과 항상 접하고 있는 기관으로서 일차적으로 물리적인 장벽 기능을 수행한다. 표피의 각질층은 외부로의 수분과 전해질의 손실을 억제함으로써 피부의 건조를 막고, 피부의 정상적인 생화학적 대사를 할 수 있는 환경을 제공한다. 그리고 외부의 물리적 손상과 화학물질로부터 인체를 보호하고, 세균, 곰팡이, 바이러스 등이 피부로 침범하는 것을 방지한다. 그러므로 각질층은 피부의 가장 바깥층에 위치해 있으면서 피부장벽에 있어서 가장 중요한 역할을 하고 있다<sup>1,2,3</sup>. 피부장벽은 각질층에서의 경표피 수분손실(trans epidermal water loss, TEWL)과 피부를 통한 약물 전달을 제어하는 역할을 한다<sup>4</sup>. 각질층은 각질세포와 각질세포간 지질로 이루어져 있으며, 각질세포간 지질은 과립층(stratum granulosum)에 존재하는 각질형성세포에서 형성된 층판소체(lamellar body)가 과립층과 각질층의 경계부위로 세포 외 유출(exocytosis)을 통하여 배출된 후, 세포 외 변환(extracellular processing)을 거쳐 생성된다. 피부장벽기능의 이상은 건선, 아토피 피부염, 건성습진, 주부습진 등과 같은 매우 흔한 염증성 피부질환에서도 나타나지만, 실험적으로나 일상생활에서 피부장벽을 손상시키는 자극에 의해서도 유도된다. 각질층 내 각질세포간 지질

은 신체에서 피부를 통한 수분손실에 대한 장벽 역할을 수행함은 이미 잘 알려진 사실이다. 각질형성세포는 간, 신장, 위장관처럼 지질에 대한 생합성 능력이 있으며, 이는 어느 한 부위에서 일어나는 것이 아니고, 표피의 거의 전 층에서 일어나는 반응이다. 실험적으로 계면활성제, 유기용매, 테이프 스트리핑 등을 이용하여 피부장벽을 급성 손상시키면 경표피 수분손실의 증가와 함께 표피에서 회복 반응이 나타나고 장벽기능이 빠르게 회복된다<sup>5,6</sup>. 즉 피부장벽이 손상을 받으면 표피는 지질합성을 일시적으로 증가시킨 후, 층판소체의 분비를 통하여 각질세포간 지질을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 피부장벽의 손상은 콜레스테롤, 세라마이드, 자유지방산의 합성을 증가시킬 뿐만 아니라 이들을 합성하는데 필요한 효소의 mRNA의 발현도 증가시킨다는 사실도 알려져 있다<sup>7</sup>. 이러한 회복반응은 층판소체의 즉각적인 분비, 새로운 층판소체의 형성<sup>8</sup>, 표피 지질합성의 증가<sup>7</sup>, 분비된 층판소체에서 나온 지질의 재배열을 통하여 최종적으로 각질층 내의 세포 외 부분에서 지질의 다중층상막 구조를 회복시킨다<sup>9</sup>. 또한 피부장벽을 손상시킨 후, 수증기가 통과 할 수없는 막으로 밀폐하여 인위적으로 피부의 장벽 기능을 제공하는 경우, 정상적인 피부장벽의 항상성 회복 반응이 억제되는 것이 밝혀져 있으며, 피부장벽의 회복 기전은 피부를 통한 급격한 수분손실의 증가와 밀접하게 연관되어 있는 것으로 제시되고 있다<sup>10</sup>. 이와 함께 피부장벽의 손상과 회복 기전은 피부의 항상성에 의한 것이고, 층판소체의 즉각적인 분비를 포함한 회복 반응은 피부의 지질의 생성을 증가시키고, 새로운 층판소체를 형성하는 결과인 것으로 보고된 바 있다<sup>8</sup>.

각질형성세포 배양을 이용한 in vitro 연구에서 외부 칼슘 농도에 의해 각질형성세포의 성장과 분화가 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>11,12</sup>. 그리고 실제로 표피에 존재하는 칼슘 농도 기울기는 표피의 분화 및 장벽회복 과정을 조절하는 것으로 보인다<sup>13,14</sup>. 칼슘 이온은 과립층에서 높은 농도를 나타내지만 기저층으로 갈수록 낮은 농도로 존재하여

표피 전층에 걸쳐 칼슘 이온의 농도 기울기를 형성하는 것이 calcium ion capture cytochemistry와 proton-induced X-ray emission (PIXE)을 이용하여 밝혀진 바 있다<sup>13,15</sup>. 표피 내 칼슘 기울기는 피부 장벽의 항상성 유지에 관여한다. 즉 피부장벽이 손상되면 상부 표피로부터의 칼슘 이온이 소실되고 이에 따라 증판소체의 분비와 생성이 증가되어 피부장벽이 회복된다<sup>16</sup>. 즉, 피부장벽의 손상은 칼슘 기울기를 무너뜨리는 원인이 되고 장벽의 회복 역시 표피에서 칼슘 기울기의 회복과 함께 일어난다<sup>17</sup>. 피부장벽의 급성 손상 후에 상부 표피로부터 칼슘 이온이 소실되면서 정상적인 표피내 칼슘 기울기가 소실되고 피부장벽이 회복됨에 따라 과립층의 칼슘 이온 농도도 증가하여 칼슘 기울기가 회복되며<sup>13,14</sup>, 피부장벽의 급성 손상 후 회복 반응이 표피의 세포 외 칼슘 이온 함유량 변화에 의해 조절된다<sup>16,18</sup>. 만성 피부장벽 이상을 보이는 필수 지방산 결핍 생쥐와 국소적으로 콜레스테롤 생성을 억제하는 HMG-CoA reductase 억제제 (lovastatin)를 도포한 무모 생쥐에서는 하부 표피의 세포 내 칼슘 이온의 증가에 의해 칼슘 기울기의 소실이 나타난다. 또한 만성적인 피부장벽의 이상이 있는 피부에 수증기 밀폐막을 덮어 수분 손실을 억제시키면 칼슘 기울기가 정상화된다. 이를 종합하면 표피 칼슘 기울기와 피부장벽 기능은 매우 밀접하게 연관되어 유지된다고 할 수 있다<sup>19</sup>. 무모생쥐의 피부장벽을 손상시킨 후 고농도의 칼슘 이온 용액에 담그면 피부장벽 손상 시 일어나는 콜레스테롤의 합성 증가가 나타나지 않아 피부장벽 회복이 억제되고, 이때 L형의 voltage-sensitive 칼슘 통로 차단제(calcium channel blocker)인 verapamil이나 nifedipine을 처리하면 이러한 억제효과를 차단할 수 있다<sup>16</sup>. 또한 정상 피부에 초음파나 이온 영동을 시행하는 경우, 경표피 수분손실의 증가로 나타나는 피부장벽의 손상이 없어도 칼슘 기울기의 소실과 증판소체 분비의 증가가 유도된다<sup>19,20</sup>. 이러한 연구 결과는 피부의 장벽 기능을 유지하는데 칼슘 이온의 변화가 매우 중요한 요인임을 알 수 있다.

