

무모생쥐에서 아세톤 자극후 스테로이드의 국소도포 및 스테로이드 주사에 의한 피부장벽의 회복효과

연세대학교 원주의과대학 피부파학교실, 연세대학교 의과대학 피부파학교실*

안성구 · 천승현 · 최용호 · 이승현*

=Abstract=

The Effect of Barrier Recovery using Topical Steroid and Systemic Steroid after Acetone-application in Hairless Mice

Sung Ku Ahn, M.D., Seung Hyun Chun, M.D., Eung Ho Choi, M.D., Seung Hun Lee*, M.D.*

Department of Dermatology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea,

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine*, Seoul, Korea

Background : Acetone disrupts the cutaneous permeability barrier through the removal of stratum corneum lipids. This perturbation of barrier integrity stimulates a variety of homeostatic repair that ultimately results in the normalization of barrier function.

Object : To measure the effect of steroid on the barrier recovery of acetone applied skin.

Material and Methods : The flank skin of 8~10 week old hairless mice was treated with acetone and then topical and systemic steroids were applied. Transepidermal water loss(TEWL) was checked after 0, 3, 6, 12 and 24 hours. Electron and light microscopic examination and ion capture cytochemistry were performed after 3, 6, 12 and 24 hours after systemic and topical steroids had been applied.

Results : The results were as follows :

- 1) During 3~6 hours after experiment, the recovery rate of TEWL was most prominent in the group of acetone applied animal than other groups.
- 2) After 12 hours after acetone applied, formation of new stratum corneum was found in the groups of acetone applied or acetone applied skin with topical steroid application. But loss of stratum corneum was observed in the groups of high or low dose steroid injection.
- 3) Ruthenium tetroxide staining of acetone alone or topical steroid treated specimens after 12 hours experiment revealed that the lipid bilayer was partly impaired and fragmented. Intercellular spaces were widening and the lipid bilayer disappeared or was damaged in the groups of high or low dose steroid injection.
- 4) Six hours after acetone application, pattern of calcium distribution had been partially reestablished in the group of acetone alone or topical steroid treated animals. But calcium content was still sparse and decreased from the stratum granulosum to basale in the groups of high or low dose steroid injection.

서 론

<접수:2002년 9월 6일>

<이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 대학교수 해외파견 연구지원에 의하여 연구되었음>

교신저자 : 안성구

주소 : 220-701 강원도 원주시 일산동 162

연세원주의과대학 피부파학교실

전화 : (033)741-0621 Fax : (033)748-2650

E-mail : ahnsk@wonju.yonsei.ac.kr

피부는 다양한 내·외적 환경에 의해 쉽게 손상을 받으나 피부장벽의 역할을 담당하므로써 수분과 전해질의 소실을 억제하여 피부의 건조를 방지한다. 또한 정상적인 생화학적 대사를 유지하고 각종 세균으로부터 피부를 보호한다.

각질층은 단백질이 풍부한 각질형성세포와 각질형성세

Conclusion : In summary the present study demonstrates that steroid treatment acutely delays recovery rate of TEWL, inhibits normalization of calcium gradient or epidermal lipid synthesis that leads to abnormalities in permeability barrier homeostasis.

(Korean J Dermatol 2002;40(10) : 1173~1180)

Key Words : Acetone, Barrier recovery, Calcium, Lipid, Steroid

포사이에 존재하는 지질의 두 가지 성분으로 구성되어 있다. 즉 각질세포의 케라틴은 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공하며, 충상구조의 지질은 세라미드, 폴레스테롤, 지방산을 함유하고 서로 직선상의 구조를 가짐으로서 장벽역할을 담당한다. 그러나 피부에 손상을 주는 다양한 화학물질과 테이프 스트리핑과 같은 물리적 자극에 의한 급성 장벽 기능 소실시 각질층의 손실과 함께 경표피수분손실이 증가하지만 항상성 회복반응을 유발하여 피부 장벽기능이 회복된다^{2~10}.

