노화피부에 대한 초음파의 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

이 세 원

노화피부에 대한 초음파의 효과

지도 최 응 호 조교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 세 원

이세원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

진정한 과학자의 길에 첫걸음을 내딛는데 가장 큰 힘이 되어 주시고 늘 세심하고 자상한 조언으로 이 영광의 순간까지 함께 해 주신 최응호 지도교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 항상 좋은 가르침을 베풀어주시고 연구에 전념하도록 많은 배려를 해 주신 이원수 교수님과 바쁘신 중에도 저의 논문을 위해 훌륭한 조언을 해 주신 이광길 교수님께도 깊이 감사드립니다.

저를 피부과에 입문하도록 해 주시고 공부하는 자세를 가르쳐 주신 안성구 교수님께 감사드립니다. 실험과 논문으로 인해 바빴던 저의 빈자리를 메우느라 고생한 손인범 선생님, 안형진 선생님, 이상훈 선생님, 이진욱 선생님을 비롯한 우리 피부과학 교실 모든 분들과 실험에 많은 도움을 주신 김민정 연구원, 전자현미경실의 김석 선생님, 송미숙 선생님, 병리학 교실의 선생님들께도 감사를 드립니다.

저를 낳아 길러주시고 지금 이 순간에도 가장 기뻐해 주실 아버지, 어머니, 그리고 사랑하는 동생들에게 큰 감사를 드리며 이 영광을 돌리고자 합니다.

저 자 씀

차 례

표 차 례

그 림 차 례

국 문 요 약

노화피부에 대한 초음파의 효과

인간의 피부는 노화가 진행됨에 따라 여러 가지 임상적, 조직학적 변화가 나타난다. 조직학적 변화 중 가장 두드러진 것은 피부의 두께 감소, 진피내 결합조직의 감소, 탄력섬유의 변성이다. 최근 많은 피부과 의원에서 피부의 탄력성을 높이고 주름을 감소시킬 목적으로 초음파를 이용하여 화장품을 경피 주입하는 sonophoresis를 시술하고 있으며 유럽에서는 예전부터 피부미용에 초음파가 사용되고 있으나 그 효과에 대한 체계적인 연구나 검증은 아직 되어 있지 않다. 기존의 연구에서 초음파에 의해 섬유아세포의 활성과 단백질 합성이 증가한다는 보고가 있으나 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 않고, in vivo 상태에서 진행한 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구자는 교원섬유와 진피두께가 감소된 노화피부에 초음파를 시술하였을 때 초음파가 TGF-β의 발현을 증가시켜 섬유아세포를 자극하여 교원섬유의 합성을 증가시키고 진피의 두께를 증가시킬 것이라는 가설을 세우고 이의 증명을 위해 진피성분이 감소되어 피부가 얇아진 노화 쥐와 정상피부를 갖고 있는 젊은 쥐를 대상으로 1MHz의 초음파를 처치하여 피부의 두께, 교원질, 탄력섬유, 기질의 변화를 알아보고, TGF-β의 발현이 증가되는 지를 살펴보고자 본 실험을 진행하였다. 피부의 두께와 진피의 밀도를 측정하기 위해 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였고, 진피내 교원질의 증가를 살펴보기 위해 Massons trichrome 염색을 실시하였으며 영상분석기를 이용하여 그 결과를 분석하였다. 탄력섬유의 변화를 보기 위해 Verhoeff-van Gieson 염색을 하였고, 기질의 변화를 보기 위해 alcian blue 염색을 하였으며 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. TGF-β의 발현을 보기 위해 면역조직화학 검사를 시행하였고 영상분석기로 분석하였다. 진피 미세구조의 변화를 살펴보기 위해 전자현미경 검사를 실시하였다. TGF-β mRNA의 발현 정

도를 보기 위해 RT-PCR을 시행하였다.

노화 쥐에 초음파를 처치하였을 때 표피두께와 진피밀도는 유의한 증가를 보이나, 진피의 두께, 탄력섬유, 기질은 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. 젊은 쥐에 초음파를 처치하였을 때는 노화 쥐에서 관찰된 표피두께와 진피밀도의 변화를 관찰할 수 없었다. 노화 쥐에선 초음파 처치군에서 TGF-β 발현의 증가와 전자현미경 관찰시 초음파 처치군에서 교원섬유가 더 촘촘하게 배열된 것을 관찰할 수 있었으나, 젊은 쥐에선 이런 변화가 관찰되지 않았다. 노화 쥐와 젊은 쥐 모두 TGF-β mRNA RT-PCR 에서 처치군의 평균값이 대조군에 비해 높게 나왔으나, 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

이상의 결과로부터 초음파를 노화피부에 시술시 교원섬유와 진피밀도가 증가함을 알 수 있었으며 이는 TGF-β의 증가에 의한 섬유아세포의 활성화에 의해 나타나는 것으로 생각된다. 이에 대한 좀 더 많은 연구를 통해 노화피부의 개선에 초음파가 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심 되는 말: 노화피부, 초음파, 교원질, 섬유아세포, TGF-β

노화피부에 대한 초음파의 효과

<지도 최 응 호 조교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 세 원

Ⅰ. 서 론

인간의 수명이 길어지면서 노인인구의 비율이 늘어나고 있고, 노화에 대한 관심 또한 점점 증가하고 있다. 노화에 의한 많은 현상 중 가장 뚜렷이 인지되는 것이 피부의 변화이고 피부의 노화를 막기 위한 다양한 방법이 시도되고 있다.

피부의 노화는 크게 내적 요인에 의한 노화와 외적 요인에 의한 노화로 나눌 수 있으며, 그 요인에 따라 피부의 구조적, 기능적 변화를 초래한다. 내적인 노화란 유전적 프로그램에 의해 일어나는 현상으로서[1] 피부의 위축, 황색변화, 주름, 늘어짐 등이 나타난다[2]. 노화에 관계하는 외적 요인으로는 자외선, 흡연, 바람, 화학물질 등이 있으며 이중 자외선에 의한 광노화가 가장 중요한 요인으로 생각된다. 광노화에서 나타나는 임상적 양상은 피부의 거칠어짐, 미세한 주름, 혈관확장, 광선각화증, 흑자 등이다. 외적요인에 의한 노화는 노출된 부위에만 나타나는 특징이 있다[3]. 노화에 의해 나타나는 조직학적 변화는 피부의 각 구조별로 차이가 있다. 표피는 두께가 얇아지고[4], 표피-진피 경계부가 편평해지며[5], 랑게르한스 세포와 멜라닌 세포의 수가 감소한다[6]. 진피는 전반적인 밀도, 세포충실도, 혈관이 감소한다[7-9]. 정상적인 성인의 피부는 매년 1%씩 교원질의 양이 감소하며[7] 노화피부에서 교원질은 그 양 뿐 아니라 성질의 변화도 동반하는데 정상피부의 교원질에 비해 가용성이 떨어지고 콜라게나제에 의해 잘 분해되지 않게 된다[10]. 탄력섬유도 수가 감소하고 다양한 변성된 모양을 띄며 배열도 불규칙해진다[11]. 기질은 글라이코스아미노글라이칸의 양이 감소되어 진피 점도의 변화를 가져온다[12]. 피하층은 노화가

진행되면서 얼굴, 손, 발, 정강이는 위축되는 반면, 허리나 허벅지는 비후된다[13]. 피부 부속기는 한선, 모낭의 수가 감소되고 피지선의 증식이 관찰된다[14]. 노화피부에서 나타나는 조직학적 변화들은 각각 노화피부의 임상적인 변화와 연관된다[6].

피부의 노화를 개선하기 위해 화학박피, 이온영동, α-hydroxy acids[15], 레티노이드[16] 같은 화학물질의 도포 등 여러 방법이 시도되고 있으나 그 방법이 간단치 않고 효과 또한 일시적이거나 미미하며 시술 후 자극증상이나 색소침착 등의 부작용이 나타나기도 한다. 최근 많은 피부과 의원에서는 초음파를 이용하여 각종 화장품을 경피주입 하는 sonophoresis[17]를 피부의 탄력성을 높이고 주름을 감소시킬 목적으로 시술하고 있다. 유럽에서는 예전부터 주름살이 펴지고 기미가 없어지며 팽팽하고 윤기 있는 얼굴이 되는 효과를 본다하여 초음파를 피부미용에 사용하고 있으나 그 효과에 대한 체계적인 연구나 검증이 아직 되어 있지 않고, 초음파 자체가 피부에 미치는 영향에 대한 의학적인 연구도 매우 드물다.

초음파는 정상적인 청력을 가진 인간이 청감각을 느낄 수 없을 정도로 주파수가 높은 음파로서 의학적으로는 진단, 치료, 파괴의 목적으로 이용되고 있다[18]. 그 중 치료용 초음파는 1 3MHz의 주파수를 가지며 열작용과 비(非)열작용에 의해 그 효과를 나타낸다. 열작용은 물리치료, 염좌회복, 통증감소의 목적으로 사용되며 비열작용은 조직회복[19,20], 정맥류성 궤양의 치료[21], 욕창의 치료[22], 허혈근육의 혈류개선[23], 건의 재생[24], 섬유아세포에서 단백질의 생성 촉진[25]에 이용된다. 피부조직에서 1MHz의 초음파는 37mm까지 투과하여 그 효과를 나타낼 수 있고 3MHz의 초음파는 12mm까지 그 효과를 나타낼 수 있는데, 일반적으로 치료용 초음파는 1MHz를 사용한다. Dyson 등[26]은 인위적으로 상처를 낸 쥐의 귀에 초음파시술을 하면 섬유아세포의 형태학적 변화를 유발한다고 하였고, 이런 현상은 초음파가 섬유아세포의 유전자에 영향을 미치기 때문이라고 하였다. Harvey 등[27]은 인간의 피부와 근육의 섬유아세포를 배양하여 초음파를 시술했을 때 단백질의 생성이 유의한 증가를 보였다고 보고하였으며, Webster 등[28]은 인간배아 섬유아세포에 초음파를 시술하였을 때 교원질의 합성이 증가됨을 발견하였다. 이런 일련의 결과들은 초음파에 의해 섬유아세포가 자극되어 교원질의 증가가 일어남을 시사하나 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으며 여러 가지 사이토카인이 그 과정에 관여할 것으

로 생각된다[18].