Protein kinase C (PKC)는 세포의 신호전달 과정에서 세포의 분화와 증식과 같은 중요한 기능을 조절하는 인자이다<sup>21</sup>. PKC는 serine/threonine kinases의 family로 활성화에 필요로 하는 보조인자에 따라 크게 세 가지 그룹으로 분리된다. Conventional isoform인 PKC- $\alpha$ , - $\beta$  와 - $\gamma$ 는 최대의 활성을 나타내기 위해 칼슘 이온과 diacylglycerol(DAG)을 필요로 하고, novel isoform인 PKC- $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\eta$ , - $\theta$ 는 칼슘 이온과는 무관하지만 활성을 나타내기 위해 DAG를 필요로 하며, atypical isoform인 PKC- $\zeta$ , - $\iota$  와 - $\lambda$ 는 sphingolipid를 필요로 한다<sup>22</sup>. 특히 PKC- $\gamma$ 의 피부 표피에서의 발현 여부에 관해서는 여전히 논란이 있지만<sup>23</sup>, 다른 PKC isoform들은 피부에서 발견되는 것으로 보고되었다<sup>24,25</sup>. 다양한 PKC isozyme의 종류와 다양한 조직에 대한 분포는 세포의 기능을 조절하는 데 있어 PKC의 역할이 매우 다양함을 나타낸다. 표피에서 각질형성세포가 기저층에서 유극층, 과립층을 거쳐 각질층으로 분화됨에 따라 다양한 분화 단백질이 생성되며, PKC의 활성이 이러한 분화 과정에 있어 매우 중요한 역할을 수행함을 잘 알려져 있다. 배양된 각질형성세포에서 배지 내의 칼슘 농도를 증가시켜 분화를 유도하는 경우, 외부 칼슘 농도의 증가는 phosphatidylinositol (PI)의 turnover를 증가시켜 각질형성세포 내의 DAG의 생성을 증가시키게 되며, 분화 과정에 관여하는 다양한 단백질의 인산화(phosphorylation)를 유도한다. 이는 PKC 활성제인 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)를 각질형성세포에 처리하는 경우에도 동일하게 나타나며, TPA나 DAG를 통한 PKC의 활성화는 각질세포외막(cornified envelope)의 형성을 촉진하고, 유극층이나 과립층에서 나타나는 분화 단백질의 형성을 유도한다<sup>26,27</sup>. 이러한 연구결과를 토대로 PKC가 표피 내 각질형성세포의 분화에 매우 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다. 그러나 현재까지 표피의 중요한 기능 중 하나인 피부장벽 기능의 형성과 회복에 있어 PKC의 역할에 대해서는 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 피부장벽의 손상 후 회복에 있어 PKC의 역할을 규명하고자 하고, 피부장벽 회복에 영향을 미치는 칼슘 이온과의 관계를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 무모생쥐의 정상 피부에서 PKC 아형의 발현 양상을 관찰하고, 피부장벽을 급격히 손상시킨 후 이의 변화를 관찰하였다. 또한 PKC가 피부장벽의 회복에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 무모생쥐의 피부에 급성 장벽 손상을 유도한 후 PKC 억제제를 도포하여 피부장벽 회복율을 측정하였으며, 칼슘 통로 차단제를 함께 처리하였을 때 변화를 살펴보았다. PKC 억제제가 각질형성세포의 세포 내 칼슘 이온에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 배양된 각질형성세포를 이용하여 PKC 억제제를 첨가하였을 때의 세포 내 칼슘 이온 농도의 변화와, 칼슘 통로 차단제를 함께 처리하였을 때의 효과를 살펴보았다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에는 연세대학교 임상의학연구소에서 공급받은 8-12주의 무모생쥐 (female hairless mouse, Hr<sup>-</sup>/Hr<sup>-</sup>)를 사용하였으며, 실내온도 25°C, 상대습도 50-60%인 항온항습 조건에서 동일한 표준사료로 사육하여 실험하였다. 매개체로 사용한 polyethylene glycol (Mw 300)과 ethanol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였고, PKC 억제제인 calphostin C, chelerythrine chloride, rottlerin과 hispidin은 Calbiochem (San Diego, California, U.S.A)에서 구입하였다. 면역조직화학염색과 Western blot을 위한 PKC 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, California, U.S.A)에서 입수하였으며, 단백질 정량을 위해서는 BCA protein assay reagent (ECL kit, Amersham, UK)를 사용하였다. 기타 실험에 사용된 모든 재료는 1등급 이상의 시약을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 가. 급성피부장벽 손상

4% chloral hydrate 용액을 복강 내 주사하여 무모생쥐를 마취한 후, 경표피 수분손실량 (TEWL)이 40g/m<sup>2</sup>/hr의 수준이 되도록 셀로판 테이프 (3M, St. Poul, MN, U.S.A)를 사용하여 무모생쥐의 피부장벽을 손상시켰다. Tewameter TM210 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany)를 사용하여 경표피 수분손실량을 손상 직전과 직후, 손상 후 3, 6, 24, 48 시간에 측정하고 다음과 같은 식으로 회복율을 계산하였다.



$$\text{Recovery} = \left( \frac{\text{TEWL}_i - \text{TEWL}_b}{\text{TEWL}_0 - \text{TEWL}_b} \right) \times 100 (\%)$$

TEWL<sub>i</sub> : TEWL at indicated time

TEWL<sub>b</sub> : baseline TEWL

TEWL<sub>0</sub> : TEWL immediately after barrier disruption

#### 식 1. TEWL 측정치를 통한 피부장벽 회복율

모든 데이터는 대조군과 동시에 측정하여 비교하였다.

#### 나. PKC 억제제의 피부 도포

셀로판 테이프를 피부장벽을 손상시킨 무모생쥐 양쪽 배부에 polyethylene glycol/ethanol(70:30) 혼합액을 vehicle로 사용하여 PKC 억제제(calphostin C, chelerythrine chloride, rottlerin, hispidin)를 각각 농도별로 도포하였다. 경표피 수분손실량을 손상 직전과 직후, 손상 후 3, 6, 24, 48 시간에 측정하고, 식 1.을 이용하여 회복율을 계산하였다.

#### 다. Western blot

셀로판 테이프를 피부장벽을 손상시킨 무모생쥐를 마취하고 경추도 살한 후 피부를 생검하였다. 처치부와 대조부에서 각각 생검한 피부에서 피하지방을 제거한 후, 10mM ethylenediamine - tetraacetic acid-phosphate buffered saline (EDTA- PBS, pH 7.4) 용액 위에서 진피층이 아래쪽으로 향하도록 고정한 후, 37°C에서 35-45분간 방치하였다. 이후 여과지(filter paper)를 이용하여 표면의 수분을 제거한 후, 수술용 면도날로 표피층을 분리하였다. 분리한 조직의 무게를 측정하여 tube에 넣고 3ml의 얼음 온도의 RIPA 완충액(50mM Tris (pH 7.5), 1% NP-40 (Tergitol type NP-40; polyglycol ether

(nonionic) surfactant), 2mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 1% DOC(deoxycholic acid), 0.15M NaCl, 1mM PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride)를 포함한 aprotinin을 가하여 잘 섞은 후, 4°C에서 조직을 균질화 하였다. 30 $\mu$ l의 10 mg/ml PMSF 용액(phenylmethanesulfonyl fluoride)을 가하고 얼음 속에서 30분간 처리하였다. 조직을 microcentrifuge tube에 옮기고 10,000xg, 4°C에서 10분 간 원심분리한 후, 상청액을 취하고 같은 조건에서 다시 원심분리한 후 상청액을 전체 세포 용해물로 사용하였다. 조직을 같은 부피의 2X 전기영동 시료 완충액과 섞고, 2-3분 간 끓인 후, vertical slab gel unit에서 성형하였다. 50ml conical tube에 적당 농도의 acrylamide를 포함한 separating gel 용액을 준비한 후, ammonium persulfate(APS)와 TEMED 완충액을 섞어 유리판 사이에 부었다. 0.3ml water-saturated n-butanol을 조심스럽게 separating gel 위에 올려놓고 상온에서 30-60분 간 두어 gel을 굳혔다. Water-saturated n-butanol을 버리고 이차 증류수로 여러 번 씻은 후 여과지로 남아있는 물기를 제거하였다. Stacking gel 용액을 만들어 separating gel 위에 붓고 comb을 꽂고 30분 후 gel이 굳었을 때 gel 성형기에서 gel을 떼어내고 gel 전기 영동기에 장착한 후, running 완충액을 부었다. 시료를 집적시킨 후, 전압을 100-120 V로 일정하게 맞추고 bromophenol blue 지시약이 바닥에 올 때까지 전기 영동을 실시하였다. 전기 영동한 gel에서 running gel 부분만 분리한 후 transfer 완충액을 담은 통에 nitrocellulose(NC) membrane과 thick paper를 적시고 running gel을 15 분 이상 incubation한 후, 2 시간 동안 400mA, 10-15V의 조건 하에서 transfer를 시행하였다. Membrane을 공기 중에서 말린 후 Ponceau-S 용액에 2분 정도 담가 염색하고 증류수로 씻어 transfer된 band를 확인하였다. Blocking 완충액(5% blotting grade blocker non-fat dry milk solution(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA))에

membrane을 담그고 흔들면서 60분간 blocking을 실시하였다. Blocking 완충액에 적당한 농도로 희석한 PKC 아형에 대한 일차 항체인 anti-protein kinase C- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\eta$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A)를 가하고 60분 정도 흔들었다. TBST 완충액으로 5분씩 3회 정도 반복해서 씻은 후 blocking 완충액에 1/1000로 희석한 이차 항체(horseradish peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 이용하여 60분간 흔들었다. TBST 완충액으로 5분씩 3회 반복해서 씻은 후 ECL kit로 발색반응을 일으켰고 ECL™ Western blotting detection 용액 A와 B를 1:1로 섞어 NC filter에 부어준 후 1분간 흔들어 주었다. NC filter를 핀셋으로 집어내어 3MM 여과지에 잠시 둔 후 wrap으로 싸서 cassette에 넣고 암실에서 15초간 감광시켰다.

#### 라. 면역조직화학염색

생검한 조직을 10%의 formaldehyde 용액에서 고정한 후 파라핀 블록을 만들고 박절기를 이용하여 5 $\mu$ m의 두께로 잘라 poly-L-lysine (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO., U.S.A)으로 표면을 처리한 유리 슬라이드에 부착하였다. Xylene으로 파라핀을 제거하고 100%, 90%, 80%, 50%의 ethanol로 순서대로 처리하여 hydration을 시행하고, 마지막으로 PBS 용액(pH 7.4)으로 세척하였다. Methanol을 포함한 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에서 5분간 처리하여 내재성 과산화효소(peroxidase)를 제거하고, PBS 용액으로 5분간 세척한 후, 10% goat non-immune serum을 포함한 PBS 용액을 이용하여 조직 내의 biotin을 blocking하였다. 각각의 PKC 아형에 대한 일차 항체는 400:1로 희석한 anti-protein kinase C- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\eta$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A)로 각각 1시간 동안 실온에서 반응시켰고, PBS로 5분간 세척 후, anti-rabbit biotinylated 이차 항체로 20분간 반응시켰다. PBS로 세

척한 후 HRP-streptavidin-peroxidase로 실온에서 10분간 반응시킨 후 반응을 정지시키기 위해 증류수로 세척하였다. DAB 용액으로 실온에서 5분간 반응하여 염색 시켰다. Slide를 증류수에 담가 반응을 정지한 후 hematoxylin으로 counter staining하고 광학 현미경으로 결과를 관찰하였다.

