

초음파가 표피 투과 장벽과 표피 지질
합성에 미치는 효과

연세대학교 대학원
의 학 과
조 남 준

초음파가 표피 투과 장벽과 표피 지질 합성에 미치는 효과

지도 이 승 현 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 남 준

조 남 준 의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

년 월 일

감사의 글

본 논문이 완성 되기까지 자상한 지도와 늘 열심히 연구 하시는 모습으로 저를 일깨워 주시고 배려해 주신 이승헌 지도 교수 겸 연세 의대 피부과학 교실 주임 교수께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 심사를 맡아 주신 피부과학 교실 방동식, 원주의대 피부과학 교실 안성구, 의학 공학 교실 김덕원, 치과 대학 구강 생물학 교실 서정택 교수께도 아울러 깊은 감사를 드립니다. 그 외에도 연구에 많은 도움을 주신 원주의대 최응호 교수님, 피부과 연구원 여러분들과 의국원들 그리고 교실원 여러분들께 감사 드립니다. 만일 여러분의 도움이 없었다면 논문의 완성이 쉽지는 않았을 것입니다.

오늘의 결실이 있기 까지 곁에서 돌봐 주고 격려해 주신 어머니와 동생들, 사랑하는 아내, 딸 수연이와 처가 가족들에게 사랑과 감사의 마음을 전하고 마지막으로 하늘에 계시는 아버님과 더불어 이 기쁨을 나누고자 합니다.

2004 년 9 월 10 일

조남준 씀

<차례>

그림 및 표 차례.....	
국문요약	1
I . 서론.....	3
II. 재료 및 방법.....	7
1. 연구내용 및 범위	7
2. 연구방법	7
가. 동물준비.....	7
나. 초음파 시행	8
다. 조직 생검	8
라. 전자 현미경 관찰	8
(1) Calcium-ion capture cytochemistry	9
(2) Ruthenium tetroxide(RuO ₄) 후 고정 법	9
마. 지질 분석	9
바. 지질합성에 관여하는 효소 측정을 위한 real time RT-PCR	11
(1) RNA 분리	11
(2) RNA 정량	12
(3) real time RT-PCR	12
3. 통계 처리	13
III. 결과	14
1. 경표피 수분손실양(TEWL).....	14
2. 전자현미경 관찰	14

가. Calcium-ion capture cytochemistry	14
나. Ruthenium tetroxide(RuO ₄) 후 고정 법	17
3. 초음파 처리 후 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산의 변화	19
4. 초음파 처리 후 HMG CoA reductase 와 serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase mRNA 의 변화	20
가. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase mRNA	20
나. Serine palmitoyl transferase(SPT) mRNA	21
다. Fatty acid synthase(FAS) mRNA	22
IV. 고찰	23
V. 결론	27
참고문헌	28
영문요약	36

그림 차례

그림 1. Effect of ultrasound on skin barrier function	14
그림 2. Normal epidermal calcium gradient	15
그림 3. Calcium gradient changes after ultrasound treatment in hairless mouse skin.....	16
그림 4. The electron microscopic findings of the SC - SG interface of hairless mouse of control group.	17
그림 5. Alteration of SC - SG interface after ultrasound treatment in hairless mouse skin	18
그림 6. mRNA level of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase after ultrasound treatment in hairless mouse skin.	20
그림 7. mRNA level of serine palmitoyl transferase(SPT) after ultrasound treatment in hairless mouse skin	21

그림 8. mRNA level of fatty acid synthase(FAS) after ultrasound treatment in hairless mouse skin	22
---	----

표 차례

표 1. Change of epidermal lipids after treatment of ultra	
sound	19

.

초음파가 표피 투과 장벽과 표피 지질 합성에 미치는 효과

피부는 외부로부터 인체를 보호하는 중요한 장벽의 역할을 담당하고 있다. 이 역할은 주로 피부의 가장 바깥 구조인 각질층이 담당 하고 있다. 각질층은 단백질이 풍부한 각질세포와 각질세포간 지질 및 교소체 등으로 구성 되어 있으며, 각질세포 사이에 위치하는 층상구조를 이루는 지질이 연속적인 층을 이루고 있다. 각질층의 지질은 주로 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산으로 이루어져 있고 각질층의 지질은 대부분 층판소체에서 유래된 다. 층판소체는 유극층 상부와 과립층에 있으며, 과립 층에 가장 풍부하게 존재하고, 과립층과 각질층이 인접하는 곳에서 과립층의 세포막과 융합되어, 그 내용물을 세포간격으로 분비한다. 표피 투과 장벽이 손상되면 표피의 지질합성과 DNA 합성이 증가되고, 층판소체의 분비가 증가되는 등의 변화가 일어나는데, 이런 변화의 신호 역할은 이온이나 여러 종류의 사이토카인이 관여 한다. 이온 중에서 칼슘 이온이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 피부에 이온영동과 초음파를 시행하면 경표피 수분손실량의 증가 없이, 표피내 칼슘이온 농도의 변화를 유도하여 피부장벽형성에 필수적인 층판소체의 분비가 증가되는 것이 보고된 바 있다. 그러나 아직까지 피부에 초음파를 처치한 후에 표피의 지질 변화에 대한 연구는 없는 상황이다.

무모생쥐 배부의 피부에 초음파를 시행한 후 표피내의 지질의 변화를 확인하기 위한 방법으로 표피를 분리하여 지질을 정량 분석하였다. 표피내의 지질합성의 변화를 확인하기 위하여 지질합성에 관여하는 효소인 HMG CoA reductase 와 serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase 의 mRNA 의 양을 real time RT-PCR 을

이용하여 정량 하였다. 경표피 수분손실량을 측정하여 표피 투과 장벽의 손상을 알아보고, ruthenium tetroxide 후 고정과 calcium ion capture cytochemistry 를 이용하여 각질층 지질의 형태학적 변화와 표피내 칼슘 이온의 변화를 관찰 하였다. 결과는 다음과 같다.

1. 초음파 처치 후 경표피 수분손실량은 처치전과 비교해서 차이가 없다.
2. 대조군의 칼슘이온 분포는 과립층에서 가장 많은 칼슘 이온이 관찰 되었고, 극세포 층과 기저 세포층에서 칼슘이온은 과립층에 비해 적은 양상을 보였으나, 초음파 처치 후 칼슘 이온의 분포는 상부 표피에서의 칼슘 이온은 감소하고 하부 표피에서는 증가하는 양상을 나타냈다. 처치 후 6 시간이 지난 피부에서는 칼슘 이온 분포가 정상으로 회복 되는 양상을 보였다.
3. 각질 세포 간격에 대한 전자현미경 관찰에서 정상군에 비하여 초음파 처치군에서 각질 세포간 지질의 변화와 층판소체의 분비 증가가 관찰 되었다.
4. 표피의 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산의 양은 초음파 처치군에서 대조군에 비해 증가하였다.
5. HMG CoA reductase 와 serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase 의 mRNA 의 양을 real time RT-PCR 을 이용하여 측정한 결과 초음파 처치 후에 증가 되었다.

이상의 결과는 초음파가 칼슘 이온의 변화를 유도 하고 이 변화로 인하여 표피 지질 합성이 증가 하여 표피 지질이 증가 되는 것으로 생각된다.

핵심 되는 말: 표피 투과 장벽, 초음파, 표피 지질, 표피 칼슘 기울기, HMG CoA reductase, serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase.

초음파가 표피 투과 장벽과 표피 지질 합성에 미치는 효과

<지도교수 이 승 현>

연세대학교 대학원 의학과

조 남 준

I. 서론

피부는 수분과 전해질의 손실을 막는 보호막의 역할과 인체 외부의 여러 해로운 자극이나 물질이 피부를 통해 흡수되는 것을 막는 장벽의 역할을 수행하고 있으며, 각질층이 이러한 역할을 담당 하고 있다¹. 각질층은 단백질이 풍부한 각질세포와 각질세포간 지질로 구성 되어 있다². 각질층의 지질은 보통 생체막과는 다르게, 인지질을 함유하지 않고 주로 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산으로 구성되어 있다. 인지질, sphingomyelin, 콜레스테롤을 함유하는 보통의 생체막은 물에 잘 녹는 작은 물질의 투과가 용이하여 장벽으로서의 역할은 잘 하지 못하지만, 인지질이 없는 각질층은 지질들이 직선적으로 잘 연결되어 있어 수용성 물질이나 작은 물질들의 투과를 방지하는 훌륭한 장벽 역할을 하고 있다. 각질층의 지질은

전 층에 골고루 분포하는 것이 아니라, 상부로 갈수록 점차 감소한다. 교소체에 의한 각질세포간의 결합도 상부로 갈수록 약해지고, 그 숫자도 적어지면서 형태도 점차 쇠퇴한다^{3,4}. 각질층의 지질은 대부분 층판소체에서 유래되며, 과립층과 각질층이 인접하는 곳에서 과립층의 세포막과 융합되어, 그 내용물이 세포간격으로 분비된다. 층판소체에서 분비된 작은 막성 원판상 구조들은 융합되고, 넓고 사이가 비지 않는 다층 지질층이 형성되어 수분손실에 대한 장벽역할을 하게 된다⁵. 각질세포의 표면에 위치하는 각질세포의 지질막은 각질세포막과 서로 공유결합으로 연결되어 있다^{6,7}.