Transforming growth factor-beta(TGF-β)는 대식세포와 섬유아세포의 동원[29], 기질의 합성 자극[30], 혈관생성 자극 등 다양한 생물학적 활성을 갖는 사이토카인으로서 주로 혈소판에서 생성이 되나 대식세포, 섬유아세포, 평활근세포에서도 생성이 되며[31], 섬유아세포의 교원질 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[32]. TGF-β는 이런 다양한 기능에 의해 상처치유 과정에서 필수적인 사이토카인으로 알려져 있는데[33], 노화피부에서는 정상피부에 비해 TGF-β의 발현이 감소되어 있다[34].

이에 본 연구자는 교원섬유와 진피두께가 감소된 노화된 피부에 초음파를 시술하면 초음파가 TGF-β의 발현을 증가시켜 섬유아세포를 자극하고, 이로 인해 교원섬유의 합성과 진피의 두께를 증가시킬 것이라는 가설을 세우고, 이의 증명을 위해 진피성분이 감소되어 피부가 얇아진 노화 쥐와 정상피부를 갖고 있는 젊은 쥐를 대상으로 1MHz의 초음파를 처치하여 피부의 두께, 교원질, 탄력섬유, 기질의 변화를 알아보고, 이들 변화와 TGF-β 발현의 관계를 살펴보고자 본 실험을 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 노화피부에 대한 초음파의 효과

가. 실험동물

노화피부에 대한 초음파의 효과를 확인하기 위하여 동일한 표준사료로 사육한 생후 81주의 암컷 무모생쥐 20마리를 준비하여 실험에 사용하였으며, TGF-ß mRNA에 대한 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)을 시행하기 위해 생후 81주의 암컷 무모생쥐 6마리를 사용하여 실험하였다.

나. 초음파의 시행

무모생쥐의 등을 두 구획으로 나누어 한쪽을 처치부위(처치군)로 하고 반대쪽을 대조부위(대조군)로 하였다. 2주간 매일 일정한 시각에 ethyl ether를 이용하여 흡입 마취시킨 후 한쪽 등에 1MHz의 연속파를 내는 초음파 기구(Skin joy; Sonic tech: Korea)를 이용하여 5분간 초음파를 처치하였으며 다른 한쪽 등에는 초음파 처치시 사용되는 transmission gel(Biosonic ultrasound transmission gel; Amite: USA)만을 5분간 도포하여 대조부위로 삼았다.

다. 경표피수분손실양의 측정

무모 생쥐 중 10마리를 chloral hydrate로 복강내 주사하여 마취시킨 후 일정한 온도(22℃±1℃)와 습도(상대습도 40 60%)가 유지되는 공간에서 처치부위와 대조부위 각각에 대해 Tewameter TM210(Courage+Khazaka: Germany)을 이용하여

경표피수분손실양(transepidermal water loss; TEWL)을 측정하였다. 경표피수분손실양은 초음파 처치 전과 2주간의 초음파 시술이 끝나고 24시간 후에 측정하였다.

라. 조직생검

2주간의 초음파 시행 후 경표피수분손실양을 측정하고 나서 처치부위와 대조부위를 각각 조직생검하고 각각의 조직을 2등분하여 반은 10% 포름알데히드에 고정하였고 반은 액체질소를 이용하여 신선조직 상태로 급속 냉동 보관하였다.

마. 광학현미경 검사

포르말린에 고정한 조직에 hematoxylin-eosin염색, Massons trichrome염색, Verhoeff-van Gieson염색, alcian blue 염색을 시행하였다.

Hematoxylin-eosin염색한 조직은 영상분석기(Analysis®3.0; Soft imaging system: Germany)를 이용하여 분석을 하였는데 100배 광학현미경 하에서 한 조직당 임의의 3부위를 선택하여 gray scale로 전환한 후 표피의 두께, 진피의 두께를 측정하였으며, 진피내 일정부위에서 진피내 결합조직이 차지하는 면적의 비율을 구하여 진피의 밀도를 측정하였다.

Massons trichrome염색한 조직도 영상분석기를 이용하여 진피내 교원섬유의 밀도를 측정하였는데 hematoxylin-eosin염색시 진피의 밀도를 측정한 방법과 동일하게 시행하였다.

Verhoeff-van Gieson염색한 조직과 Alcian blue 염색한 조직은 연구자 2인이 광학현미경을 이용한 육안관찰로 동일한 무모생쥐의 처치부위와 대조부위에서 탄력섬유와 기질의 정도를 상대 비교하였다.

바. 면역조직화학 검사

액체질소에 넣어 급속 냉동 고정시킨 조직을 OCT compound가 채워진

crymold에 넣고 isopentane을 사용하여 급속 냉동시켰다. 동결된 조직은 동결절편기를 이용하여 6-8㎛ 두께로 잘라서 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 붙이고 영하 20℃에서 차갑게 만든 아세톤에서 5분간 고정한 후 실온에서 건조시켰다. TBS 완충용액으로 수세한 후, 3% H_2O_2에서 30분간 배양하고, 다시 TBS 완충용액으로 수세하였다. 0.5% 말혈청과 2% 양혈청을 떨어뜨려 실온에서 30분간 반응시킨 후 습윤상자에서 TGF-β 1차 항체(Santacruz: USA)를 100 150㎕ 떨어뜨린 후 상온에서 1시간 반응시키고 TBS 완충용액에서 수세하였다. 2차 항체(EnVision; DAKO: USA)를 2방울씩 떨어뜨리고 30분간 반응시키고 다시 TBS완충용액에서 수세 후 diaminobenzidine(DAB; DAKO: USA)용액 2방울을 떨어뜨려 5분간 발색시킨 후 봉입제로 봉입하여 광학현미경(×100)하에서 영상분석기의 intensity profile을 이용하여 관찰하였다. Intensity profile은 염색된 조직의 발색정도를 판단하는 방법으로서 광학현미경에 나타난 상을 gray scale로 전환하여 측정하고자 하는 부위의 발색범위를 설정한 후 평균값을 구하여 지표로 삼는다.

사. 전자현미경 검사

조직의 고정은 OsO_4 후고정법을 사용하였는데 조직을 얻은 즉시 입체현미경하에서 1mm 두께로 절편하여 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1M sodium cacodylate 완충액 pH7.4로 조성된 modified Karnovsky 용액에 넣어 고정하였다. 고정된 조직은 실온에서 1시간 동안 방치한 후 18 24시간(overnight)동안 4℃ 냉장고에 보관하였다. Modified Karnovsky 용액을 제거한 후 0.1M cacodylate 완충액으로 40분씩 3회 세척하였다. 이후 후고정을 최종농도 1% OsO_4, 0.1M cacodylate 완충액에 빛을 차단한 상태로 시행하였다. 후고정 후 0.1% cacodylate 완충액으로 10분간 1회 세척한 후 50%, 70%, 95% 에탄올로 각 10분씩 2회, 100% 에탄올로 각 20분씩 4회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide로 각 15분간 2회 조직을 침투시키고 통상적인 방법으로 만들어진 epon으로 포매시켜 36시간동안 78℃ 배양기에서 resin을 중합시킨 후 1 5㎛ 두께로 절편한 후 부위를 찾고 초박절 후 통상적인 uranyl acetate와 lead

citrate로 염색하여 투과전자현미경(Joel 1200EX; Tokyo: Japan)으로 관찰하였다.

아. TGF-β mRNA 에 대한 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

준비된 무모쥐의 등을 처치부위와 대조부위로 나누어 처치부위에 10분간 초음파를 시술하고 대조부위에는 transmission gel만을 도포하였다. 초음파 시술 2시간 후에 처치부위와 대조부위 각각에 대해 조직생검을 실시하였다. 생검한 조직의 피하지방층을 제거하고 10mM EDTA에 담가서 37℃에서 5분간 배양하여 표피와 진피를 분리시킨 후 진피만 모아서 분해 용액(Trizol®; Gibco: USA) 500㎕를 가하고 파쇄기를 이용하여 조직을 파쇄시켰다. 3분간 실온에서 배양 후 0.1㎖ chloroform을 가하고 와동(vortex)후 다시 5분간 배양하였다. 4℃에서 13,200rpm으로 15분간 원심분리하고 상층액만을 모아 동량의 isopropyl alcohol을 가한 뒤 와동 후 10분간 배양하였다. 4℃에서 13,200rpm으로 10분간 원심분리 한 후 침전물에 75% DEPC로 처리한 에탄올을 가하고 15분간 원심분리 후 에탄올을 제거하고 실온에서 압착결정(pellet)을 말렸다. 마른 압착결정을 20 30㎕의 DEPC로 처리된 증류수에 녹여 영하 20℃에 보관하였다. RNA로 부터의 역전사는 Reverse transcription system(Promega: USA)을 이용하였고 중합효소연쇄반응은 Takara taq(Takara: USA)을 이용하였다. 총 RNA 분리와 cDNA의 합성이 잘 이루어졌는지는 house keeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자를 PCR 방법으로 증폭하여 확인하였다. PCR 생성물은 2% agarose gel에 전기영동을 하여 반응 생성물을 확인하였다.

2. 정상피부에 대한 초음파의 효과

동일한 표준사료로 사육된 생후 6주의 암컷 무모생쥐 6마리를 준비하여 실험에 사용하였으며, TGF-β mRNA에 대한 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하기 위해 생후 6주의 암컷 무모생쥐 3마리를 사용하여 실험하였다.

노화 쥐에서와 동일한 방법으로 초음파 처치 후 조직생검을 실시하였으며 hematoxylin-eosin 염색, TGF-β 면역조직화학 염색, 전자현미경 관찰, TGF-β mRNA RT-PCR을 시행하고 노화 쥐와 동일한 방법으로 분석하였다.

3. 통계학적 분석

각각의 방법에 대해 Student t-test를 이용하여 처치 전, 후에 대조부위와 처치 부위사이에 유의한 차이가 있는지를 살펴보았다.

Ⅲ. 결 과

1. 노화피부에 대한 초음파의 효과

가. 경표피수분손실양

경표피수분손실양은 실험 전, 후에 처치군과 대조군 모두에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 1).

나. 광학현미경 검사

Hematoxylin-eosin 염색한 조직을 영상분석기를 이용하여 분석한 결과 표피의 두께와 진피의 밀도는 처치군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 관찰할 수 있었으나 진피의 두께는 두 군 사이에 유의한 차이를 발견할 수 없었다.(Fig. 2, 3, 4)

진피의 교원섬유를 보기 위한 Massons trichrome 염색에서 실험 후에 처치군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 관찰할 수 있었으나(Fig. 5), 탄력섬유를 보기 위한 Verhoeff-van Gieson 염색에서는 두 군 모두 탄력섬유나 탄력소양 물질이 거의 관찰되지 않았고 기질의 변화를 관찰하기 위한 alcian blue 염색에서도 두 군 사이에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

다. 면역조직화학 검사

섬유아세포에 대한 전섬유화 사이토카인(profibrotic cytokine)인 TGF-β에 대한 면역조직화학검사상 처치군에서 대조군에 비해 TGF-β의 발현이 유의하게 증가된 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

라. 전자현미경 검사

두 군 사이에 교원섬유나 탄력섬유의 모양에 뚜렷한 차이는 관찰할 수 없었으나 처치군에서 대조군에 비해 교원섬유가 좀 더 촘촘하게 배열된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 탄력섬유는 두 군 모두에서 거의 관찰이 되지 않았고 차이도 없었다.