#### 마. 전자현미경 분석

##### (1) RuO<sub>4</sub> 후고정

생검한 조직을 얻은 즉시 입체현미경 하에서 0.1mm<sup>3</sup> 이하의 크기로 잘게 자르고, 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1 M sodium cacodylate 완충액으로 (pH 7.4) 조성된 modified Karnovsky 용액에 넣어 고정한다. 고정된 조직은 실온에서 1시간 방치한 후 18-24시간 동안 4°C 냉장고에 보관하였다. Karnovsky 용액을 제거한 후 0.1M cacodylate 완충액으로 40분씩 3회 세척하였다. 이후 후고정은 RuO<sub>4</sub>, 0.1 M cacodylate 완충액에 빛을 차단한 상태로 실온에서 45분간 시행하였다. 후고정 후 0.1 M cacodylate 완충액에서 10분간 1회 세척한 후 50% ethanol로 5분씩 2회, 70%와 95% ethanol로 각 10분씩 2회, 100% ethanol로 각 20분씩 4회 탈수시킨 후, 100% propylene oxide로 각 15분간 2회 조직에 침투시키고 통상적인 방법으로 만들어진 epon에 포매하였다. 제작한 시편을 1-5μm 두께 절편으로 자른 후, 관찰할 부위를 찾고 thin section을 한 후 통상적인 uranyl acetate 와 lead citrate 로 염색하여 투과 전자현미경 (Philips CM 10)으로 관찰하였다.

##### (2) Calcium ion capture cytochemistry

조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90 mM potassium oxalate, 1.4% sucrose로 조성된 고정액에서 4°C에서 조직을 고정한 후, 입체 현미경 하에서 냉고정액 1방울을 점적 후,

0.5mm<sup>3</sup>로 세절하여 얼음 조각 위에서 고정한 후, 고정액을 버리고 1ml 4% OsO<sub>4</sub>와 3ml 2% potassium pyroantimonate stock 용액이 혼합된 후고정액으로 얼음 위에서 2시간 동안 후고정하였다. KOH로 pH 10으로 조절된 냉증류수에 10분간 세척한 후 통상적인 방법으로 탈수, embedding하고 염색하였다. 이 때 대조표본으로 10mM EDTA에서 30분간 처리한 조직을 동일한 방법으로 처리하였다. 투과전자현미경하에서 표피를 관찰하였다.

#### 바. Intracellular Ca<sup>2+</sup>의 측정

각질형성세포에서의 세포 내 칼슘 이온의 농도([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)를 Oda의 방법을 수정하여 측정하였다<sup>28</sup>. 세포를 130mM NaCl, 3mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.03mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM HEPES, 10mM D-glucose (pH 7.4)을 포함한 HEPES-buffered 용액에 4 μM fura-2AM 을 30분간 처리했다. 세포들은 HEPES-buffered 용액에서 2번 세척하였다. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 측정은 spectrofluorometry (Photon Technology International, Brunswick, NJ, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 세포들은 100% O<sub>2</sub> gas와 함께 HEPES-buffered 용액을 가지고 분당 2ml의 농도로 계속해서 제공되었다. Excitation wavelength는 340nm 와 380nm 사이를 반복하도록 하였고 emission fluorescence는 510nm에서 기록하였다. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 농도의 측정은 Grynkiewicz가 사용한 방법에 따라 식2.와 같이 계산하였다<sup>29</sup>.

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

KD : dissociation constant of Fura-2

R : Fluorescence ratio measured at  $\lambda_{340/380}$

R<sub>min</sub> : Fluorescence ratio measured at PC12 cells after 2.5mM EGTA treatment

R<sub>max</sub> : Fluorescence ratio measured at PC12 cells after 25mM ionomycin treatment

S<sub>f2</sub> : Fluorescence intensity of  $\lambda_{380nm}$  at R<sub>min</sub>

S<sub>b2</sub> : Fluorescence intensity of  $\lambda_{380nm}$  at R<sub>max</sub>

식 2. Fura-2를 이용한 intracellular calcium ion 농도의 측정

사. Statistical analysis

통계학적 유의성은 Student's paired *t* test를 사용하여 실시하였으며, 유의수준은 0.05 미만으로 설정하였다. 막대 그래프(그림 1, 9)는 평균±S.D. 로 표시하였으며, 각 군당 개체 수는 7이상이다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리하였을 때 피부장벽 회복율의 변화(그림 1)

무모 생쥐의 피부를 테이프 스트리핑 방법을 이용하여 급성으로 피부장벽을 손상시킨 후, 각각 broad type PKC 억제제인 chelerythrine chloride(A)와 calphostin C(B)를 처리한 결과 장벽 손상 후 3, 6시간에서 통계학적으로 유의한 장벽 회복의 저해가 관찰되었다. 동일한 피부장벽 손상 후 PKC- $\beta$ 와 PKC- $\eta$ 의 활성을 각각 선택적으로 억제하는 hispidin(C)과 rottlerin(D)을 처리한 결과, 역시 장벽 손상 후 3, 6시간에서 장벽 회복의 저해가 관찰되었다. (\*p<0.05, \*\*p<0.01) (A: chelerythrine chloride, B: calphostin C, C: hispidin, D: rottlerin)

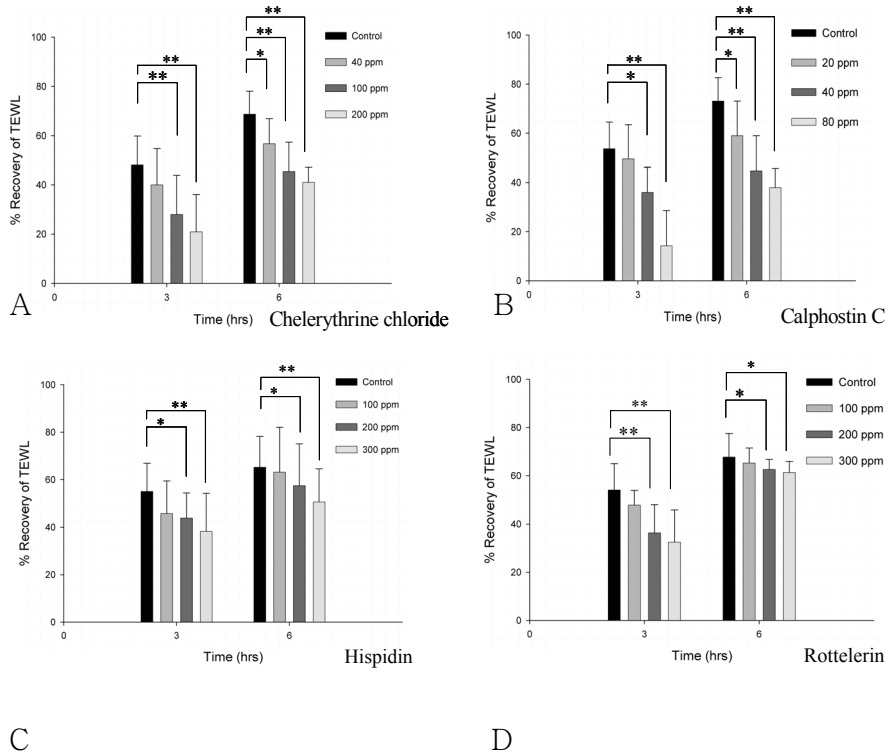


그림 1. 급성 피부장벽 손상 후 회복에 PKC 억제제가 미치는 영향. 무모 생쥐의 피부를 테이프 스트리핑 방법을 이용하여 급성으로 피부장벽을 손상시킨 후, 각각 broad type PKC 억제제인 chelerythrine chloride (A)와 calphostin C (B)를 처리한 결과 장벽 손상 후 3, 6시간에서 통계학적으로 유의한 장벽 회복의 저해가 관찰되었다. 동일한 피부장벽 손상 후 PKC- $\beta$ 와 PKC- $\eta$ 의 활성을 선택적으로 억제하는 hispidin (C)과 rottlerin (D)을 처리한 결과, 역시 장벽 손상 후 3, 6시간에서 장벽 회복의 저해가 관찰되었다(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). (A: chelerythrine chloride, B: calphostin C, C: hispidin, D: rottlerin)



2. 급성 피부장벽 손상 후 Western blot으로 확인한 PKC 단백질의 발현(그림 2)

정상 무모생쥐의 표피와 테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에서 Western blot으로 PKC- $\gamma$ 를 제외한 PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$ 의 단백질이 모두 발현되었다. 테이프 스트리핑 방법으로 손상을 준 3시간, 6시간, 24시간과 48시간에 PKC 단백질 발현을 관찰한 결과 시간에 따른 PKC 단백질 발현의 차이는 없었다.



