

표피 칼슘기울기 변화가 각질형성세포의
분화에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

황 상 민

표피 칼슘기울기 변화가 각질형성세포의
분화에 미치는 영향

지도 안 성 구 부교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

황 상 민

황상민의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 안 성구 인

심사위원 이 용건 인

심사위원 李 源 秀 인

심사위원 李 濬 吉 인

심사위원 金 炳 元 인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 한결같은 마음으로 조언과 가르침을 베풀어 주신 안성구 교수님께 표현할 수 없는 큰 은혜를 입었다고 생각합니다. 언제 어느 곳에서든 항상 따뜻한 마음으로 살아가겠습니다. 그동안 많은 조언과 격려를 베풀어 주신 이광길 교수님, 이승현 교수님, 이원수 교수님, 김현원 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 바쁜 업무중에도 도움을 주신 전자현미경실의 송미숙 선생님과 병리학 교실의 김중섭 선생님께 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

정든 학교를 떠나 새로운 길을 걸으며 지난 시절을 돌이켜 봅니다. 4년전 석사학위 논문의 감사의 글을 읽어보니 세월이 지났지만 그때의 감정과 마음을 잊을 수 없습니다. 그때 가졌던 감사의 마음을 저를 이끌어주신 모든 분께 가슴속 깊은 곳으로부터 전하고 싶습니다. 석사의 과정이 없었다면 지금의 저는 이 논문을 완성하지 못했을 것입니다. 이 박사 논문이 마지막이라고 생각하지는 않습니다. 이 논문을 시작으로 가까운 미래에 새로운 박사논문을 써 보려 합니다.

이곳에 나열하지는 않았지만 저를 사랑해 주시고 제가 사랑한 모든 분들께 다시 한번 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
(1) 실험동물	4
(2) 피부장벽의 손상 및 밀폐	4
(3) 이온영동의 시행	4
(4) 경피수분손실량의 측정	5
(5) 조직생검	5
(6) 칼슘이온캡처 세포화학적 염색	5
(7) 면역조직화학 검사	5
III. 결과	6
(1) 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 및 밀폐 후 칼슘기울기 변화	6
(2) 이온영동 후 칼슘기울기의 변화	6
(3) 피부장벽의 손상 및 밀폐, 이온영동에 의한 칼슘기울기 변화에 따른 K5, K10, K6의 발현양상	8
(4) 피부장벽의 손상 및 밀폐, 이온영동에 의한 칼슘기울기 변화에 따른 involucrin, loricrin의 발현양상	11
IV. 고찰	19
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	26

그림 차례

Fig. 1. Normal calcium ion distribution	7
Fig. 2. Calcium ion distribution after tape-stripping and tape-stripping with occlusion	8
Fig. 3. Calcium ion distribution after negative iontophoresis	9
Fig. 4. Immunostaining of K5 after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis	10
Fig. 5. Immunostaining of K10 after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis	12
Fig. 6. Immunostaining of K6 after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis	14
Fig. 7. Immunostaining of involucrin after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis	16
Fig. 8. Immunostaining of loricrin after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis	18

표 차례

Table 1. Summary of K5 expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis	11
Table 2. Summary of K10 expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis	13
Table 3. Summary of K6 expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis	15
Table 4. Summary of involucrin expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis	17
Table 5. Summary of loricrin expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis	19

표피 칼슘기울기 변화가 각질형성세포의 분화에 미치는 영향

각질세포외막은 최종분화를 마친 각질형성세포의 원형질막을 대체하는 특성화된 구조물로써 세포외부에서 각질세포간 지질과 공유결합으로 연결되어 구조적, 기능적으로 완전한 형태의 피부장벽을 형성한다. 칼슘이온이 층판소체의 분비조절에 관여하여 피부장벽 손상 후 회복의 과정에 중요한 조절인자임은 잘 알려져 있다. 그러나 생체내에서 표피 칼슘이온의 변화가 각질형성세포의 분화과정, 특히 각질세포외막 단백질의 발현에 미치는 영향에 관하여 알려진 바가 없다. 이에 연구자는 다양한 방법을 통하여 표피내 칼슘이온의 변화를 유발한 후 각질세포외막 단백질의 발현을 관찰하였다. 테이프 스트리핑을 이용하여 피부장벽을 손상시킨 후 공기노출군, 밀폐군 그리고 피부장벽 손상없이 이온영동을 시행한 군으로 구분한 후, 각 시간 별로 조직검사를 시행하여 칼슘이온캡처 세포화학적 염색법을 이용하여 투과전자현미경으로 칼슘이온의 변화를 관찰하였으며, anti-K5, anti-K6, anti-K10, anti-involucrin, anti-loricrin을 이용하여 면역조직화학 검사를 시행하였다. 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 후 소실된 칼슘기울기(calcium gradient)는 공기노출군은 피부장벽 손상 후 36시간에, 밀폐군은 밀폐 60시간 후에 정상으로 회복되었다. 이온영동 후 소실된 칼슘기울기는 양극과 음극 첩포부착 부위 모두에서 이온영동 6시간 후에 정상으로 회복되었다. 공기노출군, 밀폐군 및 이온영동군 모두에서 기저층의 K5 발현은 12시간 이후 약간 감소하였으며, K10의 발현은 유극층과 과립층에서 증가되었다. K6는 공기노출군과 밀폐군에서 피부장벽 손상 12시간 이후 나타나 점차 증가하여 36시간째 표피 전층에서 관찰되었으며, 이온영동군에서 12시간 이후 기저층과 유극층에서 부분적으로 발현되었다. Involucrin의 발현은 12시간 후 공기노출군과 이온영동군에서 증가되었으며, 밀폐군에서 하부의 유극층으로 확장되었다. Loricrin의 발현은 공기노출군, 밀폐군 그리고 이온영동군 모두에서 정상표피와 비교해 특별한 차이를 보이지 않았다. 상기 실험결과는 생체내에서 피부장벽 손상을 동반하지 않는 칼슘이온의 변화가 케라틴과 각질세포외막 단백질의 발현에 변화를 가져오는 것으로 보아 칼슘이온이 각질형성세포의 말기분화에 중요한 역할을 수행하는 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 케라틴, 각질세포외막 단백질, 피부장벽, 칼슘이온, 칼슘기울기, 각질형성세포 분화

표피 칼슘기울기 변화가 각질형성세포의 분화에 미치는 영향

<지도 안 성 구 부교수>

연세대학교 대학원 의학과

황 상 민

I. 서 론

피부는 외부의 환경과 항상 접하고 있는 기관으로서 주된 기능은 수분소실을 막는 보호장벽 역할을 한다. 피부장벽 역할을 담당하는 각질층은 단백질이 풍부한 각질세포와 각질세포 사이에 존재하는 연속적인 층상구조로 존재하는 지질의 두가지 구성성분으로 이루어져 있다. 각질세포는 주로 케라틴 다발로 이루어져 있으며 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공하고, 각질세포간 지질은 인지질을 함유하는 보통의 생체막과는 달리 주로 세라미드, 콜레스테롤, 지방산을 함유하며 서로 직선으로 연결되어 물질의 투과를 방지하는 장벽역할을 수행한다(Elias와 Menon, 1991; Dowing, 1992; Feingold, 1997).

세포화학적 연구방법으로 포유류 표피에서 칼슘저장고의 위치를 확인한 연구에 의하면 기저세포와 유극세포의 세포질, 미토콘드리아, 핵내 염색질 사이에 칼슘이온 침전물이 위치함을 보여 세포주기와 칼슘이온이 연관성이 있음을 시사하였다(Menon 등, 1985). 또한 표피에는 칼슘기울기(calcium gradient)가 있어 기저층과 유극층에는 칼슘이온 농도가 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 상부 과립층에 가장 높다. 기저층과 유극층에 비해 하부 과립층에서 부터 점차적으로 더 많은 칼슘이온이 세포간에 나타나고 최상부 과립세포는 세포외부와 세포질 내에 높은 칼슘이온을 보인다. 또한 과립세포와 각질세포 사이로 분비되는 층판소체(lamellar body) 내에서 다량의 칼슘이온이 발견된다(Menon 등, 1992a; Menon 등, 1994a; Lee 등, 1998). 바꾸어 말하면 낮은 농도의 칼슘이온은 기저층에서 세포의 증식과 연관되며, 높은 농도의 칼슘이온은 과립층의 세포분화와 연관된다고 할 수 있다.

아세톤 처치 또는 테이프 스트리핑에 의한 급성 피부장벽 손상은 항상성 회복반응을 유발시켜서 피부장벽 기능이 빠르게 회복된다. 피부장벽 회복의 과정은 몇가지 과정을 거치면서 일어나는데 1) 이미 형성되어 있던 층판소체의 분비, 2) 콜레스테롤, 지방산, 스펅고리피드와 같은 표피지질의 합성증가, 3) 새로운 층판소체의 형성과 분비, 4) 이들 결과로 인한 각질세