마. TGF-β mRNA 에 대한 역전사 중합효소연쇄반응

처치군에서 대조군에 비해 발현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(Fig. 8).

2. 정상피부에 대한 초음파의 효과

가. 광학현미경 검사

Hematoxylin-eosin 염색한 조직에서 표피의 두께와 진피의 두께, 진피의 밀도 모두 처치군과 대조군사이에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 9, 10, 11)

나. 면역조직화학 검사

TGF-β에 대한 면역조직화학검사상 처치군과 대조군사이에 유의한 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 12).

다. 전자현미경 검사

처치군과 대조군 사이에 교원섬유나 탄력섬유의 모양, 배열 등에서 차이를 관

찰할 수 없었다.

라. TGF-β mRNA 에 대한 역전사 중합효소연쇄반응

처치군에서 대조군에 비해 발현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(Fig. 13).

이상의 결과는 Table 1.에 정리하였다.

Table 1. Results of Epidermal thickness, dermal thickness, dermal density, dermal collagen, immunoreactivity, TGF-β mRNA/GAPDH on aged and young mice.

	Aged mice			Young mice		
	Ultrasound	**Control**	**p value**	**Ultrasound**	**Control**	**p value**
Epidermal thickness	23.1±4.8	18.9±3.7	0.0002	32.5±4.7	25.9±5.1	0.1108
Dermal thickness	207.5±27.9	200.8±32.9	0.3537	198.1±7.6	197.9±34.9	0.9955
Dermal density	90.9±4.0	87.2±3.2	0.0031	89.6±3.4	87.8±3.3	0.5564
Dermal collagen	86.5±5.1	81.8±4.5	0.0022			
Immunoreactivity	82.1±2.8	79.9±3.0	0.0459	72.4±1.9	72.3±1.6	0.7904
TGF-β mRNA /GAPDH	82.5±13.1	71.6±14.2	0.1338	70.9±20.9	52.3±13.1	0.0536

Ⅳ. 고 찰

노화 시에 피부에서 나타나는 임상양상은 교원질의 양과 밀접한 관계가 있다[35]. 교원질은 피부의 노화가 진행됨에 따라 많은 변화가 나타나는데 섬유아세포를 통한 생성속도가 감소하며[36], 섬유아세포의 수명도 감소하게 된다[37]. 이런 변화를 통해 노인의 피부는 상처치유가 지연되고 피부 교원질 양 감소에 의한 진피위축 현상이 나타난다[38]. Shuster 등[7]은 15세부터 93세의 남자 74명과 여자 80명을 대상으로 피부의 두께와 교원질의 양, 밀도를 조사하였는데 나이가 들면서 피부내 교원질의 함량은 감소하게 되며 피부의 두께와 교원질의 밀도 또한 감소하게 되므로 피부의 두께를 결정하는 가장 중요한 요소가 교원질이라고 밝혔다. Moragas 등[39]은 생후 3.5개월부터 86세의 사람 96명의 복부피부를 생검하여 영상분석기로 분석한 결과 40세까지는 피부의 두께가 증가하나 이후 나이가 들면서 두께가 감소하고, 교원섬유의 밀도도 감소한다고 하였다. 기존의 문헌에도 나이가 들면서 진피내 교원질은 진피내 섬유아세포와 함께 감소를 하게 되고[9], 섬유아세포는 수적인 감소 뿐 아니라 운동성[40]과 교원 단백질의 분비도 감소된다고 보고[41,42]되어 있다.

본 연구의 목적은 노화에 의해 교원질이 감소하고 피부가 얇아진 노화피부에 대해 초음파를 시술했을 때 노화현상을 역전시킬 수 있는지를 관찰하는 것인데 초음파 처치 후 hematoxylin-eosin염색과 Massons trichrome염색에서 진피내 교원질의 밀도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 진피의 두께는 처치군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었는데 이는 노화에 의해 진피의 교원섬유들이 위축되어 그 배열이 성기게 되어있는 상태에서 교원질의 밀도가 증가하더라도 진피의 두께를 회복하기에는 그 정도가 부족하고 또한 alcian blue 염색결과에서 나타난 바와 같이 기질의 증가가 동반되지 않았기 때문으로 생각된다.

초음파가 치료작용을 나타내는 기전은 명확히 밝혀져 있지는 않으나 몇 가지 가설이 제시되고 있다[43]. 첫째, 초음파가 미세관(microtubule)을 압박하고 미세거품(microbubble)의 진동과 음향흐름을 생성하여 세포막의 투과도와 2차 전령인 아데닐산 사이클라제 활성에 직접적인 영향을 미친다. 이로 인해 이온과 단백질의 이

동에 변화가 생기고 유전자 발현에 대한 세포내 신호전달에 변화를 유발하여 작용을 나타낸다[44]. 두 번째, 초음파에 의해 세포표면에 가해지는 압력이 양이온 통로의 'stretch receptor'에 영향을 미쳐 세포내 양이온 농도를 변화시키고 유전자 발현을 조절하는 신호전달체계에 영향을 주어 작용을 나타낸다[45]. 세 번째, 초음파에 의한 기계적 자극이 세포 외 기질에 부착되어 있는 세포골격에 변화를 일으켜 유전자 발현과 세포대사에 영향을 미친다[46]. 네 번째, 뼈에서는 초음파에 의해 생체전류가 강화되어 작용을 나타낸다[47]. 다섯 번째, 초음파 시술시 나타나는 온도의 상승이 세포변화에 영향을 미친다[28]. 초음파가 섬유아세포에 영향을 미치는 기전이 명확히 밝혀져 있지 않음에도 불구하고, 초음파 시술시에 섬유아세포가 활성화되고 사이토카인이 증가한다는 논문이 다수 발표되었고, 실제 임상에서도 이를 활용해 다양한 질환의 치료에 초음파가 이용되고 있다[18,28,48]. Ramirez 등[48]은 건의 섬유아세포를 배양하여 in vitro 상태에서 초음파를 시술한 결과를 보고하였다. 이에 따르면 정상 세포기질상태에서는 초음파를 시행하여도 교원질 합성에 변화가 관찰되지 않았으나 배양배지에 vitamin C를 추가할 경우 섬유아세포를 통한 교원질의 합성은 200%까지 증가하였다. 기존에 대동맥 평활근 세포에서 vitamin C가 교원질 합성과 축적을 증가시킨다는 보고가 있었는데[49] Ramirez 등 의 실험을 통해 대동맥 뿐 아니라 다른 부위에서도 이 효과가 입증이 되었고 이로 미루어 피부의 섬유아세포에서도 유사한 효과를 보일 것으로 생각된다. Ramirez 등 의 실험에서 가장 주목할 만한 점은 세포 기질에 물리적 손상과 화학적 손상을 가했을 때 초음파를 시술하면 정상 상태에 비해 교원질 합성이 현저하게 증가하며 이런 효과는 5일까지 지속이 된다는 것이다. 이것은 초음파가 정상세포보다는 기질이 손상된 상태에서 더 효과적임을 의미하며 본 연구자의 실험에서도 초음파 시술시 노화 쥐의 진피에서는 결합조직의 밀도와 교원섬유의 증가가 관찰되나 젊은 쥐의 정상진피에서는 이런 변화가 관찰되지 않는 것을 설명하는 단서가 될 것으로 생각된다. Ramirez 등 의 실험에서는 in vitro 상태에서 섬유아세포에 초음파를 시술할 경우 섬유아세포의 증식이 증가되는 것이 관찰되었는데, 이는 De Deyne 등[50]이 인간의 피부에 있는 섬유아세포를 대상으로 초음파를 시술한 실험에서도 나타난 결과이다. 상기 연구들과 본 실험에서는 연속파를 내는 초음파(continuous

ultrasound)를 사용하였는데 이는 펄스형의 초음파(pulsed ultrasound)의 경우 초음파에 의한 세포의 분해나 손상이 잘 일어나고[51] 이것이 실험 결과에 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

시간에 따른 내적인 노화는 생체시계에 의해 다른 기관의 노화와 함께 진행되나[52] 자외선에 의한 노화는 태양광의 노출정도에 따라 진행이 다르다[53]. 비노출부에 나타나는 내적인 노화는 임상적으로 가는 주름과 진피의 위축, 피하지방의 감소로 나타나며 상처치유의 지연과 진피 결합조직이 약해지는 현상과 관계된다. 반면에 노출부에 나타나는 자외선에 의한 노화는 굵고 깊은 주름의 형태로 나타나며 비정상적인 탄력섬유양 물질의 침착으로 인해 피부가 두꺼워져서 가죽같은 형태로 된다. 광학현미경하에서도 노화 시에 진피에 나타나는 이런 변화들이 관찰되는데, 태양광 노출부위와 비노출 부위는 현저한 차이를 보이며 노출부위에는 탄력섬유양 물질의 축적이 현저하고 교원섬유의 호염기성 변성과 균질화가 나타나며 기질의 침착이 관찰되는[54] 반면에 비노출 부위에서는 탄력섬유의 수와 크기가 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 이런 변화는 전자현미경에서도 관찰이 되는데 광노화부위에서는 탄력섬유가 증가하고 탄력섬유의 미세섬유가 커지며 전자밀도가 증가된 과립성 물질이 관찰이 되나[55] 비노출 부위에서는 탄력섬유가 분해되는 현상을 관찰할 수 있다[56]. 탄력소 유전자는 태생기 초기에 발현이 되어 수십 년간 일정 수준을 유지하나 노화가 본격화되면 감소하게 되고 이로 인해 노화 시에 관찰되는 탄력섬유의 감소가 나타나는 것으로 생각된다[38]. 본 실험에 사용된 쥐들은 실내에서 사육되어 태양광에 노출될 기회가 없었다. Verhoeff-van Gieson염색과 전자현미경하에서 탄력섬유가 거의 관찰되지 않은 것은 노화 쥐들의 내적인 노화에 의해 탄력섬유가 소실되었기 때문으로 생각되며 탄력섬유의 경우 교원질과는 달리 초음파에 의해 노화현상의 역전을 가져올 수는 없을 것으로 판단된다.