그림 2. 급성 피부장벽 손상 후 Western blot상 발현된 PKC 단백질. 정상 무모생쥐의 표피와 테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에서 Western blot으로 PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$ 의 단백질이 시간별로 모두 발현됨을 확인하였다.

3. 급성 피부장벽 손상 후 면역조직화학염색법으로 확인한 PKC 단백질의 발현(그림 3)

테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에서 면역조직화학염색으로 PKC- $\gamma$ 를 제외한 PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$ 의 단백질이 발현됨을 확인하였다.

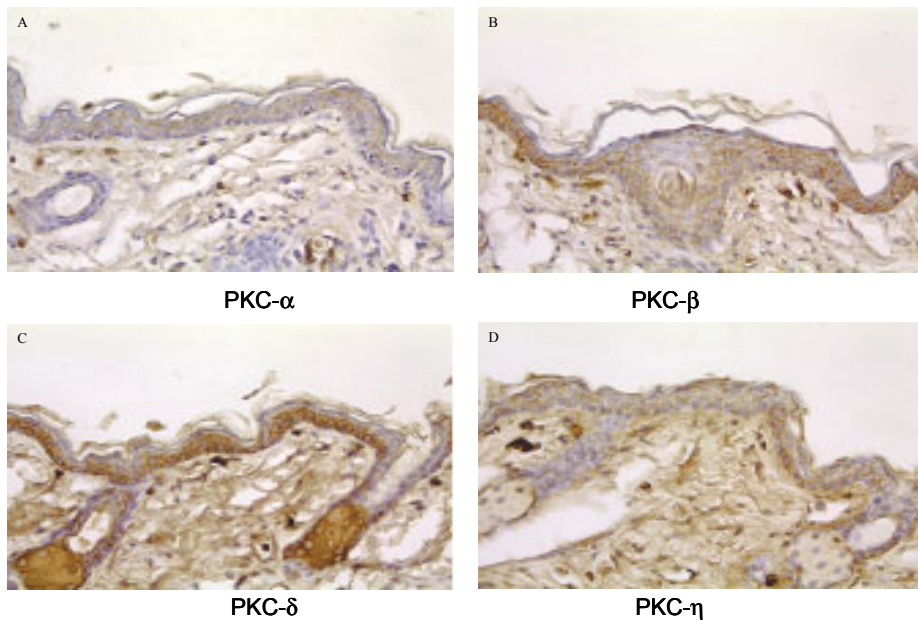
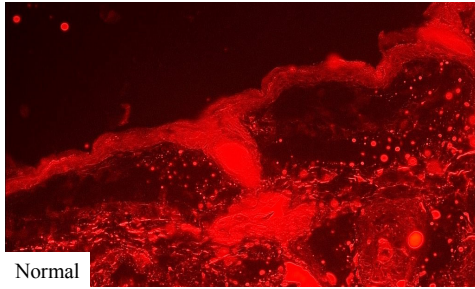


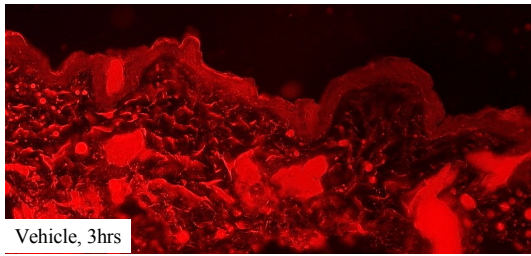
그림 3. 급성 피부장벽 손상 후 면역조직화학염색상 발현된 PKC 단백질. 면역조직화학염색법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에서 PKC- $\gamma$ 를 제외한 PKC- $\alpha$  (A), - $\beta$  (B), - $\delta$  (C), - $\eta$  (D)의 단백질이 발현됨을 확인하였다.

4. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리했을 때 Nile red 염색 상 각질층의 지질의 변화(그림 4)

테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에 broad type PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리하였을 때, 각질층의 지질의 변화를 알아보기 위한 Nile red 염색 결과 피부장벽 손상 3시간 후, 정상표피(A)와 대조군(B)에 비해 PKC 억제제를 처리한 표피에서 각질층 내 중성지질의 양이 적은 것이 관찰되었다(C).



A



B



C

그림 4. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제가 각질층 내 중성 지질에 미치는 영향. 테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에 PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리한 후, Nile red로 염색한 결과 PKC 억제제를 처리한 표피 내에서 장벽 손상 3시간 후 정상표피(A)와 대조군(B)에 비해 각질층 내 중성지질의 양이 적은 것이 관찰되었다(C).

5. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리했을 때 전자현미경 검사상 각질층의 지질의 변화(그림 5)

테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에 broad type PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리하였을 때, 각질층의 지질의 변화를 알아보기 위한 전자 현미경 검사 결과 피부장벽 손상 3시간 후, 정상표피(A)와 대조군(B)에 비해 과립세포 내 층판소체가 감소되어 있지 않고, 과립층과 각질층 사이에 층판소체의 분비가 관찰되지 않았으며 각질세포간 지질에는 다수의 미성숙된 구조가 관찰되었다(C).

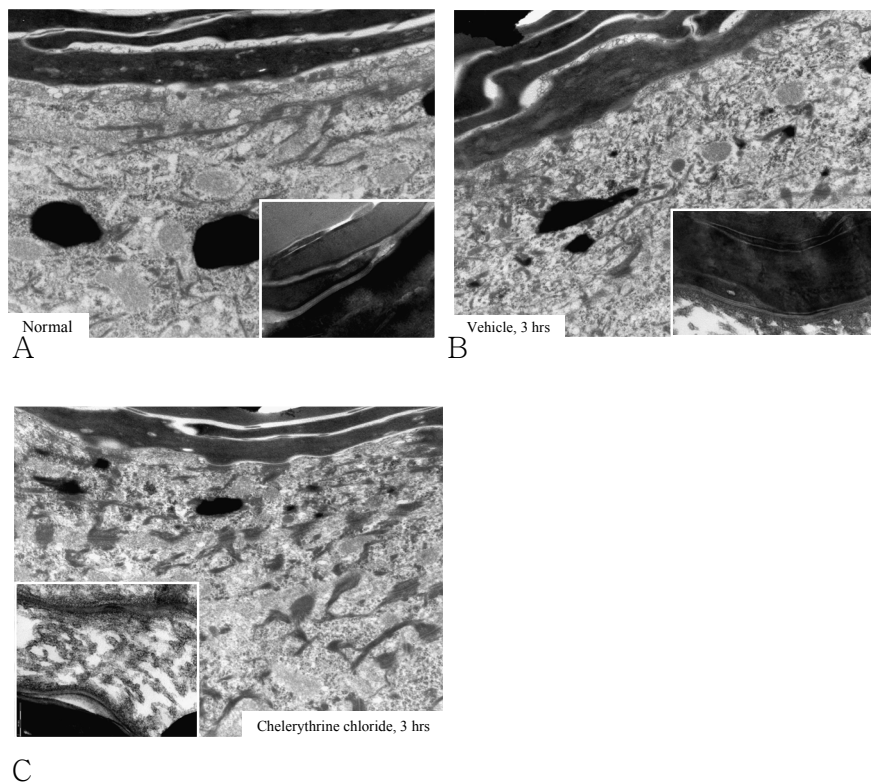
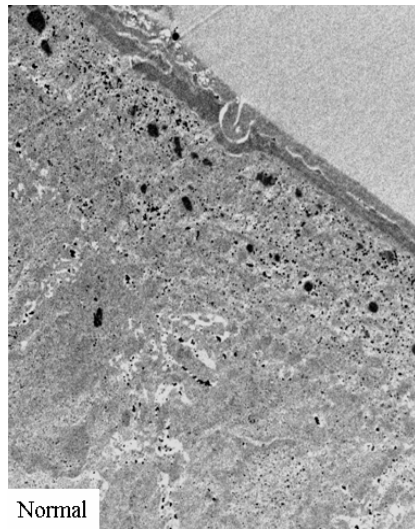


그림 5. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제가 층판소체와 각질세포간 지질의 구조에 미치는 영향. 테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에 PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리한 후, 전자 현미경으로 검사한 결과, 장벽 손상 3시간 후 정상표피(A)와 대조군(B)에 비해 과립세포 내 층판소체가 감소되어 있지 않고, 과립층과 각질층 사이에 층판소체의 분비가 관찰되지 않았으며 각질세포간 지질에는 다수의 미성숙된 구조가 관찰되었다(C). (RuO<sub>4</sub> postfixation, X57,000)

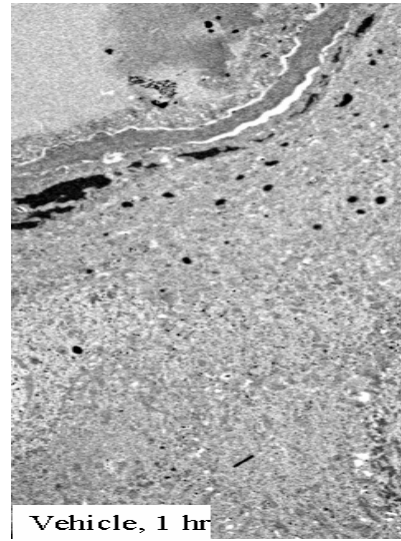
6. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리했을 때 표피 내 칼슘 기울기의 변화(그림 6)

테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에 broad type PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리하였을 때, 표피 내 칼슘 기울기는 피부장벽 손상 1시간 후, 정상표피(A)와 비교했을 때 대조군(B)에서는 표피 내 칼슘 기울기가 소실되었으나, PKC 억제제를 도포하는 경우(C) 표피 내 칼슘 기울기의 소실이 억제되었다.