포간 지질의 회복, 5) 분비된 지질의 개조와 같은 일련의 과정에 의해 회복된다(Feingold, 1991; Menon 등, 1992b; Holleran 등, 1993). 이러한 피부장벽 손상 후 회복의 과정은 Latex[®]와 같은 수증기 불투과막으로 밀폐할 경우 억제된다(Grubauer 등, 1989; Menon 등, 1994b). 즉 밀폐에 의해 피부장벽 회복에 관여하는 어떤 인자가 억제되고 이로 인해 표피지질의 합성과 각질층 내 각질세포간 지질의 층상구조의 형성과 회복이 늦어진다. 이와는 달리 피부장벽 손상 후 수증기 투과막으로 밀폐하면 각질층 내 각질세포간 지질이 회복되고, 결국 피부장벽 기능은 정상화된다. 그러므로 피부장벽 손상에 의해 유도된 경피수분손실(trans-epidermal water loss, TEWL)의 증가가 피부장벽의 회복과정을 매개한다(Grubauer, 1989). 그러나 피부장벽 손상 후 등삼투압성 자당용액이나 등장성 생리식염수에 담그는 경우, 그리고 저장성 용액이나 고장성 용액에 담그는 경우 모두에서 피부장벽 회복의 변화를 가져오지 않는다(Lee 등, 1992). 오히려 고농도의 칼슘이온 용액에 노출하여 칼슘기울기를 형성시켜주면 피부장벽의 회복이 지연되는 것으로 보아 피부장벽 손상으로 인한 수분의 이동변화 보다는 이온의 변화, 특히 칼슘이온의 변화가 피부장벽 회복에 중요한 역할을 할 것으로 생각한다(Lee 등, 1992; Lee 등, 1994). 피부장벽의 손상은 표피의 상부로부터 수분손실을 유도하고 이로 인한 수분손실은 표피 칼슘기울기의 변화를 초래한다. 이러한 칼슘기울기의 변화는 피부에서 항상성 회복반응을 유발하고 이후 피부장벽 기능은 빠르게 회복된다. 최근에는 피부장벽에 손상을 주지않고 칼슘기울기를 변화시킬 수 있는 이온영동(iontophoresis)을 이용한 연구에서 피부장벽 손상없이 유발된 칼슘기울기의 소실이 층판소체의 분비를 증가시키는 것을 확인하였다(Lee 등, 1998). 피부장벽 손상과 무관하게 칼슘이온의 변화가 층판소체의 빠른 분비를 가져오는 것으로 보아 칼슘이온이 층판소체의 분비조절에 관여하며 피부장벽 손상 후 회복의 과정에 중요한 조절인자 임이 밝혀졌다. 최근에 급성 피부장벽 손상 후 수증기 불투과막으로 밀폐하면 칼슘기울기의 회복이 지연될 뿐 아니라 표피의 분화가 지연되어 이행성 세포(transitional cell)가 증가하는 모습을 관찰하고 생체에서도 칼슘이온의 변화가 표피의 분화와 관련이 있음을 확인하였다(Ahn 등, 1999).

각질형성세포는 최종분화의 과정에서 원형질막 내부 표면에 10-20nm 두께의 단백질로 구성된 각질세포외막(cornified cell envelope: CE)을 형성한다. CE은 말기분화를 이룬 각질형성세포의 원형질막을 대체하는 특성화된 구조물로 세포 외부로는 각질세포간 지질, 특히 hydroxyceramides와 공유결합으로 연결되어 구조적, 기능적으로 완전한 형태의 피부장벽을 형성하며 세포 내부로는 세포각질들과 교차결합을 이룬다(Steinert 와 Marekov, 1995). 또한 특징적으로 탄력성을 가져 구조적 지지대 역할 외에 각질세포층의 보호역할도 수행하는데 이는 여러 단백질을 연결해주는 ϵ (- γ -glutamyl)-lysine isopeptide 결합에서 기인하며 이황화 결합에 의해 강화된다(Henning 등, 1981; Tracher 와 Rice, 1985). CE은 주된 구성성분인 loricerin과 involucrin 그리고 그외 small proline-rich proteins(SPRs), cystatin A, keratins, envoplakin, elafin 등의 단백질로 구성되어 있다(Jarnik 등, 1996; Jarnik 등, 1998; Akiyama 등, 1999).

칼슘이온은 피부장벽의 형성과 손상 후 회복의 과정에 중요한 역할을 하는 것 외에 각질

형성세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다(Henning 등, 1980; Henning 등, 1981; Eckert 등, 1997). 최근 연구에 의하면 각질형성세포의 세포외 칼슘이온의 변화가 일부 CE 단백질과 케라틴의 발현에 영향을 준다고 하였다(Ekanayake-Mudiyanselage 등, 1998). 증가된 세포외 칼슘이온은 각질형성세포의 K1/10, involucrin, loricrin 및 transglutaminase I의 발현을 증가시키며(Eckert 등, 1997), 급성 피부장벽 손상에 의한 표피의 칼슘이온의 소실은 K6, K16, 및 K17의 발현과 involucrin을 조기 발현시키므로 칼슘이온이 각질형성세포의 분화와 밀접한 관련이 있다고 하였다(Ekanayake-Mudiyanselage 등, 1998). 시험관내에서 세포외부 칼슘이온은 각질형성세포의 증식과 분화에 결정적인 역할을 수행하여 낮은 농도의 칼슘이온은 세포의 증식을 유도하며, 반면에 높은 농도의 칼슘이온은 세포의 증식을 억제하고 세포분화를 촉진한다(Henning 등, 1980; Henning 등, 1981). 또한 세포외부 칼슘이온의 변화가 각질형성세포의 부적절한 말기분화를 유도하며, 일부 CE 단백질의 표현을 증가시킨다(Vicanova 등, 1998).

이에 연구자는 첫째로 급성 피부장벽 손상모델인 테이프 스트리핑에 의해서 초래된 칼슘기울기의 변화가 특정 CE 단백질의 표현에 영향을 미치는지, 둘째로 이들에 의해 피부장벽 손상 후 수증기 불투과막으로 밀폐하여 인위적으로 칼슘기울기의 회복을 억제하는 경우 특정 CE 단백질의 발현에 변화가 있는지, 셋째로 피부장벽 손상은 초래하지 않으면서 칼슘기울기의 변화를 유도하는 이온영동법을 이용하여 피부장벽 손상없이 유발된 칼슘이온의 변화가 특정 CE 단백질의 발현을 조절할 수 있는지를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

(1) 실험동물

생후 8-12주 된 무모생쥐를 동일 표준사료로 사육한 후 실험하였다.

(2) 피부장벽의 손상 및 밀폐

급성 피부장벽 손상모델은 테이프 스트리핑을 사용하였다. Hairless mouse의 한쪽 배부를 시험부위로 하고 반대부위는 대조부위로 하였다. 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상은 4% chloral hydrate의 복강내 주사를 통해 마취시킨 후 멸균테이프(3M, St. Paul, MN, USA)를 사용하여 배부를 40mg/cm²/hr에 도달할 때까지 3~5회 테이프 스트리핑하였다. 공기노출군은 (각 시간군: 5마리) 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 후 공기에 노출시켜 자연적인 피부장벽의 회복을 유도하였다. 밀폐군(각 시간군: 5 마리)은 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 후 수증기 불투과막인 Latex[®]로 밀폐하였다.

(3) 이온영동의 시행

피부장벽의 손상과 무관하게 표피 칼슘이온의 변화가 CE 단백질의 표현에 미치는 영향을

알아보기 위해서 피부장벽의 손상없이 칼슘이온을 변화시키는 모델인 이온영동 모델을 사용하였다(Lee 등 1998). 이온영동은 8-12주된 무모생쥐를 준비하여 4% chloral hydrate의 복강내 주사를 통해 마취시킨 후, 직경 2.1cm 의 탄소 소재 첩포를 부착하였다(각 시간군: 5마리). 이후 멸균테이프로 고정하고 6V, 0.8mA의 직류전류를 1시간 동안 통전시켰다. 이때 전류의 흐름을 원활하게 하기 위하여 한방울의 증류수를 떨어뜨린 후 첩포를 부착하였다. 대조군은 통전없이 증류수를 떨어뜨린 후 첩포 만을 동일한 시간동안 부착하였다.

(4) 경피수분손실량의 측정

피부장벽 손상은 TEWL이 40mg/cm²/hr에 도달 할 때까지 손상시켰으며, 일정한 온도와 습도를 유지하는 공간에서 Tewameter TM 210(Courage+Khazaka, Koln, Germany)을 이용하여 측정하였다.

(5) 조직생검

피부장벽 손상군과 이온영동 시행군은 피부장벽 손상 후 그리고 이온영동 시행 후 즉시, 2, 6, 12, 24, 36 시간 후에 그리고 피부장벽 손상 후 밀폐군에서는 6, 12, 24, 36, 48, 60 시간 후에 각 시간 별로 각 군의 배부에서 피부를 생검하고 이등분하여 칼슘 염색을 위한 칼슘이온캡처 세포화학적 염색용과 CE 단백질 염색을 위한 면역조직화학 검사용으로 구분하였다.

(6) 칼슘이온캡처 세포화학적 염색

조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1.4% sucrose로 조성되고 4℃로 냉장된 고정액에 조직을 고정한 후 칼슘이온의 관찰을 위해 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색을 시행하였다. 입체현미경 하에서 냉고정액 한방울을 점적 후 0.5mm³로 세절하여 얼음조각 위에서 하룻밤동안 고정하였다. 고정액을 버리고 1ml 4% OsO₄와 3ml 2% potassium pyroantimonate stock 용액이 혼합된 후고정액으로 얼음 위에서 2시간 동안 후고정하였다. KOH를 사용하여 pH10으로 조절된 냉증류수에 10분간 수세한 후 통상적인 방법으로 탈수, 포매하고 염색하였다. 이때 대조 표본은 10mM EDTA에서 10분간 배양하였다. 이렇게 준비된 표본은 투과전자현미경(Joel, Tokyo, Japan) 하에서 표피 전층을 관찰하였다(Menon 등, 1985).

(7) 면역조직화학 검사

조직을 얻은 즉시 면역조직화학 검사를 위해 조직을 OCT 화합물(Miles Inc, Elkhart, IN, USA)로 채워진 cryomold에 넣고, 100% 에탄올에 드라이 아이스를 넣은 용액을 사용하여 급속 냉동시켰다. 동결된 조직을 6-8 μ m 두께로 절편을 만들어 avidin-biotin 면역과산화효소법을 사용해서 면역조직화학 검사를 시행하였다. 준비된 조직절편 슬라이드를 영하 20℃에서 10

분간 차가운 아세톤 용액에 고정한 후 건조시켰다. 고정된 조직절편 슬라이드를 3% H₂O₂ 용액에 넣어 내인성 과산화효소의 활성을 막고, 2% 양 혈청과 0.5% 말 혈청을 사용하여 비특이성 항체들을 억제하였다. 이렇게 준비된 조직절편 슬라이드를 제1차 항체, anti-K5(BAbCO, Richmond, CA, USA), anti-K6(BAbCO, Richmond, CA, USA), anti-K10(BAbCO, Richmond, CA, USA), anti-involucrin(BAbCO, Richmond, CA, USA), anti-loricrin(BAbCO, Richmond, CA, USA)으로 상온에서 2시간 동안 반응시키고, 2차 항체로는 biotinylated horse anti-mouse IgG(1:200 dilution, Vector, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 약 30분간 반응시켰다. 이들 각 단계마다 트리스 완충용액으로 5분간 3번씩 씻어 내었다. 이후 diaminbenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 발색하였다. Hematoxylin으로 대조염색을 하고, 2% glutaraldehyde용액으로 고정하여 gel-mount(Biomedica, Foster City, CA, USA)로 봉입하고 광학현미경하에서 관찰하였다. 면역조직화학 염색 결과는 각질형성세포의 각 항체에 대한 양성 여부, 염색정도 및 표피내 층에 따른 염색정도를 3인의 피부과 의사가 관찰하여 판정하였다. 염색정도는 염색되지 않은 경우 음성 (-), 부분적으로 염색된 경우 (+/-), 약하게 발현된 경우 (+), 중등도로 발현된 경우 (++), 강하게 발현된 경우 (+++)로 표시하였다.