피부기질의 프로테오글라이칸과 하이알루론산은 피부의 수화를 담당하는데 노화가 진행되면서 점차 감소하게 되며 이런 현상은 광노화부위보다 비 노출부위에서 두드러지게 나타난다[57]. 본 실험에서도 노화 쥐의 진피에서 기질의 함량은 낮게 관찰되었으며 초음파에 의해 이런 기질의 감소가 호전되지는 않았다.

TGF-β는 잘 알려진 섬유아세포의 유사분열 촉진인자이며 전번역

(pre-translation), 후번역(post-translation) 단계에 모두 작용하여 기질과 교원질의 축적을 촉진한다[58]. Chung 등[59]에 의하면 광노화부위와 자외선 차단부위의 노화피부 모두에서 교원질 합성은 감소되어 있으나, TGF-β에 의한 생성유도 시에는 신생아의 세포에서 나타나는 반응 이상으로 합성이 증가된다[59]. 노화피부와 신생아 피부 모두 TGF-β에 의한 교원질 합성 유도는 전번역 단계에서는 proα_1(Ⅰ)과 proα_1(Ⅲ) 교원질 RNA의 증가에 의하며[58] 후번역 단계에서는 1형 전교원질 mRNA의 증가에 의해 일어난다[31]. TGF-β에 의한 1형 교원질 mRNA는 신생아의 섬유아세포보다 노화된 섬유아세포에서 더 현저하게 증가한다[59]. Reed 등[60]에 의하면 무모생쥐에게 인위적으로 만든 상처에서 TGF-β_1에 대한 섬유아세포의 반응은 노화가 진행되도 감소하지는 않으며 섬유아세포에서 1형 교원질의 유도는 노화피부와 정상피부에서 동일하게 나타난다. 즉, 쥐의 나이가 증가함에 따라 나타나는 상처부위 교원질의 감소는 TGF-β_1 과 β_2의 감소에 기인한다. 또한 무모쥐의 상처에 TGF-β_1과 β_2를 발랐을 때 상처의 교원질 함량이 증가한다[61]. 본 실험의 면역조직화학염색 결과를 보면 노화 쥐에선 초음파 시술 후 TGF-β의 발현이 증가되고 hematoxylin-eosin 염색과 Massons trichrome 염색에서 나타났듯이 진피의 교원질 밀도가 증가하나 젊은 쥐의 피부에서는 초음파 시술 후에 TGF-β의 발현이 증가되지 않으며 진피의 밀도 또한 증가되지 않았다. 이의 원인이 무엇인지는 명확하지 않으나, 노화피부에서는 초음파에 의해 TGF-β의 발현이 증가하게 되고 이로 인해 진피내 교원질의 밀도가 증가하게 되지만 젊은 피부에서는 초음파를 시술하더라도 TGF-β가 증가하지 않고 이에 따라 교원질의 증가도 없기 때문인 것으로 생각된다.

광노화피부에는 많은 염증세포들이 침윤되고 이런 세포들에서 다양한 사이토카인이 분비되는데 TGF-β도 그중 하나이다. 광노화 피부의 섬유아세포는 광손상을 받지 않은 부위의 노화피부에 비해 교원질 생산의 기저수준이 증가되어 있다. 이것은 광손상 부위에 침윤된 염증세포들이 TGF-β같은 사이토카인을 분비하고 이것이 교원질의 합성을 증가시키기 때문으로 생각된다[62]. Oikarinen 등[62]은 장기간 PUVA치료를 받는 환자의 피부에서 대조군에 비해 교원질과 탄력소의 mRNA가 증가되어 있는 것을 관찰하고 이것은 광손상을 회복하기 위해 섬유아세

포가 교원질이나 탄력소 같은 결합조직 구성물질을 활발히 생성하기 위해서일 것이라고 하였다. 자외선이나 초음파는 모두 파장의 형태로 나타나며 파에 의한 영향이 유사할 것이라 가정한다면 본 실험에서 노화피부에 초음파를 시술했을 때 젊은 쥐에서는 관찰되지 않았던 처치부위의 TGF-β와 교원질 발현의 증가가 설명될 수 있을 것이다. 즉, 초음파에 대한 반응은 어떤 이유에서건 정상피부보다 손상을 받은 피부에서 더 현저하게 나타나며 노화피부도 여러 가지 피부구성물질이 변성된 손상 피부로 볼 수 있으므로 초음파에 의한 반응이 노화피부에서 더 현저하게 나온 본 실험의 근거가 되며 이는 일종의 반응성 증식으로 생각된다. 하지만 본 실험에서 TGF-β mRNA의 발현은 노화 쥐와 젊은 쥐 모두 처치군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 없었는데 이는 TGF-β mRNA의 발현을 보기 위한 대상개체의 수(노화 쥐=6, 젊은 쥐=3)가 적었던 것에 기인되는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과 중 노화 쥐의 표피두께의 증가는 초음파에 의한 TGF-β의 증가가 일부 관여할 것으로 생각되며 이외에도 초음파 과정 중에 도포한 transmission gel에 의한 표피의 수화도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. TGF-β의 활성에 의해 두꺼워 졌는지를 판단하기 위해선 표피를 구성하는 각질세포의 층이 증가했는지를 살펴봐야 할 것으로 생각되나 쥐의 경우 표피가 3-4층으로 매우 얇아서 이의 판단이 어렵고, 수화에 의해 세포의 부피나 간질이 약간만 증가해도 표피두께의 증가가 나타날 것으로 생각된다.

피부의 노화상태를 회복시키거나 지연시키기 위한 많은 방법이 개발되었는데 내적인 노화는 생체시계에 의해 진행되므로 외적인 노화에 비해 그 예방이 어렵다. 따라서 이를 방지하기 위해 여러 가지 복잡한 방법이 쓰이고 있다. 기계적인 방법과 약물에 의한 방법으로 나누어 볼 수 있는데 기계적인 방법으로는 화학박피[63], 삭피술(dermabrasion)[63], 레이저 박피(laser resurfacing)[64], 연부조직강화(soft tissue augmentation)[65], 보툴리눔 독소(botulinum toxin)의 주입[65] 등이 있으나 시술 후 여러 가지 부작용이 있으며 시술시에 통증을 동반하게 되고 환자에게 수술이나 마취에 대한 공포감을 불러일으키기도 한다. 화학적인 방법으로는 레티노이드(retinoid)[66] 나 아스코르빈산(ascorbic acid)[67]의 복용이나 도포, α-hydroxy

acids[68]의 도포 등이 있으며 기계적인 방법에 비해 사용이 간단하나 그 효과가 미미하고 가끔은 심각한 부작용을 일으키기도 한다.

노화피부에 대한 초음파 시술은 본 실험에서 나타났듯이 감소된 교원질을 회복시킬 수 있으며 이를 통해 얇아진 피부를 두껍게 하고 상처가 잘 나지 않게 하며 피부가 좀 더 팽팽해 보이도록 하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 또한 시술의 어려움이나 큰 부작용이 없으므로 노화피부를 개선하는 한 방법으로서 효과적일 것이라 생각된다. 하지만 그 효과나 기전에 대해서는 향후 많은 개체의 동물에 대한 실험과 인체에 대한 실험이 필요할 것으로 생각되며 본 실험에서 나타난 교원질에 대한 효과 이외에 탄력소나 다른 진피 기질에 대한 영향도 좀 더 많은 연구가 필요할 것이다.

Ⅴ. 결 론

노화피부에 대한 초음파의 효과를 보기 위해 진행된 본 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 노화 쥐의 처치군에서 표피두께는 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나, 진피두께는 두 군 사이에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

2. 노화 쥐의 처치군에서 진피밀도는 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며, 특히 교원섬유의 유의한 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 탄력섬유와 기질은 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.

3. 젊은 쥐의 처치군에서는 노화 쥐에서 관찰된 표피두께와 진피밀도의 변화를 관찰할 수 없었다.

4. 노화 쥐의 처치군에서 TGF-β 면역조직화학 염색상 대조군에 비해 유의한 증가를 관찰할 수 있었으나, 젊은 쥐에선 두 군 사이의 차이가 없었다.

5. 노화 쥐의 전자현미경 관찰시 처치군에서 대조군에 비해 교원섬유가 더 촘촘하게 배열된 것을 관찰할 수 있었으나, 젊은 쥐에서는 두 군 사이의 차이가 없었다.

6. 노화 쥐와 젊은 쥐 모두 TGF-β mRNA RT-PCR 에서 처치군의 평균값이 대조군에 비해 높게 나왔으나, 유의한 차이는 관찰할 수 없었다.

이상의 결과로부터 노화피부에 초음파를 처치하면 진피의 밀도와 진피내 교원질이 증가하는 것을 알 수 있었으며 이는 결과에서 나타난 바와 같이 TGF-β의 증가에 의한 것으로 생각된다. 즉, 초음파의 작용에 의해 TGF-β가 증가하고 섬유아세포가 활성화되어 교원질의 합성이 증가됨을 유추할 수 있다. 초음파는 피부에 미치는 부작용이 미미하며 그 시술이 어렵지 않으므로 향후 노화피부에 대한 연구가 좀 더 진행되면 임상에서 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Gendler EC. Topical treatment of the aging face. Dermatol Clin 1997;15:561-7
2. Glogau RG. Physiologic and structural changes associated with aging skin. Dermatol Clin 1997;15:555-9
3. Lewis AB, Gendler EC. Resurfacing with topical agents. Semin Cutan Med Surg 1996;15:139-44
4. Lavker RM. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. J Invest Dermatol 1979;73:59-66
5. Hill WR, Montgomery H. Regional changes caused by age in the normal skin. J Invest Dermatol 1940;3:321-45
6. Richey ML, Richey HK, Fenske NA. Aging-related skin changes: Development and clinical meaning. Geriatrics 1988;43:49-64
7. Shuster S, Black MM, McVite E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. Br J Dermatol 1975;93:639-43
8. Montagna W, Carlisle K. Structural changes in aging human skin. J Invest Dermatol 1979;73:47-53
9. Andrew W, Behnake RH, Sato T. Changes with advancing age in the cell population of human dermis. Genotologica (Basel) 1964-1965;10:1-19
10. Rasmussen DM, Wakim KG, Winkelmann RK. Effect of aging on human dermis: Studies of thermal shrinkage and tension. In: Montagna W, ed. Advances in biology of skin. Vol. 6. Aging. Oxford: Pergamon Press. Inc., 1965:151-62
11. Braverman IM, Fonferko E. Studies in cutaneous aging. J Invest Dermatol 1982;78:434-43
12. Smith JG Jr, Davidson EA, Taylor RW. Human cutaneous acid

mucopolysaccharides: The effects of age and chronic sun damage. In: Montagna W, ed. Advances in biology of skin. Vol. 6. Aging. Oxford: Pergamon Press. Inc., 1965:211-18