표피의 수분함량은 기저층에서 과립층 하부까지는 65%에서 70% 정도로 비교적 일정하지만, 과립층과 각질층의 경계부위에서는 40%로 감소하며, 하부 각질층에서는 40%정도이지만 상부로 갈수록 15%까지 수분함량이 감소한다. 경표피 수분 손실 (transepidermal water loss, TEWL)은 정상에서 시간당 $0.1 - 0.4\text{mg}/\text{cm}^2$ 정도이다. 표피 투과 장벽이 손상 받는 경우 표피 지질의 합성이 증가한다⁸. 손상된 피부장벽은 수증기가 투과되지 않는 막 (water-vapor impermeable membrane)에 의해 인위적으로 교정될 수 있는데, 장벽이 손상된 후에 표피의 표피 지질의 합성 증가는 증기가 투과되지 못하는 막으로 밀폐하면 이러한 합성이 억제된다. 이는 경표피 수분손실 자체가 표피지질 합성의 조절에 관여한다는 증거로 생각되었다⁹. 그러나 경표피 수분 손실량의 증가 없이 즉 표피 투과장벽의 손상이 없이 표피내의 칼슘 이온만을 변화시키는 이온영동으로 층판소체의 분비증가를 유도 시킴으로 칼슘이 중요한 신호전령자라고 설명할 수 있게 되었다¹⁰. 표피에는 저밀도 지방단백 수용체가 극히 적으며 콜레스테롤의 합성은 혈류 내에서 순환되는 콜레스테롤의 영향을 거의 받지 않는다. 표피에서의 지질합성은 외적인 변동, 특히 외부로부터 섭취되는 지질양과는 관계가 없이 비교적 일정하게 일어날 것으로 추측되고 있다^{11,12}.

극성유기용매를 도포 하거나, 접착테이프를 이용해 각질층을 벗겨 내거나, 필수지방산을 제한한 식이를 이용하여 표피 투과 장벽에 손상을 유도하면 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산의 합성이 증가 된다¹³. 표피 투과 장벽의 손상은 세라마이드, 콜레스테롤, 자유 지방산의 합성을 증가시킬 뿐만 아니라 이들을 합성하는데 필요한 효소의 mRNA 도 증가시킨다^{14, 15}. 콜레스테롤 합성에 속도 조절 효소인 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase 와 스핑고지질의 합성을 관장하는 serine palmitoyl transferase (SPT)의 mRNA 는 극성유기용매를 도포 하거나, 접착테이프를 이용해 표피 투과 장벽에 손상을 가한 피부에서 증가된다. HMG CoA reductase 나 넷에 대한 특이한 억제제를 처치하면 콜레스테롤과 스핑고지질의 합성이 억제되고, 결국 손상된 표피 투과 장벽기능의 회복이 지연된다^{15, 16}. 표피 투과 장벽이 손상 되면 표피의 지질합성과 DNA 합성이 증가되고, 증판소체의 분비가 증가되는데, 이런 변화의 신호 역할은 이온이나 사이토카인들이 담당하고 있을 것으로 생각된다. 이온 중에서 칼슘 이온이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 그 증거들은 다음과 같다, 첫째 표피 투과 장벽의 급성손상 후에 상부표피에서 칼슘 이온의 손실이 일어나 정상적인 표피 칼슘 기울기가 소실되며 표피 투과 장벽이 회복됨에 따라 다시 과립 층의 칼슘 이온 농도가 증가되어 칼슘 기울기가 회복된다¹⁷. 둘째 표피 투과 장벽의 급성손상 후 회복반응은 표피의 세포내 칼슘 이온 함유량 변화에 의해 조절될 수 있다¹⁸. 셋째 만성 표피 투과 장벽 이상을 보이는 필수지방산 결핍 생쥐에 국소적으로 콜레스테롤 생성을 억제하는 HMG-CoA reductase 억제제 (lovastatin)를 도포 하면 하부표피의 세포내 칼슘 이온이 증가 되고 칼슘 기울기의 소실이 나타난다. 그러나 무모생쥐의 피부를 latex 로 밀폐하면 칼슘 기울기가 정상화된다^{19, 20}. 넷째 무모생쥐의 피부장벽을 손상시킨 후 고농도의 칼슘 이온 용액에 피부를 담그면 피부장벽 손상 시 일어나는 표피 지질의 합성증가가

일어나지 않고 장벽회복이 억제 된다. 그러나 칼슘 이온 통로 차단제인 verapamil 이나 nifedipine 을 첨가 하면 억제효과를 차단할 수 있다¹⁸. 다섯째 초음파나 이온영동을 시행하여 경표피 수분 손실양의 증가 없이 칼슘 기울기의 소실을 유도하면 층판소체의 분비가 증가된다^{10, 20}.

초음파는 정상적인 청력을 가진 인간이 느낄 수 없는 정도로 주파수가 높은 음파(18KHz 이상)로서 의학적으로는 진단, 치료, 파괴등의 목적으로 이용되고 있다²¹. 진단용으로는 주로 3 - 10 MHz 의 초음파를 이용하고, 파괴용으로는 18 - 100KHz 의 초음파가 주로 사용된다. 치료용 초음파는 주로 주파수가 1 - 3 MHz 이며, 열 작용과 비열작용에 의해 그 효과를 나타낸다. 열 작용은 물리치료, 염좌 회복, 통증감소의 목적으로 사용되며, 비열작용은 조직회복^{22, 23}, 정맥류성 궤양의 치료²³, 욕창의 치료²⁴, 허혈 근육의 혈류개선²⁵, 건의 재생²⁶, 섬유모세포에서 단백질의 생성 촉진²⁷ 등에 이용된다. 피부조직에서 1MHz 의 초음파는 37mm, 3MHz 의 초음파는 12mm 까지 투과하여 그 효과를 나타낼 수 있다. 최근에 1MHz 초음파를 처치한 노화피부에서 표피의 두께와 진피 교원질이 증가됨을 보고 하였다²⁸. 표피 투과 장벽의 손상이 완전히 회복되지 않은 상태에서 손상이 반복되거나 장기화 되면 표피의 증식과 과각화증상이 나타난다. 따라서 표피 투과 장벽이 손상된 피부 질환인 아토피 피부염, 건선, 건성습진, 자극 피부염등의 발생과 악화는 이러한 기전이 관여 하는 것으로 생각된다. 손상된 표피 투과 장벽을 손상시키면 표피를 통하여 수분이 빠져나가면서 여러 이온들의 손실이 함께 일어나는데, 이들 이온들 중 칼슘 이온의 표피내 변화가 표피 투과 장벽 회복에 중요하다. 이를 근거로 하는 새로운 개념의 피부 질환 치료와 예방법을 생각하게 되었다.

연구자들은 최근 연구^{10, 29,32} 에서 피부에 초음파를 시행하면 경 표피 수분 손실양의 증가 없이, 표피내 칼슘이온 농도의 변화를 유발하여 피부장벽형성에 필수적인 층판소체의 분비가 증가되는 것을 보고하였다. 초음파를 이용하면

피부장벽을 견실하게 만들어서 외부의 피부장벽 손상 물질과 자극으로부터 피부를 보호하는 예방효과를 나타낼 수 있음을 의미하는 결과이다. 초음파는 오래 전부터 피부를 통한 약물전달을 위한 방법으로 사용되어왔으나 최근에는 화장품을 도포하고 처치해주는 피부미용을 위한 방법으로 널리 사용되고 있다. 그러나 아직까지 피부에 초음파를 시행한 후에 각질층에 대한 지질분석은 이루어지지 않았고 표피에서 실질적으로 지질합성이 증가되는 지에 대한 연구도 미미한 현실이다.

이에 연구자는 초음파를 피부에 시행한 후 표피 내에서 지질의 정량적인 변화를 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구내용 및 범위

무모생쥐의 배부 피부에 초음파를 시행 한 후 경표피 수분 손실량을 측정하였다. 시간 별로 표피지질의 형태학적 변화와 칼슘 이온의 변화를 보기 위해 Ruthenium tetroxide 후 고정법과 calcium ion capture cytochemistry 를 시행하였다. 또한 초음파를 시행한 후 표피 지질의 변화를 확인하기 위하여 표피를 분리하여 지질을 정량 분석하였고, 표피내의 지질합성의 변화를 확인하기 위하여 지질합성에 관여하는 효소의 mRNA 의 양을 real-time RT-PCR 을 이용하여 정량 하였다.

2. 연구방법

가. 동물준비

생후 8 주에서 12 주의 암컷 무모생쥐(hairless mice: Hr/Hr)를 상대온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 40-60%사이의 사육조건에서 동일한 표준사료와 수분을 공급하고 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용할 무모생쥐의 경우 배부 피부에 상처가 없는 부위를 선택하였다.

나. 초음파 시행

초음파기구(정훈기공, 한국)는 출력은 1.0 W/cm^2 으로서, 3MHz 의 초음파를 방출하도록 조정하였다. 무모생쥐를 마취시키고 초음파용 젤리를 바른 후 초음파 프로브(probe)를 배부의 피부에 밀착시킨 후 5 분간 시행하였다. 대조군은 초음파용 젤리만을 도포 하고 전원을 끈 초음파 프로브를 5분 밀착하였다.

다. 조직 생검

초음파를 5 분간 시행한 후부터 3 시간, 6 시간, 24 시간이 경과한 후에 지질 분석과 1, 2.5, 3, 4, 6, 12, 24 시간 후 지질합성 효소의 정량분석을 위하여 경추를 탈골 시킨 직후 피부조직을 생검하였다. 각 단계마다 경표피 수분 손실량을 Tewameter TM 210 (Courage + Khazaka, Germany)로 측정하였다.