III. 결과

(1) 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 및 밀폐 후 칼슘기울기의 변화

정상 표피에서 과립층 상부는 기저층에 비해 세포질 내외부에 높은 농도의 칼슘이온이 존재하여 정상적인 칼슘기울기를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 직후 상부 과립층의 칼슘이온은 감소되어 정상 표피에서 관찰되는 칼슘기울기가 소실되었다(Fig. 2A). 피부장벽 손상 2시간 이후 과립층의 칼슘이온은 점차 증가되어 피부장벽 손상 36시간에는 정상 표피와 동일한 칼슘기울기를 회복하였다 Fig. 2B). 피부장벽 손상 후 수증기 불투과막으로 밀폐한 경우 정상적인 칼슘기울기의 회복이 억제되어 피부장벽 손상 후 밀폐 60시간에 정상적인 칼슘기울기를 관찰할 수 있었다(Fig. 2C).

(2) 이온영동 후 칼슘기울기의 변화

이온영동 후 표피 내 칼슘기울기는 변화되어 양극 첩포 부착부의 표피 내 칼슘이온은 이온영동에 의해 칼슘이온이 과립층에서 진피와 기저층 부위로 이동되었다. 음극 첩포 부착부의 표피 내 칼슘이온은 이온영동에 의해 칼슘이온이 과립층에서 각질층의 각질세포 사이로 빠져나와 관찰되었다. 즉 양극과 음극 이온영동 부위 모두에서 칼슘기울기가 소실되었다(Fig. 3A). 이온영동 2시간 이후 양극과 음극 첩포 부착부위 모두에서 과립층에 칼슘이온의 증가가 관찰되었으며, 이온영동 6시간 후에 정상적인 칼슘기울기로 회복되었다(Fig. 3B, C).

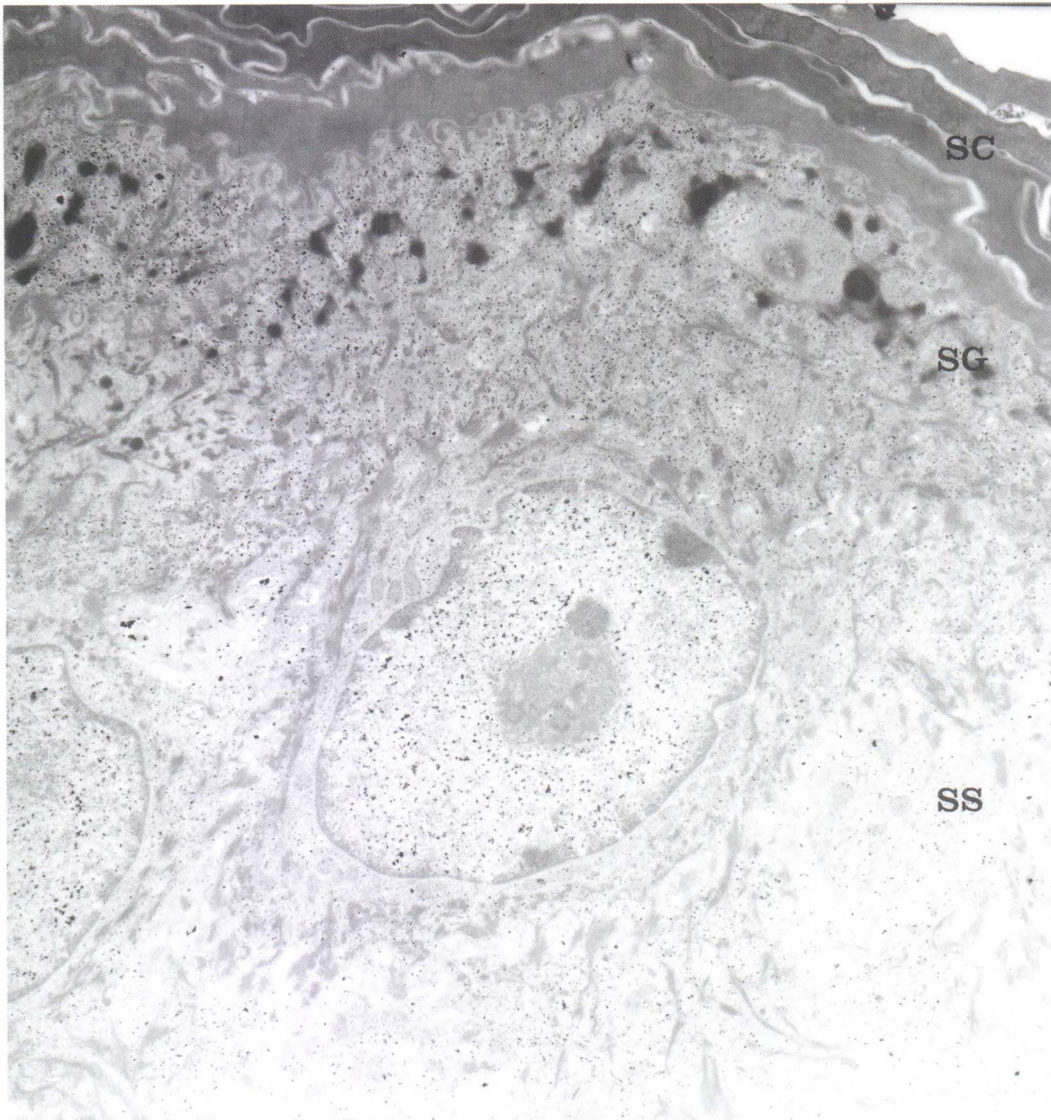


Fig. 1. Normal calcium ion distribution. Normal calcium gradient can be seen in the control epidermis. SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum. OsO₄ postfixation, unstained, ×5000.

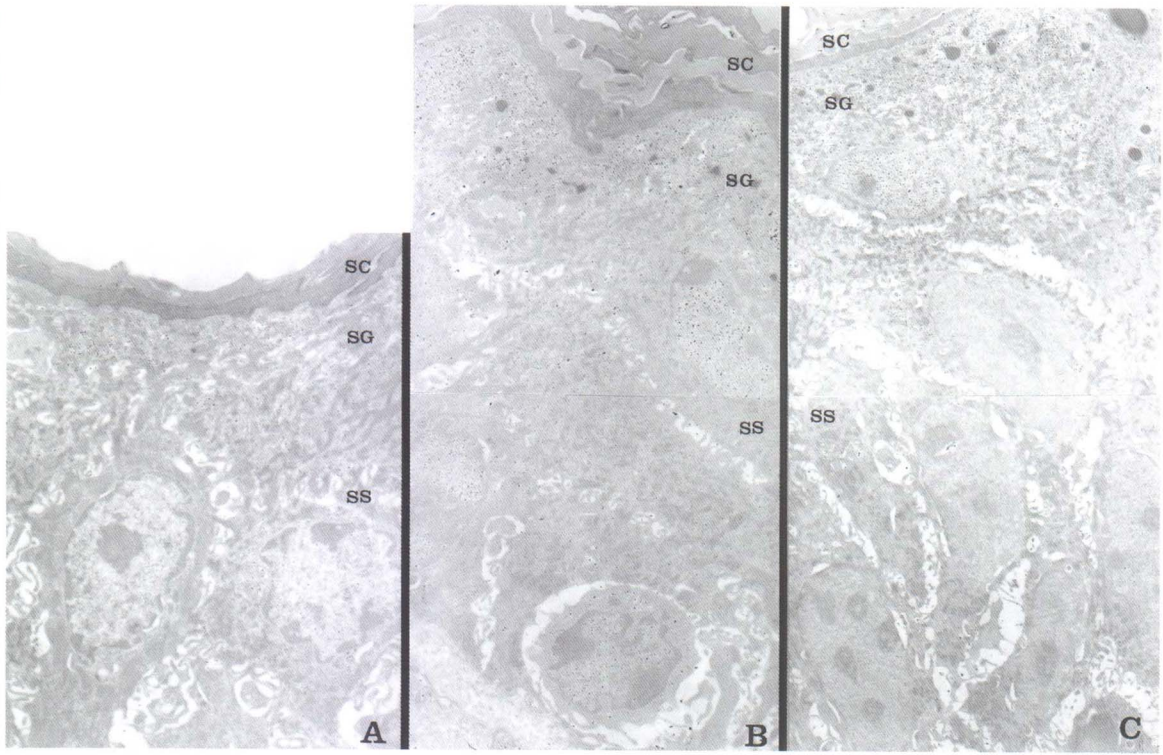


Fig. 2. Calcium ion distribution after tape-stripping and tape-stripping with occlusion. Calcium content is decreased in SG after immediate tape-stripping(A). Calcium gradient is restored at 36 h after tape-stripping(B) and 60 h after tape-stripping with occlusion(C). SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum. OsO₄ postfixation, unstained, ×5000.