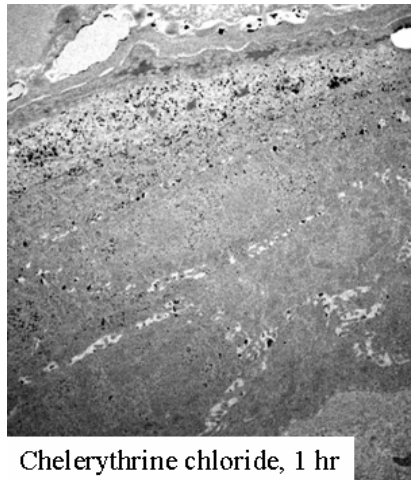
Normal

A



Vehicle, 1 hr

B



Chelerythrine chloride, 1 hr

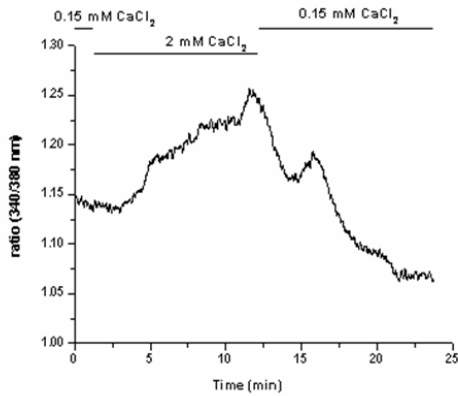
C

그림 6. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제가 표피 내 칼슘 기울기에 미치는 영향. 테이프 스트리핑 방법으로 급성 피부장벽 손상을 유도한 무모생쥐의 표피에 PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리한 후, 전자 현미경으로 검사한 결과 표피 내 칼슘 기울기는 장벽 손상 1 시간 후, 정상표피(A)와 비교했을 때 대조군(B)에서는 표피 내 칼슘 기울기가 소실되었으나, PKC 억제제를 도포하는 경우(C) 표피 내 칼슘 기울기의 소실이 억제되었다.

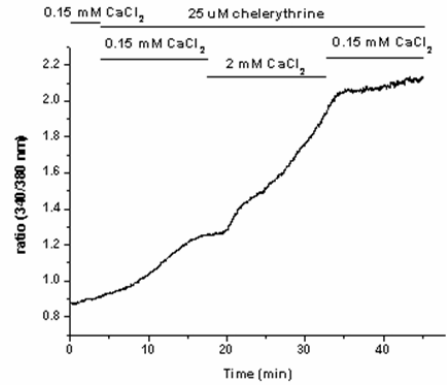


7. PKC 억제제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향(그림 7)

배양된 각질형성세포에서 세포 외 칼슘 농도를 0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 포함하는 HEPES-buffered(low  $\text{Ca}^{2+}$ ) 용액에서 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 포함한 HEPES-buffered(high  $\text{Ca}^{2+}$ ) 용액으로 변화시키면 세포 내 칼슘 이온의 농도가  $92 \pm 5.4\text{nM}$ 에서  $128 \pm 12.4\text{nM}$ 로 즉시 증가하였고 다시 low  $\text{Ca}^{2+}$  용액으로 변화시키면 세포 내 칼슘 이온의 농도가 감소하였다(A). 세포 내 칼슘 이온의 농도에 관한 PKC 억제제의 영향을 알아보기 위해 PKC 억제제인  $25 \mu\text{M}$  chelerythrine chloride를 처리한 후 high  $\text{Ca}^{2+}$  용액을 넣었을 때 칼슘의 농도가 chelerythrine chloride를 공급하지 않았을 때보다 훨씬 높은  $210 \pm 19.3\text{nM}$  농도를 나타냈고 다시 외부 칼슘 농도를 low  $\text{Ca}^{2+}$  용액으로 변화시켜도 세포 내 칼슘 이온의 농도는 감소되지 않았다(B).



A



B

그림 7. PKC 억제제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향. 배양된 각질형성세포에서 low  $\text{Ca}^{2+}$  용액에서 high  $\text{Ca}^{2+}$  용액으로 세포 외 칼슘 농도가 변하면 세포 내 칼슘 이온이 증가하고 다시 low  $\text{Ca}^{2+}$  용액으로 바뀌면 세포 내 칼슘 농도가 감소한다(A). PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 처리한 각질형성세포에서는 세포 외 칼슘 이온의 감소에도 불구하고 세포 내 칼슘 이온의 농도가 오히려 증가하는 경향을 나타냈다(B). 세포 내 칼슘의 양은 fura-2를 가한 각질형성세포에서 방출하는 340nm 파장의 형광과 380nm 파장의 형광의 비를 측정하여 계산하였다.

8. PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향(그림 8)

배양된 각질형성세포에  $5\ \mu\text{M}$  chelerythrine chloride를 처리하면, 세포 내 칼슘 이온의 농도가 시간에 따라 증가하며, L형의 voltage-sensitive 칼슘 통로 차단제인  $10\ \mu\text{M}$ 의 verapamil을 동시에 처리하는 경우 세포 내 칼슘 이온 농도의 증가가 부분적으로 억제되었다.

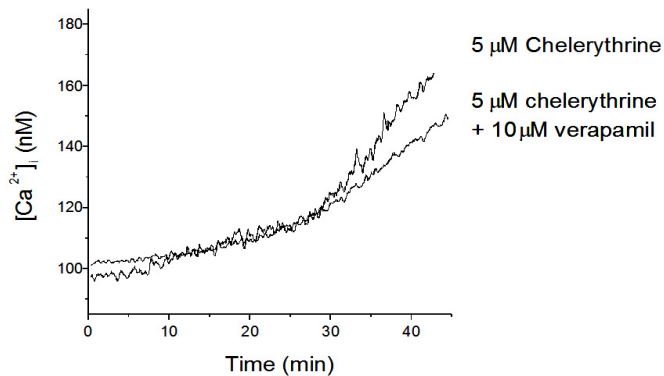


그림 8. PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 배양된 각질형성세포의 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향. 배양된 각질형성세포에  $5\ \mu\text{M}$  chelerythrine chloride를 처리하면, 세포 내 칼슘 이온의 농도가 시간에 따라 증가하며, L형의 voltage-sensitive 칼슘 통로 차단제인  $10\ \mu\text{M}$ 의 verapamil을 동시에 처리하는 경우 세포 내 칼슘 이온 농도의 증가가 부분적으로 억제되었다.

9. 급성 피부장벽 손상 후 회복에 PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 미치는 영향(그림 9)

테이프 스트리핑을 이용하여 피부장벽을 급성으로 손상시킨 무모생쥐의 표피에 PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 단독으로 처리하면 피부장벽 손상 후 3시간, 6시간에서 피부장벽의 회복이 저해되지만, chelerythrine chloride와 칼슘 통로 차단제인 verapamil을 동시에 처리하면 피부장벽 손상 후 3시간, 6시간에서 피부장벽 회복의 억제가 저해되었다.

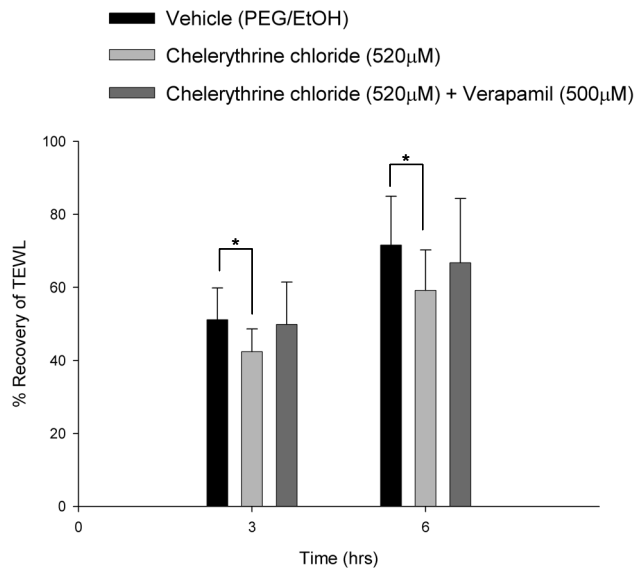


그림 9. 급성 피부장벽 손상 후 회복에 PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제가 미치는 영향. 테이프 스트리핑을 이용하여 피부장벽을 급성으로 손상시킨 무모생쥐의 표피에 PKC 억제제인 chelerythrine chloride를 단독으로 처리하면 피부장벽 손상 후 3시간, 6시간에서 피부장벽의 회복이 저해되지만, chelerythrine chloride와 칼슘 통로 차단제인 verapamil을 동시에 처리하면 피부장벽 손상 후 3시간, 6시간에서 피부장벽 회복의 억제가 저해되었다(\* p<0.05).