스테로이드는 매우 다양한 약리학적 기전을 나타내며 장기간 사용시 여러 가지 부작용을 초래한다. 또한 피부 장벽의 회복과 연관성이 제시되고 있다.

이에 연구자는 아세톤 처치후 스테로이드의 도포 및 주사시 피부장벽의 회복효과를 구명하고자 본실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 분류

1) 실험동물

생후 8~10주의 hairless mice(Hr/Hr)을 사용하였으며 동일한 표준사료로 사육한 후 실험하였다.

2) 분류

실험은 4군으로 구분하였으며 각군은 10마리씩 사용하여 실험하였다.

A군 : 아세톤 단독처리

B군 : 아세톤 처치후 스테로이드(Desoxymethasone, espersson[®] cream) 도포

C군 : 아세톤 처치후 저용량의 스테로이드(triamcinolone acetonide, 0.2mg) 주사

D군 : 아세톤 처치후 고용량의 스테로이드(triamcinolone acetonide, 0.5mg) 주사

2. 실험방법

1) 표피장벽 손상 및 경표피수분손실(TEWL) 측정

Hairless mice의 배부에 아세톤과 면봉을 이용하여 TEWL이 40mg/cm²/hr 이상 유발한 다음 실험을 진행하였다.

아세톤 처치 30분후 스테로이드의 복강내 주사 및 배

부에 도포하였고, 0, 3, 6, 12, 24시간에 Tewameter TM 210(Courage + Khazaka, Germany)을 이용하여 TEWL을 측정하였다. 또한 실내온도는 24°C, 실내습도는 40~50%인 동일한 환경에서 시행하였다.

2) 조직생검 및 광학현미경 검사

Chloral hydrate 복강주사후 각 실험군에서 6, 12, 24시간후에 조직생검을 하였으며 통상의 과정을 거쳐 hematoxylin-eosin염색을 시행하였다.

3) 전자현미경 검사

가) RuO₄후 고정법

조직생검후 1mm 두께로 표본을 절단하여 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1M sodium cacodylate buffer(pH=7.4)로 조성된 modified Karnovsky 용액에 고정하였다. 고정된 조직은 실온에서 1시간 방치후 4°C 냉장고에서 overnight 시켰다. Modified karnovsky용액을 제거한 후 0.1M cacodylate buffer로 40분씩 3회 세척한 다음 후고정을 0.25% RuO₄, 0.1M cacodylate buffer 용액에 빛을 차단한 상태로 실온에서 45분간 시행하였다. 후고정후 0.1M cacodylate buffer 용액에 10분간 1회 세척후 50% ethanol로 5분씩 2회, 70%와 95% ethanol로 각 10분씩 2회, 100% ethanol로 각 20분씩 4회 탈수하였다. 탈수후 100% propylene oxide로 15분간(2회) 조직을

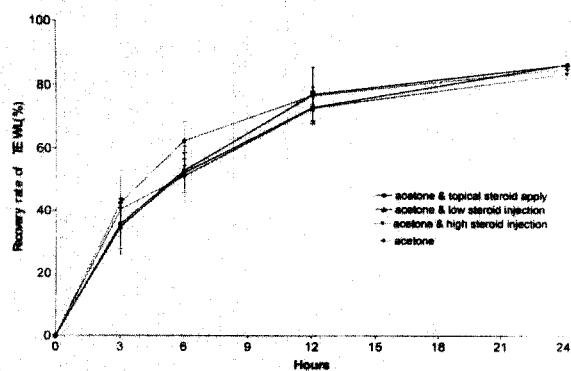


Fig. 1. Recovery rate of TEWL of acetone irritated hairless mouse skin after high or low dose steroid injection and topical steroid application.

침투시키고 통상적인 방법으로 만든 Epon을 이용하여 24시간동안 70°C incubator에서 resin을 polymerization 하였다. 세절편후 통상적인 uranyl acetate와 lead acetate로 염색하여 투과전자 현미경으로 관찰하였다.