(3) 피부장벽의 손상 및 밀폐, 이온영동에 의한 칼슘기울기 변화에 따른 K5, K10, K6의 발현양상

테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 후 공기노출군, 밀폐군 및 이온영동군 모두에서 피부장벽 손상 직후부터 6시간까지는 K5, K14, K6의 발현은 특별한 변화가 없었다. 정상표피에서 K5는 기저층과 기저층 상부에서 발현되었다. 기저층의 K5 발현은 공기노출군, 밀폐군 및 이온영동군 모두에서 12시간 후에 약간 감소하였으며, 12시간 이후 표피두께의 증가와 함께 기저층 상부와 유극층으로 확장되었다(Fig. 4)(Table 1).

정상표피에서 K10은 유극층과 과립층에서 발현되었다. 기저층 상부의 K10의 발현은 공기노출군과 이온영동군에서 12시간 후에 증가되었으며, 이후에는 시간경과에 따라 K10의 발현이 증가되었다. 밀폐군에서 K10의 발현은 12시간 이후 증가되었으나 공기노출군에 비해 약하게 발현되었다(Fig. 5)(Table 2).

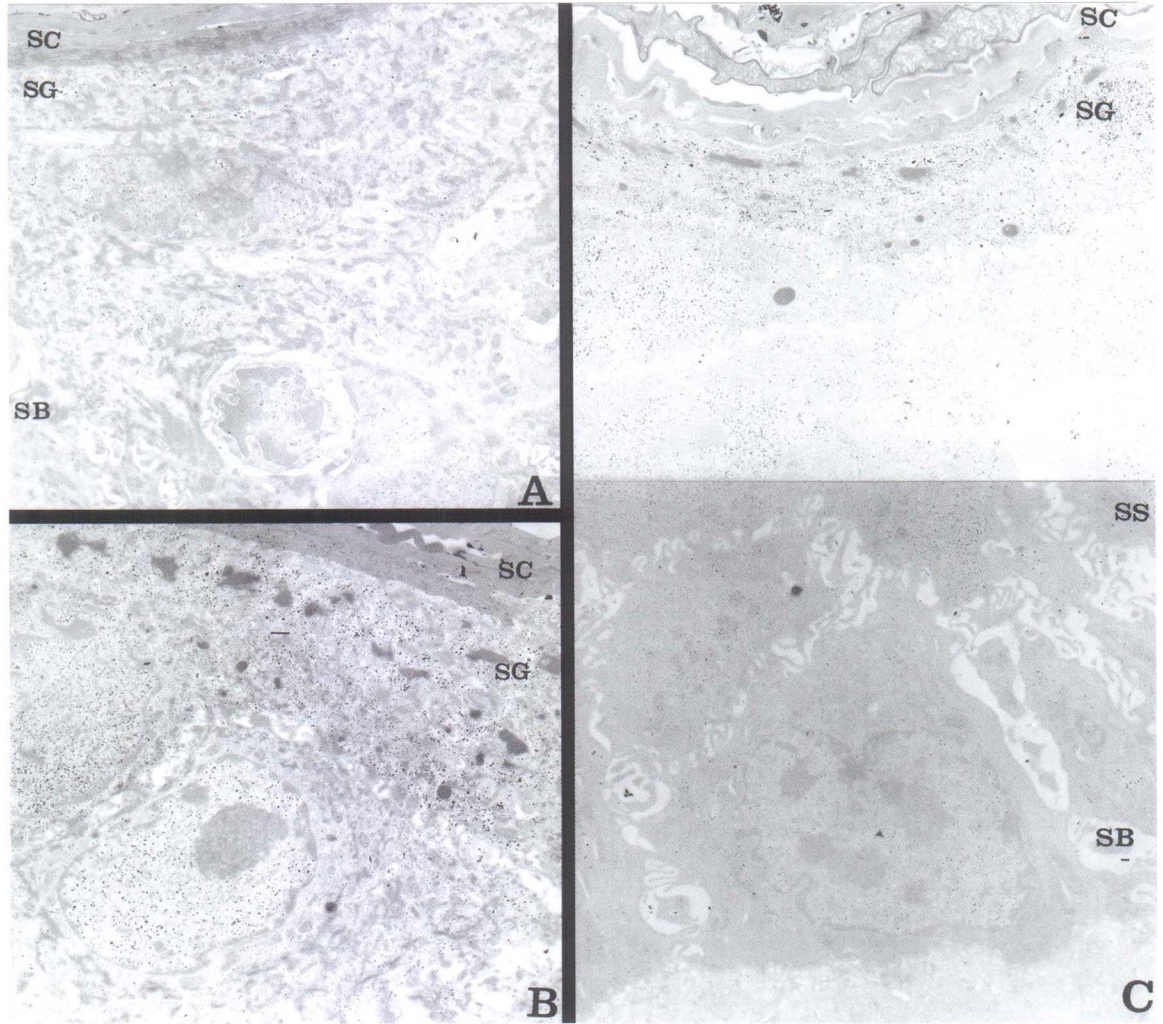


Fig. 3. Calcium ion distribution after negative iontophoresis. Calcium ions are pulled toward the SC by negative iontophoresis(A). Calcium gradient is restored at 6 h(B). Calcium ion distribution at 36 h after iontophoresis(C). SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale. OsO₄ postfixation, unstained, ×5000.

정상표피에서 K6은 발현되지 않았으며 세 실험군 모두 피부장벽 손상과 이온영동 후 6시간에는 발현되지 않았다. 각질세포의 증식과 연관된 K6의 발현은 공기노출군에서 피부장벽 손상 12시간 후에 기저층과 유극층에 나타났으며 점차 증가하여 36시간째 가장 강하게 표현되었고 각질층을 제외한 표피 전층에서 관찰되었다. 그러나 밀폐군은 K6의 발현이 억제되어 12시간 후에 기저층에서만 부분적으로 발현되었으며, 시간에 따른 발현정도도 공기노출군에

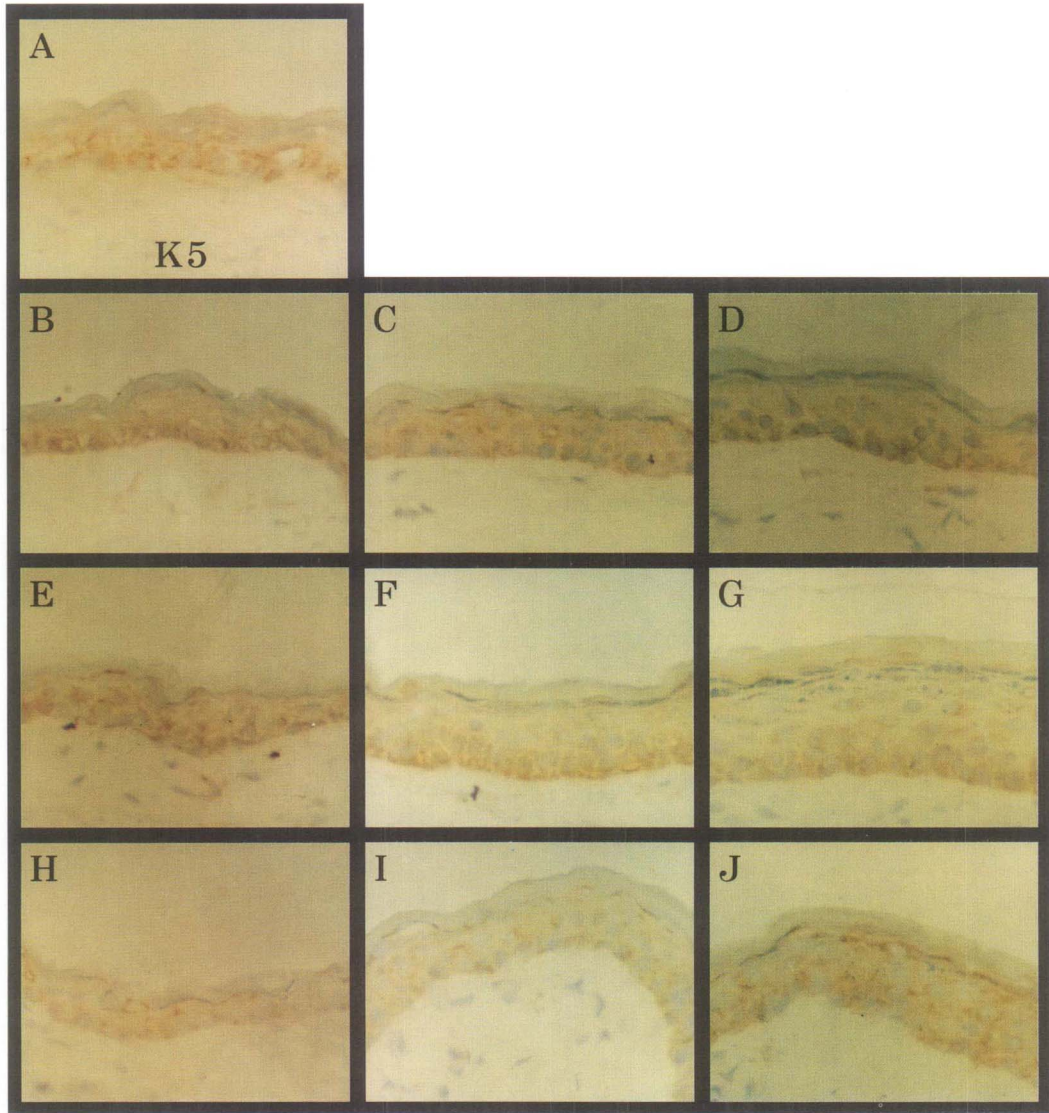


Fig. 4. Immunostaining of K5 after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis. Expression of basal K5 was slightly decreased at 12 h with air exposure after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis. Normal(A). 2 h(B), 12 h(C), and 36 h(D) after tape-stripping. 12 h(E), 36 h(F), and 60 h(G) after tape-stripping with occlusion. 2 h(H), 12 h(I), and 36 h(J) after negative iontophoresis. $\times 200$.

Table 1. Summary of K5 expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis

		SC	SG	SS	SB
Normal		-	-	+/-	++
Tape-stripping	2 h	-	-	+/-	++
	12 h	-	+/-	+	+
	36 h	-	+/-	+	++
Occlusion with tape-stripping	12 h	-	+/-	+	+
	36 h	-	+/-	+	+
	60 h	-	-	+/-	+
Iontophoresis, positive/negative	2 h	-	-	+/-	++
	12 h	-	+/-	+/-	+
	36 h	-	+/-	+	++

-, negative staining; +/-, focal positive staining; +, mild positive staining; ++, moderate positive staining; +++, strong positive staining; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale.