#### IV. 고 찰

피부의 가장 중요한 기능 중 하나는 물리적, 화학적, 기계적, 미생물 방어 장벽으로서의 역할이다. 다양한 장벽 기능 중 표피투과장벽(epidermal permeability barrier)은 표피를 통한 수분 손실과 약물 전달을 제어하는 기능을 담당하며 표피의 최외각에 위치하는 각질층이 투과장벽의 기능을 수행한다<sup>1-4</sup>. 각질층은 단백질이 풍부한 각질세포와 다중층상구조(multilamella structure)를 나타내는 각질세포 간 지질로 이루어져 있으며 이러한 각질층의 구조를 bricks and mortar model로 설명을 할 수 있다<sup>2, 30</sup>. 즉 벽돌의 역할은 각질세포가 담당하며 각질세포 간 지질을 회반죽에 비유하여 설명할 수 있다. 각질세포는 주로 케라틴의 다발로 구성되어 있으며, 피부의 구조적 안정과 탄력성에 관여한다. 각질세포 간 지질의 주성분은 보통의 생체막들과는 다르게 인지질을 함유하지 않고, 표피 내 과립세포에서 생성되는 층판소체에서 유래된 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산이며 약간의 콜레스테롤 설페이트(cholesterol sulfate)가 존재하는 것이 알려져 있다<sup>3</sup>. 층판소체는 각질형성세포의 최종 분화 과정에서 과립층에 있는 과립세포에서 세포외 유출(exocytosis) 과정을 거쳐 과립층과 각질층의 경계부위에 배출된다. 이러한 유출단계에서 각 지질의 전구체와 함께 층판소체 내부에서 유래하는 효소에 의한 작용과 세포외 변환(extracellular processing) 과정을 거쳐 지질의 다중층상구조를 이룬다<sup>31</sup>. 또한 각질세포의 외각에 존재하는 단백질막인 각질세포외막(cornified envelope)과 각질세포외막의 외각에 존재하는 지질의 단분자층(monomolecular layer)인 각질세포 지질막(cornified lipid envelope)이 서로 공유결합으로 연결되어 있어서 각질층의 장벽 기능에 필요한 결합을 이루고 있다<sup>32</sup>. 즉, 각질세포외막과 각질세포지질막이 각질세포간 지질의 정확한 배열을 위한 지지대의 역할을 수행하는 것으로 볼 수 있다.

표피의 수분 함량은 기저층에서 과립층 하부까지는 65%에서 70% 정도로 비교적 일정하지만, 과립층과 각질층의 경계부위에서는 40%로 감소하며, 각질층의 상부로 갈수록 15%까지 감소된다. 이것은 신체의 내부에서 외부로 수분이 수동 확산되는 과정에서 생기는 현상으로 설명되고 있다. 각질층을 통한 수분 이동의 결과 나타나는 경표피 수분손실량은 정상 피부에서 시간당 0.1-0.4mg/cm<sup>2</sup>의 범위이다. 피부장벽을 인위적으로 급격히 손상시키는 경우, 손상 정도에 비례하여 경표피 수분손실량이 증가하게 된다. 따라서 비침습적인 기기를 이용하여 경표피 수분손실량을 측정함으로써 피부장벽 손상 정도와 시간에 따른 회복률을 측정할 수 있다. 그러나 최근 이온영동법 (iontophoresis)이나 초음파영동법(sonophoresis)을 정상 피부에 시행하여, 피부장벽을 손상시키지 않으면서도 회복기전을 연구할 수 있는 방법이 제시되고 있다<sup>20</sup>.

피부장벽 손상 후 회복을 지시하는 신호가 무엇인지는 아직 확실하지 않다. 급성 피부장벽 손상 후 피부를 수증기불투과막(water vapor impermeable membrane)으로 밀봉하면 피부장벽 기능의 회복에 필수적인 표피 내 지질 합성이 억제되는 것으로 보아 표피를 통한 수분 통과 자체가 표피 지질 합성의 조절에 관여하는 것으로 보인다<sup>33</sup>. 현재는 피부장벽 손상 후 나타나는 이온의 손실이 장벽 회복의 신호로 가장 유력시되고 있으며, 특히 칼슘 이온의 역할이 중요하게 생각되고 있다. 배양된 각질형성세포를 이용한 in vitro 연구에서 저농도의 칼슘 이온은 각질형성세포의 증식을, 고농도의 칼슘 이온은 각질형성세포의 분화를 일으킨다는 것이 알려졌다<sup>11,12</sup>. 실제 표피에서의 칼슘 이온의 농도는 기저층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 과립층에서 가장 높은 농도로 존재하여 표피 내 칼슘 기울기를 형성한다<sup>13</sup>. 피부장벽이 손상되면 표피를 통한 수분손실이 증가하고 이에 따라 수동적으로 상부표피, 즉 과립층으로부터 칼슘 이온의 손실이 일어나 정상적인 표피 내 칼슘 기울기가 소실된다. 이후 피부장벽이 회복되면서 칼슘 기울기

도 같은 양상으로 회복된다<sup>15</sup>. 또한 피부장벽을 급격히 손상시킨 후 고농도의 칼슘 이온 용액에 손상된 피부를 담가 인위적으로 피부 내 칼슘 기울기를 만들어주면 피부장벽 회복이 지연된다<sup>16</sup>. 또한 칼슘 통로 차단제를 용액에 첨가하면 피부장벽 회복이 정상화되므로 칼슘 이온이 피부장벽 손상 후 회복의 과정에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 즉, 외부에서 인위적으로 제공한 칼슘에 의하여 피부장벽의 회복이 억제되며, L형의 칼슘 통로 차단제(L-type voltage-sensitive calcium channel blocker)인 verapamil이나 nifedipine을 함께 투여하면, 칼슘 이온에 의한 피부장벽 회복의 억제를 차단시킨다<sup>16</sup>. 이온영동을 이용하여 급성 피부장벽 손상 없이 표피 내 칼슘 기울기의 소실을 유도하면 증판소체의 분비가 증가되는데 이는 경표피 수분손실의 증가가 없어도 칼슘 이온의 변화 자체가 피부장벽의 회복을 조절하는 중요한 인자임을 나타낸다<sup>20</sup>. 또한 칼슘 이온운반체인 ionomycin을 도포하여 표피의 각질형성세포내로 칼슘 이온을 유입시켜 세포 내 칼슘농도가 높아지면, 과립세포에서 증판소체의 세포외유출 반응이 억제되고 피부장벽의 회복 역시 억제된다<sup>30</sup>. 이러한 연구결과를 종합하면 표피 내 칼슘 이온의 농도가 피부장벽의 항상성 유지에 있어 중요한 조절인자인 것으로 보인다.

PKC는 serine/threonine kinase에 속하는 단백질로서, 각질형성세포를 포함한 많은 종류의 세포에서 다양한 세포 내 대사과정의 조절에 중심적인 역할을 수행한다. 최근까지 약 11종류의 PKC isotype이 보고되어 있으며 각각의 활성화에 필요한 인자의 종류에 따라 크게 세 가지 subtype으로 구분된다<sup>35</sup>. 각각의 아형은 세포의 종류에 따라 독특한 발현 양상을 나타내며, 분화와 증식을 포함한 다양한 세포 내 반응을 조절한다. 특히 피부에서 PKC는 각질형성세포의 분화와 증식을 조절하는 것으로 보고되고 있다. 정상 인체 각질형성세포와 설치류의 각질형성세포에는 PKC- $\alpha$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\eta$ , - $\zeta$  등이 존재하는 것으로 보고된 바 있다<sup>17,36-38</sup>. 그리고 각질형성세포와 함께 표피를 구성하

는 세포인 멜라닌세포(melanocyte)에서 발현되는 PKC- $\beta$ 가 tyrosinase의 인산화 반응을 일으켜 tyrosinase와 tyrosinase related protein-1 (TRP-1) 과의 복합체를 형성하여 멜라닌 형성에 중요한 기능을 수행한다는 보고도 있다<sup>39</sup>. 이와 함께 각질형성세포가 분화됨에 따라 나타나는 칼슘 이온의 증가가 PKC의 발현에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다<sup>17</sup>. 또한 PKC의 활성 물질인 TPA가 각질형성세포의 증식을 억제하며, 최종분화를 촉진한다는 보고가 있다<sup>26,27,40</sup>. 한편 PKC의 억제제인 GF109203X나 Ro 31-7549에 의하여 분화 단백질의 발현이 억제되며<sup>38</sup>, 세포의 증식과<sup>41</sup> DNA 합성이 증가된다는 보고가 있다<sup>42</sup>. 최근 이러한 PKC의 기능을 수행하는 각각의 아형에 대한 연구 결과, 정상 인체 각질형성세포에서 PKC- $\delta$ 와 PKC- $\eta$ 의 발현을 adenoviral vector를 사용하여 증가시키는 경우 세포의 증식이 억제되며<sup>43,44</sup>, PKC- $\alpha$ 의 발현이 정상 각질형성세포 및 각질형성세포 종양의 최종분화에 중요한 역할을 수행하는 것이 밝혀진바 있다<sup>45</sup>.

