

# Confocal laser scanning microscopy를 이용한 표피내 칼슘기울기 관찰

연세대학교 원주의과대학 피부과학교실, 의과대학 피부과학교실\*

황상민 · 안형진 · 안성구 · 이승현\*

=Abstract=

## The Change of Epidermal Calcium Gradient: Confocal Laser Scanning Microscopic Approach

Sang Min Hwang, M.D., Hyung Jin Ahn, M.D. Sung Ku Ahn, M.D., Seung Hun Lee, M.D.\*

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

**Background** : Ion capture cytochemistry(the potassium oxalate pyroantimonate method), semi-quantitatively, and proton probe X-ray microanalysis, quantitatively, have been applied to investigate the epidermal calcium distribution.

**Objective** : In this study, we examined the epidermal calcium distribution with confocal laser scanning microscopy(CLSM) in an attempt to evaluate the possibility of another method in epidermal calcium study.

**Methods** : The change of epidermal calcium distribution after barrier perturbation with tape stripping was investigated with CLSM and was compared to the results of ion capture cytochemistry.

**Results** : The calcium distribution pattern in normal murine epidermis demonstrated by CLSM show a normal calcium gradient, from a low level of calcium ions in the basal and spinous layer, followed by a progressive increase with a level of calcium ions reaching its maximal density within the outer stratum granulosum. Disruption of the epidermal barrier with tape stripping induced an immediate loss of the calcium gradient and the calcium gradient after 36h was almost normalized, in parallel with the recovery of barrier function.

**Conclusion** : These results show that calcium gradient in murine epidermis after tape-stripping is restored by 36h and CLSM study can be used as a new method in epidermal calcium study.

(Korean J Dermatol 2001;39(1) : 22~27)

**Key Words** : Calcium gradient, Confocal laser scanning microscopy, Permeability barrier

### 서 론

피부장벽은 표피의 각질층에 존재하는데 이 각질층은

단백질이 풍부한 각질세포(corneocyte)와 이 각질세포 사이에 존재하는 연속적인 층상구조의 지질의 두가지 구성 성분으로 이루어져 있다.<sup>1,3</sup> 이 중 각질세포는 주로 케라틴 다발로 이루어져 있으며 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공하고, 각질세포간 지질은 인지질을 함유하는 보통의 생체막과는 달리 주로 세라미이드, 콜레스테롤, 자유지방산을 함유하며 서로 직선적으로 잘 연결되어 물질의 투과를 방지하는 장벽역할을 수행한다<sup>2,5</sup>.

아세톤 처치 또는 테이프 스트리핑에 의한 급성 표피장벽 손상은 항상성 회복반응을 유발시키고 표피장벽 기능은 빠르게 회복된다. 표피장벽 회복의 과정은 몇가지

<접수:2000년 7월 21일>

본 논문은 1999년도 연세대학교 원주의과대학 교수연구비의 지원으로 이루어졌음.

교신저자 : 황상민

주소 : 143-130 서울 광진구 화양동 6-6

피부사랑 피부과

전화 : (02)469-9757 Fax : (02)469-9758

E-mail : hsmkkm@hanmail.net

이용한 confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 이용한 방법이 표피내 칼슘이온 연구에 사용될 수 있는지 알아 보고자 본 연구를 시작하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

8주에서 10주사이의 무모생쥐를 사용하였다.

### 2. 급성피부장벽 손상

기존의 피부장벽손상 실험의 방법과 동일하게 테이프 스트립핑을 통해 피부장벽을 손상시킨다. 피부장벽의 손상은 경표피수분손실이  $40\text{mg}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 에 도달 할 때까지 손상시켰다. 피부장벽 손상 후 즉시, 6, 12, 24, 36시간 후 조직검사를 시행하였다.

### 3. 경표피수분손실의 측정

경표피수분손실량은 Tewameter TM210(Courage+Khazaka, Germany)로 측정하였다.

### 4. 전자현미경 관찰을 위한 조직생검

정상피부와 급성피부장벽 손상 후 직후, 6, 12, 24, 36 시간 후에 각 시간별로 조직을 생검하여 2등분한 후 1개는 면역형광 염색을 위해 조직을 OCT compound(Miles Inc, Elkhart, IN, USA)가 채워진 cryomold에 넣고, 100% ethanol에 dry ice를 넣은 용액을 사용하여 급속 냉동시키고, 1개는 calcium ion capture cytochemical procedure를 위해 고정하였다.