13. Kligman AM, Grove GL, Balin AK. Aging of human skin. In: Finch CE, Schneider EL, eds. Handbook of the biology of aging. New York: Van Nostrand Reinhold Co. Inc., 1985:820-41
14. Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. J Am Acad Dermatol 1986;15:571-85
15. Ditre CM, Griffin TD, Murphy GF, Sueki H, Telegan B, Johnson WC, Yu RJ, Van Scott EJ. Effects of α-hydroxy acids on photoaged skin: A pilot study clinical, histologic, and ultrastructural study. J Am Acad Dermatol 1996;34:187-95
16. Pepine ML, Calderone DC, Fenske NA. The therapeutic role of topical tretinoin in photoaging. J Geriatr Dermatol 1996;4:156-68
17. Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. Pharm Res 1996;13:411-20
18. 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;57:409-19
19. Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. Clin Sci 1968;35:273-85
20. Dyson M. Role of ultrasound in wound healing. In: Kloth LC, McCulloch JM, Feedar JA, eds. Wound healing: Alternatives in management. Philadelphia: PA, Davis, 1990:259-85
21. Dyson M, Franks C, Suckling J. Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. Ultrasonics 1976;14:232-6
22. Paul BJ, LaFratta CW, Dawson AR, Canestrari R. Use of ultrasound in the

treatment of pressure sores in patients with spinal cord injuries. Arch Phys Med Rehabil 1960;41:438-41

23. Hogan RDB, Burke KM, Franklin TD. The effect of ultrasound on the microvascular hemo dynamics in skeletal muscle: Effects during ischaemia. Microvasc Res 1982;23:370-9
24. Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. Ultrasound Med Biol 1990;16:801-7
25. Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. Rheumatol Rehabil 1975;14:237
26. Dyson M, Pond JB. The effect of pulsed ultrasound on tissue regeneration. Physiotherapy 1970;56:136-42
27. Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The 'in vitro' stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic levels of ultrasound: proceedings of the Second European Congress on Ultrasonics in Medicine. In: Exerpta Medica International Congress Series 363. 1975:10-21
28. Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB. The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vitro' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. Ultrasonics 1980;18:33-7
29. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses H, Kang A. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. J Exp Med 1987;165:251-6
30. Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JB. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. Science 1983;219:1329-31
31. Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor-β increases steady state levels of type I

procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. J Clin Invest 1987;79:1285-8

32. Peltonen J, Kahari L, Jaakkola S, et al. Evaluation of transforming growth factor-β and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. J Invest Dermatol 1990;94:365-71
33. Martin P, Hopkinson-Woolley J, McCluskey J. Growth factors and cutaneous wound repair. Prog Growth Factor Res 1992;4:25-44
34. Schmid P, Kunz S, Cerletti N, McMaster G, Cox D. Injury induced expression of TGF-β1 mRNA is enhanced by exogenously applied TGF-β. Biochem Biophysic Res Comm 1993;194:399-406
35. Shuster S, Bottoms E. Senile degeneration of skin collagen. Clin Sci 1963;25:487-9
36. Uitto J. A method for studying collagen biosynthesis in human skin biopsies in vitro. Biochem Biophys Acta 1970;210;438-45
37. Praeger B. In-vitro studies of aging. Dermatol Clin 1986;4:359-69
38. Uitto J, Fazio MJ, Olsen DR. Molecular mechanisms of cutaneous aging. J Am Acad Dermatol 1989;21:614-22
39. Moragas A, Garcia-Bonafe M, Sans M, Toran N, Huguet P, Martin-Plata C. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. Analyt Quant Cytol Histol 1998;20:493-9
40. Pienta KJ, Coffey DS. Characterization of the subtypes of cell motility in aging human skin fibroblasts. Mech Aging Dev 1990;56:99-105
41. Martin M, Nabour R, Lafuma C, Crechet F, Remy J. Fibronectin and collagen expression during in vitro ageing of pig skin fibroblasts. Exp Cell Res 1990;191:8-13
42. Mays PK, McAnulty RJ, Laurent GJ. Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues. Mech Ageing Dev 1991;59:229-41

43. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME. Exposure to low-intensity ultrasound increase aggregation gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res 1996;14:802-9
44. Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo JA, Weiner LS. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. Trans Orthop Res Soc 1989;14:15-21
45. Sachs F. Mechanical transduction by membrane ion channels: A mini review. Mol Cell Biochem 1991;104:57-60
46. Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. Science 1993;260:1124-7
47. Behari J, Singh S. Ultrasound propagation in 'in vivo' bone. Ultrasonics 1981;19:87-90
48. Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. Med Sci Sports Exerc 1997;29:326-32
49. Faris B, Ferrera R, Toselli P, Nambu J, Gonnerman WC, Franzblau C. Effect of varying amounts of ascorbate on collagen, elastin and lysil oxidase synthesis in aortic smooth muscle cell cultures. Biochem Biophys Acta 1984;797:71-5
50. De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. Phys Ther. 1995;75:629-34
51. American College of Sports Medicine. Policy statement of the American College of Sports Medicine on research with experimental animals. Med Sci Sports Exerc 1995;27:**iv**
52. Balin AK, Allen RE. Mechanism of biologic aging. Dermatol Clin 1986;4:347-58
53. Kligman LH. Photoaging: manifestations, prevention, and treatment. Dermatol Clin 1986;4:517-28

54. Lever WF, Schaumburg-Lever G. Histopathology of the skin. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1983:271-89

55. Uitto J, Matsuoka LY, Kornberg RL. Elastic fibers in cutaneous elastoses. In Rudolph R, ed. Problems in aesthetic surgery. St Louis: The CV Mosby Co, 1986:307-38

56. Braverman IM, Forferko E. Studies in cutaneous aging: I; the elastic fiber network. J Invest Dermatol 1982;78:434-43

57. Johnston KJ, Oikarinen AI, Lowe NJ, Uitto J. Ultraviolet induced connective tissue changes in the skin: models for actinic damage and cutaneous aging. In: Maibach HI, Lowe NJ, eds. Models in dermatology. Vol 1. Basel, Switzerland: S Karger, 1998;5:69-76

58. Philips CL, Tajima S, Pinnel SR. Ascorbic acid and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) increase collagen biosynthesis via different mechanism: coordinating regulation of proα_1(I) and proα_1(III) collagens. Arch Biochem Biophys 1992;295:397-403

59. Chung JH, Youn SH, Kwon OS, Cho KH, Youn JI, Eun HC. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-β and interferon-γ in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent. J Dermatol Sci 1997;15:188-200

60. Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH. TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels by fibroblasts from young and aged donors. J Cell Physiol 1994;158:169-79

61. Cox DA, Kunz S, Cerletti N, McMaster GK, Burk RR. Wound healing in aged animals: effects of locally applied TGF-β2 in different model systems. In Angiogenesis; Key principles (eds. Steiner R, Weisz PB, Langer R) pp. 287-95. Basel: Birkhauser.

62. Oikarinen A. The aging of skin: chronoaging versus photoaging. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1990;7:3-4
63. Mattarasso SL, Hanke CW, Alster TS. Cutaneous resurfacing. Dermatol Clin 1997;15:569-81
64. Ross EV, McKinlay JR, Anderson PR. Why does carbon dioxide resurfacing work? Arch Dermatol 1999;135:444-54
65. Klein AW, Wexler P, Carruthers F. Treatment of facial furrows and rhytides. Dermatol Clin 1997;15:595-607
66. Pepine ML, Calderone DC, Fenske NA. The therapeutic role of topical tretinoin in photoaging. J Geriatr Dermatol 1996;4:156-68
67. Perricone NV. Aging: prevention and intervention. Part 1; Antioxidants. J Geriatr Dermatol 1997;5:1-2
68. Bernstein EF, Uitto J. Connective tissue alteration in photoaged skin and the effects of alpha hydroxy acids. J Geriatr Dermatol 1995;3:7-18

부 록

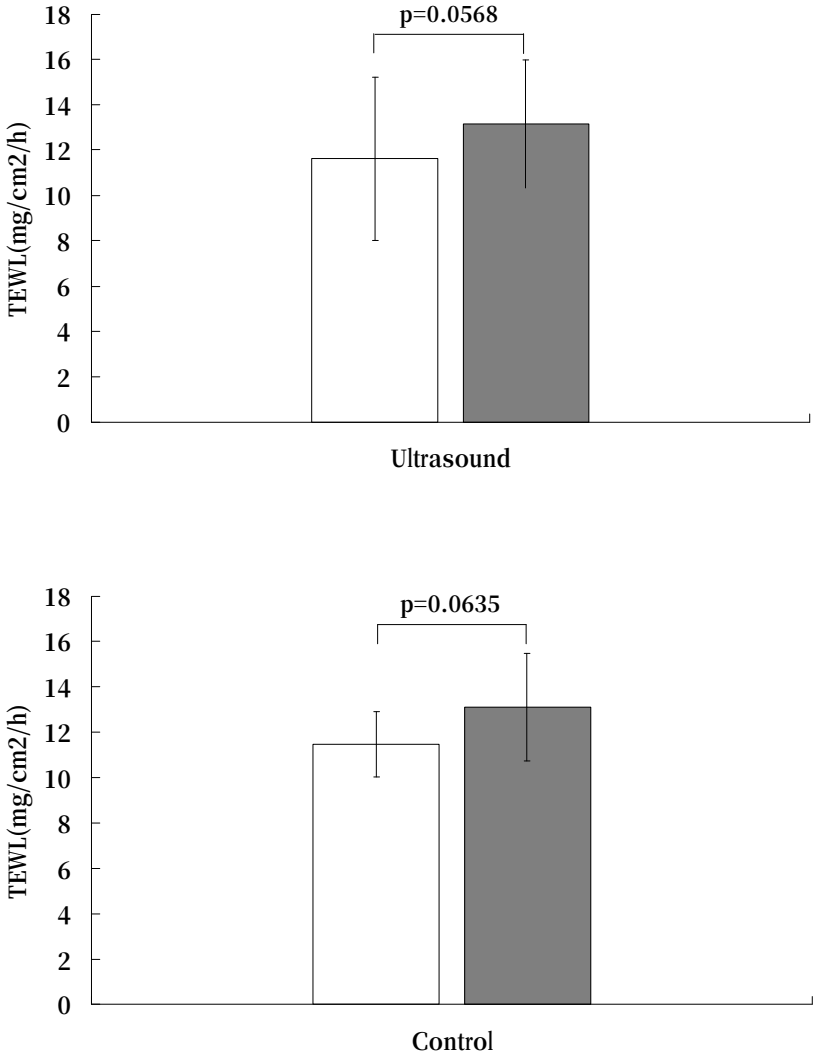

Fig. 1. Changes of TEWL between pre- and post-ultrasound or transmission gel application: There was no statistically significant difference between pre-and post-ultrasound or transmission gel application in for either the ultrasound or the control group.