라. 전자 현미경 관찰

(1) Calcium-ion capture cytochemistry

표피내 칼슘이온의 변화를 관찰하기 위하여 calcium ion capture cytochemistry 를 사용하였다. 생검한 피부 조직을 0.5mm^3 의 조각으로 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate, 1.4% sucrose 가 함유된 고정액에 넣고 얼음을 채워서 냉장고에서 하루 밤 동안 고정하였다. 다음날 고정액을 제거하고 조직을 두 시간 동안 얼음을 채운 osmium/pyroantimonate 에 후 고정한 후 pH10 의 차가운 증류수로 10 분간 세척하였다. 모든 후 고정 조직들은

0.1M sodium cacodylate buffer 에 10 분간 헹구고 50% ethanol 로 5 분씩 2 회, 70%와 95% ethanol 로 각 10 분씩 2 회, 100% ethanol 로 각 20 분씩 4 회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide 로 각 15 분간 2 회 조직을 침투 시키고 통상적인 방법으로 epon 을 포매시킨 후 투과 전자 현미경 (H-500, HITACHI, Japan)으로 관찰 하였다.

(2) Ruthenium tetroxide (RuO_4) 후 고정 법

각질층과 과립층 사이의 증판소체의 분비 양상과 각질세포간 지질막 구조를 관찰하기 위해 Ruthenium tetroxide(RuO_4) 후 고정법을 시행하였다. 조직을 얻은 후 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 로 조성된 modified Karnovsky 용액에 넣어 고정 하였다. 고정된 조직은 실온에서 1 시간 동안 방치한 후 18-24 시간 동안 냉장고에서 보관하였다. Karnovsky 용액을 제거한 후 0.1 M sodium cacodylate buffer 로 40 분씩 3 회 세척하였다. 이후 후 고정액을 최종농도 0.25% RuO_4 , 0.1 M sodium cacodylate buffer 용액에 빛을 차단한 상태로 실온에서 45 분간 시행하였다. 후 고정 후 0.1 M sodium cacodylate buffer 에서 10 분간 1 회 세척한 후 50% ethanol 로 5 분씩 2 회, 70%와 95% ethanol 로 각 10 분씩 2 회, 100% ethanol 로 각 20 분씩 4 회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide 로 각 15 분간 2 회 조직을 침투 시키고 통상적인 방법으로 epon 을 포매시켜 35 시간 동안 78°C incubator 에서 resin 을 polymerization 시킨 후 ultra thin section 을 한 후 통상적인 uranyl acetate 와 lead citrate 로 염색하여 투과 전자 현미경(H-500, HITACHI, Japan)으로 관찰하였다

마. 지질분석

초음파 시행 군 과 초음파 대조군 (각 n=5)은 3 군데 이상에서 8mm 펀치를 이용하여 피부조직을 생검하였다. 생검한 피부는 표피 쪽이 아래로 가도록 잘 펴고 칼날로 피하지방을 제거하였다. 0.5% trypsin PBS (pH 7.2-7.4)용액을 페트리디시에 넣고 진피가 아래로 가도록 잠기게 하였다. 상온에서 90-120 분 정도 방치한 후 표피를 조직에서 분리하고 남은 조직은 제거하였다. PBS 에 띄워서 와동 후 세포 조직편을 제거하고 증류수로 2 회 세척한 후 kim wipes 로 물기를 제거하였다. 건조기에서 건조 후, 무게를 측정하고 시험관에 옮긴 후 Bligh-Dyer 용액(MeOH: CHCl₃: water = 4:2:1.6) 5ml 를 넣어 흔들어주고 초음파 처리한 후 24 시간 동안 상온에서 방치하였다. 원심분리 후 상등액을 따로 모으고 침전물에 CHCl₃: MeOH(2:1) 4ml 를 첨가 후 흔들어 원심분리 하였다. 모아둔 상등액과 함께 여과하고 여과액에 증류수 6ml 를 넣고 원심분리(2000rpm, 10 분)를 시행하였다. 상층액은 버리고 하층액은 35℃에서 N₂ 가스로 증발 건조하고, CHCl₃: MeOH(2:1)에 녹여 냉동 보관하였다^{31,32}.

지질분석을 위한 Chromatography 는 silica gel 을 입힌 HPTLC plate(60F254, 20x10cm, Merk, Germany)를 사용하였다. 지질정량분석을 위해 사용될 표준물질은 Phytosphingosine(PS) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), Galactoserebroside(GS) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), cholesterol(CH) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), cholesterol sulfate(CS) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), triolein(TG) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), oleic acid(FFA) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), cholesteryl oleate(CE) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), ceramide type III, ceramide IV, squalene(SQ)과 Ceramide VI (Doosan Chemical Co. Korea)를 사용하였다.

자동화된 TLC sampler III ATS3(Camag, Basel, Switzerland)를 사용하여 각 plate 마다 각 표준혼합물을 2, 5, 10, 15, 20 μ l씩 plate 하단에 10mm 에 7mm 의 밴드로 자동 점적하였다. 각 plates 를 Camag AMD instrument 로 (1) methanol/ chloroform/ water (19:79: 2), (2) methanol/ chloroform/ ethyl ether/ hexane (20:25:40:15), (3) chloroform/ ethyl ether/ hexane (25:50:25), (4) ethyl ether/ hexane (52:48), (5) ethyl ether/ hexane(5:95)의 용매하에서 전개하였다. 전개 전에 각 plates 는 chloroform-methanol (2:1, v/v)로 미리 수세하였다. 크로마토그래피 후에 plate 는 10% (w/v) cupric sulfate pentahydrate (in 8% (v/v) o-phosphoric acid solution)에 판을 담근 후 charring 시키고 140℃에서 15 분간 굽는 과정을 시행하여 발색시켰다. 시료들과 지질표준혼합물들의 발색된 띠는 photodensitometer(TLC2 scanner II)(Camag, Switzerland) 와 TLC evaluation software (ver. 3.15)(Camag, Switzerland)를 사용하여 slit width 0.4×7mm, wavelength 570 nm 로 scanning 한 후 각 plates 마다 각각의 표준물질의 농도와 질량에 따른 각각의 밀도와 면적을 측정하여 시료와의 상관식을 구하여, 시료들의 정량적 측정을 시행하였다^{11,31}.

바. 지질합성에 관여하는 효소 측정을 위한 real time RT-PCR

(1) RNA 분리³³⁻³⁵

피부 생검 후 피하지방을 제거하고 10mM EDTA in PBS 에 담가 37℃에서 35 분간 숙성하여 표피와 진피가 분리 되도록 한 후 다음과 같은 순서로 진행하였다.

표피를 칼로 긁어 1.5ml tube 에 모은 후 lysis solution 을 500 μ l를 가하였다. 5 ml 또는 10 ml syringe 를 사용해 in & out 하여 조직을 파쇄한 후 3 분간 실온에서 incubation 시켰다. 0.1 ml chloroform 을 가한 뒤 와동 후 5 분간 숙성

하였다. 4℃ 13,200rpm 에서 15 분간 원심분리 하였다. 상층액만을 모아 동량인 0.5 ml isoprophyl alcohol 을 가하고 와동 후 10 분간 숙성 하였다. 4℃ 13,200rpm 에서 10 분간 원심분리 하였다. 용액을 조심스럽게 쏟아 버린 후 DEPC 로 처리한 75% 에탄올을 가하였다. 15 분간 원심 분리하여 에탄올을 다 제거한 후 실온 또는 37℃에서 압착 결정을 건조 하였다. 마른 압착 결정에 20 - 30 μ l 의 DEPC 처리한 증류수를 취하여 RNA 를 녹였다.

(2) RNA 정량

RNA 를 DEPC 처리한 증류수와 1:100 으로 희석 후 spectrophotometer 를 이용해 흡광도 260nm 와 280nm 에서 측정하였다.

(3) real time RT-PCR

지질합성에 관여하는 다양한 유전자의 염기 서열 부위를 증폭할 수 있는 시발체는 computer program 을 이용하여 고안 제작하였다. 내부 대조 유전자 증폭을 위해서 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 시발체를 합성하여 사용하였다. 또한 각각의 지질 합성 효소의 유전자와 내부 대조 유전자에 대하여 형광 발광체를 부착한 특이 탐식자를 합성하여 사용하였다.

총 50ml 의 PCR 조건을 계획하여 각 반응 당 10mM dNTP Mix, 각 5nmol 의 5 ‘과 3’ primer, 25mM MgCl₂, 1 nmol 의 probe, 그리고 Light Cyler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Applied Science)를 이용하여 내부 대조군과 함께 표피조직을 동일한 조건으로 증폭시켰다. 반응 조건은 최적화 실험을 통하여 결정하며, 총 증폭 주기는 55 회로 제한하나 실시간으로 증폭되는 산물의 증폭 정도에 따라 변화를 주었다. 반응에 이용되는 증폭기는 반응이 진행됨에 따라 연결된 컴퓨터 화면 상에 유전자가 증폭되면서 분리되는 형광 발광체간의 상호

반응에 의하여 발생하는 특이 파장의 형광을 감지하여 증폭 양상을 실시간으로 추적 관찰하였다. real time RT-PCR 에 사용한 primer 의 염기 서열은 다음과 같다. Serine Palmitoyl transferase (forward primer 5'-CTGCTGAAGTCCTCAAGGAGTA-3', reverse primer 5'-GGTTCAGCTCATCACTCAGAATC-3'), HMG-CoA reductase (forward primer 5'-GATCCAGGAGCGAACCAA-3', reverse primer 5'-GCCAATAGACACACCACGTT-3'), fatty acid Synthase (forward primer 5'-CCTCACTGCCATCCAGATTG-3', reverse primer 5'-CTGTTTACATTCTCCAGGAC-3').

3. 통계처리

통계학적 의미는 two-tailed unpaired Student's t test 를 이용하여 결정하였다. 결과는 mean±S.D.로 표시하였고, 유의수준은 0.05 이하로 설정하였다.