### 5. Calcium ioncapture cytochemical procedure

조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA), 1.4% sucrose로 조성된  $4^\circ\text{C}$ 로 냉장된 고정액에 조직을 고정한 후 stereomicroscope하에서 냉고정액 한 방울을 점적후  $0.5\text{mm}^3$ 로 세절하여 얼음 조각위에서 하룻밤동안 고정하였다. 고정액을 버리고 1ml 4% OsO<sub>4</sub>와 3ml 2% potassium pyroantimonate stock용액이 혼합된 후 고정액으로 얼음위에서 2시간 후 고정하였다. KOH로 pH 10으로 조절된 냉증류수에 10분 세수한후 통상적인 방법으로 탈수, 포매하고 염색하였다. 이때 대조표본으로 10mM EDTA에서 30분간 방치하였다. 이렇게 준비된 표본은 투과전자현미경 하에서 표피세포 전층을 관찰하였다.

### 6. 면역형광 염색

동결 후 즉시 조직을  $6-8\mu\text{m}$  두께로 절편을 만들어 면역

**Fig. 1.** Ion capture cytochemical stain of calcium ions. Precipitates of calcium ions is low level in the basal and spinous layer, followed by a progressive increase with a level of fluorescence of calcium ions reaching its maximal density within the outer SG(A). SG, stratum granulosum. OsO<sub>4</sub> postfixation, unstained,  $\times 5,000$ .

과정을 거치면서 일어나는데 1) 이미 형성되어 있던 층판 소체의 분비, 2) 콜레스테롤, 지방산, 스펅고리피드와 같은 표피지질의 합성증가, 3) 새로운 LB의 형성과 분비, 4) 이들 결과로 인한 각질세포간 지질의 회복, 5) 분비된 지질의 개조(remodeling)와 같은 일련의 과정에 의해 표피장벽은 회복된다<sup>6,8</sup>. 이러한 표피장벽 손상 후 회복의 과정은 Latex<sup>®</sup>와 같은 수증기 불투과막(water vapor-impermeable membrane)으로 밀폐하여 인위적으로 표피장벽 기능을 대행시켜 줄 경우 억제된다.<sup>9,10</sup> 즉 밀폐에 의해 표피장벽 회복에 관여하는 어떤 인자가 억제되고 이로 인해 표피지질의 합성과 각질층 내 각질세포간 지질의 층상구조의 형성과 회복이 늦어진다. 현재까지의 연구에 의하면 표피장벽 손상으로 인한 경표피수분소실(Transepidermal Water Loss: TEWL)에 의한 칼슘이온의 변화가 중요한 역할을 하는 것으로 생각한다<sup>11,12</sup>.

표피내 칼슘이온에 대한 연구는 반정량적 연구방법인 ion capture cytochemistry 방법과<sup>13</sup> 정량적 연구방법인 proton induced X-ray emission(PIXE)이<sup>14</sup> 소개되어 있다. 그러나 ion capture cytochemistry 방법은 영상을 얻을 수 있으나 반정량적이고, PIXE 방법은 정량적이거나 연구의 방법이 복잡하고 경제적 부담이 크며 영상을 얻을 수 없는 단점이 있다. 연구자는 칼슘이온에 대한 면역형광 염색을

**Fig. 2.** Change of fluorescence of calcium ions after TS. The maximal fluorescence of calcium ions was observed in SG in normal murine epidermis(A). Barrier disruption by TS caused an immediate disappearance of the fluorescence of calcium ions(B). Restoration of the fluorescence of calcium ions was noticed with lapse of time(C,D,E). 36 h after TS, fluorescence of calcium ions almost resembles normal(F). TS, tape stripping. SG, stratum granulosum.  $\times 400$ .

형광 염색을 시행하였다. 준비된 조직절편 슬라이드를 실온에서 30분 동안 Fluo-3(1:200 dilution, Upstate Biotechnology, NY, USA)를 사용하여 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 이후 포스페이트 완충용액(PBS)으로 15분씩 2회 세척하였다. 이후 gel-mount(Biomedex, Foster City, CA, USA)로 봉입하고 CLSM(CLSM 410, Carl Zeiss)로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 경표피수분소실량의 변화

경표피수분소실량은 테이프스트리핑에 의한 장벽손상 후 2시간째  $36.5 \pm 2.1 \text{ mg/cm}^2/\text{hr}$ (mean  $\pm$  SD)로 회복되었으며, 6시간째에는  $23.3 \pm 2.7 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$ , 12시간째에는  $18.2 \pm 2.3 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$  로 회복되었다. 24시간째  $13.5 \pm 1.9 \text{ mg/cm}^2/\text{hr}$  까지 회복되었으며 36시간째  $9.1 \pm 1.1 \text{ mg/cm}^2/\text{hr}$ 로 회복되

어 거의 정상 경표피수분소실량( $6.2 \pm 1.1 \text{mg/cm}^2/\text{h}$ )과 비슷한 수준으로 감소하였다.