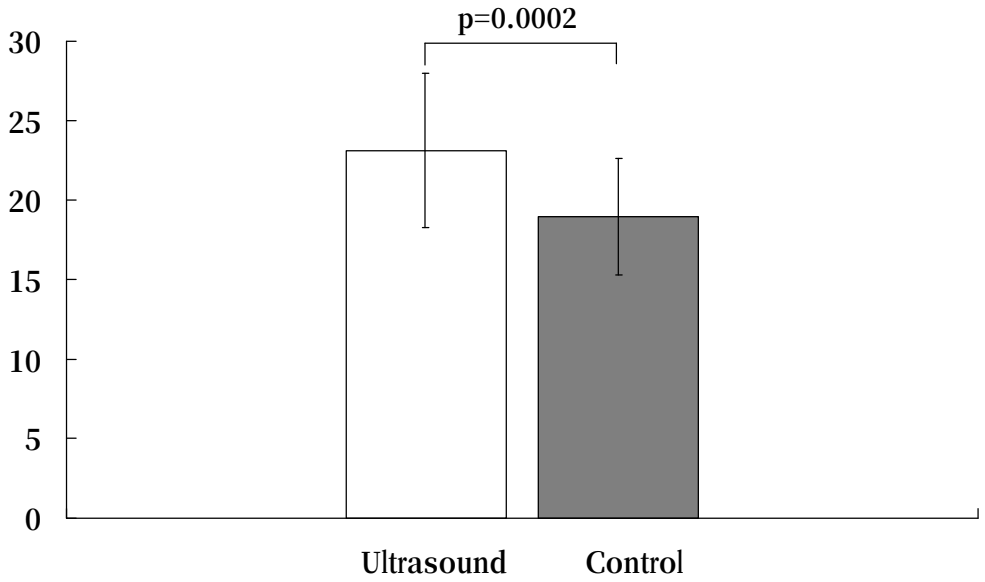

Fig. 2. Epidermal thickness in the ultrasound and the control group of aged mice after application or ultrasound: These was a statistically significant difference between the two groups.

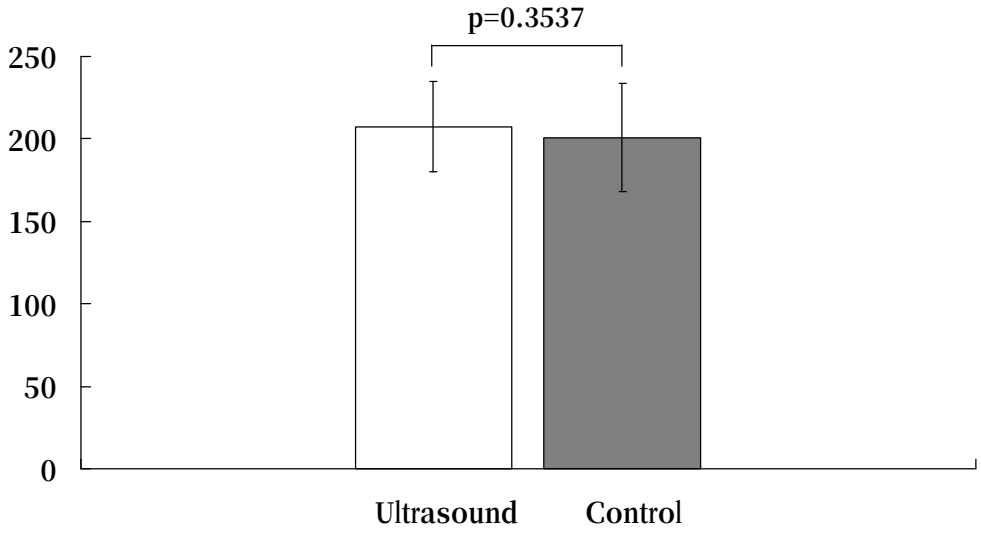

Fig. 3. Dermal thickness in the ultrasound and the control group of aged mice: There was no statistically significant difference between the two groups.

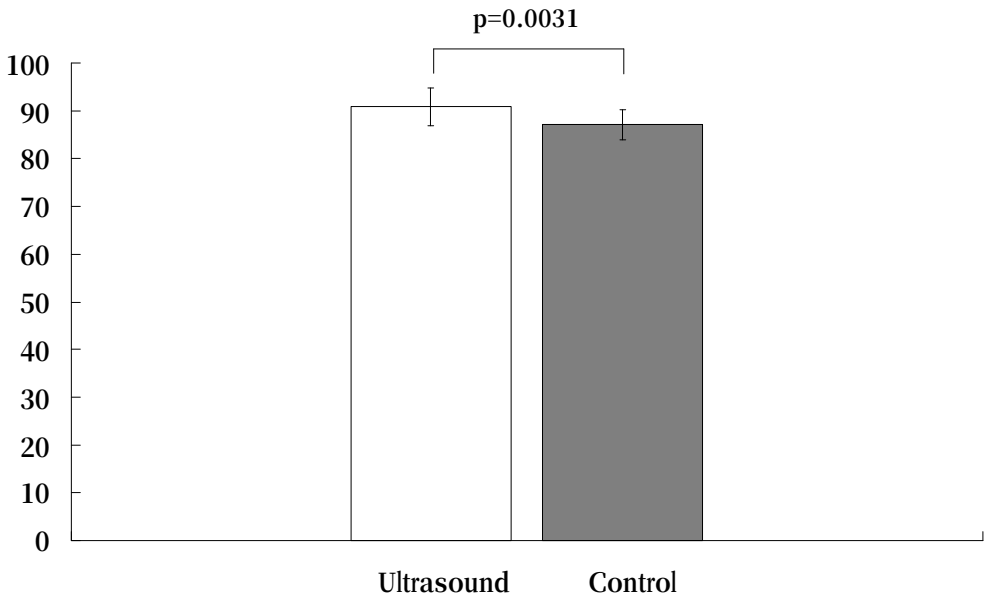

Fig. 4. Dermal density in the ultrasound and the control group of aged mice: There was a statistically significant difference between the two groups.

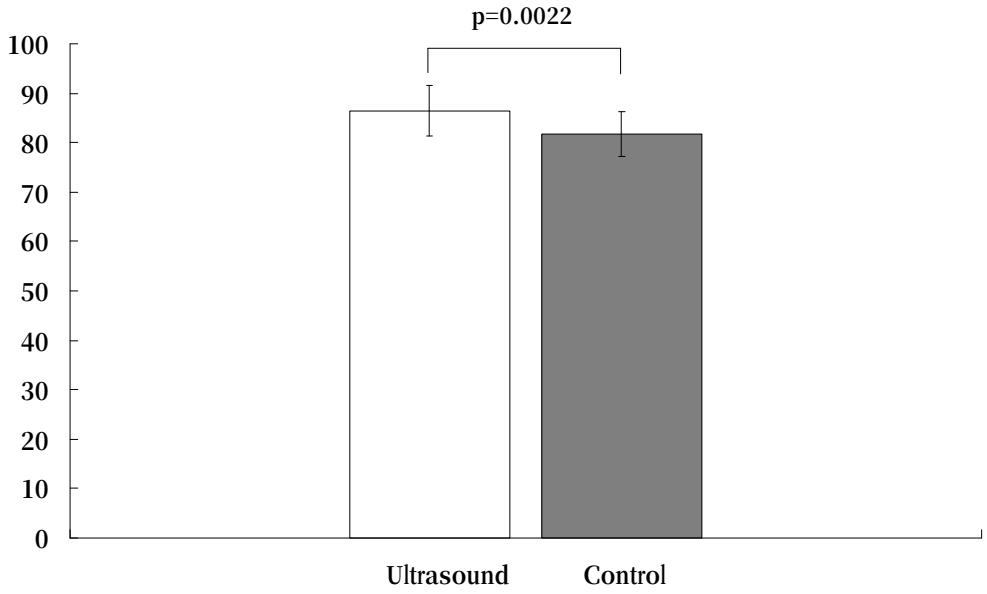

Fig. 5. Dermal collagen in the ultrasound and the control group of aged mice using Massons trichrome stain: There was a statistically significant difference between the two groups.

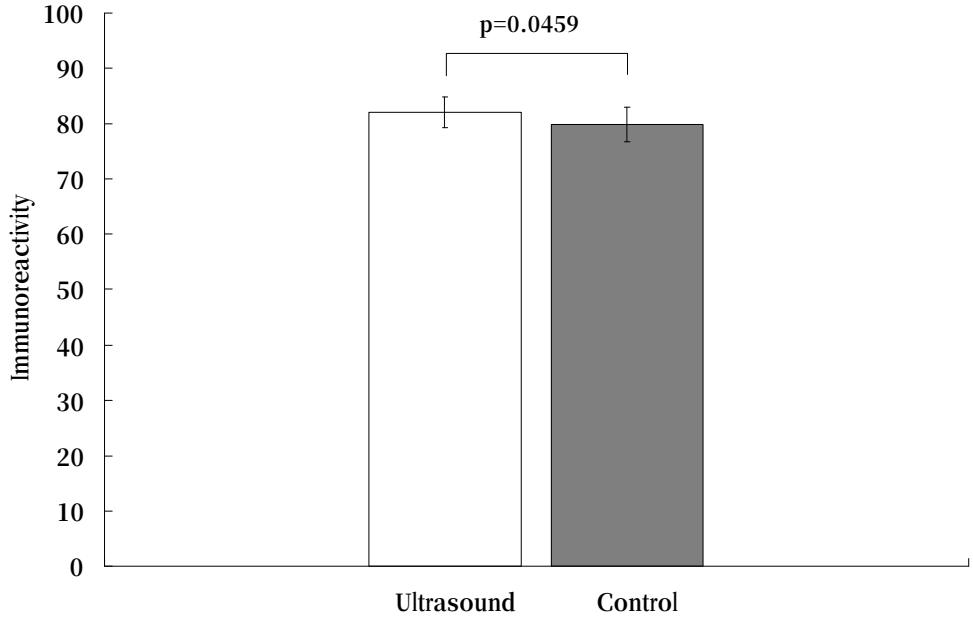

Fig. 6. Immunoreactivity(250-value of intensity profile) to TGF-β: There was a statistically significant difference between the two groups of aged mice. The black color in the intensity profile indicates strong revelation, and completely black color indicates '0'. The white color indicates weak revelation, and completely white color indicates '250'.