III. 결과

1. 경 표피 수분 손실 양(TEWL)

경표피 수분 손실량은 실험 전, 후에 대조군과 초음파 처리군 모두에서 유의한 변화가 없었다. ($p>0.05$)(Fig.1.)

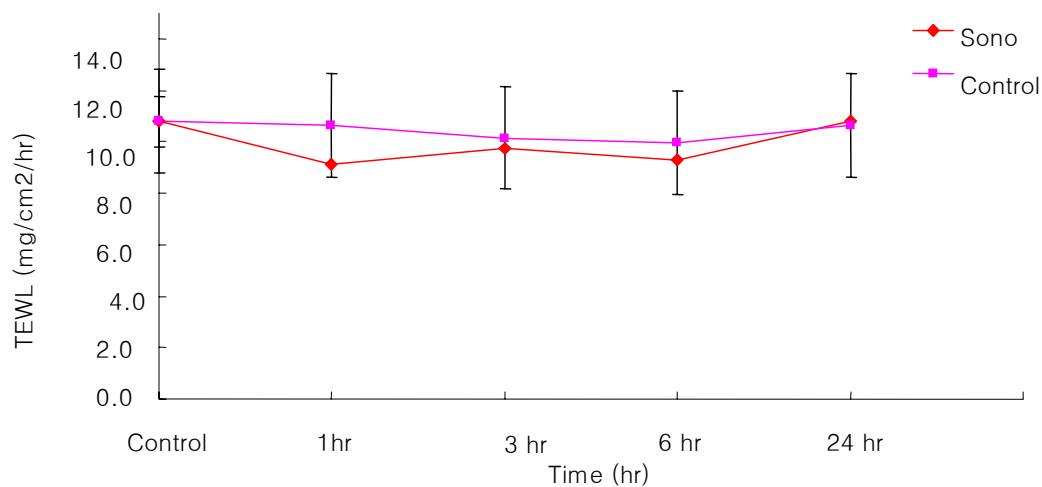


Fig. 1. Effect of ultrasound on skin barrier function.

There were no significant differences in TEWL level between control and ultrasound treated hairless mice skin

2. 전자 현미경 관찰

가. Calcium-ion capture cytochemistry

대조 군의 칼슘 이온 분포는 과립층에서 가장 높은 농도를 보였고 극세포층, 기저세포층으로 내려 가면서 감소하여 기저 세포층에서 가장 낮은 농도를 나타내었다. (Fig 2)

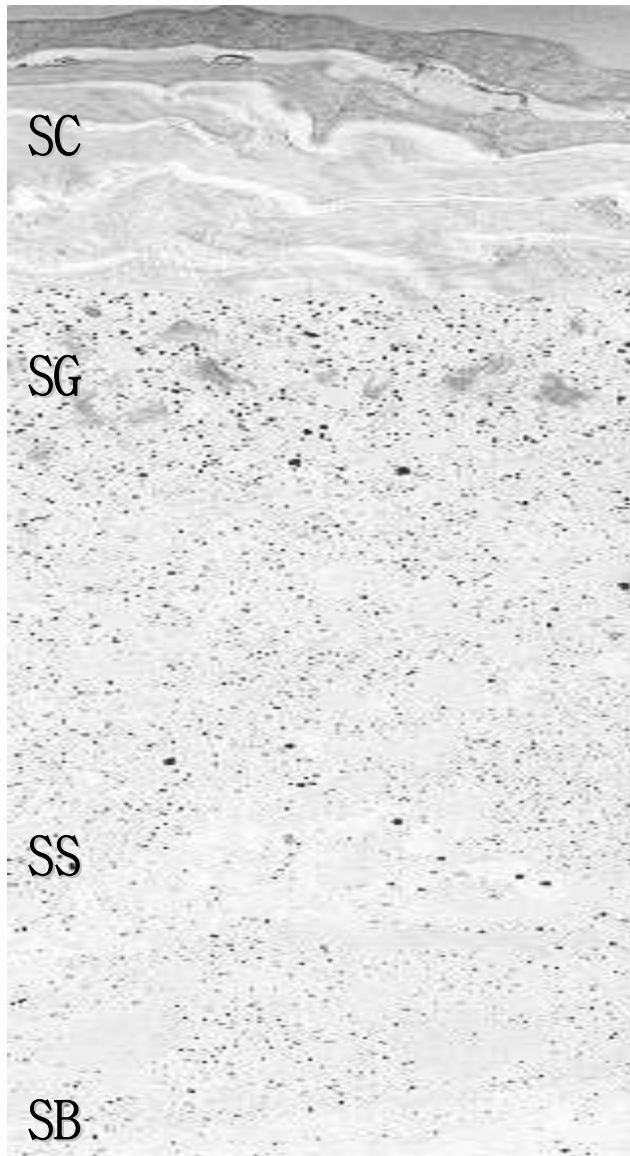


Fig. 2. Normal epidermal calcium gradient: The gradient of calcium within the epidermis, with highest levels in the stratum granulosum (SG) and lowest levels in the stratum basale (SB), is very important for both permeability barrier homeostasis and epidermal differentiation. (X 5,000)

한편 초음파 처리 후 즉시 (Fig. 3A), 15분 후 (Fig. 3B), 1 시간 후 (Fig. 3C), 3 시간 후 (Fig. 3D), 6 시간 후 (Fig. 3E) 의 표본은 초음파 처리 직후와 15 분, 1 시

간, 3 시간 후 까지는 과립 층의 칼슘이온은 감소된 양상이 관찰 되었다. 6 시간 후 생검한 표본에서는 칼슘 이온이 회복 되는 양상이었다.

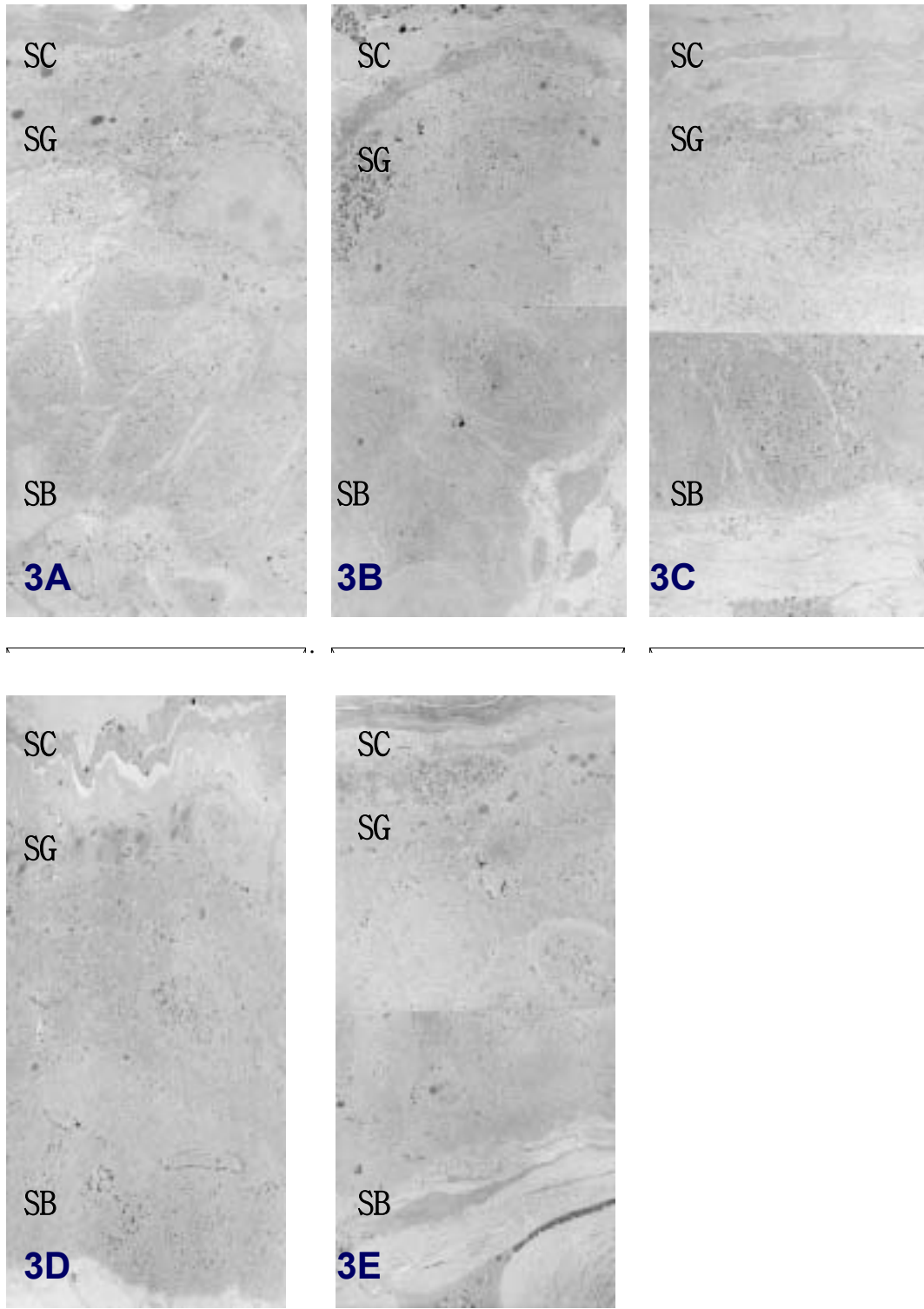


Fig.3. Calcium gradient changes 0 min (3A), 15 min (3B), 1 hr (3C), 3 hr (3D) and 6 hr (3E) after 3 MHz ultrasound treatment in hairless mouse skin. There were decreased calcium in upper epidermis and some increased calcium in lower epidermis in fig. 3A, 3B, and 3C. There was some recovery of calcium gradient on Fig.3E compare with Fig. 3A - 3C (X 5,000) .