## 2. Ioncapture cytochemistry에 의한 칼슘이온의 변화

정상표피에서는 칼슘이온 농도가 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에서 가장 높게 나타나는 칼슘이온기가 관찰되었다(Fig. 1A). 표피장벽 손상 후 외부 과립층에서 칼슘이온이 감소되어 칼슘이온기가 소실되었으며(Fig. 1B), 이후 점차 외부 과립층에 칼슘이온이 증가되어 36시간 이후 정상적인 칼슘이온기를 형성하였다.

## 3. Confocal scanning laser microscopy에 의한 칼슘이온의 변화

면역형광염색 후 CLSM을 이용하여 칼슘이온의 변화를 관찰한 결과 ion capture cytochemistry에 의한 결과와 유사한 양상을 보였다. 정상표피에서는 칼슘이온 농도가 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에서 가장 높게 나타나는 칼슘이온기가 관찰되었으며(Fig. 2,A), 표피장벽 손상 후 칼슘이온기가 소실되었고, 이후 점차 회복되어 36시간 이후 정상적인 형태의 칼슘이온기를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B,C,D,E,F).

## 고 찰

세포화학적(cytochemical) 연구에 의하면 피부에는 calcium gradient가 있는데 칼슘이온 농도는 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에서 가장 높다. Ion capture cytochemistry를 이용한 연구에서 기저세포와 유극세포의 세포질, 미토콘드리아, 핵내 염색질사이에서 칼슘이온 침전물이 위치함을 보여 세포주기와 칼슘이온이 연관성이 있음을 시사하였다. 또한 하부과립층에서 점차적으로 더 많은 칼슘이온 침전물이 세포간에 나타나고 세포내에서는 칼슘이온이 미토콘드리아와 충판소체에 위치하며, 가장 윗쪽의 과립세포는 항상 많은 양의 세포외 침착과 세포질내에 높은 칼슘이온을 보인다. 과립-각질세포 사이로 분비되는 충판소체에서 칼슘이온 침전물을 다량 발견되어 중간 과립층내에서 세포간 칼슘이온의 축적과 상부 과립층에서 세포내부로 칼슘이온의 유입은 세포내 칼슘이온의 변화가 표피분화를 조절할 수도 있음을 의미한다<sup>7,13</sup>. Calcium과 피부장벽과의 연관관계는 여러 연구에 의해서 밝혀졌는데, 피부장벽손상 후 상부표피로부터 수분 및 calcium 이온의 소실에 의해서 정상적인 칼슘이온기가 소실되고, 이후 피부장벽이 회복됨에 따라 과립층의 칼슘이온 농도도 증가하여 칼슘이온기가 회복된다.<sup>7</sup> 또한 급성피부장벽 손상 후 회복반응이 표피의

세포의 칼슘이온 함유량 변화에 의해 조절될 수 있다<sup>11</sup>. 만성피부장벽 이상을 보이는 필수지방산결핍 마우스와 콜레스테롤 합성억제 작용이 있는 lovastatin을 국소적으로 도포한 마우스의 하부표피에서는 세포질 칼슘증가에 의해 칼슘이온기가 소실되며, 인위적으로 수증기불투과막으로 밀폐하여 수분손실을 억제함으로써 칼슘 분포가 정상화되어 칼슘이온기가 회복되는 것을 확인하였다<sup>10</sup>. 급성피부장벽 손상 후 수증기불투과막으로 밀폐하면 칼슘이온기의 회복이 지연될 뿐 아니라 표피의 분화도 지연되어 이행성 세포(transitional cell)가 증가된다. 즉 생체에서도 칼슘이온의 변화가 표피의 분화와 관련이 있음을 구조적으로 확인되었다<sup>15</sup>. 최근에는 만성피부장벽 손상의 다른 모델인 건선의 병변을 수증기불투과막으로 7일 동안 밀폐한 결과, 칼슘분포의 정상화와 칼슘이온기의 회복을 관찰하였다<sup>16</sup>.