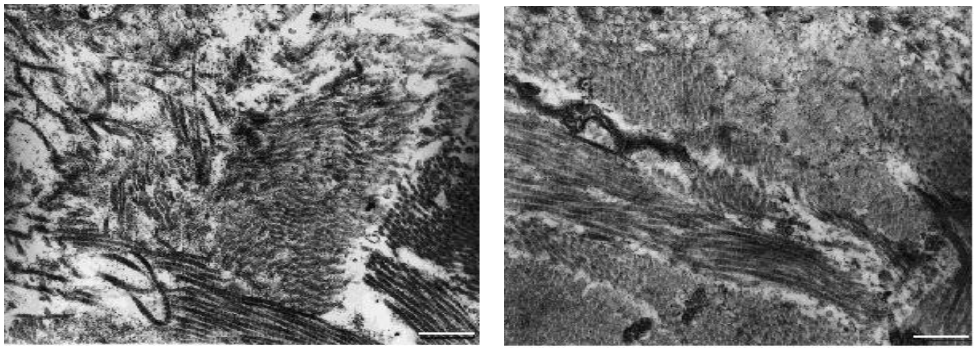

Fig. 7. Electron micrographs of aged dermis: left-Control, right-Ultrasound group. The collagen fibers in the ultrasound group are more densely arranged than those in the control group. In both groups, very few elastic fibers were found. Bar=500nm

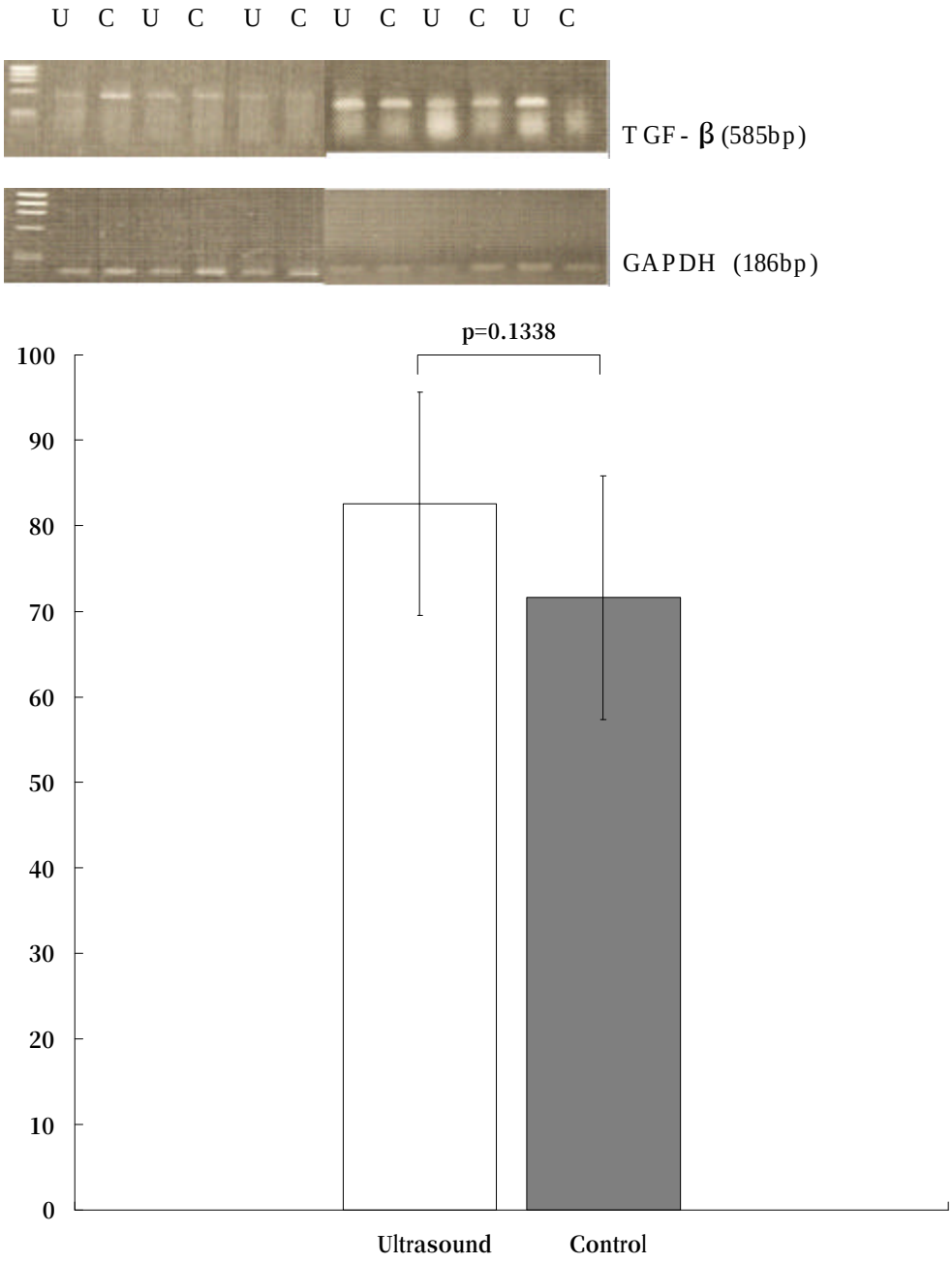

Fig. 8. The expression of TGF-β mRNA of aged mice: The graphs show TGF-β mRNA/GAPDH. There was no statistically significant difference between the ultrasound and the control group of aged mice.

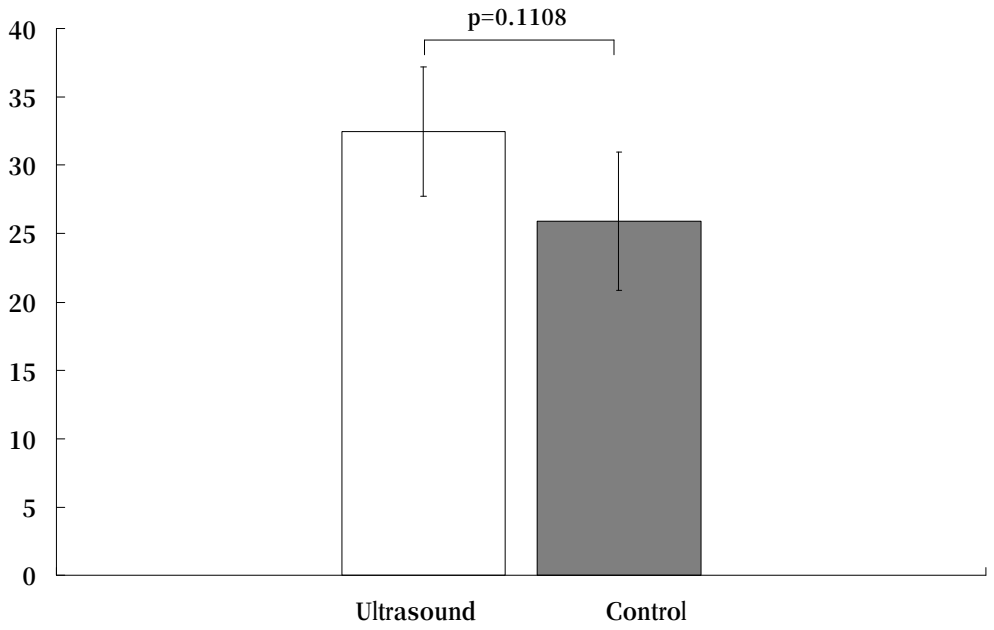

Fig. 9. Epidermal thickness in the ultrasound and the control group of young mice after application of ultrasound: There was no statistically significant difference between the two groups.

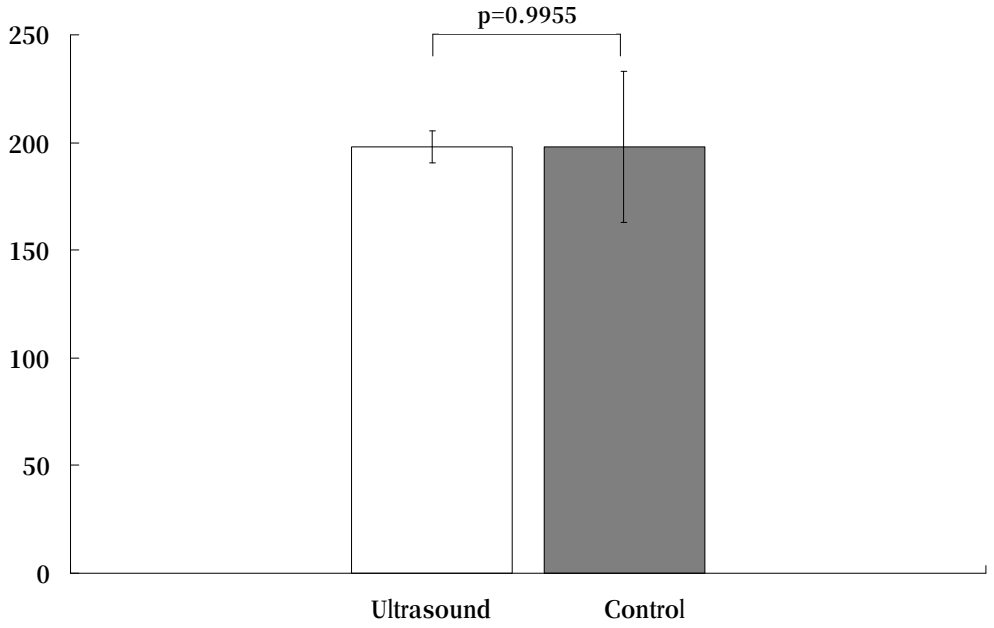

Fig. 10. Dermal thickness in the ultrasound and the control group of young mice: There was no statistically significant difference between the two groups.