다양한 PKC의 아형 중 칼슘 이온과 DAG에 의해 활성화되는 conventional PKC(cPKC)가 각질형성세포의 분화와 증식에 있어 매우 중요한 기능을 한다는 것을 기초로 할 때<sup>26,27</sup>, 표피 내 각질형성세포의 분화와 증식에 있어 세포 외 칼슘 이온의 농도는 매우 핵심적인 역할을 수행한다고 할 수 있다. 표피 내 형성되어 있는 칼슘 기울기는 과립층으로 갈수록 칼슘 이온의 농도가 증가하고<sup>13</sup> 이에 따라 cPKC의 활성화와 같은 다양한 반응이 일어나면서 증식 과정에 있던 각질형성세포가 분화하게 되고<sup>27,45</sup>, 각질형성세포가 표피층을 구성하는 데 중요한 역할을 하게 된다. 이와 함께 표피 내 칼슘 이온은 과립층에서 층판소체의 분비를 조절한다는 점에서 피부장벽 기능의 형성과 회복에 있어서도 핵심적인 역할을 하는 신호전달물질로 볼 수 있다<sup>34,46</sup>. 즉 표피 내 칼슘 이온은 피부장벽 기능의 회복에 중요한 신호전달물질이면서, PKC의 활성화에 중요한 역할을 수행한다. PKC는 각질형성세포



의 증식과 분화에 중요한 역할은 담당하며, 또한 피부장벽 기능의 형성과 회복에도 중요한 역할을 담당할 것으로 예상할 수 있다.

이에 따라 본 연구는 반복적인 테이프 스트리핑을 통하여 무모생쥐의 피부장벽을 급성으로 손상시킨 후 장벽 기능 회복의 조절 기전에서 PKC가 미치는 영향을 알아보고 PKC억제제와 칼슘 이온과의 관계를 확인하고자 하였다. 반복적인 테이프 스트리핑 방법을 사용하여 8-12주된 무모생쥐의 피부장벽을 급성 손상시킨 후, Western blot을 시행하여 표피에서의 PKC의 발현을 관찰한 결과 PKC- $\gamma$ 를 제외한 PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$ 가 검출되었고, 이것은 테이프 스트리핑 전의 정상 무모생쥐의 표피에서도 검출되었다. 하지만 시간에 따른 PKC 아형의 양적인 변화를 확인할 수 없었다. PKC의 활성화는 세포 내 존재하는 PKC가 세포막으로 이동해서 나타나기 때문에 양적인 변화가 활성 정도를 나타내지는 않는다. 따라서 Western blot을 통한 정량 실험을 통하여 PKC의 활성화를 측정하지는 못하였으나 각 subtype이 급성 피부장벽 손상 전, 후에 존재하는 것이 확인되었고, 이것으로 PKC가 피부장벽이 급격히 손상 받았을 때 어떤 역할을 할 것으로 생각된다. 본 실험에서 발현되지 않은 PKC- $\gamma$ 는 아직까지 피부에서 발견된다는 보고가 없고 뇌에서만 발견되는 것으로 보고되었다<sup>47</sup>. 이와 함께 각각의 PKC 아형에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 시행한 결과 PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$  단백질이 표피에서 확인되었다. PKC 억제제가 피부장벽의 회복에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 급성 피부장벽 손상을 유도한 후, broad type의 PKC 억제제인 calphostin C와 chelerythrine chloride와 subtype specific PKC 억제제를 도포하였다. PKC 억제제를 처리한 군이 대조군에 비하여 3시간과 6시간에서 피부장벽 회복율이 통계적으로 유의하게 저하됨을 알 수 있었다. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리한 후 중성 지질을 선택적으로 검출하는 Nile red 염색을 시행한 결과, 대조군에 비하여 장벽 회복 과정에서 나타나는 중성지질의 양이 적은 것이 관찰되었

다. 전자 현미경 검사에서는 과립세포 내 층판소체가 감소되어 있지 않고, 과립층과 각질층 사이에 층판소체의 분비가 관찰되지 않았으며 각질세포간 지질에서 다수의 미성숙된 구조가 관찰되었다. 이는 PKC 억제제를 처리하면 피부장벽의 급성 손상 후 회복 과정에서 나타나는 층판소체의 분비와 표피층 내 지질의 합성과 같은 과정이 억제되는 것으로 생각할 수 있다. 이 결과는 피부장벽의 급성 손상 후 회복 과정에서 PKC가 어떤 역할을 수행한다는 것을 보여준다.

표피 내 칼슘 이온 기울기는 피부장벽 기능이 손상됨에 따라 소실되고, 장벽 기능이 회복됨과 동시에 다시 나타나는 것으로 알려져 있다. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리한 후 전자 현미경으로 관찰한 결과 대조군에서 나타나는 표피 내 칼슘 기울기의 소실이 관찰되지 않았고 과립층 내에 칼슘이 여전히 높은 농도로 유지되어 있었다. 표피 내 칼슘 기울기의 소실이 손상된 장벽 기능의 회복을 유도하는 신호로 볼 때, PKC 억제제를 사용하는 경우 과립층의 칼슘 이온의 손실을 억제하여 피부장벽 기능의 회복을 저해하는 것으로 보인다. 각질형성세포에서 나타나는 이러한 PKC 억제제의 기전에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다. PKC 활성화제인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)가 HL-60 세포에서 칼슘의 유입을 억제하는 것이 보고되었고<sup>48</sup>, adrenal chromaffin 세포에서 주로 L형의 voltage-sensitive 칼슘 통로를 억제하여 세포 내 칼슘 유입을 억제하는 것이 보고되었다<sup>49</sup>. 각질형성세포에서 PKC 억제제의 기전을 알아보기 위해 배양된 각질형성세포에 PKC 억제제를 처리한 결과, 세포 내 칼슘 이온의 농도가 증가되었으며, 이러한 세포 내 칼슘 이온의 증가는 voltage-sensitive 칼슘 통로 중 L형의 칼슘 통로 차단제인 verapamil에 의하여 일부 억제되었다. 따라서 PKC 억제제에 의한 세포 내 칼슘의 증가는 voltage-sensitive 칼슘 통로와 연관되어 세포 외 칼슘이 유입되는 것으로 설명할 수 있다. PKC 억제제는 voltage-sensitive 칼슘 통로에 직접적인 영향을 미치거나 혹은 칼슘

통로를 조절하는 여러 가지 다른 인자들도 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 PKC 억제제와 L형의 voltage-sensitive 칼슘 통로 차단제를 함께 처리하였을 때 칼슘 이온의 증가가 완전히 억제되지 않는 것으로 보아, PKC 억제제에 의한 세포 내 칼슘 이온의 증가에는 다른 기전이 함께 관여할 것으로 생각된다. 수용체에 의해 조절되는 L형 칼슘 통로 이외에 다른 칼슘 통로가 일부 관여하거나, 활성화된 PKC에 의하여 칼슘 감지 수용체가 인산화되면 G단백질의 부착이 억제되어 세포 내 칼슘 저장소에서 세포 내로 칼슘 이온이 유리되는 것을 억제한다는 보고를 고려하여 볼 때<sup>50</sup>, 세포 내 칼슘 저장소에서 세포 내로 칼슘 이온의 유리 등 다른 기전이 관여할 것으로 생각된다. 피부장벽 회복에 있어서 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제만을 처리하는 경우 피부장벽의 회복이 저해되었으나, PKC 억제제와 칼슘 통로 차단제를 함께 도포하면 피부장벽 회복의 저해가 억제되는 것을 관찰하였다. 따라서 PKC 억제제는 과립세포 내의 칼슘의 농도를 증가시켜, 급성 피부장벽 손상 후 나타나는 표피 투과 장벽의 회복 과정을 억제하는 것으로 보인다. 그러므로 PKC 억제제가 칼슘의 유입에 영향을 주는 것으로 보아 PKC의 각 아형별 역할은 알 수 없으나 일부 아형이 피부장벽 기능의 급성 손상 후 회복 과정에서 칼슘의 세포 내 이동에 영향을 미쳐 회복 과정에 일부 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

피부장벽을 급격히 손상시킨 후 PKC가 피부장벽 회복에 미치는 영향과 칼슘과의 관계를 알아보려고 본 연구를 시행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상표피에서 PKC 아형(PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$ ) 단백질이 관찰되었고, 급성 피부장벽 손상 후 표피에서도 관찰되었다. PKC 억제제는 피부장벽 손상 후 회복을 억제하였다.
2. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 처리한 표피의 Nile red 염색 결과, 정상표피와 대조군에 비하여 중성지질의 양이 적은 것이 관찰되었다. 전자 현미경 검사 상 대조군에 비하여 과립세포 내 층판소체가 감소되어 있지 않고 과립층과 각질층 사이에 층판소체의 분비가 관찰되지 않았으며, 각질세포간 지질에서 다수의 미성숙된 구조가 관찰되었다.
3. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제를 도포하는 경우 대조군에서 나타나는 표피 내 칼슘 기울기의 소실이 관찰되지 않았다.
4. 배양된 각질형성세포에 있어서 세포 내 칼슘 이온의 농도는 PKC 억제제에 의하여 증가되었으며, 이러한 세포 내 칼슘 이온의 증가는 칼슘 통로 차단제에 의하여 억제되었다.
5. 급성 피부장벽 손상 후 PKC 억제제만을 처리하는 경우 피부장벽의 회복이 저해되었으나, 칼슘 통로 차단제를 함께 도포하면 피부장벽 회복의 저해가 억제되었다.