비해 감소되었다. 이온영동군은 이온영동 후 12시간 이후 기저층과 유극층에서 발현이 증가되었다(Fig. 6)(Table 3). 이온영동군에서 양극과 음극 첩포부착 부위에 따른 K5, K10, K6 발현의 차이는 없었다.

(4) 피부장벽의 손상 및 밀폐, 이온영동에 의한 칼슘기울기 변화에 따른 involucrin, loricrin의 발현양상

Involucrin의 발현은 정상적으로 과립층 상부에서 관찰되었다. Involucrin의 발현은 공기노출군과 이온영동군에서 12시간 후에 증가되었으며, 이후 시간 경과에 따라 발현이 확장되어 피부장벽 손상 후 36시간에는 유극층에서도 발현되었다. 밀폐군에서 involucrin의 발현은 공

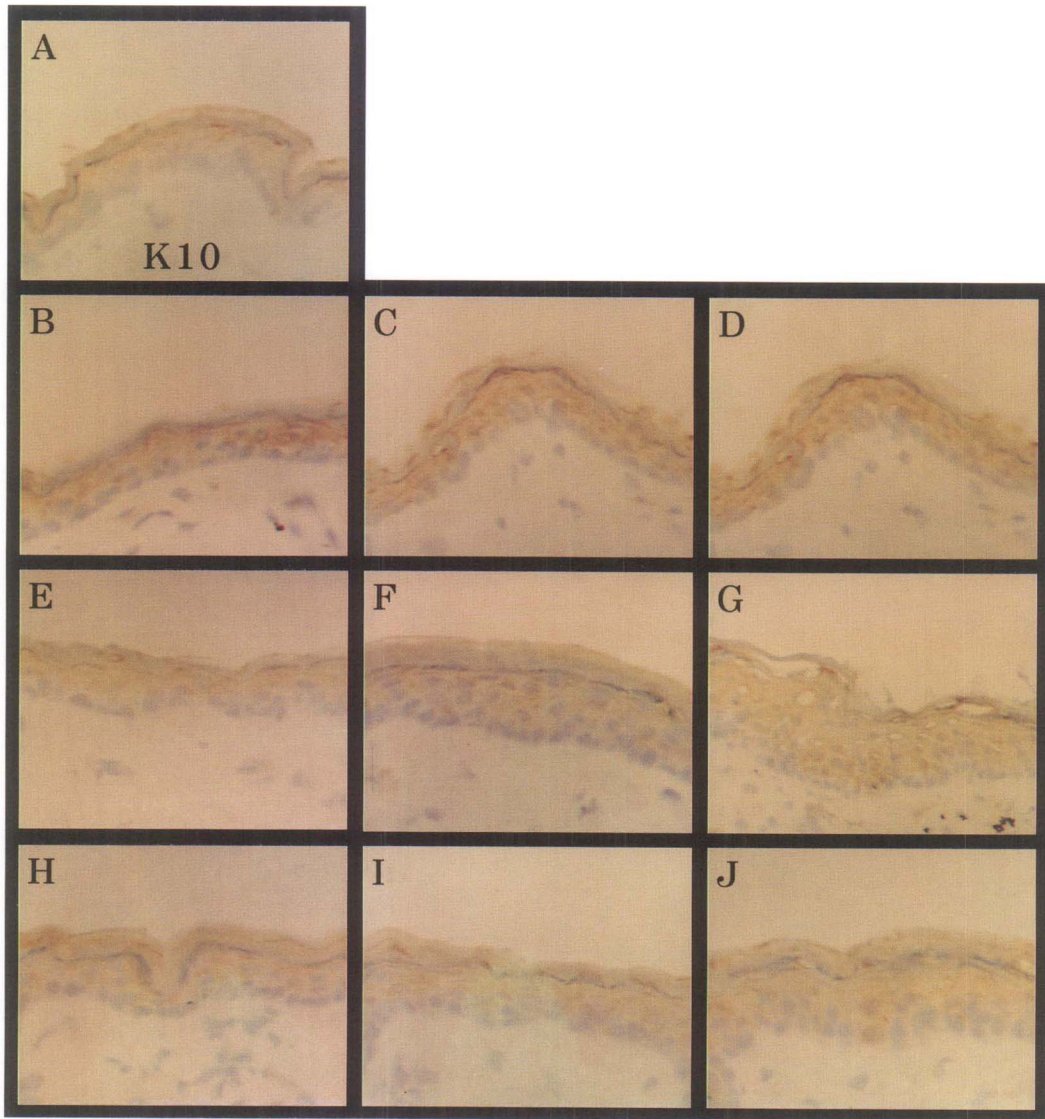


Fig. 5. Immunostaining of K10 after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis. Expression of suprabasal K10 was increased at 12 h with air exposure after tape-stripping and iontophoresis. However it was slightly decreased in tape-stripping with occlusion, compared to air exposure after tape-stripping. Normal(A). 2 h(B), 12 h(C), and 36 h(D) after tape-stripping. 12 h(E), 36 h(F), and 60 h(G) after tape-stripping with occlusion. 2 h(H), 12 h(I), and 36 h(J) after negative iontophoresis. $\times 200$.

Table 2. Summary of K10 expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis.

		SC	SG	SS	SB
Normal		+	++	++	-
Tape-stripping	2 h	+	++	++	-
	12 h	+	+++	+++	-
	36 h	+	+++	+++	-
Occlusion with tape-stripping	12 h	+	++~+++	++~+++	-
	36 h	+	++~+++	++~+++	-
	60 h	+	++~+++	++~+++	-
Iontophoresis, positive/negative	2 h	+	++	++	-
	12 h	+	+++	+++	-
	36 n	+	+++	+++	-

-, negative staining; +/-, focal positive staining; +, mild positive staining; ++, moderate positive staining; +++, strong positive staining; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale.

기노출군에 비해 조기에 하부의 유극층으로 확장되어 밀폐 12시간 후에 유극층에서 발현되었으며 밀폐 60시간 후에는 기저층 상부에서도 발현되었다(Fig. 7)(Table 4).

Loricrin의 발현은 정상적으로 과립층에서 관찰되었다. Loricrin의 발현은 피부장벽 손상 후 공기노출군, 밀폐군 및 이온영동군 모두에서 특별한 차이를 보이지 않았으며, 각 군에서 36시간 이후 과립층에서 부분적으로 발현이 증가되었다(Fig. 8)(Table 5). 이온영동군에서 양극과 음극 첩포부착 부위의 involucrin과 loricrin 발현의 차이는 없었다.

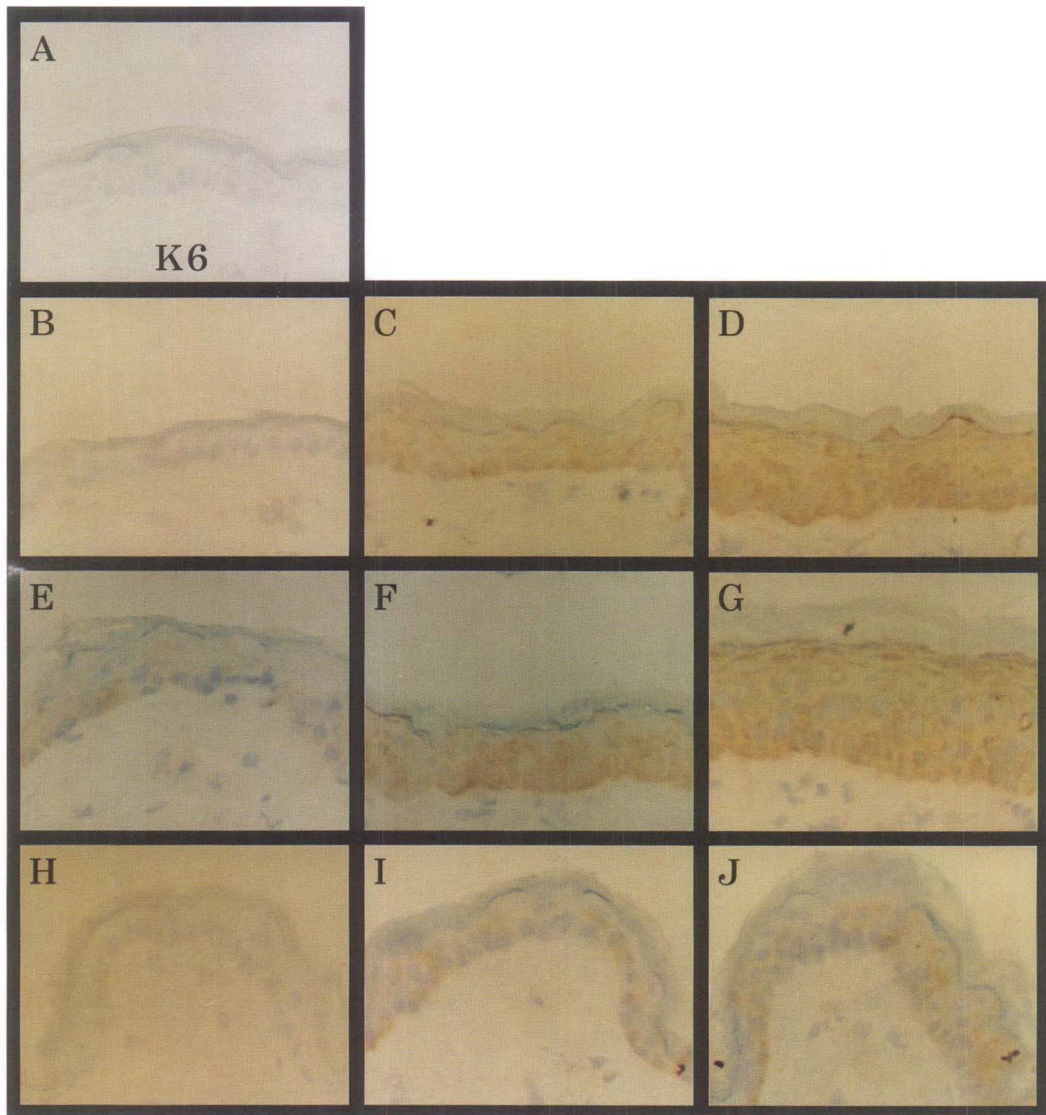


Fig. 6. Immunostaining of K6 after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis. Expression of K6 appeared in the basal and suprabasal layers at 12 h with air exposure after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis and then extended to whole epidermis at 36 h. However it was slightly decreased in tape-stripping with occlusion, compared to air exposure after tape-stripping. Normal(A). 2 h(B), 12 h(C), and 36 h(D) after tape-stripping. 12 h(E), 36 h(F), and 60 h(G) after tape-stripping with occlusion. 2 h(H), 12 h(I), and 36 h(J) after negative iontophoresis. $\times 200$.