나) ion-capture cytochemistry

조직을 얻은 즉시 고정액에 담구어 4°C 냉장고에 보관하였다(고정액 : 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate, 1.4% sucrose), 2시간 이후에 조직을 세절한 다음 얼음조작 위에서 하룻밤동안 냉장고에서 고정을 시켰다. 이후 1ml OsO₄(4%)와 3ml potassium pyroantimo-

nate stock 용액(2%)이 혼합된 후 고정액으로 2시간동안 얼음위에 방치하였다. 냉증류수(pH=10)에 10분간 세수한 다음 통상적인 방법으로 탈수 및 포매를 실시하였다.

4) 통계적 유의성 검정

통계처리는 SPSS/PC를 사용하였고 분석방법은 student-t 검정을 실시하였다. 유의수준은 0.05 이하로 설정하였다.

결 과

1. 경표피 수분 손실의 회복율(Fig. 1)

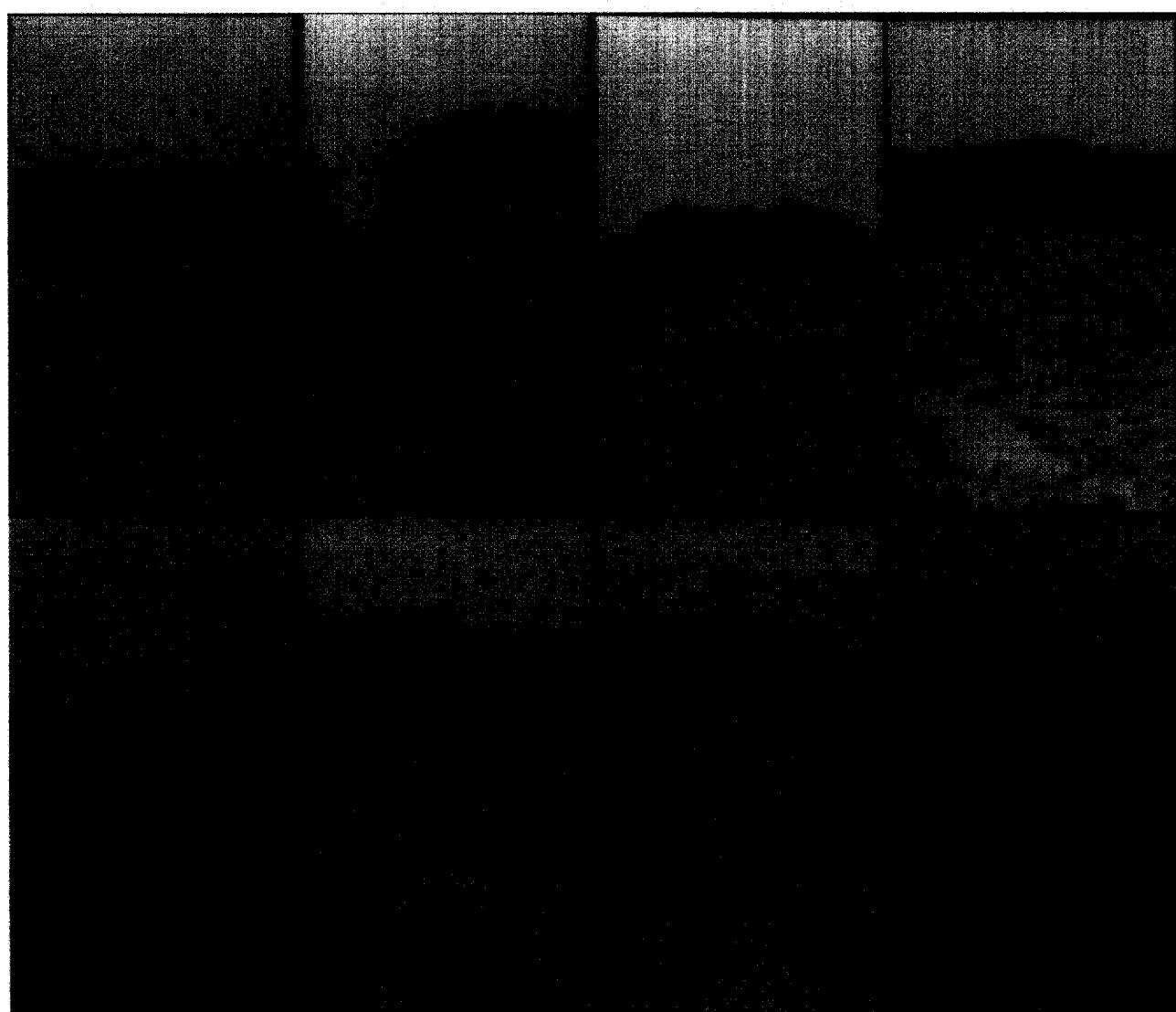


Fig 2. 12 hours after acetone irritation, formation of new stratum corneum(A : acetone alone B : topical steroid) and loss of stratum corneum(C : low dose injection of steroid, D : high dose injection of steroid) is observed. After 24 hours after acetone irritation, all of the specimens show formation of new stratum corneum and stratum granulosum (a : acetone alone, b : topical steroid c : low dose injection of steroid, d : high dose injection of steroid)

회복율은 도포 6시간 이후 모든군에서 현저한 증가를 보였으나 12시간 이후에는 완만한 증가를 나타내었다. 24시간 경과시 회복율은 모든군에서 유사하였다(80%). 특히 실험 3, 6시간에는 아세톤 단독처치군이 가장 뚜렷한 회복율을 보였으며 통계적 유의성($P < 0.05$)이 있었다. 그러나 스테로이드(저, 고용량)주사군은 아세톤 단독처치군, 스테로이드 도포군에 비해 낮은 회복율을 보였으나 통계적 의의는 없었다 (3, 12시간).