나 Ruthenium tetroxide (RuO_4) 후 고정 법

대조군에서 각질 세포 사이에 전형적인 지질의 다층상 구조(화살표)가 관찰되었다 (Fig. 4).

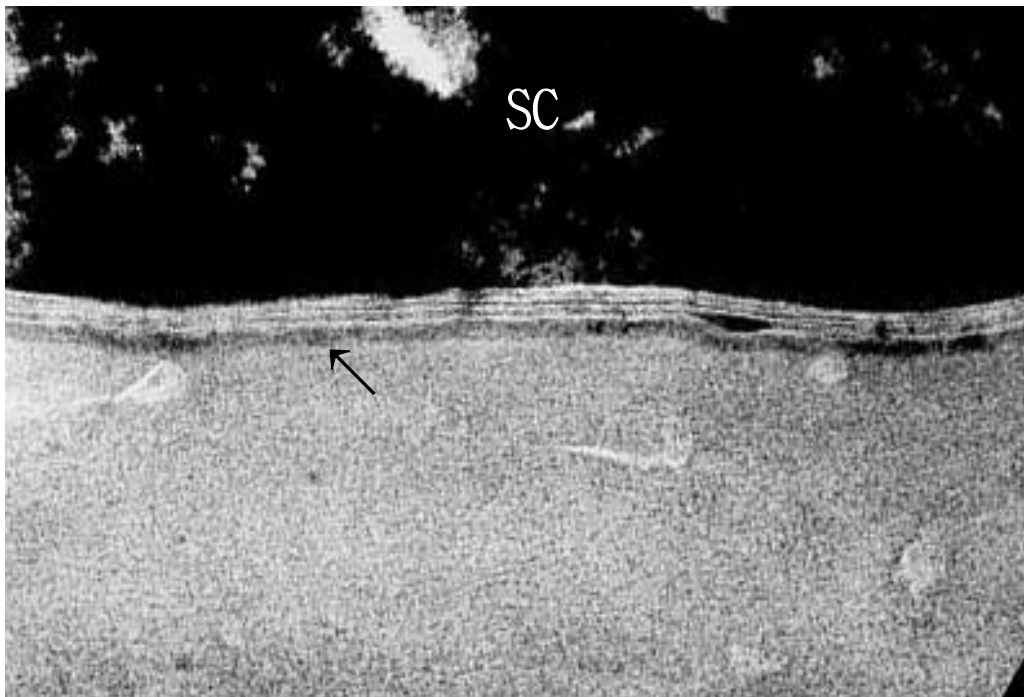


Fig.4. The electromicroscopic findings of the SC - SG interface of hairless mice of control group. It showed typical multi-lamellar structure (arrow) and lamellar bodies in SG (X 50,000).

초음파 처치군에서 시행한 RuO₄ 염색 소견상 초음파 처치 후 즉시 (Fig. 5A,A'), 1 시간 후 (Fig. 5B), 3 시간 후 (Fig. 5C,C'), 6 시간 후에 (Fig. 5D,D') 관찰한 표본은 대조군에 비해서 열공의 확장과 각질세포간 지질의 변화 및 증판소체의 분비 증가가 관찰되었다.

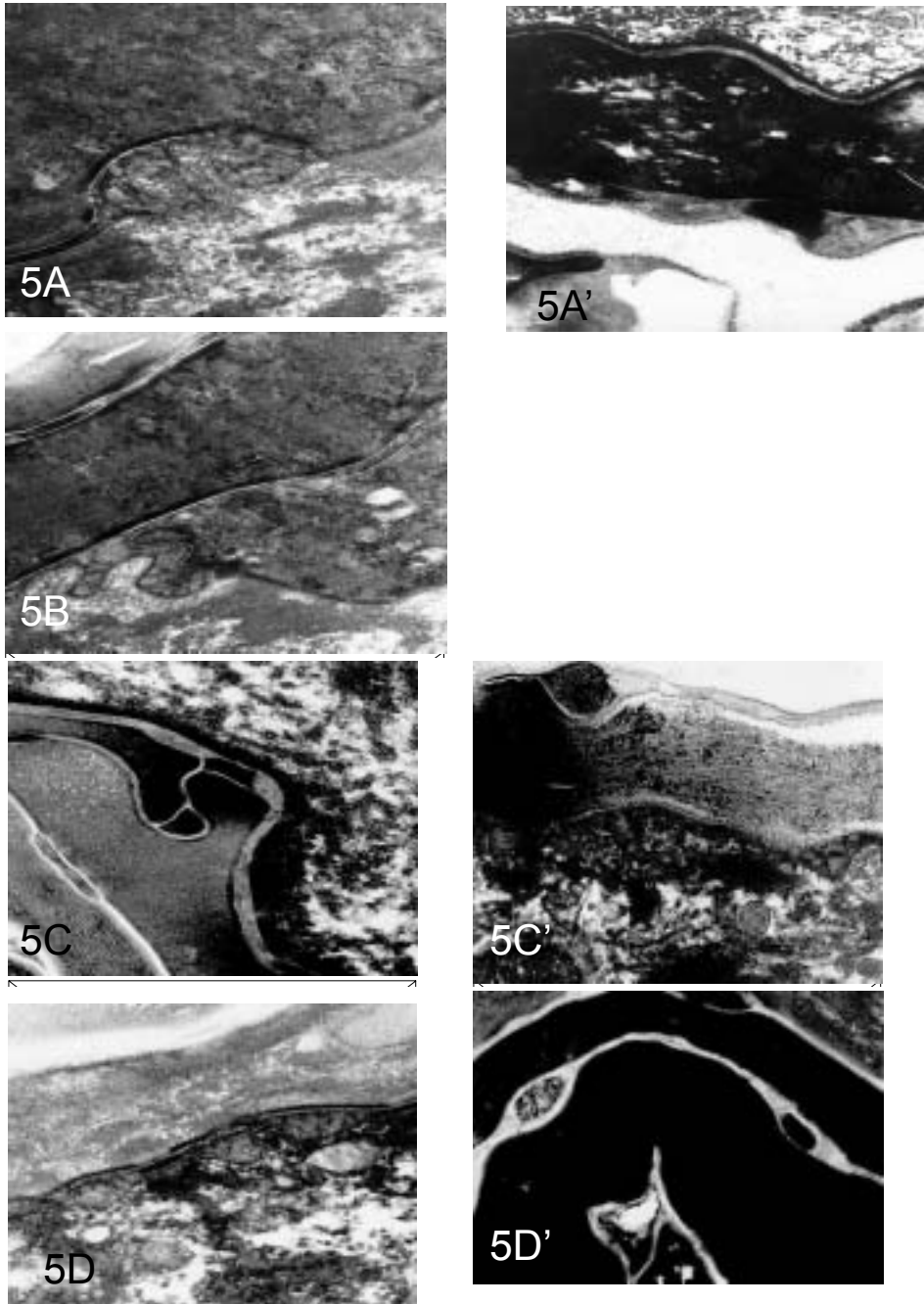


Fig. 5. Alteration of SC-SG interface 0 min (5A,A'), 1 hr (5B), and 3 hr (5C,C') and 6 hr (5D,D') after 3 MHz ultrasound treatment in hairless mouse

skin. Lacuna dilatation, partial distension of the intercellular layer, loss of multi-lamellar structures of the stratum corneum and increased lamellar body secretion were observed in ultrasound treated hairless mice skin. These findings were observed also in 6 hr post treatment sample (X 50,000) .

3. 초음파 처리 후 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산의 변화

세라마이드는 처리 6 시간 후에서 증가하며, 24 시간에서도 대조군에 비하여 증가되었다. 콜레스테롤은 처리 후 3 시간에서 증가되어 이후 계속 증가된 양상이었다. 자유지방산은 처리 후 3 시간에서 오히려 약간 감소 하였으나, 이후 6 시간, 24 시간에서는 대조군에 비하여 증가 되었다 (Table 1).

Table 1. Change of ceramide, cholesterol, free fatty acid after 3 hr, 6 hr, and 24 hr treatment of ultra sound.

	control	3 hr	6 hr	24 hr
ceramide	100	103±16.3 ^{NS}	125±15.7*	122±23.4*
cholesterol	100	115±24.7*	116±25.5*	111±25.9*
free fatty acid	100	98± 17.2 ^{NS}	115±26.2*	113±25.8*

Unit, % of control, * p<0.05 vs. control, NS (not significant) vs. control

4. HMG CoA reductase 와 serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase 의 mRNA 양

가. HMG CoA reductase 의 mRNA 양

초음파 처치 후 HMG CoA reductase 의 mRNA 양은 대조군에 비해 유의 있게 증가하였다 ($p<0.05$) (Fig. 6) .