Table 3. Summary of K6 expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis

		SC	SG	SS	SB
Normal		-	-	-	-
Tape-stripping	2 h	-	-	-	-
	12 h	-	+/-	+	+
	36 h	-	+++	+++	+++
Occlusion with tape-stripping	12 h	-	+/-	+/-	+/-
	36 h	-	++	++	++
	60 h	-	+++~++++	+++~++++	+++~++++
Iontophoresis, positive/negative	2 h	-	-	-	-
	12 h	-	-	+/-	+/-
	36 h	-	+/-	+	+

-, negative staining; +/-, focal positive staining; +, mild positive staining; ++, moderate positive staining; +++, strong positive staining; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale.

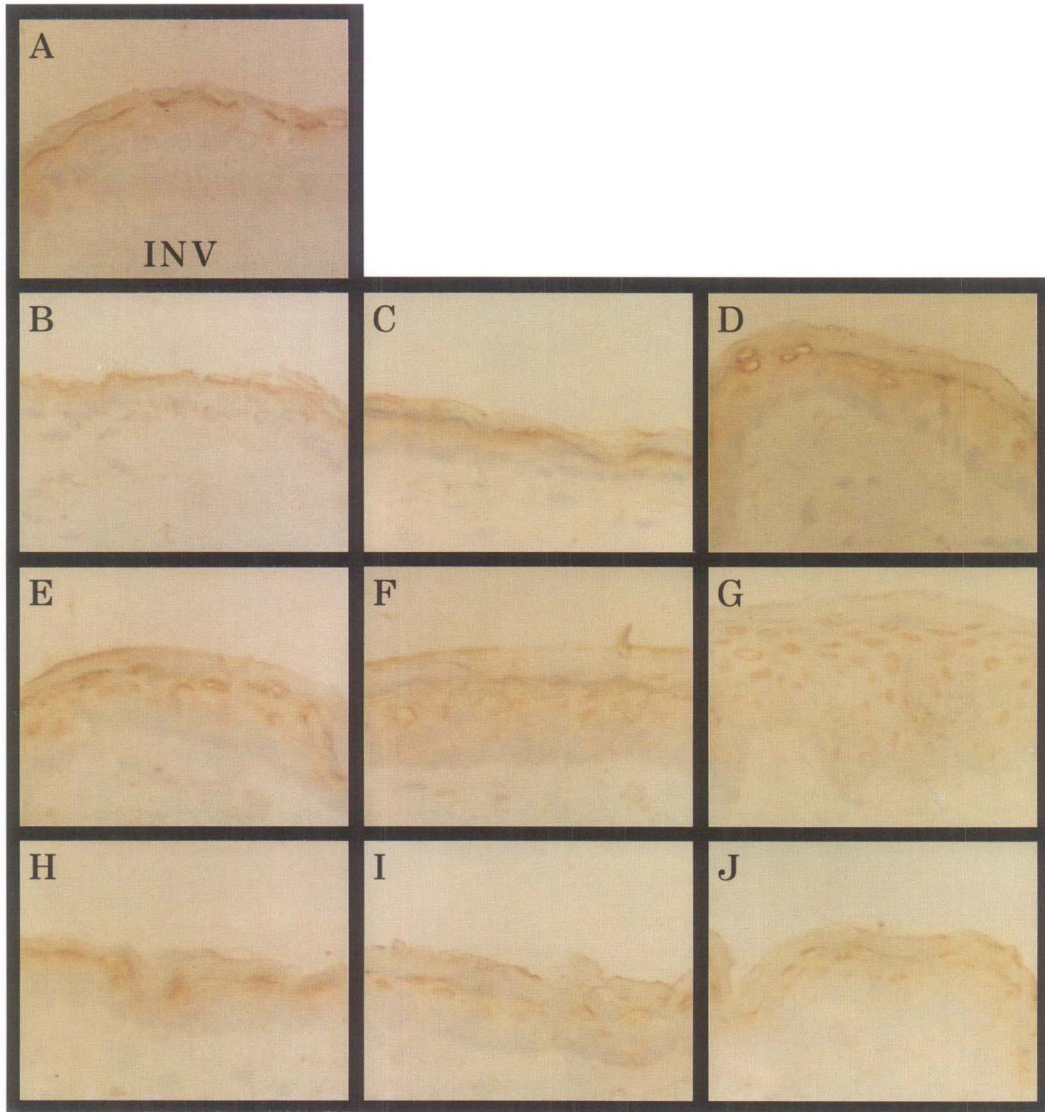


Fig. 7. Immunostaining of involucrin after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis. Expression of involucrin was increased at 12 h in air exposure after tape-stripping and iontophoresis and was extended to the lower spinous layers in tape-stripping with occlusion. Normal(A), 2 h(B), 12 h(C), and 36 h(D) after tape-stripping. 12 h(E), 36 h(F), and 60 h(G) after tape-stripping with occlusion. 2 h(H), 12 h(I), and 36 h(J) after negative iontophoresis. $\times 200$.

Table 4. Summary of involucrin expression after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis

		SC	SG	SS	SB
Normal		+/-	++	-	-
Tape-stripping	2 h	+/-	++	-	-
	12 h	+	++	+/-	-
	36 h	+	++	+	-
Occlusion with tape-stripping	12 h	+	++	+	-
	36 h	+	++	++	-
	60 h	+/-	++	++	-
Iontophoresis, positive/negative	2 h	+/-	++	-	-
	12 h	+	++	+	-
	36 h	+	+++	+	-

-, negative staining; +/-, focal positive staining; +, mild positive staining; ++, moderate positive staining; +++, strong positive staining. SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale.

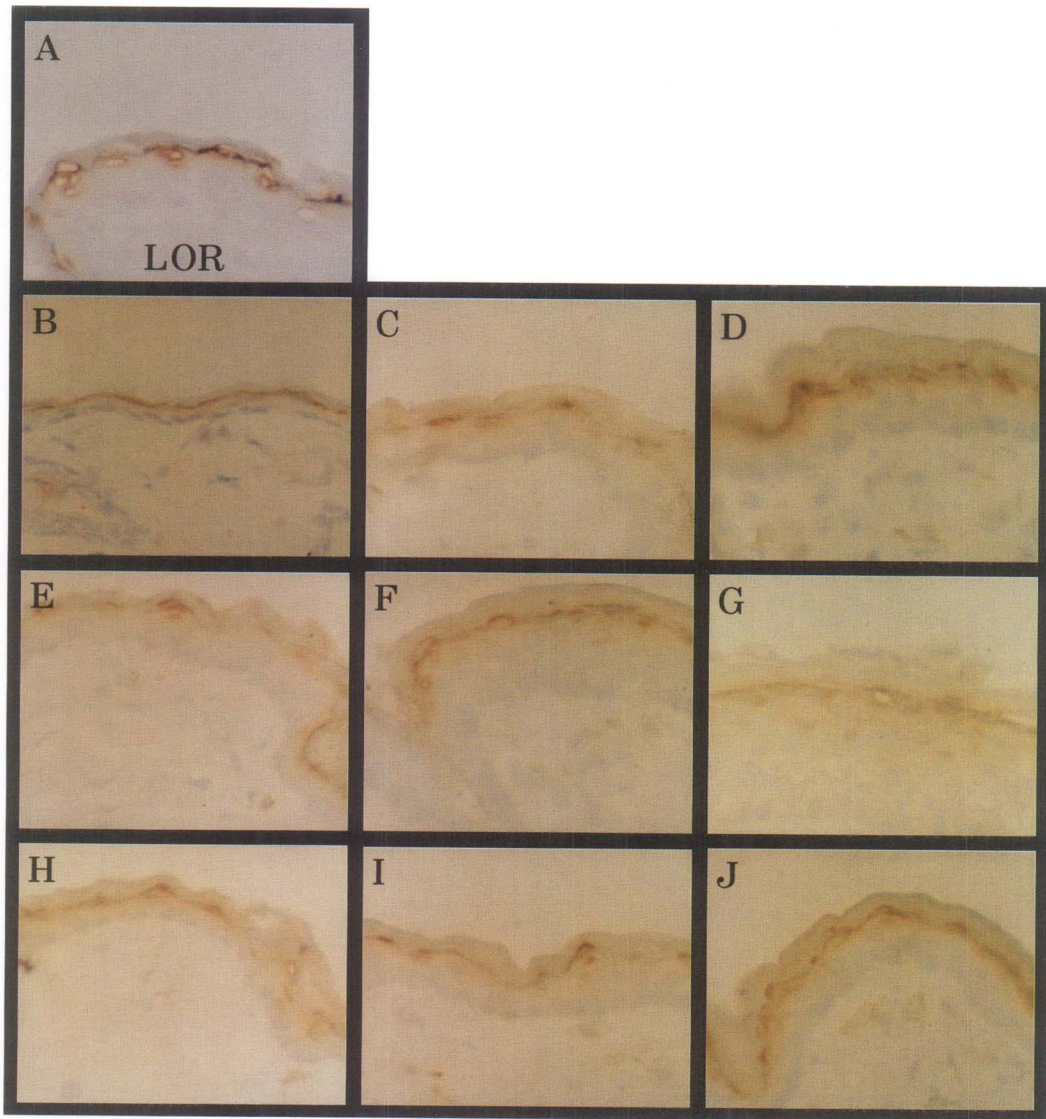


Fig. 8. Immunostaining of loricrin after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and negative iontophoresis. Expression of loricrin in air exposure after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis was similar to normal. Normal(A). 2 h(B), 12 h(C), and 36 h(D) after tape-stripping. 12 h(E), 36 h(F), and 60 h(G) after tape-stripping with occlusion. 2 h(H), 12 h(I), and 36 h(J) after negative iontophoresis. $\times 200$.