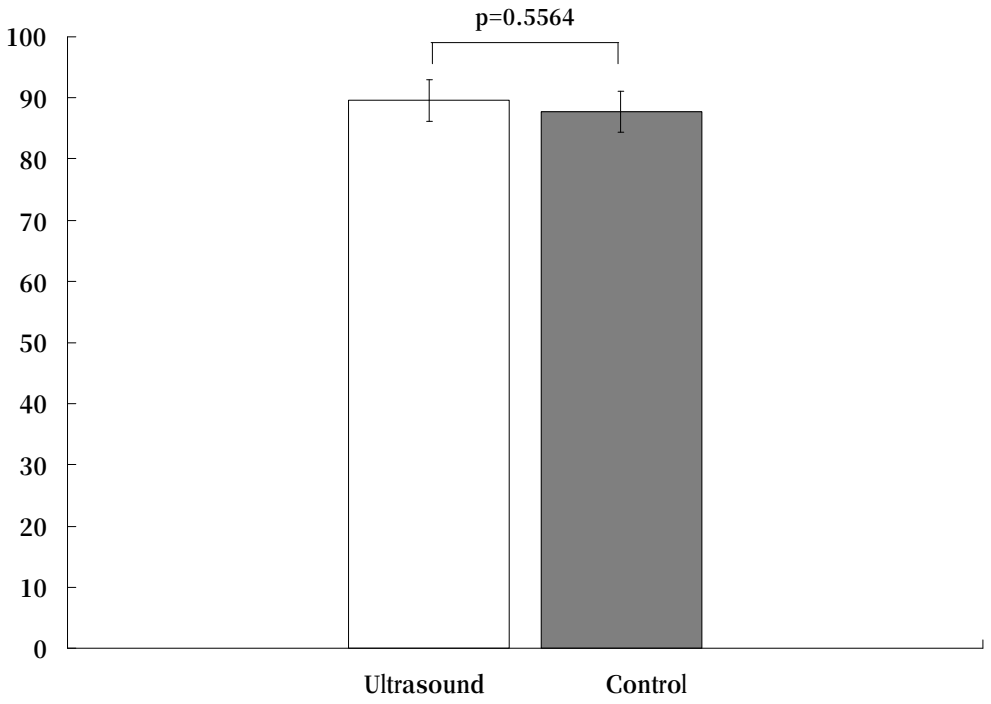

Fig. 11. Dermal density in the ultrasound and the control group of young mice: There was no statistically significant difference between the two groups.

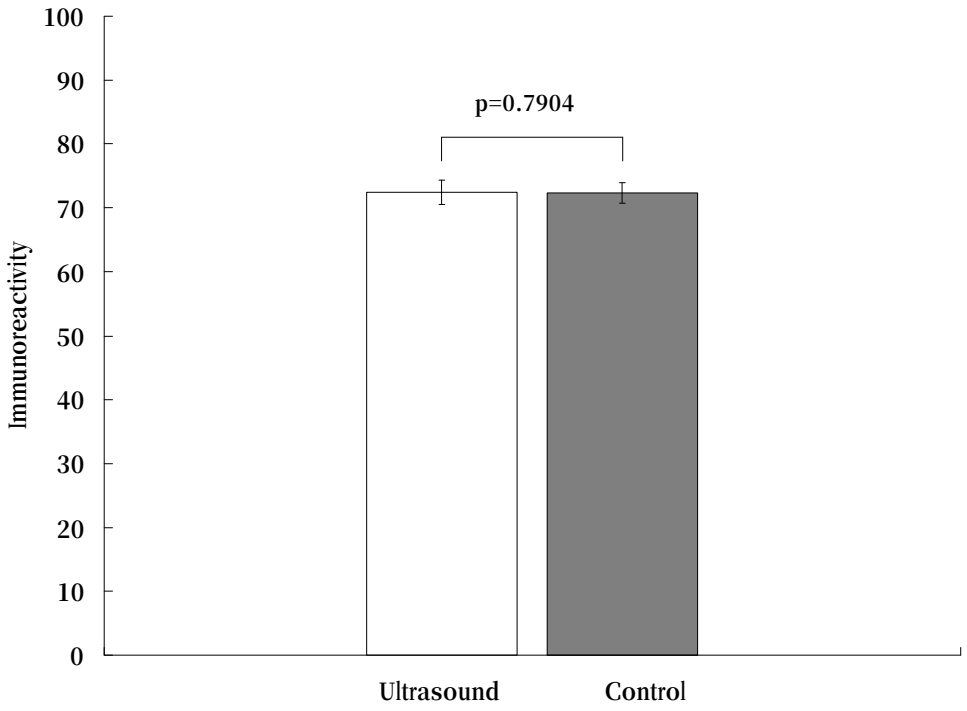

Fig. 12. Immunoreactivity to TGF-β: There was no statistically significant difference between the two groups of young mice.

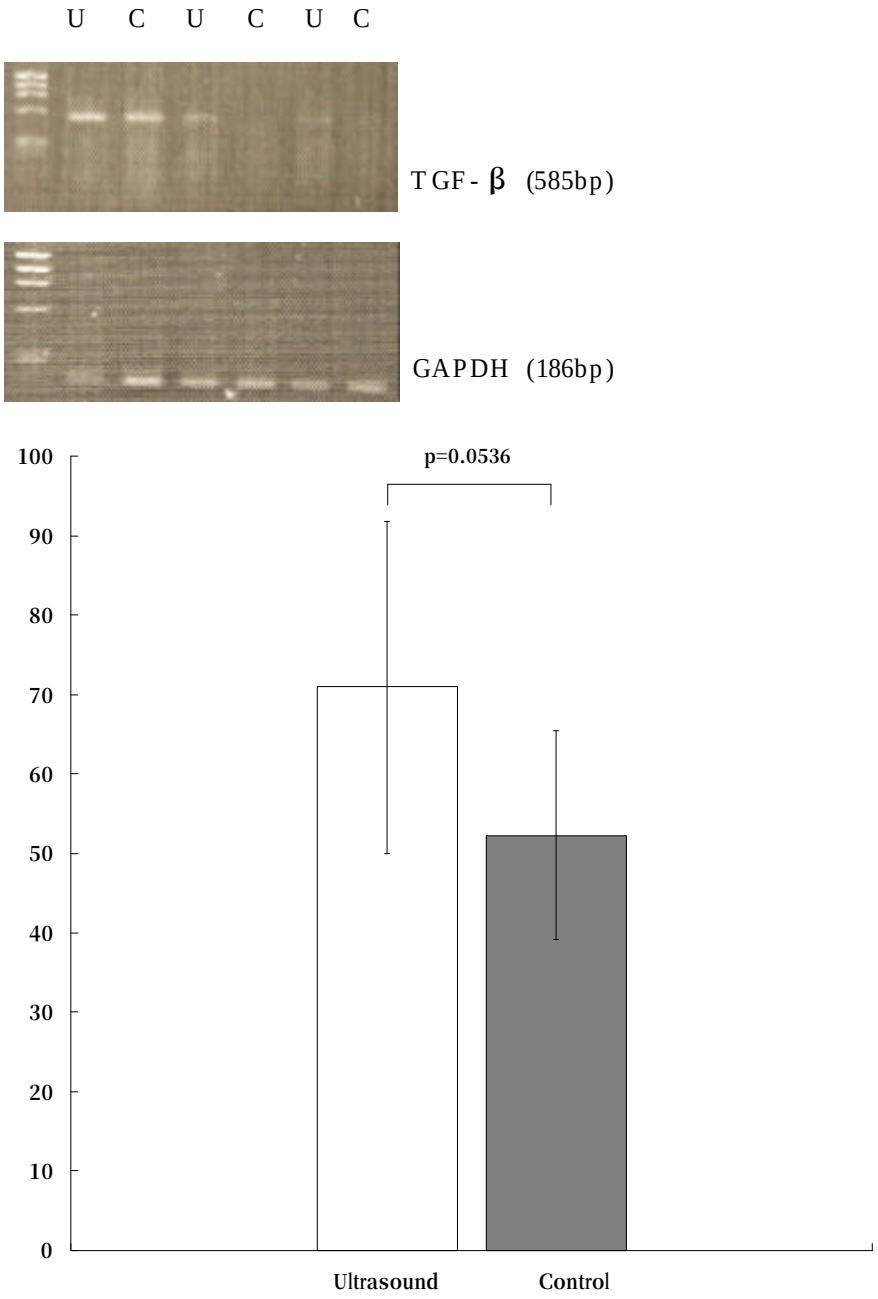

Fig. 13. The expression of TGF-β mRNA of young mice: The graphs show TGF-β mRNA/GAPDH. There was no statistically significant difference between the ultrasound and the control group of young mice.

Abstract

The Effect of Ultrasound on Aged Skin

Lee, Se Won
Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

As human skin ages, it presents various clinical and histological changes. The most remarkable histological changes are a decrease of skin thickness and connective tissue, and an alteration in elastic fibers.

Recently, many dermatologists are using ultrasound as a sonophoresis for transdermal delivery of cosmetic agents known to increase elasticity of skin and decrease wrinkles. In Europe, ultrasound has been used for cosmetic care of skin. However, systematic investigation conforming the effect of ultrasound on the skin has not been done. It has been reported that the effects of ultrasound include increased protein synthesis in the fibroblasts, but the exact mechanism is unknown. Also, in vivo studies have not been reported.

The hypothesis was, when skin is treated by ultrasound, TGF-β expression is increased so that fibroblasts are activated and an increases in collagen synthesis and skin thickness follow. A treatment of 1MHz ultrasound was given to old mice having thin skin and young mice having normal skin. Changes in skin thickness, collagen, elastic fibers and ground substances were investigated along with determining of TGF-β expression that was increased or not. H&E stain was used in order to measure skin thickness and dermal density. Massons trichrome stain was used to measure increase of collagen in

the dermis. An image analyzer was used to analyze the results. Verhoeff-van Gieson stain for elastic fiber and alcian blue stain for ground substances were used. Immunohistochemical stain for TGF-β expression was quantified by the image analyzer. Electron microscopic study was performed to determine dermal ultrastructural changes. RT-PCR for TGF-β mRNA was performed.

In the aged mice, ultrasound increased the epidermal thickness and dermal density, but it did not increase dermal thickness, elastic fiber or ground substance. In young mice, changes in epidermal thickness and dermal density as in aged mice were not observed. In aged mice, an increase of TGF-β expression on immunohistochemical stain and compact arrangement of collagen fiber on electron microscope were observed after ultrasound. But, these changes were not found in young mice. The expression of TGF-β mRNA was increased in the ultrasound treated aged and young mice, but the difference was not statistically significant.

In conclusion, ultrasound is thought to increases the epidermal thickness and dermal collagen fibers, and these effects may be resulted from the increase of TGF-β activated fibroblasts.

Key words : aged skin, ultrasound, collagen, fibroblast, TGF-β