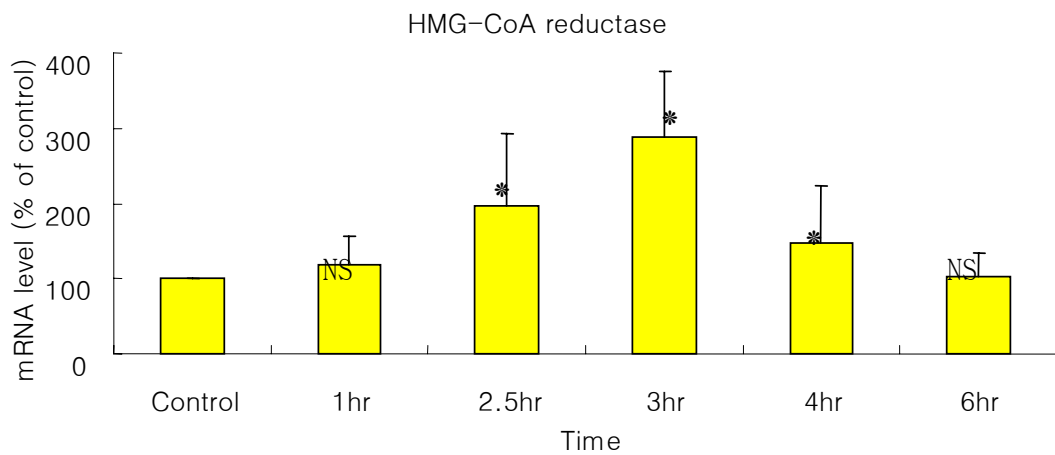


Fig. 6. mRNA level of HMG CoA reductase after ultrasound treatment in hairless mouse skin, * $p<0.05$ vs. control, NS (not significant) vs. control.

나. Serine palmitoyl transferase(SPT)의 mRNA 양

SPT 의 mRNA 양은 초음파 처치 1 시간 후 $83 \pm 57\%$ 로 다소 감소 하는 양상을 보였으나 통계학적인 의의가 없었다. 초음파 처치 후 3 시간 후 SPT 의 mRNA 양은 $301 \pm 140\%$ 로 최고로 증가 하였으며 ($p<0.05$)로 그 후 감소 하는 양상이 었다 ($p<0.05$) (Fig. 7) .

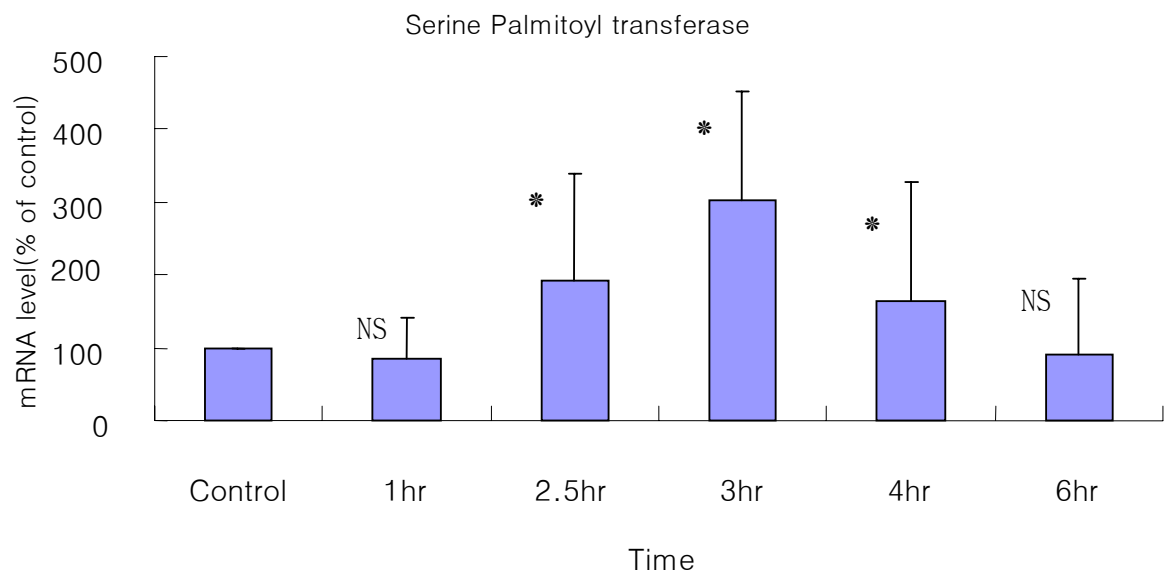


Fig. 7. mRNA level of SPT after ultrasound treatment in hairless mouse skin, * $p<0.05$ vs. control, NS (not significant) vs. control.

다. Fatty acid synthase(FAS) 의 mRNA 양

FAS 의 mRNA 양은 초음파 처치군에서 대조군에 비해 증가하는 양상이었다 ($p<0.05$) (Fig. 8) .

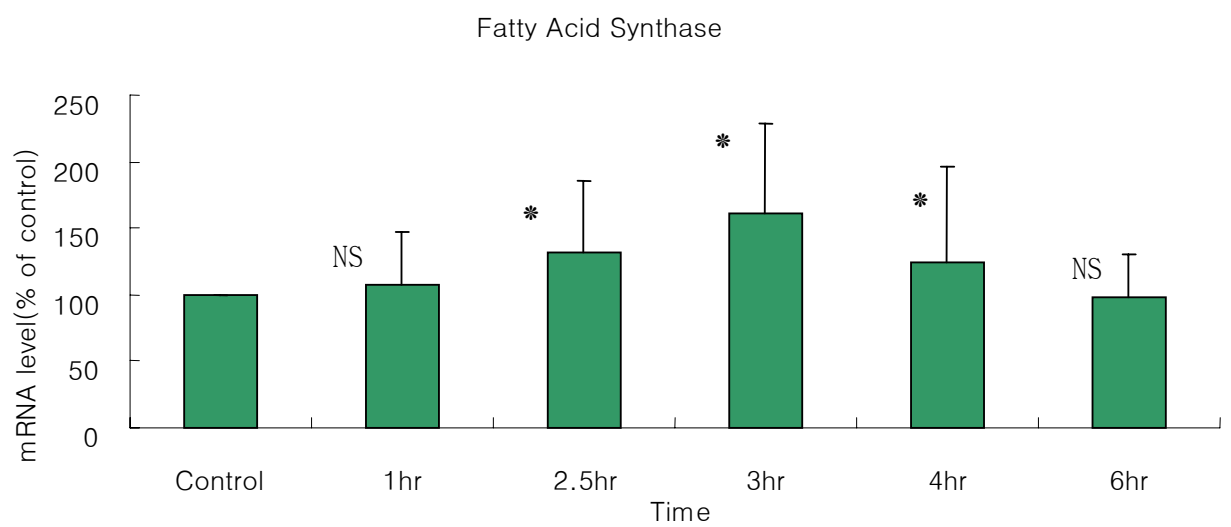


Fig. 8. mRNA level of FAS after ultrasound treatment in hairless mouse skin, * $p<0.05$ vs. control, NS (not significant) vs. control.

IV. 고찰

피부는 외부의 환경과 접하고 있는 기관으로서 외부로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 건조한 육지에서 포유동물이 생존을 하기 위해서는 생체내의 수분이 건조한 환경으로 증발되거나 손실되는 것을 억제하는 발달된 피부 장벽이 필요하며, 인체 피부의 가장 바깥 구조인 각질층이 이러한 역할을 담당하고 있다¹. 각질층의 기능은 표피의 수분과 전해질의 손실을 억제하는 장벽의 역할을 함으로써 표피의 건조화를 막고, 표피가 정상적인 생화학적 대사를 할 수 있는 환경을 제공한다. 또한 외부의 자외선이나 물리적 손상으로부터 피부를 보호하며, 화학물질의 흡수를 조절하여 인체를 보호하고, 세균, 곰팡이, 바이러스 등이 피부로 침범하는 것을 억제하는 인체 방어기전의 교두보 역할을 담당하고 있다. 표피 투과 장벽의 중요한 기능을 수행하는 표피 지질은 각질층과 과립층 사이에서 층판소체내의 지질이 세포외유출에 의해 세포 간격으로 분비 된다. 층판소체에는 인지질, glycosphingolipids, 자유 스테롤등의 지질과 지질 가수분해 효소, glycosidase, 단백효소, 산 인산분해효소 등의 효소들과 당이 존재한다^{2,3,15,35}. 각질층의 지질은 층판소체에 존재하는 인지질과 glycosphingolipid 등의 지질은 거의 없으며, 주로 세라마이드와 자유 지방산으로 이루어져 있다. 이것은 glycosidase 와 지질 가수분해 효소가 인지질을 자유 지방산으로 glycosphingolipid 를 세라마이드로 분해하기 때문이다. 콜레스테롤의 경우는 steroid sulfatase 에 의해 콜레스테롤 황산염이 콜레스테롤로 변화 되는 것으로 알려져 있다⁴. Steroid sulfatase 는 각질층 상부에서는 지방층을 분해하여 각질세포의 탈락에도 관여하는 것으로 알려져 있는데, 반성 어린선인 경우 steroid sulfatase 가 부족하여 각질세포의 탈락이 지연 되어 증상이 나타난다⁴. 층판소체 내에서 존재하는 효소들은 극성 지질을 각질층의 비극성 지질로 전환 시켜서 표피