결론적으로 PKC 억제제는 각질형성세포 내의 칼슘의 농도를 증가시켜, 급성 피부장벽 손상 후 나타나는 표피투과 장벽의 회복 과정을 억제한다. 그러므로 PKC의 각 아형별 역할은 알 수 없으나 일부 아형이 세포 내로의 칼슘 이동에 영향을 미쳐 피부장벽 기능의 급성 손상을

후 회복 과정에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. *Cosmet Toilet* 1997;112: 49-59.
2. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80: 44-49.
3. Lee SH, Chung HS, Lee W. Epidermal lipid homeostasis. *Ann Dermatol* 1995;7: 99-111.
4. Su MH, Srinivasan V, Ghanem AH, Higuchi WI. Quantitative in vivo iontophoretic studies. *J Pharm Sci* 1994;83: 12-17.
5. Elias PM, Feingold KR. Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. *Semin Dermatol* 1992;11:176-182 .
6. Proksch E, Holleran WM, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *Br J Dermatol* 1993;128: 473-482.
7. Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 1992;24:57-82.
8. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. The lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992b;98:279-289.
9. Holleran WM, Takagi Y, Menon GK, Legler G, Feingold KR, Elias PM. Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest* 1993;91:1656-1664.
10. Choi EH, Ahn SK, Lee SH. 반복적인 이온영동에 의한 표피 calcium gradient의 변화가 피부장벽상태에 미치는 영향. *한국피*

부장벽학회지 2001;3:62-67.

11. 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.
12. Hennings H, Steinert P, Buxman MM. Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;102:739-745.
13. Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 1985b;84:508-512.
14. 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* 1992a;270:503-512.
15. Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, Feingold KR, Elias PM, Cullander C. Acute barrier perturbation abolishes the Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol* 1998;111:1198-1201.
16. 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.
17. Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg

- PM, Yuspa SH. Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* 1995;6:149–157.
18. Ahn SK, Hwang 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:993–999.
  22. Gangeswaran R, Jones KT. Unique protein kinase C profile in mouse oocytes: lack of calcium-dependent conventional isoforms suggested by RT-PCR and Western blotting. *FEBS Lett* 1997;412:309–312.
  23. Li LF, Fiedler VC, Kumar R. Protein kinase C isoform levels in normal and sodium dodecyl sulphate-irritated mouse skin. *Br J Dermatol* 1998;139:11–15.
  24. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isozymes: divergenece



- in signal transduction? *Biochem J* 1991;291:329–343.
25. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995;9:484–496.
  26. Dlugosz AA, Yuspa SH. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 1993;120:217–225.
  27. Dlugosz AA, Yuspa SH. Protein Kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TG<sub>K</sub>) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J Invest Dermatol* 1994;102:409–414.
  28. Oda Y, Tu CL, Chan WG, Crumrine D, Komuves L, Mauro T, et al. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in murine epidermal differentiation. *J Biol Chem* 2000;275:1183–1190.
  29. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–3450.
  30. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in Lipid Research* 1991;24:1–26.
  31. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1–26.
  32. Abraham WA, Downing DT. Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1990;1021:119–125.

33. 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.
34. Denda M, Fuziware S, Inoue K. Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2003;121:362–367.
35. Parker PJ, Murray–Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci* 2004; 117:131–132.
36. Dlugosz AA, Mischak M, Mushinski JF, Yuspa SH. Transcripts encoding protein kinase C–alpha, –delta, –epsilon, –zeta, and –eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cell. *Mol Carcinog* 1992;5:286–292.
37. Fischer SM, Lee ML, Maldve RE, Morris RJ, Trono D, Burow DL, et al. Association of protein kinase C activation with ornithine decarboxylase in murine but not in human keratinocyte cultures. *Mol Carcinog* 1993;7: 228–237.
38. Lee Y S, Yuspa Sh, Dlugosz AA. Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C pathway. *J Invest Dermatol* 1998;111:762–766.
39. Wu H, Park HY. Protein kinase C–beta–mediated complex formation between tyrosinase and TRP–1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311:948–953.
40. Lichti U, Yuspa S H. Modulation of tissue and epidermal

transglutaminases in mouse epidermal cells after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and/or retinoic acid in vivo and in culture. *Cancer Res* 1988;48:74-81.

41. Le Panse R, Coulomb B, Mitev V, Bouchard B, Lebreton C, Dubertret L. Differential modulation of human fibroblast and keratinocyte growth by the protein kinase C inhibitor GF 109203X. *Mol Pharmacol* 1994;46:445-451.
42. Bollag WB, Ducote J, Harmon CS. Effects of the selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-7549, on the proliferation of cultured mouse epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1993;100:240-246.
43. Ohba M, Ishino K, Kashiwagi M, Kawabe S, Chida K, Huh NH, et al. Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 1998;18:5199-5207.
44. Li L, Lorenzo PS, Bogi K, Blumberg PM, Yuspa SH. Protein kinase C  $\delta$  targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol* 1999;19:8547-8558.
45. Lee YS, Dlugosz AA, McKay R, Dean NM, Yuspa SH. Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C  $\alpha$  in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal

- keratinocytes. *Mol Carcinog* 1997;18:44–53.
46. 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.
  47. Saito N, Shirai Y. Protein kinase C  $\gamma$  (PKC  $\gamma$ ):Function of neuron specific isotype. *J Biochem* 2002;132:683–687.
  48. Song SK, Choi SY, Kim KT. Opposing effects of protein kinase A and C on capacitative calcium entry into HL-60 promyelocytes. *Biochem Pharmacol* 1998;56:561–567.
  49. Sena CM, Santos RM, Boarder MR, Rosario LM. Regulation of Ca<sup>2+</sup> influx by a protein kinase C activator in chromaffin cells: differential role of P/Q- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Pharmacol* 1999;366:281–292.
  50. Bai M, Trivedi S, Lane CR, Yang Y, Quinn SJ, Brown EM. Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor(CaR) inhibits coupling to Ca<sup>2+</sup> store release. *J Biol Chem* 1998;273:21267–21275.

## Abstract

Effect of protein kinase C on the recovery after acute skin barrier disruption

Hee Sung Kim

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Seung Hun Lee)

The skin is a physical, chemical, mechanical and microbial barrier; preventing water and electrolytes loss and protecting human body from various outside assaults. The barrier function of the skin is mainly carried out by the outermost layer of the epidermis, stratum corneum (SC); The intercellular lipid located between the corneocytes in SC plays a significant role in maintaining the homeostasis of permeability barrier function. Intercellular lipid contents are provided by the lamellar bodies that are originated from the granuloocytes in epidermis through the exocytosis to the stratum granulosum and SC junction.

There is a calcium gradient in the epidermis and these calcium ions act as an important signaling factor for epidermal permeability barrier function homeostasis. Protein kinase C(PKC) which comprises a family of serine/threonine kinases plays a central role in the proliferation and differentiation of keratinocytes. In the process of differentiation of the keratinocytes, calcium-induced PKC activation plays a central role in the expression of the keratinocyte

differentiation-specific marker proteins, such as involucrin, loricrin, and filaggrin. Recently, it has been reported that, in cultured human keratinocytes, the PKC activation is associated with the enzyme activation of ceramide which is one of the intercellular lipid contents. In this study, we investigated the effect of PKC in the recovery of epidermal permeability barrier function using hairless mouse animal experiment model. We examined the expression and localization of various PKC isoforms in hairless mouse skin after acute skin barrier disruption using tape-stripping treatment. We also investigated the effects of PKC inhibitors on the recovery of barrier function by measuring trans-epidermal water loss (TEWL).

As a result, we observed the expression of PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\eta$  proteins in a hairless mouse skin. The rate of recovery in acutely disrupted skin barrier treated with PKC inhibitor is shown to be decreased. The secretion of lamellar bodies were inhibited and there was a significant change in intercellular lipid structure. Also, PKC inhibitors suppressed the loss of normal epidermal calcium gradient after acute skin disruption and increased the intracellular calcium ion in cultured keratinocytes. It was inhibited by calcium channel blocker. In consequence, PKC inhibitors increase the calcium ion density in keratinocyte thus suppress the barrier recovery process after acute skin barrier disruption. Therefore PKC is thought to be related with the recovery process of acute skin disruption.

---

Key words: Epidermal permeability barrier function, Protein kinase C, Calcium ion