세포내에서 칼슘이온은 다양한 종류의 protein kinase 들을 활성화시킴으로써 세포의 조절과 기능에 중요한 역할을 수행하는 신호전달물질(second messenger)임은 이미 알려져 있다. 현재까지 ion capture cytochemistry와 PIXE 방법이 표피내 칼슘이온의 변화에 대한 연구방법으로 소개되었는데 ion capture cytochemistry의 방법은 반정량적 방법이며 PIXE 방법은 정량적이나 연구의 방법이 복잡하고 경제적 부담이 크며 영상을 얻을 수 없는 단점이 있다. 본 연구의 의의는 비교적 간단한 방법으로 표피내 칼슘이온의 변화를 관찰하는 방법으로 CLSM을 소개하는데 있다고 할 수 있다. CLSM은 공초점(confocal)의 원리를 현미경에 도입하여 세포연구에 있어서 미세구조의 관찰을 가능하게 하였으며 일반현미경과 전자현미경에서 단면을 얻음으로 인해 올 수 있는 상(image)의 변화가 없고 삼차원 영상과 실시간 분석이 가능하다는 점에서 많은 장점을 가지고 있다<sup>17,18</sup>. 일반현미경의 경우 전자현미경과는 달리 살아있는 세포와 고정된 시료를 관찰할 수 있지만 해상도가 0.2 $\mu\text{m}$ 에 불과해 미세구조를 관찰할 수 없고, 특히 초점면 이외에서 오는 상에 의한 산란현상으로 인해 두꺼운 시료는 관찰하는데 많은 어려움을 가지고 있다. 또한 초미세구조를 관찰하는데 중요한 기능을 수행하는 전자현미경은 시료의 고정과 절편을 만드는 과정에서 시료에 인위적 변화를 줄 수 있다. 공초점의 원리는 point source로부터 나오는 광을 사용해서, 시료의 초점과 detector pinhole 상의 초점을 일치시켜 초점면 이외의 부분은 현미경 상에 나타나지 않도록 함으로서 일반현미경의 산란현상과 전자현미경의 인위적 변화와 같은 단점을 보완할 수 있게 하는 것이다<sup>17,18</sup>. 또한 기존의 형광 현미경에서 나타나는 간섭현상을 제거할 수 있다. 그러나 point source로부터 나온 광원은 detector pinhole을 지나 상을 형성하는 과정에서 대부분의 빛을 소모하기 때문에 광원이 아

주 밝아야 되거나, 시료자체가 상당한 형광을 발해야만 되는 단점이 있었다. 그러므로 이러한 어려움을 해결하기 위해 광원으로 레이저를 사용하게 되었고, 아울러 시료 전체를 scanning해야 되기 때문에 scanning의 속도를 증가시키기 위해 beam steering method가 개발되었다<sup>17-20</sup>. 현재 CLSM은 세포 생물학, 신경생리학, 의학, 약품, 식품, 금속, 반도체 등의 광범위한 분야에 걸쳐서 활용되고 있는데, 생물 분야에서는 FITC나 Rhodamine, Fluo-3와 같은 다양한 형광염색물질의 개발로 세포내 칼슘이온 농도, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 pH의 변화를 살아있는 세포에서 직접 측정할 수 있다. 또한 CLSM은 면역형광 염색을 이용한 생체 세포내 구조물의 형태적 변화 관찰, 염색체 분석, 막성분의 세포내 이동 현상 연구, 소포체나 미토콘드리아등의 세포내 소기관 연구, 세포간의 신호전달의 가시화, 면역화학적 표식자를 이용한 면역계의 연구 등이 가능하다<sup>17-20</sup>.

CLSM을 이용하여 칼슘이온 변화를 분석하기 위해서는 칼슘이온의 변화에 민감하고 CLSM으로 분석 가능한 형광물질을 선택해 세포를 염색하는 것이다. 본 연구에서 사용한 Fluo-3는 형광물질과 그 특성이 비슷하기 때문에 형광물질을 관찰할 수 있는 부속장치가 있는 공초점현미경을 이용해 세포내 칼슘이온을 쉽게 분석할 수 있었다. 현재 세포내 칼슘이온의 분석을 위해 가장 널리 이용되고 있는 형광물질은 Fura red와 Fluo-3를 들 수 있다.<sup>21</sup> 이러한 형광물질은 세포막을 통과할 수 있도록 유도체가 되어 있어야 하는데, 현재 acetoxymethyl ester(AM)나 diacetate를 붙이는 방법이 널리 이용되고 있다.<sup>18</sup> 세포막을 통과한 형광물질은 세포질에 존재하는 esterase에 의해 유도체가 절단된다. 이후 유도체가 없는 형광물질은 세포막을 통과할 수 없어 세포 내부에 계속 존재하게 된다. 지금까지 CLSM을 이용하여 실시간으로 세포내 변화분석이 가능한 것은 칼슘이온 뿐만 아니라 pH, oxygen free radicals, c-AMP등의 세포조절에 중요한 신호전달물질의 분석도 가능하다. 또한  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  등의 이온도 분석이 가능하며 계속 새로운 형광물질이 개발되고 있기 때문에 지금보다 훨씬 다양한 물질의 실시간 분석이 가능할 것으로 생각된다.

## 결 론

저자들은 간단하면서도 영상을 얻을 수 있으며 정량적 연구의 방법으로 칼슘이온에 대한 면역형광 염색을 이용한 CLSM 방법이 표피내 칼슘이온 연구에 사용될 수 있는지 알아보려고 본 연구를 시작하였다.

무모생쥐를 이용하여 정상 표피와 테이프·스트립핑을 통한 표피장벽을 손상 후 표피를 Ion capture cytochemistry를 통해 칼슘이온의 변화를 관찰한 결과 정상 표피에서

는 칼슘이온 농도가 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가되어 외부 과립층에서 가장 높게 나타나는 칼슘기울기가 관찰 되었다. 표피장벽 손상 후 외부 과립층에서 칼슘이온이 감소되어 칼슘기울기가 소실되었고 이후 점차 외부 과립층에 칼슘이온이 증가되어 36시간 이후 정상적인 칼슘기울기를 형성하였다. 면역형광염색 후 CLSM을 이용하여 칼슘이온의 변화를 관찰한 결과 ion capture cytochemistry에 의한 결과와 유사한 양상을 보여 표피장벽 손상 후 칼슘기울기가 소실되었고 36시간 이후 정상적인 칼슘기울기를 형성하였다.

따라서 저자들은 표피내 칼슘이온 연구에 Fluo-3를 이용한 형광염색 후 CLSM을 이용한 방법이 표피내 칼슘이온에 대한 연구의 방법으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- Schaefer H, Redelmeier TE. Structure and Dynamics of the Skin Barrier. In: Schaefer H, Redelmeier TE eds. Skin Barrier; Principles of Percutaneous Absorption. Basel: Karger, 1996: 1-42
- Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. Cosmet Toilet 1997; 112:49-59
- Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. J Invest Dermatol 1983;80:44-49.
- 이승현, 장성남. 표피지방과 표피장벽. 항공우주의학 1992;2:15-24.
- Lee SH, Chung H-S, Lee W. Epidermal lipid homeostasis. Ann Dermatol 1995;7:99-111
- Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. Adv Lipid Res 1991;24:57-82
- Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of permeability barrier. Cell Tiss Res 1992; 270:503-512
- Holleran WM, Takagi Y, Menon GK, Legler G, Feingold KR, Elias PM. Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. J Clin Invest 1993;91:1656-1664
- 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
- Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epi-

- dermal calcium gradient. *Br J Dermatol* 1994;130:139-147
11. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Qiang M, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
  12. Lee SH, Elias PM, Feingold KR, Mauro T. A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol* 1994;102:976-979
  13. Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 1985;84:508-512
  14. Elias PM, Nau P, Hanley K, Cullander C, Crumrine D, Bench G et al. Formation of epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J Invest Dermatol* 1998;110:399-404
  15. Ahn SK, Hwang SM, Jiang SJ, Choi EH, Lee SH. The change of epidermal calcium gradient and transitional cells after prolonged occlusion following tape stripping in the murine epidermis *J Invest Dermatol* 1999;113:189-195
  16. Hwang SM, Jiang SJ, Menon G, Ahn SK, Lee SH. Occlusive therapy in psoriasis; pathogenetic roles of permeability barrier and calcium. *J Invest Dermatol* 1999; 112:605(Abst)
  17. Shotton DM. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *J Cell Sci* 1989; 94:175-206
  18. Ha KS, Lee ZW. Confocal laser scanning microscopy. *Ajou Med J* 1997;2:91-95
  19. Egger MD. The development of confocal microscopy. *Trends in Neurosci* 1989;12:11
  20. Brakenhoff GJ, van der Voor HTM, van Spronsen EA, Linnemans WAM, Nanninga N. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* 1985;317:748-749
  21. Koo HY, Shin I, Lee ZW, Ha KS. Cellular Signaling. 2000 in press