투과 장벽의 역할을 할 수 있도록 해준다³⁰. 따라서 증판소체의 분비 증가는 손상된 표피 투과 장벽을 회복 시키고 보강하는 반응 중 첫 번째 단계이다. 표피 지질의 합성 증가에서 표피 콜레스테롤 합성 증가는 HMG CoA reductase 의 활성화 증가와 관련 되어 있다. 표피 지방산 합성 증가는 acetyl CoA carboxylase 와 fatty acid synthase(FAS) 활성화 증가와 연관이 되고, 표피 세라마이드 합성 증가는 serine palmitoyl transferase(SPT)와 연관된다^{36 - 42}. 표피 지질중 콜레스테롤과 지방산은 sterol element binding protein (SREBP)에 의해 조절 되지만 SPT 는 다른 경로를 통하는 것으로 알려져 있다⁴³. 칼슘 이온 농도는 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가 하여 과립층에서 가장 높다^{44,45}. 즉 기저층에서 낮은 농도의 칼슘 이온은 세포의 증식과, 높은 농도의 칼슘 이온은 과립층의 세포 분화와 관련이 있다. 피부 투과 장벽의 손상 시 표피 상부로부터 칼슘 이온의 손실이 일어나 표피 내의 칼슘 기울기의 변화가 나타난다. 이때 칼슘기울기의 변화는 표피 투과 장벽의 손상에 의한 경표피 수분 손실량의 증가에 의한 수동적인 칼슘 이온의 손실에 의한 것이다. 선택적으로 과립층에서 칼슘 이온의 양을 변화 시킬 수 있는 초음파와 이온 영동은 피부 투과 장벽의 손상 없이 즉 경표피 수분 손실량의 증가 없이 증판소체의 분비를 유도 하므로^{10, 29, 30, 45}, 칼슘 이온은 증판소체의 분비와 피부 투과 장벽 회복에 중요한 조절 인자로 생각되며, 칼륨이나 마그네슘 이온도 표피 투과 장벽 손상 후 회복에 영향을 줄 수 있다^{44, 46}. 그 외에도 여러 사이토카인들이 관여하는 것으로 알려졌으나 최근의 연구에 의하면 칼슘 이온 변화에 따른 이차적인 변화로 생각된다⁴⁷. 즉 기존의 연구에 의하면 급성 표피 투과 장벽 손상 후 TNF- α , IL-1 α , IL-1ra, IL-1 β , GM-CSF 등 여러 사이토카인들이 증가되므로 표피 투과 장벽 손실이 사이토카인 분비를 증가 시킨다고 하였다^{14, 48, 49}. 그러나 사이토카인들의 증가는 수증기 불투과막에 의한 피부 밀폐에 의해 억제 되지 않으므로 경표피 수분 손실량의 증가 자체가

사이토카인 증가의 신호가 아니라고 생각된다^{50, 51}. 또 최근 연구에 따르면 표피 투과 장벽의 손상 없이 칼슘 기울기의 변화를 초래하는 이온영동을 시행한 무모생쥐의 표피에서 TNF- α 와 IL-1 α 의 발현이 증가되었다. 그러므로 표피 투과 장벽 손상, 즉 경표피 수분 손실량 증가 보다는 칼슘 기울기의 변화가 사이토카인의 발현에 작용함을 주장하였다⁴⁷. 이는 표피 투과 장벽 손상 후 수증기 불투과막의 피부 밀폐가 피부 투과 장벽의 정상적인 회복을 지연 시키며 표피 내의 칼슘 기울기의 정상 복귀도 지연시키는 기전과 연관 된다⁵².

초음파가 치료 작용을 나타내는 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 몇 가지 가설이 제시 되고 있다⁵³. 초음파는 미세관을 압박하고 미세 거품의 진동과 음향 흐름을 생성하여 세포막의 투과도와 이차 전령인 adenylyl cyclase 의 활성화에 직접 영향을 주므로 이온과 단백질의 이동에 변화가 생기고 유전자 발현에 대한 세포내 신호 전달에 변화를 유발하여 치료 작용을 나타낸다⁵⁴. 초음파에 의해 세포 표면에 가해지는 압력이 양이온 통로의 ‘stretch receptor’에 영향을 주어 세포내 양이온의 농도를 변화 시켜 유전자 발현을 조절하는 신호 전달 체계에 변화를 유발할 수 있다⁵⁵. 초음파에 의한 기계적 자극은 세포 외 기질에 부착되어 있는 세포 골격에 변화를 일으켜 유전자 발현과 세포 대사에 영향을 줄 수 있다⁵⁶. 뼈에서는 초음파에 의해 생체 전류가 강화되어 작용을 나타낸다⁵⁷. 초음파에 의한 온도 상승이 세포에 변화를 줄 수 있다⁵⁸. 지금까지 피부과학 영역에서 초음파에 대한 연구는 대부분 약물의 경표피 흡수에 대한 것이다^{59 - 65}. 피부에 대한 초음파의 작용은 보통 네 가지로 설명하고 있다. 첫째, 가스 거품의 진동에 의한 공동화 현상, 둘째, 체온 상승으로 인한 열 효과, 셋째, 대류 전달(convective transport) 유발, 네 번째, 초음파에 의해 유발된 압력의 변화에 의한 기계적 효과로 이야기 한다^{60, 65}. 초음파는 주파수에 따라 나눌 수 있는데 저자마다 차이가 있으나 초고주파 (10 - 20 MHz), 고주파 (3 - 10 MHz), 중주파 (0.7 - 3.0

MHz), 그리고 저주파 (18 - 100 kHz)로 구분 한다^{59 - 65}. 고주파 초음파는 주로 임상 영상 쪽에 사용되기 때문에 진단 초음파라고도 한다⁶⁵. 중주파 초음파는 주로 물리 치료에 사용되기 때문에 치료 초음파라 하며, 저주파는 암 치료나 결석 파괴, 백내장 적출, 지방 흡입 등에 사용하며, 주로 파괴 목적으로 사용된다⁶⁵. 경 표피 약물 전달은 고주파와 저주파 초음파가 주로 사용된다^{61 - 65}.

본 실험에서 초음파 처치군과 대조군 사이에 경표피 수분 손실량의 차이는 없었다. 기존 실험과 같이 초음파는 표피 투과 장벽 기능에 손상을 주지 않음을 확인하였다. 그리고 calcium ion capture cytochemistry 를 이용하여 표피내 칼슘 이온의 변화를 관찰한 결과 초음파 처치 후 과립층의 칼슘은 감소 하고 기저층의 칼슘은 증가하는 양상이 관찰 되었으며 초음파 처치 6 시간 이후에는 회복되는 양상을 보였다. RuO₄ 후 고정법을 이용하여 각질층 지질의 구조를 관찰한 결과 초음파 처치군에서 각질층의 정상적인 지질 다층막 구조를 분열 시켰고 과립층과 각질층 경계부위에서 층판소체의 분비를 유도 시켰다. 이러한 소견은 48 시간 후에 정상으로 회복 되었다. 초음파 처치 후 표피 지질의 양을 측정한 결과 세라마이드는 처치 6 시간 후에서 증가하고, 24 시간에서도 대조군에 비하여 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 콜레스테롤은 처치 후 3 시간에서 증가되어 이후 계속 증가 되었다. 자유지방산은 처치 6 시간 후에서 증가하고, 24 시간에서도 대조군에 비하여 증가되었다. 표피 지질 합성에 관여하는 효소들의 mRNA 의 양을 측정한 결과 초음파 처치 후 대조군에 비해서 HMG CoA reductase, SPT, FAS 의 mRNA 가 증가되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 초음파는 표피 투과 장벽에 손상을 주지 않으면서 표피의 칼슘 기울기에 변화를 초래하며, 층판소체에서 지질 분비를 유도하며, 표피 지질의 합성을 증가 시키는 것으로 생각할 수 있었다. 초음파가 피부 질환에 대한

효과와 표피 지질의 형태학적 변화에도 불구하고 경표피 수분 손실량은 변화가 없었다. 그러므로 향후 이러한 기전에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결론

피부는 외부 환경으로부터 인체를 보호하는 장벽의 역할을 담당하고 있으며, 이 역할은 주로 각질층이 하고 있다. 대부분의 각질층 지질은 보통 생체막과는 다르게, 인지질을 없으며 주로 세라마이드, 콜레스테롤, 자유 지방산으로 이루어져 있다. 표피 투과 장벽의 손상 시에는 여러 대사상의 변화가 일어나는데 이런 변화의 신호 역할은 칼슘 이온이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근에 초음파를 시행하면 경표피 수분 손실량의 증가 없이, 즉 표피 투과 장벽 기능의 손상 없이 표피 내 칼슘이온 농도의 변화를 유도하여 증판소체의 분비가 증가되는 것을 보고한 바 있다.

무모생쥐의 피부에 초음파를 시행한 후 표피를 분리하여 지질을 정량 분석하고, 지질합성에 관여하는 효소인 HMG CoA reductase 와 SPT, FAS 의 mRNA 의 양을 real time RT-PCR 을 이용하여 시간 별로 정량 하였으며, 경표피 수분손실량을 측정하고, RuO₄ 후 고정과 calcium ion capture cytochemistry 를 이용하여 표피 지질의 형태학적 변화와 표피내 칼슘 이온의 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰 하였다.

초음파 처치 후 경표피 수분 손실량은 차이가 없었으며, 칼슘 이온은 상부 표피에서는 감소하고 하부 표피에서는 증가하는 양상을 보였으며, 각질 세포간 다층 지질막의 분리와 증판소체의 분비 증가가 관찰 되었다. HMG CoA reductase 와 SPT, FAS 의 mRNA 양과, 콜레스테롤, 세라마이드, 자유 지방산의 양은 증가 되었다.

이상의 결과 초음파가 칼슘 이온의 표피 기울기의 변화를 유발 하였고, 이러한 변화에 의해 표피 지질 합성에 관여하는 효소들의 mRNA 가 증가 되고 표피 지질의 합성이 증가 되는 것으로 사료된다. 향후 이온 영동을 초음파와 같이 시행한 후

표피 지질의 변화를 연구하고, 초음파가 피부 질환 치료에의 적용 가능성 여부와, 표피 지질의 형태학적 변화가 나타남에도 불구하고 경표피 수분 손실양에 변화가 없는 이유를 규명할 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Hadley NF. Lipid water barriers in biological systems. *Prog Lipid Res* 1989; 28:1-33.
2. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991; 24:1-26.
3. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983; 80:44-49.
4. Elias PM, Williams ML, Maloney ME, Bonifas JA, Brown BE, Grayson S et al. Stratum corneum lipids in disorders of cornification: Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J Clin Invest* 1984; 74:1414-21.
5. Epstein EH Jr, Williams ML, Elias PM. Steroid sulfatase, X-linked ichthyosis, and stratum corneum cell cohesion. *Arch Dermatol* 1981; 117:761-772.
6. Abraham WA, Downing DT. Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1021:119-125.
7. Friberg SE, Kayali I, Beckerman W, Rhein LD, Simion A. Water permeation of reaggregated stratum corneum with model lipids. *J Invest Dermatol* 1990; 94:377-380.