2. 병리조직학적 소견(Fig.2)

12시간 경과후의 병리조직학적 소견상 아세톤 단독처치군(A)과 스테로이드 도포군(B)은 각질층이 존재하였으

나 스테로이드 저용량(C)과 고용량(D) 주사군의 경우 각질층의 현저한 소실이 관찰되었다. 실험 24시간 경과시 시행한 조직검사상 모든군에서 각질층의 수, 두께 및 분포가 정상적인 양상을 나타내었다(a, b, c, d).

3. 표피지질의 변화(Fig.3)

실험 12시간 경과후에 시행한 RuO₄ 염색 소견상 아세톤 단독처치군(A)과 스테로이드 도포군(B)은 지질 이중막의 부분적인 소실과 함께 정상적인 지질구조가 일부 관찰되었다. 그러나 스테로이드 저용량(C)과 고용량(D) 주사군은 지질막의 단락과 분절 및 세포간격의 확장소견이 동반되었다. 실험 24시간 경과후의 지질구조는 모든 실험



Fig 3. Ruthenium tetroxide staining of acetone alone(A) and topical steroid treated(B) stratum corneum. Lipid bilayers are partially impaired and fragmented. Intercellular spaces are widening and lipid bilayer are disappeared and severely damaged [low(C), high(D) dose of steroid injection] after 12 hours after acetone irritation.

군에서 정상소견과 유사하였다(inset)

4. 칼슘 분포와 기울기(gradient)의 변화(Fig. 4)

실험 6시간 경과시 시행한 ion-capture cytochemistry 검사 소견상 아세톤 단독처리군(A)은 각질층을 포함한 표피 전층에 칼슘이 고루 분포하였다. 스테로이드 도포군(B)은 아세톤 단독처리군과 유사한 양상을 보였으나 칼슘 침착 정도는 다소 감소하였다. 또한 칼슘 기울기는 상기 두군

모두 비정상적인 소견이었다. 스테로이드 저용량(C) 및 고용량(D) 주사군은 칼슘 침착과 분포가 상기 두군에 비하여 현저히 감소하였으며 칼슘기울기 또한 회복되지 않았다. 실험 24시간 경과후의 칼슘기울기는 정상소견과 유사하였다.

고 찰

피부장벽의 유지와 형성에 대한 연구시 여러 가지 방

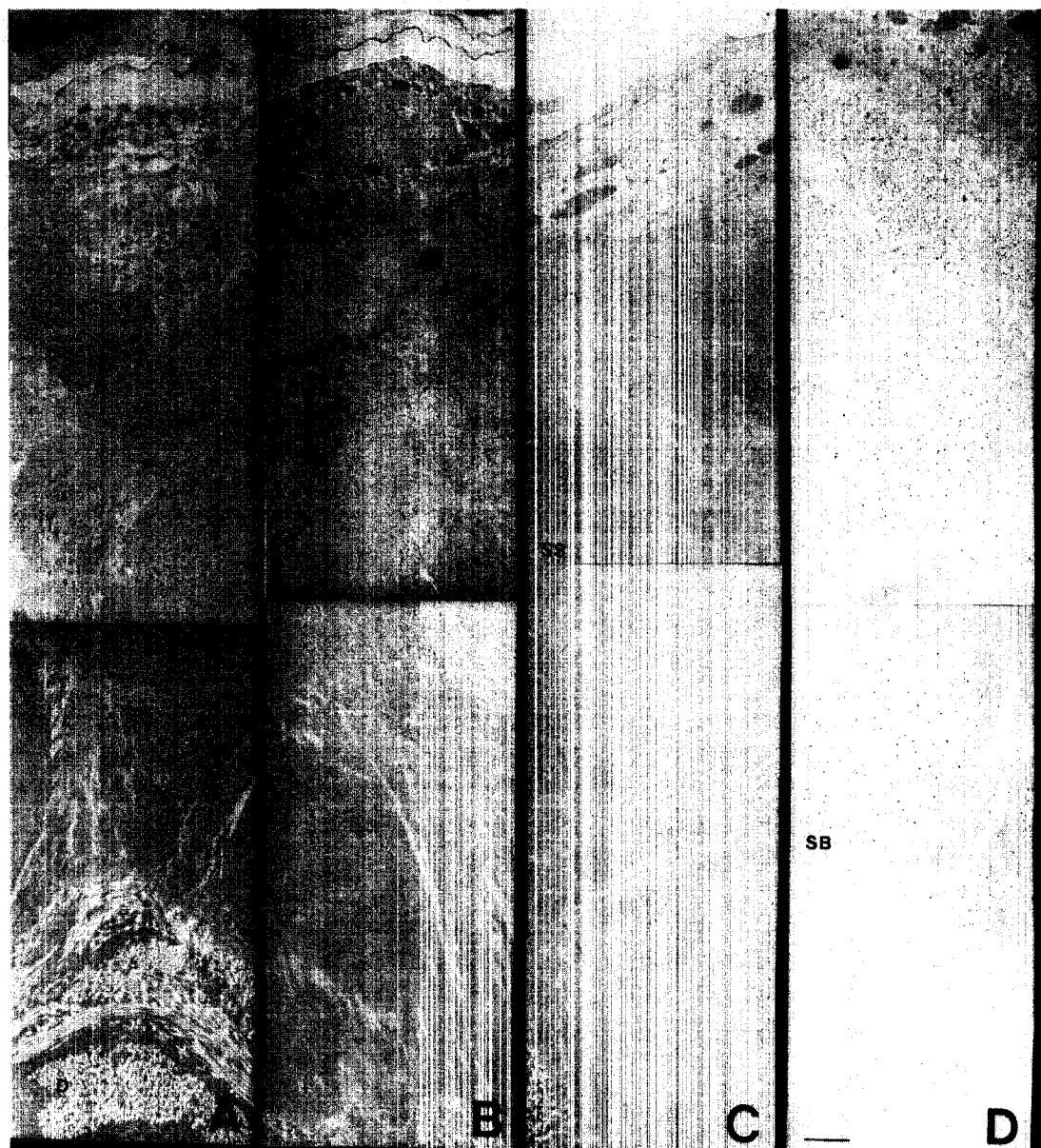


Fig 4. Six hours after acetone irritation, calcium distribution pattern has been partially reestablished(A: acetone alone), B: topical steroid). But calcium content is decreased in the stratum granulosum, stratum spinosum and basale[low(C) and high(D) dose of steroid).

법에 의한 인위적인 피부장벽 손상실험 방법이 사용되어 왔다^{8,10,11}. 첫째, 극성 유기용매나 계면활성제로 지질을 추출하는 방법, 둘째, 물리적인 방법(셀로판 테이프), 셋째, 음식물에 의한 방법(필수지방산이 포함되지 않은 음식을 투여)이 있으며 이중 아세톤이나 SDS를 이용하는 방법과 tape stripping 방법은 급성 피부장벽 손상을 유도하는 방법으로 자극성 피부염과 같은 급성 피부장벽 손상의 모델로 이용될 수 있다. 아세톤 치치 또는 tape stripping에 의한 급성 피부장벽 손상 후 장벽의 회복은 빠르게 나타난다. 장벽회복의 과정은 몇가지 과정을 거치면서 일어나는데 1) 이미 형성되어 있던 충판소체의 분비, 2) 콜레스테롤, 지방산, 스팽고지질과 같은 표피지질의 합성증가, 3) 새로운 충판소체의 형성과 분비, 4) 이를 결과로 인한 각질세포간 지질의 회복, 5) 분비된 지질의 개조(remodeling)와 같은 일련의 과정에 의해 피부장벽은 회복된다.

이러한 일련의 회복과정은 칼슘과 밀접한 연관성이 확인되었으며 특히 피부의 항상성, 분화 및 증식에 관여한다^{12~17}. 첫째, 칼슘 기울기가 표피내에 존재하는데 기저층에는 칼슘농도가 낮으나 과립층 상부에는 고농도로 존재한다. 둘째, 피부장벽손상시 칼슘기울기의 손실 및 과립층에서 칼슘의 손실이 관찰되지만 무모생쥐의 경우 24시간 이후에는 정상적인 분포를 나타낸다. 셋째, 과립층 상부에 고농도의 칼슘 농도를 유지시키면(예로서 water bathing를 이용하여 고농도의 칼슘을 접촉) 충판소체의 분비는 억제하고 장벽 회복을 지연시킨다. 넷째, 초음파나 전기영동을 이용하여 과립층의 칼슘농도를 감소시키면 장벽손상유무 관계없이 충판소체 분비를 자극시킨다. 다섯째, 표피의 분화와 증식에 관여하는데 세포의 칼슘 이온농도가 높으면 분화를, 낮을 경우에는 증식을 촉진시킨다.

본 연구결과 스테로이드의 국소도포 및 주사는 칼슘침작정도가 아세톤 단독처리전에 비하여 낮았으며 칼슘기울기의 회복정도가 감소하였다. 즉 스테로이드는 급성장벽손상시 칼슘의 회복을 억제시켰다.

Kao 등¹⁸은 3일간 국소 또는 전신적인 스테로이드 투여시 TEWL의 변화는 없었으나 장벽손상후에는 증가한다고 보고하였다. 이는 각질층의 결합력 감소에 의한다고 주장하였다. 또한 장기적인 투여시 TEWL은 증가하는데 각질층 두께, 충판소체 숫자, 지질 감소에 의한다고 하였다.

본 연구의 경우 실험 24시간 결과후 TEWL은 정상화되었으나 아세톤 단독 치치군은 다른 실험군에 비해 3~6시간 내에 유의하게 TEWL의 회복율을 나타내었다.

스테로이드는 매우 다양한 약리학적 기전을 나타내며 피부장벽의 회복과 연관성이 있다.

Rat의 경우 출생전에 당질코티코이드(glucocorticoid) 투여는 피부장벽형성을 촉진시키나, 출생후에는 촉진시키지 않는다. 한편 에스테로겐과 갑상선호르몬은 피부장벽을 촉진

시키지만 테스토스테론은 지연시키는 효과가 있다^{19,20,21}. 또한 당질코티코이드가 지질생성에 미치는 영향은 조직에 따라 다소 차이가 있다. 간의 당질코티코이드는 지방산과 콜레스테롤 합성을 자극하여 혈청 중성지방과 콜레스테롤 수치를 증가시킨다. 그러나 간을 제외한 조직의 경우 당질코티코이드는 지질 생성을 억제한다. 즉 피하 지방조직은 지방산 생성을 억제하므로 장기간 스테로이드 주사시 지방위축증을 유발시킬수 있다. 또한 태아의 폐조직에서 지방산 생성을 자극하여 표면활성제의 합성을 촉진시킨다.

실험동물에서 SDS 자극후 경피흡수는 ibuprofen, acitertin에 비하여 hydrocortisone이 가장 높다²². 피부장벽 손상이 심한 홍피증 환자의 경우 hydrocortisone 국소도포시 체내 흡수는 24시간내에 4~19%가 이루어진다. 특히 염증성 피부질환에서 1% hydrocortisone을 1일 2회 도포 할 경우 24시간 내에 혈중 농도가 최고치를 나타내는데 이 시기에는 장벽손상이 거의 회복되므로 도포횟수를 감소해야 한다고 하였다^{23,24}. 그러나 Sheu 등은²⁵ 장기간 스테로이드 도포시 각질세포의 흡수, 지질막 충판소체의 숫자가 감소되며 TEWL의 증가 및 장벽기능의 손상을 초래한다고 하였다.

정신적 스트레스는 건선, 아토피, 두드러기, 가려움증을 악화시키거나 유발시킨다. 또한 인체와 동물실험시 정신적 스트레스는 피부장벽의 항상성(homeostasis)를 상실하게하며 이는 혈중내의 당질코티코이드 수치의 증가에 의한다. 전신적인 스테로이드 투여시 유사한 결과를 보이며 길항제(RU-486) 투여시 항상성은 유지하므로 피부장벽과 스테로이드는 매우 연관성이 있음을 제시하였다²⁶.

Kao 등¹⁸은 3일간 강력한 스테로이드 제재를 도포한 결과 무모생쥐에 장벽손상을 보고하였다. 즉 경표피수분손실의 회복률 감소, 충판소체의 생성과 분비감소, 지질(세라마이드, 콜레스테롤, 지방산) 생성 감소, 교소체 감소 및 각질층의 결합력 약화를 동반한다고 하였다. 그러나 이러한 현상은 외부적으로 지질을 첨가하면 피부장벽의 회복현상을 나타낸다 보고하였다.

본 실험에 의하면 12시간 경과후 스테로이드 주사군의 경우 심한 지질구조의 손상을 나타내었으나 아세톤 단독 치치군의 경우 비교적 경미한 지질손상을 나타내었다. 또한 경표피 수분손실의 회복률 및 각질층의 회복정도도 유사한 양상을 보였다. 즉, 급성장벽 손상후 스테로이드의 도포 및 주사는 표피지질의 생성을 억제하며 결과적으로 피부장벽 회복을 저하시켰다.

결 론

아세톤을 이용하여 hairless mice에서 급성장벽 손상후

스테로이드의 국소도포 및 주사에 의한 피부장벽 회복효과를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다

- 1) 아세톤 단독처치군의 경표피수분손실의 회복율은 3~6시간 경과시 기타군에 비하여 가장 높았다.
- 2) 아세톤 단독처치군과 스테로이드 도포군은 실험 12시간 경과시 각질층이 일부 존재하였으나 스테로이드 도포 및 주사군은 현저한 소실 소견을 나타내었다. 실험 24시간 후에는 모든군에서 정상적인 각질층이 존재하였다.
- 3) 실험 12시간 경과시 Ruthenium tetroxide 염색상 아세톤 단독처치군과 스테로이드 도포군은 지질구조의 부분적인 손상과 소실이 있었으나 스테로이드 주사군은 뚜렷한 지질막의 단락과 분절 및 세포간격의 확장소견이 동반되었다.
- 4) 실험 6시간 경과시 아세톤 단독처치군과 스테로이드 도포군은 부분적으로 칼슘기울기가 존재하였다. 스테로이드 주사군(고용량, 저용량)은 칼슘침착이 현저히 소실되었고 칼슘기울기는 회복되지 않았다.

이상의 결과는 급성피부장벽 손상 12시간 이전에는 스테로이드의 국소도포 및 주사가 경표피 수분소실의 회복을 감소, 각질층의 소실 및 지질구조의 손상을 초래하므로 피부질환의 치료시 상기소견을 고려해야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 이승현, 황상민, 최옹호, 안성구. 피부장벽. 대피지 1999; 37:825-837
2. Schurer NY, Elias PM. The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 1991;24:27-56
3. Elias PM, Menon GK, Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1-26
4. Elias PM. Epidermal lipid, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80:44-49
5. Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 1991;87:1668-1673
6. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. The lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992;98:279-289
7. Holleran WM, Man MQ, Gao WN, Elias PM. Sphingolipids are required for mammalian barrier function : Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest* 1991;88:1338-1345
8. Man MQ, Elias PM, Feingold KR. Fatty acids are required for epidermal barrier function. *J Clin Invest* 1993; 92:791-798
9. Feingold KR, Man MQ, Menon GK. Cholesterol synthesis is required for cutaneous barrier function in mice. *J Clin Invest* 1990;86:696-702
10. Chung H-S, Lee SH. Differences in the recovery rate after perturbation of epidermal barrier by means of acetone treatment and tape-stripping technique. *Ann Dermatol* 1995;7:155-164
11. Yang L, Mao M, Taljebini M. Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br J Dermatol* 1995;133:679-685
12. 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* 1992;270:503-512
13. Elias PM, Nau P, Hanley K, Cullander C, Crumrine D, Bench G, Feingold KR. Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J Invest Dermatol* 1998;110: 399-401
14. 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
15. 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
16. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Man MQ, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
17. Menon GK, Price LF, Bommannan B, 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
18. Kao JS, Fluhr JW, Man MQ, Ahn SK, Elias PM, Feingold KR. Glucocorticoids inhibit epidermal lipid synthesis resulting in impaired permeability barrier homeostasis and decreased stratum corneum integrity and cohesion. *J Invest Dermatol* (in press)
19. Aszterbaum M, Feingold KR, Menon GK, Williams ML. Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat. *J Clin Invest* 1993; 91:2703-2708
20. Hanley K, Rassner U, Elias PM, Williams ML, Feingold

- KR. Epidermal barrier ontogenesis : Maturation in serum-free media and acceleration by glucocorticoids and thyroid hormone but not selected growth factors. *J Invest Dermatol* 1996;106:404-411
21. Hanley K, Rassner U, Jiang Y. Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. Acceleration by estrogen and delay by testosterone. *J Clin Invest* 1996;97:2576-2584
22. Wilhelm KP, Surber C, Maibach HI. Effect of sodium lauryl sulfate-induced skin irritation on in vitro percutaneous absorption of four drugs. *J Invest Dermatol* 1991; 96:963-967
23. Aalto-Korte K, Turpeinen M, Pharmacokinetics of topical hydrocortisone at plasma level after applications once or twice daily in patients with widespread dermatitis, *Br J Dermatol* 1995;133:259-263
24. Sheu HM, Lee JY, Chair CY, Kuo KW. Depletion of stratum corneum intercellular lipid lamellae and barrier function abnormalities after long-term topical corticosteroids. *Br J Dermatol* 1997;136:884-890
25. Aalto-korte K, Turpeinen M, Quntifyiing systemic absorption of topical hydrocortisone in erythroderma. *Br J Dermatol* 1995;133:403-408
26. Denda M, Tsuchiya T, Elias PM, Feingold KR. Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol* 2000;278, 367-372