Table 5. Summary of loricrin expression after tape-stripping, tape stripping with occlusion, and iontophoresis

		SC	SG	SS	SB
Normal		-	++	-	-
Tape-stripping	2 h	-	++	-	-
	12 h	-	++	-	-
	36 h	-	++	+/-	-
Occlusion with tape-stripping	12 h	-	++	-	-
	36 h	-	++	+/-	-
	60 h	-	++	+/-	-
Iontophoresis, positive/negative	2 h	-	++	-	-
	12 h	-	++	-	-
	36 h	-	++	+/-	-

-, negative staining; +/-, focal positive staining; +, mild positive staining; ++, moderate positive staining; +++, strong positive staining. SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale.

IV. 고찰

외부의 위험환경으로 부터 개체가 보호되고 생존을 유지하기 위해서는 출생전에 보호장벽 역할을 수행하는 표피의 각질층이 완전해야 한다. CE은 탄력성 물질로 각질세포간 지질과 함께 각질층이 피부장벽 역할을 수행하는데 중요한 역할을 한다. CE을 구성하는 주된 단백질은 loricrin이며 CE 단백질의 65~80%를 차지한다(Steinert 와 Marekov, 1995; Jarnik 등, 1998). Loricrin은 각질형성세포의 분화과정 중 후기에 발현되며 특이항체를 이용한 면역조직 화학 검사상 과립층 상부에서 관찰할 수 있다. 초기에는 L-granules이라 불리는 케라토히알

린(keratohyaline) 과립에 축적되며 후기에는 서로 연결되어 CE의 주된 구성성분이 된다(Hohl, 1990; Steinert 와 Marekov, 1995). 이외에 팽창된 간형구조(extended rod-shaped)의 involucrin은 CE 단백질의 5% 정도를 차지한다. 약 44nm 길이의 긴 구조물로 CE과 평행하게 위치하면서 다양한 형태의 단백질간 연결구조를 형성하므로 CE 형성의 초기화에서 중요한 역할을 수행한다(Steinert 와 Marekov, 1995; Jarnik 등, 1998). 또한 CE과 결합하는 세포외부 지질이 CE 단백질 중 직접 involucrin과 결합하는 것으로 알려져 있다(Marekov 와 Steinert, 1996). Involucrin은 각질형성세포의 분화과정 중 다른 CE 단백질에 비해 조기 발현되어 유극세포층 상부에서부터 발현된다. 그외의 단백질로 6~18%에 해당하는 SPRs, cystatin A, keratins, envoplakin, elafin 등이 있다(Akiyama 등, 1999; Jarnik 등, 1998). 이미 CE의 기능적 중요성은 잘 알려져 있으나 그 구조나 조합은 확실하지 않다. 현재까지 몇몇 연구에 의하면 여러 단계의 과정을 거쳐서 CE의 조합이 이루어지는데, 첫째로 각질형성세포 내 칼슘농도의 증가에 의해 transglutaminase가 활성화된다. 활성화된 transglutaminase에 의해 세포질내 전구단백질의 교차결합이 교소체 부위부터 시작되고 involucrin과 cystatin-A으로 이루어진 골격을 이루는 단백질 구조가 형성된다. 둘째로 SPRs, loricrin 그리고 막고정 단백질인 envoplakin과 같은 단백질들이 축적된다. 셋째로 CE 단백질의 외각면은 지질과 공유결합으로 연결되어 완전한 CE을 형성한다(Akiyama 등, 1999; Jarnik 등, 1998). 최근 연구에 의하면 피부장벽 손상 후 회복의 과정에서 CE 단백질 중 involucrin과 loricrin의 발현이 다르게 나타나는 것으로 알려졌다(Ekanayake-Mudiyanselage 등, 1998). 사람에서 피부장벽 손상 후 24시간 이후에 involucrin은 과립층 세포에서 뿐 아니라 하부 유극층 세포에서도 발현된다. 그러나 loricrin의 발현은 사람과 마우스 모두에서 피부장벽 손상 후 발현에 변화가 없는 것으로 알려졌다. 본 연구에서도 피부장벽 손상과 손상 후 밀폐에 대한 involucrin과 loricrin의 발현은 다르게 나타났다. 공기노출군과 이온영동군에서 involucrin은 피부장벽 손상 후 12시간 후에 발현이 증가되었으며, 밀폐군에서 involucrin은 공기노출군과 이온영동군에 비해 조기에 유극층으로 확장되었으며 60시간 후에는 기저층 상부에서 발현되었다. 그러나 loricrin은 피부장벽 손상 후 공기노출군, 밀폐군 및 이온영동군 모두에서 정상과 비교해 특별한 차이를 관찰할 수 없었다. Hole 등(1993)에 의하면 retinoids의 배양세포에 대한 효과에 대한 연구에서 involucrin과 loricrin의 합성이 다르게 나타남을 관찰하고 서로 다른 기전에 의해 조절된다고 보고하였다. 피부장벽 손상 후 공기노출군, 밀폐군 및 이온영동군 후 involucrin의 발현이 증가되므로 이들 방법에 의해 유도된 칼슘이온의 변화가 involucrin의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다. 특히 변화된 칼슘이온의 회복이 억제되는 밀폐군에서 involucrin의 발현이 확장되는 것으로 보아 involucrin의 발현이 칼슘이온의 변화와 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

케라틴은 각질형성세포의 분화의 표식자로 기저층에서는 K5와 K14이 발현되며 기저세포 상부에서는 K1과 K10이 발현된다. 또한 이들 케라틴의 발현은 다양한 증식성 및 염증성 피부질환에서 발현되는데 K16은 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서(Le 등, 1995), K17은 지연형 과민반응에서 발현된다(Jiang 등, 1993). 건선의 과증식성 표피에서는

K6, K16 및 K17이 발현된다(Smack 등, 1994; Leigh 등, 1995). 또한 피부장벽의 손상이 각질형성세포의 증식과 분화를 유도하며 분화의 표식자인 케라틴들의 발현에 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다. 급성 피부장벽 손상에 의해 기저층의 K5와 K14, 그리고 기저층 상부의 K1의 발현은 감소되고, 기저층 상부의 K10의 발현은 증가된다. 만성 피부장벽 손상의 모델인 필수지방산 결핍 마우스의 경우 기저층 케라틴 K5는 감소되며, 기저층 상부 케라틴 K1과 K10은 증가된다. 급성 피부장벽 손상과 만성 피부장벽 손상에서 케라틴 발현의 차이는 만성 표피장벽 손상의 과정에서 유도되는 항상성 기전에 의해 손상된 피부장벽이 회복되어 가는 과정에서 K1과 K10의 발현이 증가되기 때문이며 만성 피부장벽 손상에서 관찰되는 표피증식, 즉 표피의 두께 증가와 연관된다(Ekanayake-Mudiyanselage 등, 1998). 급성 피부장벽 손상에서 관찰되는 기저층 상부 케라틴 K1의 감소는 피부장벽 손상에 의해 변화된 각질형성세포의 분화 때문이라는 설명도 있다(Thewes 등, 1991). 만성 피부장벽 손상의 모델인 필수지방산 결핍 마우스의 경우 표피 DNA 합성의 증가와 함께 K6, K16, K17이 발현된다(Proksch 등, 1992). 피부장벽 손상 후 유도되는 DNA 합성 증가와 케라틴 발현의 연관관계는 아직 확실하지 않다. 그러나 표피증식에 의한 DNA 합성은 피부장벽 손상 18~20 시간 후에 일어나지만(Proksch 등, 1991), K6, K16, K17의 발현은 피부장벽 손상 후 6~12 시간에 시작된다(Ekanayake-Mudiyanselage 등, 1998). 그러므로 피부장벽 손상에 의해 유도된 표피증식이 이들 케라틴의 변화를 유도하지는 않는 것으로 생각된다. 상처회복의 과정에서 나타나는 K6와 K16은 각질형성세포의 재생피화 및 재배열과 일치하여 발현되는 것으로 보아 이들 케라틴의 발현은 피부장벽 손상에 의해 유도된 각질형성세포 내부 케라틴의 재배열에 의하는 것으로 사료된다(Mansbridge 와 Knapp, 1987; Paladini 등, 1990). 본 연구에서도 피부장벽 손상 후 공기노출군과 밀폐군에서 기저층의 K5의 발현이 감소되었으며 기저층 상부의 K6와 K10의 발현은 증가되었다. 이는 피부장벽 손상에 의해 유도된 표피증식에 의해 기저층 K5의 발현은 감소되는데 반해, 기저층 상부의 K10의 발현은 증가되기 때문으로 생각한다(Ekanayake-Mudiyanselage 등, 1998). 본 연구에서 특이한 점은 피부장벽 손상을 동반하지 않은 이온영동군에서 기저층의 K5 발현은 감소되는데 반해, 기저층 상부의 K6과 K10 발현은 증가된 점이다. 기저층 상부의 K1과 K10의 발현은 세포외부 칼슘이온에 의해 조절 받으나, 기저층의 K5과 K14는 칼슘이온과 연관이 없는 것으로 알려져 있다(Yuspa 등, 1989). Lee 등(1998)에 의하면 이온영동 이후 첩포에 의한 밀폐와 수화에 의해 각질세포간 구조의 변화가 유발된다고 하였다. 그러므로 본 연구에서 이온영동 후 기저층의 K5 발현 감소는 첩포에 의한 각질세포간 구조의 변화 때문으로 사료되며, 생체내에서 기저층 케라틴 발현과 칼슘이온의 연관성에 대해서는 좀더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이온영동군에서 기저층 상부의 K6과 K10의 발현 증가는 각질형성세포의 분화와 증식이 칼슘이온에 조절될 수 있음을 시사한다. 밀폐군에서 K6과 K10의 발현이 공기노출군에 비해 발현이 느리거나 감소되었는데 이는 피부장벽 손상 후 밀폐 방법은 증관소체의 분비억제 및 새로운 세포간 지질막 형성억제와 함께 케라틴의 재배열을 억제하기 때문으로 사료된다.

V. 결론

CE은 말기분화를 이룬 각질형성세포의 원형질막을 대체하는 특성화된 구조물로서 세포외 부로는 각질세포간 지질과 공유적으로 부착되어 구조적, 기능적으로 완전한 형태의 피부장벽을 형성한다. 칼슘이온이 층판소체의 분비조절에 관여하며 피부장벽 손상 후 회복의 과정에 중요한 조절인자임은 잘 알려져 있다. 그러나 생체에서 표피 칼슘이온의 변화가 각질형성세포의 분화과정, 특히 CE 단백질의 발현에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 연구자는 테이프 스트리핑을 이용하여 피부장벽을 손상시킨 후 공기노출균, 밀폐균 그리고 피부장벽 손상없이 이온영동을 시행한 군으로 구분한 후, 각 시간 별로 조직검사를 시행하여 칼슘이온캡처 세포화학적 염색법을 이용하여 투과전자현미경으로 칼슘이온의 변화를 관찰하였으며, anti-K5, anti-K6, anti-K10, anti-involucrin, anti-loricrin을 이용하여 면역조직화학 검사를 시행하고 다음과 같은 결과를 얻었다

1. 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 후 소실된 칼슘기울기는, 공기노출균은 피부장벽 손상 36시간후에, 밀폐균은 밀폐 60시간 후에 정상으로 회복되었다. 이온영동 후 소실된 칼슘기울기는 양극과 음극 첩포부착 부위 모두에서 이온영동 6시간 후에 정상으로 회복되었다.
2. 테이프 스트리핑에 의한 피부장벽 손상 후 공기노출균, 밀폐균 및 이온영동균 모두에서 피부장벽 손상 직후부터 6시간까지는 K5, K14, K6의 발현은 특별한 변화가 없었다. 공기노출균, 밀폐균 및 이온영동균 모두에서 기저층의 K5 발현은 12시간 이후 약간 감소하였으며, K10의 발현은 유극층과 과립층에서 증가되었다. 정상에서 발현되지 않는 K6는 공기노출균과 밀폐균에서 피부장벽 손상 12시간 이후 기저층과 유극층에 나타나 점차 증가하여 36시간에 표피 전층에서 관찰되었으며, 이온영동균에서 12시간 이후 기저층과 유극층에서 부분적으로 발현되었다.
3. 정상적으로 과립층 상부에서 관찰되는 involucrin의 발현은 12시간 후 공기노출균과 이온영동균에서 증가되었으며 시간 경과에 따라 발현이 확장되어 36시간에는 유극층에서도 발현되었다. 밀폐균은 조기에 하부의 유극층으로 확장되어 12시간 후에 유극층에서 발현되었으며, 60시간 후에는 기저층 상부에서도 발현되었다. 정상적으로 과립층에서 관찰되는 loricrin의 발현은 공기노출균, 밀폐균 그리고 이온영동균 모두에서 정상표피와 비교해 특별한 차이를 보이지 않았다.

상기 실험결과는 생체내에서 피부장벽 손상을 동반하지 않는 칼슘이온의 변화가 케라틴과

CE 단백질의 발현에 변화를 가져오는 것으로 보아 칼슘이온이 각질형성세포의 말기분화에 중요한 역할을 수행하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 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* 113: 189-195, 1999
- Akiyama M, Smith LT, Yoneda K, Holbrook KA, Hohl D, Shimizu H: Periderm cells form cornified cell envelope in their regression process during human epidermal development. *J Invest Dermatol* 112: 903-909, 1999
- Downing DT: Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 33: 310-313, 1992
- Elias PM, Menon GK: Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 24: 1-26, 1991
- Eckert RL, Crish JF, Robinson NA: Epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev* 77: 397-424, 1997
- Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E: Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol* 111: 517-523, 1998
- Feingold KR: The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 24: 57-82, 1991
- Feingold KR: Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. *Cosmet Toilet* 112: 49-59, 1997
- Grubauer G, Elias PM, Feingold KR: Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res* 30: 323-333, 1989
- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH: Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermis cells in culture. *Cell* 19: 245-254, 1980
- Hennings H, Steinert P, Buxman MM: Calcium induction of transglutaminase and the formation of (-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 739-745, 1981
- Hohl D: Cornified cell envelop. *Dermatologica* 21180-201, 1990
- Hohl D: Expression patterns of loricrin in dermatological disorders. *Am J Dermatopathol* 15: 20-27, 1993

- 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* 91: 1656-1664, 1993
- Jiang CK, Magnaldo T, Ohtsuki M, Freedburg IM, Bernerd F, Blumentberg M: Epidermal growth factor and transforming growth factor- α specifically induce the activation and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6786-6790, 1993
- Jarnik M, Kartasova T, Steinert PM, Lichti U, Steven AC: Differential expression and cell envelope incorporation of small proline-rich protein 1 in different cornified epithelia. *J Cell Sci* 109: 1381-1391, 1996
- Jarnik M, Simon MN, Steven AC: Cornified cell envelop assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J Cell Sci* 111: 1051-1060, 1998
- Le TKM, van der Valk PGM, Schalkwijk J, van de Kerhof PCM: Changes in epidermal proliferation and differentiation in allergic and irritant contact dermatitis reaction. *Br J Dermatol* 133: 236-240, 1995
- Lee SH, Choi EH, Feingold KR, Jiang SK, Ahn SK: Iontophoresis itself on the hairless mouse skin induces the loss of the epidermal calcium gradient without skin barrier impairment. *J Invest Dermatol* 111: 39-43, 1998
- Lee SH, Elias PM, Feingold KR, Mauro T: A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol* 102: 976-979, 1994
- 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* 89: 530-538, 1992
- Leigh TM, Navsaria H, Purkis PE, McKay IA, Bowden PE, Riddle PN: Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis *in vivo* and *in vitro*. *Br J Dermatol* 133: 501-511, 1995
- Mansbridge JN, Knapp AM: Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol* 89: 253-263, 1987
- Marekov LN, Steinert PM: Evidence that the lipids of the epidermal cornified cell envelope are attached directly to involucrin. *J Invest Dermatol* 106: 828(abstr), 1996
- Menon GK, Elias PM, Feingold KR: Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br J Dermatol* 130: 139-147, 1994a
- Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR: Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tiss Res* 270: 503-512,

- 1992a
- Menon GK, Feingold KR, Elias PM: The lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 98: 279-289, 1992b
- Menon GK, Grayson S, Elias PM: Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 84: 508-512, 1985
- 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* 102: 789-795, 1994b
- Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA: Onset of reepithelization of keratin filaments in wound edge keratinocyte: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 76: 353-356, 1996
- Proksch E, Feingold KR, Elias PM: Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 87: 1668-1673, 1991
- 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* 99: 216-220, 1992
- Smack PD, Korge BP, James WD: Keratin and keratinization. *J Am Acad Dermatol* 30: 85-102, 1994
- Steinert PM, Marekov LN: The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 270: 17702-17711, 1995
- Thewes M, Stadler R, Korge B, Mischke D: Normal psoriatic epidermis expression of hyperproliferation-associated keratins. *Arch Dermatol Res* 283: 465-47, 1991
- Tracher SM, Rice RH: Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 40: 680-695, 1985
- Vicanova J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrid T, Koerten HK, Ponc M: Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J Invest Dermatol* 111: 97-106, 1998
- Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR: Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentration in vivo. *J Cell Biol* 109: 1207-1217, 1989

ABSTRACT

The Effects of Change in Epidermal Calcium Gradient on Keratinocyte Differentiation

Sang Min Hwang
Department of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

The cornified cell envelope(CE) which is formed during the terminal differentiation of keratinocytes, is a specialized structure which forms a structurally and functionally complete permeability barrier. It consists of a layer of cross-linked protein coated with covalently bound intercorneocyte lipids. It is well known that calcium ions play an important role in the restoration of the permeability barrier and the secretion of lamellar bodies. However there has been no definite in vivo study to demonstrate the effects of changes in the calcium ions on keratinocyte differentiation, especially in the expression of CE protein. In this study, different methods were used to induce a change in calcium ions and the effects of these on the expression of CE protein were examined. The permeability barrier of hairless mice was disrupted by tape-stripping and then exposed to the air or occluded with a water-vapor impermeable membrane, and iontophoresis was done without permeability barrier perturbation. Skin specimens were prepared for calcium ion capture cytochemistry and immunohistochemistry with anti-K5, anti-K10, anti-K6, anti-involucrin and anti-loricrin. The calcium gradient which disappeared after tape-stripping was restored at 36 h after tape-stripping with air exposure and at 60 h after tape-stripping with occlusion. The change in calcium ions produced by both positive and negative iontophoresis showed recovery at 6 h. Expression of basal K5 showed a slight decrease and expression of suprabasal K10 showed an increase at 12 h with air exposure after tape-stripping, tape-stripping with occlusion, and iontophoresis. Expression of K6 appeared at 12 h after tape-stripping and then in the whole epidermis at 36 h with air exposure after tape-stripping and tape-stripping with occlusion and focally appeared in the stratum granulosum and stratum spinosum after iontophoresis. Expression of involucrin was increased at 12 h with air exposure after tape-stripping and iontophoresis and was extended to the lower spinous layers in tape-stripping with occlusion. Expression of loricrin in air exposure after tape-stripping, tape-stripping with occlusion and iontophoresis was similar to that of normal skin. In summary, these results suggest that changes in calcium ions without permeability barrier perturbation are related to the expression of CE protein. Based on these results it is thought that calcium ions in the epidermis have an important role in the terminal differentiation of keratinocytes.

Key Words: keratin, cornified cell envelope protein, epidermal permeability barrier, epidermal calcium gradient, keratinocyte differentiation