8. Feingold KR, Brown BE, Lear SR, Moser AH, Elias PM. Effect of essential fatty acid deficiency on cutaneous sterol synthesis. *J Invest Dermatol* 1986; 87:588-591
9. 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.
10. 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.
11. Nicolaides N. Skin lipid: their biochemical uniqueness. *Science* 1974; 186:19-26.
12. Jacson SM, Wood LC, Lauer S, Taylor JM, Cooper AD, Elias PM et al. Effect of cutaneous permeability barrier disruption on HMG CoA reductase, LDL receptor, and apolipoprotein E mRNA levels in the epidermis of hairless mice. *J Lipid Res* 1992; 22:1307-1314.
13. Elias PM, Feingold KR. Lipids and the epidermal water barrier: Metabolism, regulation, and pathophysiology. *Semin Dermatol* 1992; 11:176-182.
14. Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 1991; 87:1668-1673
15. Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 1992; 24:57-82.
16. Elias PM. Dynamics of the epidermal barrier: New implications for percutaneous drug delivery, topical therapeutic and disease pathogenesis. *Prog Dermatol* 1992; 2:1-8.

17. Menon GK, Lee S, Elias PM. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 1992; 270:503-512
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Doan N, Reber P, Megbji S, Harris M, In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57:409-419
22. Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin Sci* 1968; 35:273-285
23. Dyson M. Role of ultrasound in wound healing. In: Kloth LC, McCulloch JM, Feeder JR eds. *Wound healing: Alternatives in management*. Philadelphia: PA, Davis, 1990:259-285
24. Paul BJ, LaFratta CW, Dawson AR, Canestrari R. Use of ultrasound in the treatment of pressure sores in patient with spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil* 1960; 41:438-441

25. Hogan RDB, Burke KM, Frank, in TD. The effect of ultrasound on the microvascular hemodynamics in skeletal muscle: Effects during ischaemia. *Microvasc Res* 1982; 23:370-379
26. Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S. Mendisa S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Bil* 1990; 16:801-807
27. Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatol Rehabil* 1975; 14:237-249
28. 이세원, 최응호. 노화피부에 대한 초음파의 효과. *대한피부연구학회지* 2001; 8: 209 - 218
29. Cho NJ, Jiang S, Choi EH, Ahn SK, Lee SH. Calcium gradient and skin barrier changes after sonophoresis(Abst). *J Invest Dermatol* 2000; 114:838
30. 최응호, 안성구, 이승현. 반복적인 이온영동에 의한 표피 calcium gradient 의 변화가 피부장벽상태에 미치는 영향. *한국피부장벽학회지* 2001; 3:62-67.
31. Behne M, Uchida Y, Seki T, Montellano PO, Elias PM, Holleran WM, Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol* 1999; 114:185-192.
32. Ponc M, Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M, Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int J Pharm* 2000; 203, 211-235..
33. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-917.

34. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest* 1992; 90:482-487.
35. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Methods for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxy methyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1977; 74:5350-5357.
36. Holleran WM, Man MQ, Gao WN, Menon GK, Elias PM, Feingold KR, Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function; Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest* 1991; 88:1338-1345.
37. Proksch E, Elias PM, Feingold KR. Regulation of 3 hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in murine epidermis: modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements. *J Clin Invest* 1990; 85: 874-882
38. Ottay KA, Wood LC, Grunfeld C, Elias. PM, Feingold KR. Cutaneous permeability barrier disruption increases fatty acid synthetic enzyme activity in the epidermis of hairless mice. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 401-405
39. Holleran WM, Feingold KR, Man MQ, Gao WN, Lee JM, Elias PM. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J Lipid Res* 1991; 32: 1151-1158
40. Harris IR, Farrel AM, Grunfeld C, Holleran WM, Elias PM, Feingold KR. Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key

enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in epidermis. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 783-787

41. Stachowitz S, Alessandrini F, Abeck D, Ring J, Behrendt H. Permeability barrier disruption increases the level of serine palmitoyl transferase in human epidermis. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1048-1052

42. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991; 96: 523-526

43. Harris IR, Farrel AM, Holleran WM, Jackson S, Grunfeld C, Elias PM et al. Parallel regulation of sterol regulatory elementary binding protein-2 and the enzymes of cholesterol and fatty acid synthesis but not ceramide synthesis in cultured human keratinocytes and murine epidermis. *J Lipid Res* 1998; 39: 412-422

44. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. The lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992; 270: 503-512

45. Lee SH, Elias PM, Feingold KR. A role of ions in barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 976-979

46. Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. *Cosmet Toilet* 1997; 112: 49-59

47. 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

48. Wood LC, Elias PM, Calhaoun C. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from preformed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 397-403
49. Wood LC, Elias PM, Sequeria-Martin SM. Occlusion lowers cytokine mRNA levels in essential fatty acid deficient and normal mouse epidermis but not after acute barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 834-838
50. Wood LC, Feingold KR, Sequeria-Martin SM. Barrier function coordinately regulates epidermal IL-1 and IL-1 receptor antagonist mRNA levels. *Exp Dermatol* 1994; 3: 261-266
51. Man MQ, Wood LC, Elias PM. Cutaneous barrier repair and pathophysiology following barrier disruption in IL-1 and TNF type I receptor deficient mice. *Exp Dermatol* 1999; 8: 261-266
52. Ahn SK, Hwang SM, Jiang S, 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
53. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ. Exposure to low intensity ultrasound increase aggregation gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 1996; 14: 802-809
54. Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo JA, Weiner LS. Low intensity pulsed ultrasound increase calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc* 1989; 12: 15-21
55. Sachs F. Mechanical transduction by membrane ion channel: A mini reviews. *Mol Cell Biochem* 1991; 104: 57-60

56. Wang N, Burtler JP, Ingber DE, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; 260: 1124-1127
57. Behari J, Singh S. Ultrasound propagation in 'in vivo' bone. *Ultrasonics* 1981; 19: 87-90
58. Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB, The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vivo' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics* 1980; 18: 33-37
59. Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficacy, mechanism and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002; 243: 1-15
60. Joshi A, Raje J. Sonicated drug delivery. *J Con Real* 2002; 83: 13-22
61. Alvarez-Roman R, Merino G, Kalia AN, Naik A, Guy RH. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. *J Pharm Sci* 2003; 92: 1138-1146
62. Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and therapeutical analysis of ultrasound induced permeabilization of cell membrane. *Biophysical Journal* 2003; 84: 3087-3101
63. Terahara T, Mitragotri S, Langer R. Porous resin as a cavitation enhancer for low-frequency sonophoresis. *J Pharm Sci* 2002; 91: 753-759
64. Merino G, Kalia Y, Guy RH. Ultrasound enhanced transdermal transport. *J Pharm Sci* 2003; 92: 1125-1137
65. Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery. *DDT* 2004; 15: 670-676

Abstract

The effect of ultrasound on epidermal
permeability barrier and lipid synthesis

Nam Joon Cho

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung Hun Lee)

The stratum corneum provides protection of the underlying skin against environmental noxious influences. It is composed of both corneocytes and an extra cellular lipid-enriched matrix. Epidermal lipids represent the most important component in the formation of the epidermal permeability barrier. Mainly composed of cholesterol, ceramide, and free fatty acids, they form a multilamellar bilayer structure, which regulates barrier function.

Abrogation of the cutaneous permeability barrier results in an increased cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the underlying epidermis. Acute barrier disruption by tape stripping increased lipid synthetic enzymes (HMG CoA reductase, SPT, FAS) and cytokines expression in the epidermis and it is known that calcium ion plays an important role in the repair of the epidermal permeability barrier after barrier disruption. Recent studies have shown that ultrasound can induce changes in the epidermal calcium gradient

that increase lamellar body secretion without increasing transepidermal water loss (TEWL). We performed this study to identify whether ultrasound can stimulate lipids synthetic enzymes and lipids synthesis. Ultrasounds were applied to the skin of hairless mice for 5 minutes. And then we performed quantification of lipid synthesis and RT-PCR to measure mRNA activities of lipid synthetic enzymes. We also performed RuO₄ post fixation method and calcium ion capture cytochemistry. There were no significant changes of TEWL before and after ultrasound treatment. The epidermal calcium gradient changes were observed in 0 min, 15 min, 1 hr, 3 hr and 6 hr after 3 MHz ultrasound treatment. There were decreased calcium in upper epidermis and increased calcium in lower epidermis after treatment of ultrasound and some recovery of epidermal calcium gradient after 6 hours. In RuO₄ post fixation, samples showed alteration of SC -SG interface in 0 min, 1 hr, and 3 hr and 6 hr after 3 MHz ultrasound treatment. Lacuna dilatation, partial distension of the intercorneocyte space, loss of multilamellar structures of the stratum corneum and increased lamellar body secretion were observed in ultrasound treated hairless mice skin. These findings were observed also in 6 hr post treatment sample. The mRNA levels of HMG CoA reductase, SPT, FAS were increased maximally after 3 hours. In conclusion, ultrasound can induce increased mRNA of lipids synthetic enzymes and lipids synthesis without increasing TEWL by changes of calcium ion gradients.

Key Words: epidermal permeability barrier, ultrasound, epidermal lipids, epidermal calcium gradient, HMG CoA reductase, serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase.