

# 초음파가 표피 투과 장벽과 표피 지질 합성에 미치는 효과

국민건강보험공단 일산병원 피부과, 연세대학교 의과대학 피부과학교실\*, 서울보건대학 전자현미경실†,  
(주)정훈기공‡, 연세대학교 원주의과대학 피부과학교실§

조남준 · 정세규\* · 전정은\* · 최기주† · 박석종† · 안호정† · 안성구§ · 이승현\*

=Abstract=

## The Effect of Ultrasound on Epidermal Permeability Barrier and Lipid Synthesis

Nam Joon Cho, M.D., Jung Se Kyoo\*, Jung Eun Jun\*, Ki Joo Choi†, Suk Jong Park†,  
Ho Jung An†, Sung Koo Ahn, M.D.§, Seung Hun Lee, M.D.\*

Department of Dermatology, National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital, Koyang,

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine\*, Seoul Health College, Electron

Microscope Lab.†, Junghoon Cooperation Ltd.†, Seoul, Department of Dermatology, Yonsei

University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea§

**Background:** Abrogation of the epidermal permeability barrier results in an increased lipid synthesis and lipid synthetic enzymes. Recent studies have shown that ultrasound can induce changes in the epidermal calcium gradient that increase lamellar body secretion without increasing transepidermal water loss (TEWL).

**Objective:** We undertook this study to identify whether ultrasound can stimulate lipids synthetic enzymes and lipids synthesis.

**Methods:** Ultrasounds were applied to the skin of hairless mice, and we then quantified lipid synthesis, real time RT-PCR to measure mRNA activities of lipid synthetic enzymes and TEWL. We also performed RuO4 post fixation and calcium ion capture cytochemistry.

**Results:** There were no significant changes of TEWL before and after ultrasound treatment. Calcium in upper epidermis decreased and that in lower epidermis increased after treatment of ultrasound and some recovery of epidermal calcium gradient after 6 hours. In RuO4 post fixation, lacuna dilatation, partial distension of intercorneocyte space, loss of multilamellar structures and increased lamellar body secretion were observed in the epidermis of the ultrasound treated hairless mice. The mRNA levels of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, serine palmitoyl transferase (SPT), fatty acid synthase (FAS) and lipid synthesis were increased in the epidermis of the ultrasound treated hairless mice.

**Conclusion:** Ultrasound can increase mRNA of lipids synthetic enzymes and lipids synthesis without increasing TEWL by changing calcium ion gradients.

(Korean J Dermatol 2005;43(5):619~629)

**Key Words:** Epidermal permeability barrier, Ultrasound, Epidermal lipids synthesis, Lipid synthetic enzymes

〈접수: 2004년 12월 29일〉

\*본 논문의 요지는 2004년 10월 21일 제 56차 대한피부과학회 추  
계학술대회에서 발표하였음

교신저자: 이승현

주소: 135-720 서울 특별시 강남구 도곡동 146-92  
영동세브란스병원 피부과

전화: 02)3497-3360 Fax: 02)3463-6136  
E-mail: ydshderm@yuhmc.yonsei.ac.kr

## 서 론

피부는 수분과 전해질의 손실을 막는 보호막의 역할과  
인체 외부의 여러 해로운 자극이나 물질이 피부를 통해  
흡수되는 것을 막는 장벽의 역할을 수행하고 있으며, 각  
질층이 이러한 역할을 담당 하고 있다<sup>1</sup>. 각질층은 단백질

이 풍부한 각질세포와 각질세포간 지질로 구성 되어 있다<sup>2</sup>. 각질층의 지질은 대부분 층판소체에서 유래되며, 과립층과 각질층이 인접하는 곳에서 과립층의 세포막과 융합되어, 그 내용물이 세포간격으로 분비하여, 넓고 사이가 비지 않는 다층 지질층이 형성되어 수분손실에 대한 장벽역할을 하게 된다<sup>3</sup>. 표피의 수분함량은 기저층에서 과립층 하부까지는 65%에서 70% 정도로 일정하지만, 과립층과 각질층의 경계부위에서는 40%로 감소하며, 하부 각질층에서는 40% 정도이지만 상부로 갈수록 15%까지 감소한다. 경표피 수분 손실(transepidermal water loss, TEWL) 양은 정상에서 시간당 0.1-0.4 mg/cm<sup>2</sup> 정도이다. 표피 투과 장벽이 손상 받는 경우 표피 지질의 합성이 증가하나 증기가 투과되지 못하는 막으로 밀폐하면 이러한 합성이 억제된다. 이는 경표피 수분손실 자체가 표피지질 합성의 조절에 관여한다는 증거로 생각되었다<sup>4</sup>. 그러나 경표피 수분 손실양의 증가를 일으키는 표피 투과장벽의 손상이 없이 표피내의 칼슘 이온만을 변화시키는 이온영동법으로 층판소체의 분비증가를 유도 시킴으로 칼슘이 중요한 신호전령자라고 할 수 있게 되었다<sup>5,7</sup>. 표피 투과장벽의 손상은 세라마이드, 콜레스테롤, 자유 지방산의 합성을 증가시킬 뿐만 아니라 이들을 합성하는데 필요한 효소의 mRNA도 증가시킨다<sup>8,9</sup>. 콜레스테롤 합성에 속도 조절 효소인 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase와 스핑고지질의 합성을 관장하는 serine palmitoyl transferase (SPT)의 mRNA는 표피 투과장벽에 손상을 가한 피부에서 증가된다. HMG CoA reductase나 SPT의 특이한 억제제를 처치한 경우에는 콜레스테롤과 스핑고지질의 합성이 억제되고, 결국 손상된 표피 투과장벽기능의 회복이 지연된다<sup>9,10</sup>. 표피 투과장벽이 손상되면 표피의 지질합성과 DNA합성이 증가되는데, 이런 변화의 신호 역할은 칼슘 이온이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

초음파는(18KHz 이상) 의학적으로는 진단, 치료, 파괴 등의 목적으로 이용되고 있다<sup>11</sup>. 진단용으로는 주로 3-10 MHz의 초음파를 이용하고, 파괴용으로는 18-100 KHz의 초음파가 주로 사용된다. 치료용 초음파는 주로 주파수가 1-3 MHz이며, 열 작용과 비열작용에 의해 그 효과를 나타낸다. 열 작용은 물리치료, 염좌 회복, 통증감소의 목적으로 사용되며, 비열작용은 조직회복<sup>12,13</sup>, 정맥류성 궤양의 치료<sup>13</sup>, 육창의 치료<sup>14</sup>, 허혈 근육의 혈류개선<sup>15</sup>, 건의 재생<sup>16</sup>, 섬유모세포에서 단백질의 생성 촉진<sup>17</sup>등에 이용된다. 최근에 1 MHz 초음파를 처치한 노화피부에서 표피의 두께와 진피 교원질이 증가됨을 보고 하였다<sup>18</sup>. 연구자들은 최근 연구<sup>5,19,20</sup>에서 피부에 초음파를 시행하면 경표피 수분 손실량의 증가 없이, 표피내 칼슘이온 기울기의 변화를 유발하여 피부장벽형성에 필수적인 층판소체의 분비

가 증가되는 것을 보고하였다. 그러나 아직까지 피부에 초음파를 시행한 후에 각질층에 대한 지질분석은 이루어지지 않았고 표피에서 실질적으로 지질합성이 증가되는지에 대한 연구도 미미한 현실이다. 이에 연구자는 초음파를 피부에 시행한 후 표피 내에서 지질의 정량적인 변화를 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

생후 8주에서 12주의 암컷 무모생쥐(hairless mice: Hr/Hr)를 온도 22±2°C, 상대습도 40-60%사이의 사육조건에서 동일한 표준사료와 수분을 공급하고 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 2. 초음파 시행

초음파기구(정훈기공, 한국)는 출력은 1.0 W/cm<sup>2</sup>으로서, 3 MHz의 초음파를 방출하도록 조정하였다. 무모생쥐의 등에 초음파용 젤리를 바른 후 초음파 프로브(probe)를 피부에 밀착시킨 후 5분간 문질러 가며 시행하였다. 대조군은 초음파용 젤리만을 도포 하고 전원을 끈 초음파 프로브를 5분 밀착하여 문질렀다.

### 3. 조직 생검

초음파를 5분간 시행한 후부터 3시간, 6시간, 24시간이 경과한 후에 지질 분석과 1, 2.5, 3, 4, 6, 12, 24시간 후 경추 탈골로 안락사 시킨 직후 피부조직을 생검 하였다. 각 단계마다 경표피 수분 손실량을 Tewameter TM 210 (Courage + Khazaka, Germany)로 측정하였다.

### 4. 전자 현미경 관찰

#### 1) Calcium-ion capture cytochemistry

피부 조직을 0.5mm<sup>3</sup>의 조각으로 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate, 1.4% sucrose가 함유된 고정액에 넣고 얼음을 채워서 하루 밤 동안 고정한 후 고정액을 제거하고 조직을 두 시간 동안 얼음을 채운 osmium/pyroantimonate에 후고정한 후 pH 10의 차가운 증류수로 10분간 세척하였다. 조직들은 0.1 M sodium cacodylate buffer에 10분간 헹구고 50% ethanol로 5분씩 2회, 70%와 95% ethanol로 각각 10분씩 2회, 100% ethanol로 각각 20분씩 4회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide로 각각 15분간 2회 조직을 침투시키고 통상적인 방법으로 포매시킨 후 투과 전자 현미경(H-500, Hitachi, Japan)으로 관찰 하였다.

## 2) Ruthenium tetroxide ( $\text{RuO}_4$ ) 후 고정법

조직을 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.06% calcium chloride, 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4로 조성된 modified Karnovsky 용액에 넣어 고정 하였다. 조직은 실온에서 1시간 동안 방치한 후 18-24시간 동안 냉장고에서 보관하였다. Karnovsky 용액을 제거한 후 0.1 M sodium cacodylate buffer로 40분씩 3회 세척하였다. 이후 후고정액을 최종농도 0.25%  $\text{RuO}_4$ , 0.1 M sodium cacodylate buffer 용액에 실온에서 45분간 시행하였다. 후고정 후 0.1 M sodium cacodylate buffer에서 10분간 세척한 후 50% ethanol로 5분씩 2회, 70%와 95% ethanol로 각각 10분씩 2회, 100% ethanol로 각 20분씩 4회 탈수시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide로 각각 15분간 2회 조직을 침투 시키고 통상적인 방법으로 포매시켜 35시간 동안 incubator에서 resin을 polymerization 시킨 후 ultra thin section을 한 후 통상적인 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과 전자 현미경(H-500, HITACHI, Japan)으로 관찰하였다.

## 5. 지질분석

초음파 시행 군, 대조군(각  $n=5$ )은 3군데 이상에서 8mm 편치를 이용하여 표부조직을 생검하였다. 0.5% trypsin PBS (pH 7.2-7.4)용액을 페트리디시에 넣고 진피가 아래로 가도록 잡기게 하였다. 상온에서 120분 정도 방치한 후 표피를 분리하고 남은 조직은 제거하였다. PBS에 띄워서 와동 후 증류수로 세척한 후 kim wipes로 물기를 제거하였다. 건조 후, 무게를 측정하고 시험관에 옮긴 후 Bligh-Dyer 용액 5ml를 넣어 흔들어 주고 초음파 처리한 후 24시간 동안 상온에서 방치하였다. 원심분리 후 상층액을 따로 모으고 침전물에  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (2:1) 4ml를 첨가 후 흔들어 원심분리 하였다. 모아둔 상등액과 함께 여과하고 여과액에 증류수 6ml를 넣고 원심분리(2000rpm, 10분)를 시행하였다. 상층액은 버리고 하층액은 35°C에서 N2 가스로 증발 건조하고,  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (2:1)에 녹여 냉동 보관하였다<sup>31,32</sup>. 지질분석을 위한 Chromatography는 silica gel을 입힌 HPTLC plate (60F254, 20x10cm, Merk, Germany)를 사용하였다. 지질정량분석을 위해 사용될 표준물질로는 Phytosphingosine (PS), Galactoserebroside (GS), cholesterol (CH), cholesterol sulfate (CS), triolein (TG), oleic acid (FF A), cholesteryl oleate (CE) (이상 Sigma Chemical Co. St Louis, MO, U.S.A), ceramide type III, ceramide IV, squalene (SQ)과 Ceramidie VI (Doosan Chemical Co. Korea)를 사용하였다. 자동화된 TLC sampler III ATS3 (Camag, Basel, Switzerland)를 사용하여 각 plate마다 각 표준혼합물을 2, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{l}$ 씩 plate 하단에 10 mm에 7 mm의

밴드로 자동 점적 하였다. 각 plates를 Camag AMD instrument로 (1) methanol/ chloroform/ water (19:79: 2), (2) methanol/ chloroform/ ethyl ether/ hexane (20:25:40:15), (3) chloroform/ ethyl ether/ hexane (25:50:25), (4) ethyl ether/ hexane (52:48), (5) ethyl ether/ hexane (5:95)의 용매하에서 전개하였다. 크로마토그래피 후에 plate는 10% (w/v) cupric sulfate pentahydrate (in 8% (v/v) o-phosphoric acid solution)에 판을 담근 후 charring시키고 140°C에서 15분간 굽는 과정을 시행하여 발색시켰다. 시료들과 지질표준혼합물들의 발색된 띠는 photodensitometer (TLC2 scanner II)(Camag, Switzerland) 와 TLC evaluation software (ver. 3.15)(Camag, Switzerland)를 사용하여 slit width 0.4×7 mm, wavelength 570 nm로 scanning한 후 각 plates마다 각각의 표준물질의 농도와 질량에 따른 각각의 밀도와 면적을 측정하여 시료와의 상관식을 구하여, 시료들의 정량적 측정을 시행하였다.

## 6. 지질합성에 관여하는 효소 측정을 위한 real time RT-PCR

### 1) RNA 분리21-23

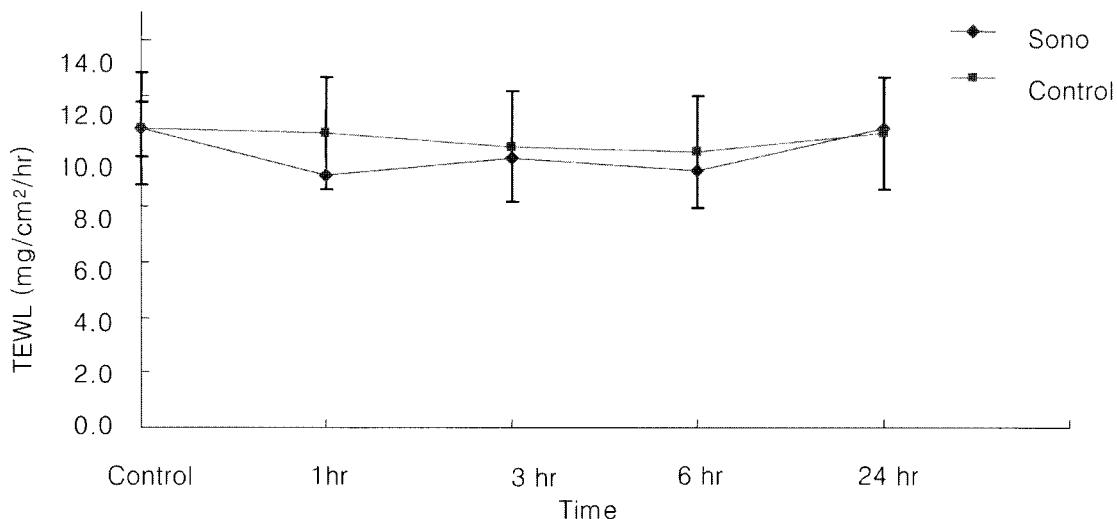
피하지방을 제거하고 10mM EDTA in PBS에 담가 37°C에서 35분간 incubation하여 표피와 진피가 분리 되도록 하였다. 표피를 칼로 긁어 1.5 ml tube에 모은 후 lysis solution을 500  $\mu\text{l}$ 를 가하였다. 조직을 파쇄한 후 3분간 실온에서 incubation 시켰다. 0.1 ml chlroloform을 가한 뒤 와동 후 5분간 숙성 하였다. 4°C 13,200 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액만을 모아 동량인 0.5 ml isoprophy alcohol을 가하고 와동 후 10분간 숙성 하였다. 4°C 13,200 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 용액을 쏟아 버린 후 DEPC로 처리한 75% 에탄올을 가하였다. 15분간 원심 분리하여 에탄올을 다 제거한 후 실온 또는 37°C에서 압착 결정을 건조 하였다. 마른 압착 결정에 20-30  $\mu\text{l}$ 의 DEPC 처리한 증류수를 취하여 RNA를 녹였다.

### 2) RNA 정량

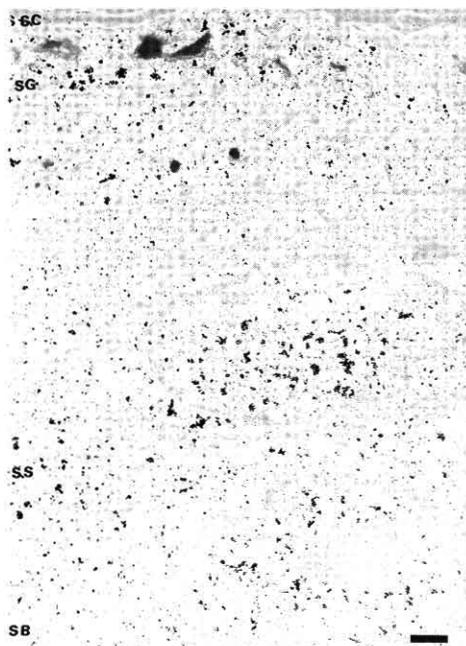
RNA를 DEPC 처리한 증류수와 1:100으로 희석 후 spectrophotometer를 이용해 흡광도 260 nm와 280 nm에서 측정하였다.

### 3) real time RT-PCR

총 50 ml의 PCR조건을 계획하여 각 반응 당 10mM dNTP Mix, 각 5 nmol의 5'과 3' primer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 nmol의 probe, 그리고 Light Cyler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Applied Science)를 이용하여 내부 대조군과 함께 표피조직을 동일한 조건으로 증폭시켰다. 총 증폭 주기는 55회로 제한하나 실시간으로 증폭되는 산물의 증폭 정도에 따라 변화를 주었다. 반응에 이



**Fig. 1.** Effect of ultrasound on skin barrier function. There was no significant difference in TEWL level between control and ultrasound treated hairless mice skin.



**Fig. 2.** Normal epidermal calcium gradient: The gradient of calcium within the epidermis, with highest levels in the stratum granulosum (SG) and lowest levels in the stratum basale (SB), was very important for both permeability barrier homeostasis and epidermal differentiation. Scale bar: 0.2  $\mu$ m

용되는 증폭기는 반응이 진행됨에 따라 연결된 컴퓨터 화면 상에 유전자가 증폭되면서 분리되는 형광 발광체간의 상호 반응에 의하여 발생하는 특이 파장의 형광을 감지하여 증폭 양상을 실시간으로 추적 관찰하였다. 이번 real time RT-PCR에 사용한 primer의 염기 서열은 다음과

같다. Serine Palmitoyl transferase (forward primer 5'-CTG CTGAAGTCCTCAAGGAGTA-3', reverse primer 5'-GGTT CAGCTCATCACTCAGAAC-3'), HMG-CoA reductase (forward primer 5'-GATCCAGGAGCGAACCAA-3', reverse primer 5'-GCGAATAGACACACCACGTT-3'), fatty acid Synthase (forward primer 5'-CCTCACTGCCATCCAGATTG-3', reverse primer 5'-CTGTTTACATTCCCTCCCAGGAC-3').

## 6. 통계처리

통계학적 의미는 two-tailed unpaired Student's t test를 이용하여 결정하였다. 결과는 mean  $\pm$  S.D.로 표시였고, 유의수준은 0.05 이하로 설정하였다.

## 결과

### 1. 경표피 수분 손실량(TEWL)

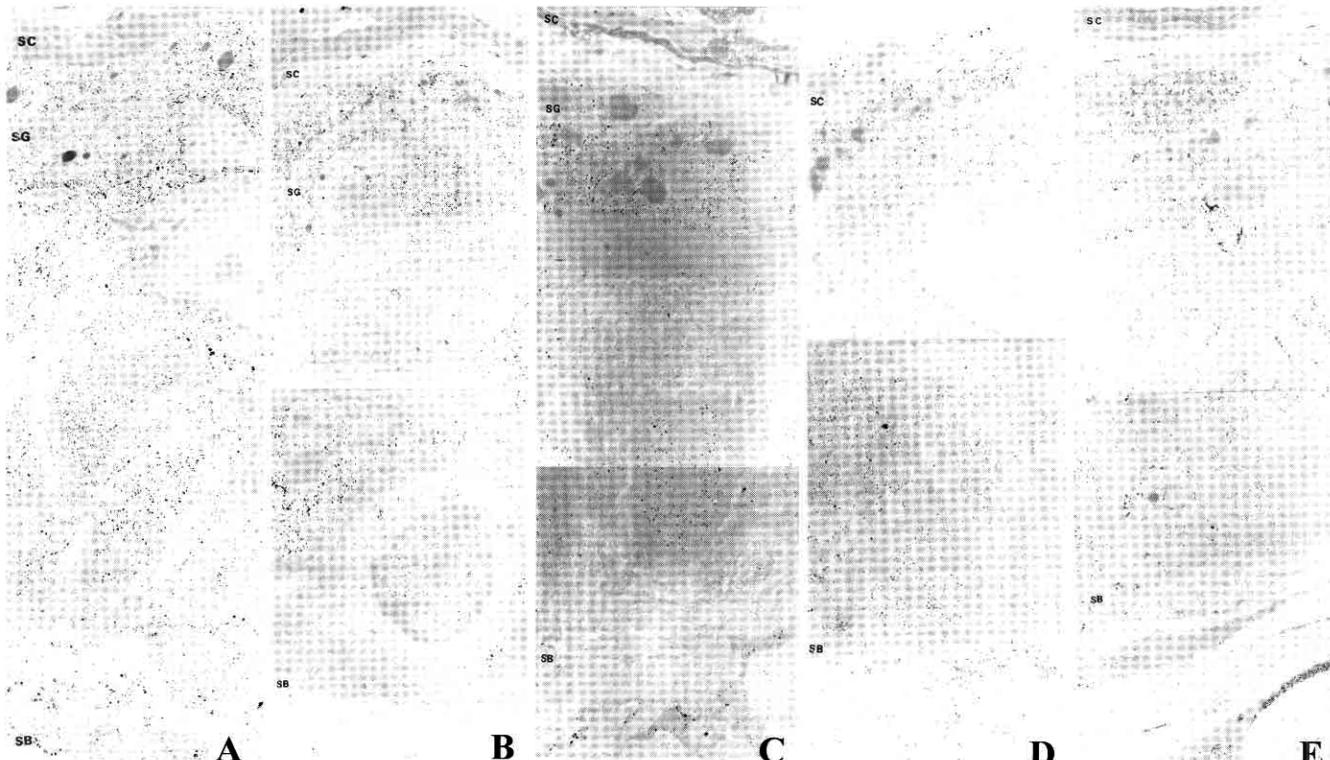
경표피 수분 손실양은 실험 전, 후에 대조군과 초음파 처치군 모두에서 유의한 변화가 없었다( $p>0.05$ )(Fig.1.)

### 2. 전자 현미경 관찰

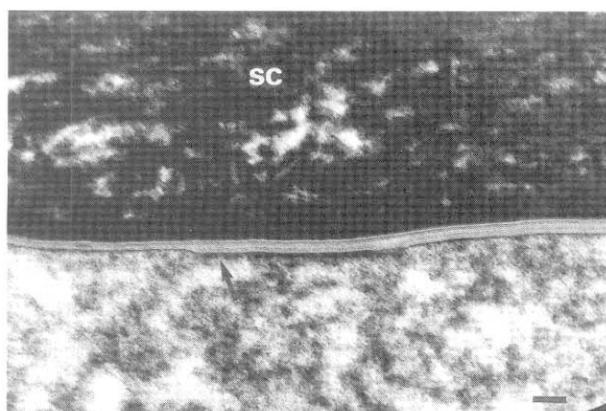
#### 1) Calcium-ion capture cytochemistry

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

한편 초음파 처치 군에서는 초음파 처치 후 즉시 (Fig. 3A), 15분 후(Fig. 3B), 1 시간 후(Fig. 3C), 3 시간 후(Fig. 3D), 6 시간 후(Fig. 3E) 관찰한 표본에서는 초음파 처치 직후와 15 분, 1 시간, 3 시간 후 까지는 과립 층의 칼슘



**Fig. 3.** Calcium gradient changes [0 min (3A), 15 min (3B), 1 hr (3C), 3 hr (3D) and 6 hr (3E)] after 3 MHz ultrasound treatment in hairless mouse skin. Calcium in upper epidermis decreased and calcium somewhat increased in lower epidermis in fig. 3A, 3B, and 3C. There was some recovery of calcium gradient in Fig. 3E, compared with Fig. 3A - 3C. Scale bar: 0.2  $\mu\text{m}$



**Fig. 4.** The elecmicroscopic findings of the SC-SG interface of hairless mice of control group, It showing typical multi-lamellar structure (arrow) and lamellar bodies in SG. Scale bar: 200 nm

이온은 감소된 양상이 관찰 되었다. 6 시간 후 생검한 표본에서는 칼슘 이온이 회복 되는 양상이 보였다.

## 2) Ruthenium tetroxide (RuO<sub>4</sub>) 후 고정 법

대조군에서 각질세포 사이에 전형적인 지질의 다층상

구조(화살표)가 관찰된다(Fig. 4). 초음파 처치군에서 시행한 RuO<sub>4</sub> 염색 소견상 초음파 처치 후 즉시(Fig. 5A,A'), 1 시간 후(Fig. 5B), 3 시간 후(Fig. 5C,C'), 6 시간 후(Fig. 5D,D') 관찰한 피부 모두에서 대조군에 비해서 열공의 확장과 각질세포간 지질의 변화 및 층판소체의 분비 증가가 관찰되었다.

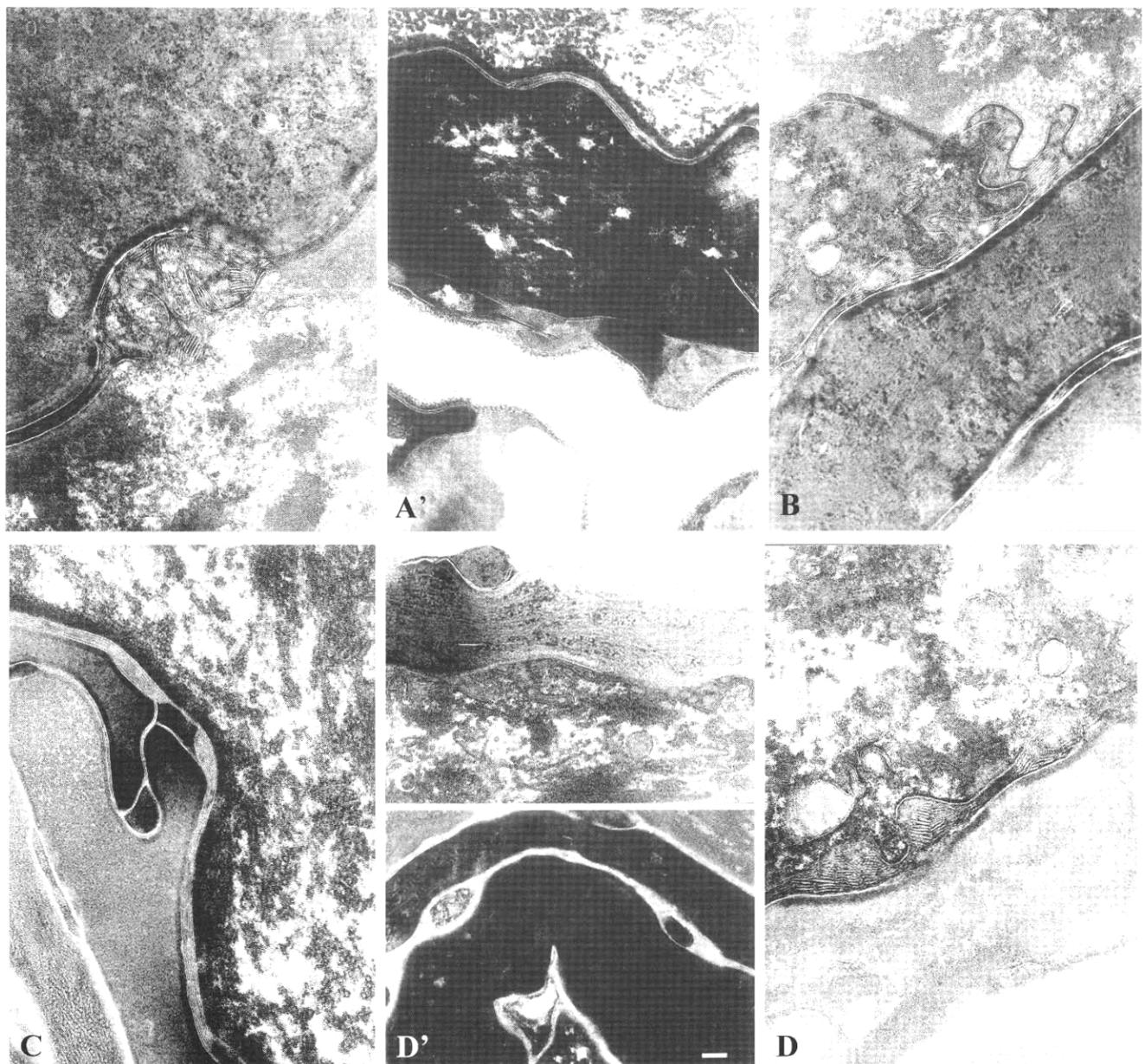
### 3. 초음파 처치 후 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산의 변화

세라마이드는 처치 6시간 후에서 증가하며, 24시간에서도 대조군에 비하여 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 콜레스테롤은 처치 후 3시간에서 증가되어 이후 계속 증가된 양을 보였다. 자유지방산은 처치 후 3시간에서 오히려 약간 감소 하였으나, 이후 6시간, 24시간에서는 대조군에 비하여 증가 되었다(Table 1, Fig. 6).

### 4. HMG CoA reductase와 serine palmitoyl transferase, fatty acid synthase 의 mRNA 양

#### 1) HMG CoA reductase의 mRNA 양

초음파 처치 후 HMG CoA reductase의 mRNA 양은 대조군에 비해 유의 있게 증가하였다( $p<0.05$ )(Fig. 7).



**Fig. 5.** Alteration of SC -SG interface [0 min (5A,A'), 1 hr (5B), and 3 hr (5C,C') and 6 hr (5D,D')] after 3 MHz ultrasound treatment in hairless mouse skin. Lacuna dilatation, partial distension of intercellular layer, loss of multi-lamellar structures of the stratum corneum and increased lamellar body secretion were observed in ultrasound treated hairless mice skin. These findings were observed also in 6 hr post treatment sample. Scale bar: 200 nm

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

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

Unit, % of control, \*  $p < 0.05$  vs. control

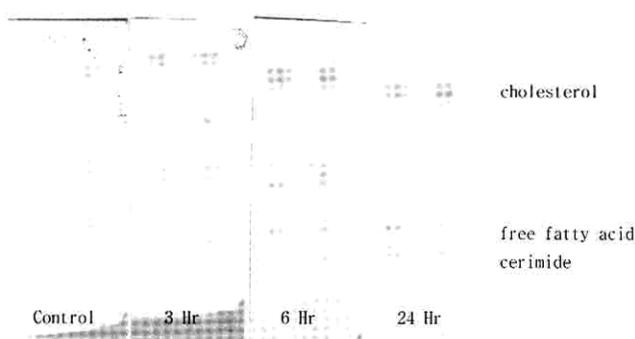


Fig. 6. Changes of ceramide, cholesterol and free fatty acid after 3 hr, 6 hr, and 24 hr treatment of ultra sound

## 2) Serine palmitoyl transferase (SPT)의 mRNA 양

SPT의 mRNA 양은 초음파 처치 1시간 후  $83 \pm 57\%$ 로 다소 감소 하는 양상을 보였으나 통계학적인 의의가 없었다. 초음파 처치 후 3시간 후 SPT의 mRNA 양은  $301 \pm 140\%$ 로 최고로 증가 하였으며 ( $p<0.05$ )로 그 후 감소하는 양상이 관찰 되었다( $p<0.05$ )(Fig. 8).

## 3) Fatty acid synthase (FAS)의 mRNA 양

FAS의 mRNA 양은 초음파 처치군에서 대조군에 비해 증가하는 양상이 관찰 되었다( $p<0.05$ )(Fig. 9).

## 고 찰

표피 투과 장벽의 중요한 기능을 수행하는 표피 지질은 각질층과 과립층 사이에서 총판소체내의 지질이 세포

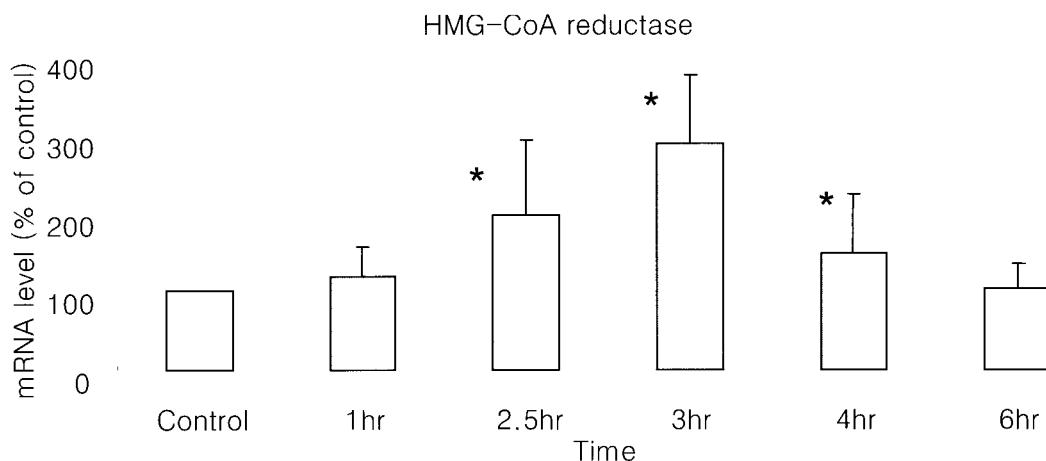


Fig. 7. HMG CoA reductase mRNA level after ultrasound treatment in hairless mouse skin, \*  $p<0.05$  vs. control

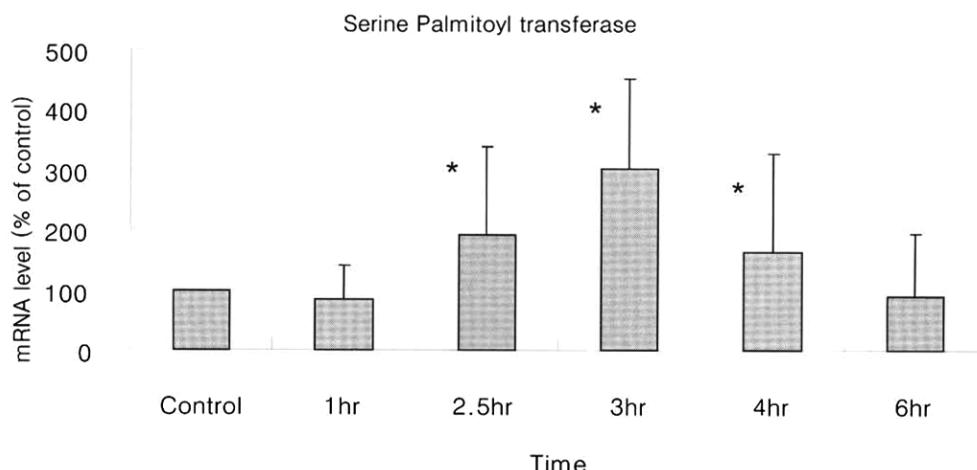


Fig. 8. SPT mRNA level after ultrasound treatment in hairless mouse skin, \*  $p<0.05$  vs. control

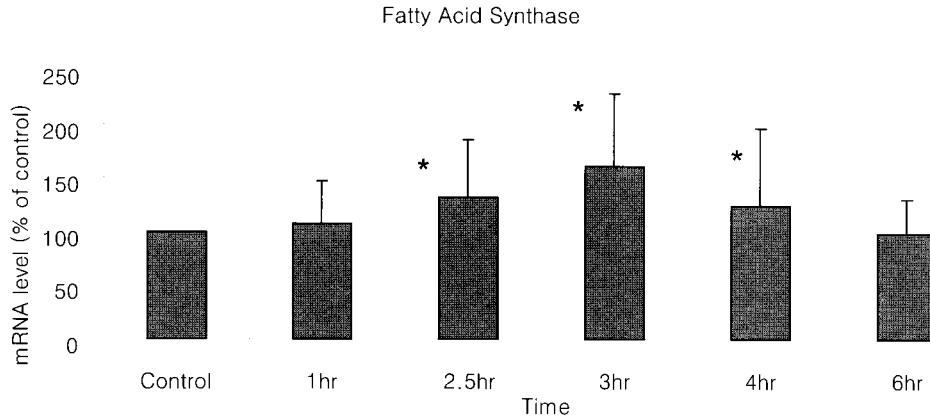


Fig. 9. FAS mRNA level after ultrasound treatment in hairless mouse skin, \*  $p<0.05$  vs. control

외유출에 의해 세포 간격으로 분비된다. 층판소체에는 인지질, glycosphingolipids, 자유 스테롤 등의 지질과 지질 가수분해 효소, glycosidase, 단백효소, 산 인산분해효소 등의 효소들과 당이 존재한다<sup>2,9,23,24</sup>. 각질층의 지질은, 층판소체에 존재하는 인지질과 glycosphingolipid들은 거의 없고, 주로 세라마이드와 자유 지방산으로 이루어져 있다. 이는 glycosidase와 지질 가수분해 효소가 인지질을 자유 지방산으로, glycosphingolipid를 세라마이드로 분해하기 때문이다. 콜레스테롤의 경우는 steroid sulfatase에 의해 콜레스테롤 황산염이 콜레스테롤로 변화 되는 것으로 알려져 있다<sup>25</sup>. 표피 지질의 합성 증가에서 표피 콜레스테롤 합성 증가는 HMG CoA reductase의 활성도 증가와 관련 되어 있고, 표피 지방산 합성 증가는 acetyl CoA carboxylase와 fatty acid synthase (FAS) 활성도 증가와 연관이 되고, 표피 세라마이드 합성 증가는 serine palmitoyl transferase (SPT)와 연관된다<sup>26-32</sup>. 표피 지질중 콜레스테롤과 지방산은 sterol element binding protein (SREBP)에 의해 조절 되지만 SPT는 다른 경로를 통하는 것으로 알려져 있다<sup>32</sup>. 칼슘 이온 농도는 기저층과 유극층에서 낮고 상층으로 갈수록 증가 하여 과립층에서 가장 높다<sup>34,35</sup>. 피부 투과 장벽의 손상 시 표피 상부로부터 칼슘 이온의 손실이 일어나 표피 내의 칼슘 기울기의 변화가 나타난다. 이때 칼슘기울기의 변화는 표피 투과 장벽의 손상에 의한 경표피 수분 손실양의 증가에 의한 수동적인 칼슘 이온의 손실에 의한 것이다<sup>4</sup>. 선택적으로 과립층에서 칼슘 이온의 양을 변화 시킬 수 있는 초음파와 이온영동은 피부 투과 장벽의 손상 없이 층판소체의 분비를 유도 하므로<sup>5,19,35,36</sup>, 칼슘 이온은 층판소체의 분비와 피부 투과 장벽 회복에 중요한 조절 인자로 생각된다<sup>34,37</sup>. 그 외에도 여러 사이토카인들이 관여하는 것으로 알려졌으나 최근의 연구에 의하면 칼슘 이온 변화에 따른 이차적인 변화로 생각된다<sup>38</sup>. 즉 기존의 연구에서는 급성 표피 투과 장벽 손

상 후 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-1 $\beta$ , GM-CSF등 여러 사이토카인들이 증가함을 관찰하여 표피 투과 장벽 손실이 사이토카인 분비를 증가 시킨다고 하였으나<sup>8,39,40</sup>, 사이토카인들의 증가는 수증기 불투과막에 의한 피부 밀폐에 의해 억제 되지 않으므로 경표피 수분 손실양의 증가 자체가 사이토카인 증가의 신호가 아니라고 생각된다<sup>41,42</sup>. 그러므로 표피 투과 장벽 손상, 즉 경표피 수분 손실량 증가 보다는 칼슘 기울기의 변화가 사이토카인의 발현에 작용함을 주장하였다<sup>38</sup>. 이는 표피 투과 장벽 손상 후 수증기 불투과막의 피부 밀폐가 피부 투과 장벽의 정상적인 회복을 지연시키며 표피 내의 칼슘 기울기의 정상 복귀도 지연시키는 기전과 연관 된다<sup>43</sup>.

초음파는 다음과 같은 몇 가지 기전에 의해 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 초음파는 미세관을 압박하고 미세 거품의 진동과 음향 흐름을 생성하여 세포막의 투과도와 이차 전령인 adenylyl cyclase의 활성에 직접 영향을 주므로 이온과 단백질의 이동에 변화가 생기고 유전자 발현에 대한 세포내 신호 전달에 변화를 유발하여 치료 작용을 나타낸다<sup>44</sup>. 초음파에 의해 세포 표면에 가해지는 압력이 양이온 통로의 'stretch receptor'에 영향을 주어 세포내 양이온의 농도를 변화 시켜 유전자 발현을 조절하는 신호 전달 체계에 변화를 유발할 수 있다<sup>45</sup>. 초음파에 의한 기계적 자극은 세포 외 기질에 부착되어 있는 세포 골격에 변화를 일으켜 유전자 발현과 세포 대사에 영향을 줄 수 있다<sup>46</sup>. 또한 초음파에 의한 온도 상승이 세포에 변화를 줄 수 있다<sup>47</sup>.

지금까지 피부과학 영역에서 초음파에 대한 연구는 대부분 약물의 경표피 흡수에 대한 것이다<sup>48-51</sup>. 초음파의 피부에 대한 작용은 보통 네 가지로 설명하고 있다. 첫째, 가스 거품의 진동에 의한 공동화(cavitation) 현상, 둘째, 체온 상승으로 인한 열 효과, 셋째, 대류 전달(convective transport) 유발, 네 번째, 초음파에 의해 유발된 압력의 변

화에 의한 기계적 효과로 이야기 한다<sup>49,51</sup>. 초음파는 주파수에 따라 나눌 수 있는데 연구마다 차이가 있으나 초고주파(10-20 MHz), 고주파(3-10 MHz), 중주파(0.7-3.0 MHz), 그리고 저주파(18-100 kHz)로 구분 한다<sup>48,51</sup>. 고주파 초음파는 주로 임상 영상 쪽에 사용되기 때문에 진단 초음파라고도 한다<sup>51</sup>. 중주파 초음파는 주로 물리 치료에 사용되기 때문에 치료 초음파라 하며, 저주파는 암 치료나 결석파괴, 백내장 적출, 지방 흡입 등에 사용하며, 주로 파괴 목적으로 사용된다<sup>51</sup>. 경표피 약물 전달은 고주파와 저주파 초음파가 주로 사용된다<sup>50,51</sup>.

본 실험에서 초음파 처치군과 대조군 사이에 경표피 수분 손실량의 차이는 없었다. calcium ion capture cytochemistry를 이용하여 표피내 칼슘 이온의 변화를 관찰한 결과 초음파 처치 후 과립층의 칼슘은 감소하고 기저층의 칼슘은 증가하는 양상이 관찰 되었으며 6시간 이후에는 회복되는 양상을 보였다. RuO<sub>4</sub> 후 고정법을 이용하여 각질층 지질의 구조를 관찰한 결과 초음파 처치군에서 각질층의 정상적인 지질 다층막 구조를 분열 시켰고 과립층과 각질층 경계부위에서 충판소체의 분비를 유도 시켰다. 이러한 소견은 48시간 후에 정상으로 회복되었다. 초음파 처치 후 표피 지질의 양을 측정한 결과 세라마이드는 처치 6시간 후에서 증가하고, 24시간에서도 대조군에 비하여 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 콜레스테롤은 처치 후 3시간에서 증가되어 이후 계속 증가 되었다. 자유지방산은 처치 6시간 후에서 증가하고, 24시간에서도 대조군에 비하여 증가되었다. 표피 지질 합성에 관여하는 효소들의 mRNA의 양을 측정한 결과 초음파 처치 후 대조군에 비해서 HMG CoA reductase, SPT, FAS의 mRNA가 증가되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 초음파는 표피 투과 장벽에 손상을 주지 않으면서 표피의 칼슘 기울기에 변화를 초래하며, 충판소체에서 지질 분비를 유도하며, 표피 지질의 합성을 증가시키는 것으로 생각할 수 있었다. 초음파가 피부 질환에 대한 효과와 표피 지질의 형태학적 변화에도 불구하고 경표피 수분 손실량은 변화가 유발되지 않았다. 향후 이러한 기전에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

## 결 론

초음파 처치 후 경표피 수분 손실양은 차이가 없었으며, 칼슘 이온은 상부 표피에서는 감소하고 하부 표피에서는 증가하는 양상을 보였으며, 각질 세포간 다층 지질막의 분리와 충판소체의 분비 증가가 관찰 되었다. HMG CoA reductase와 SPT, FAS의 mRNA양과, 콜레스테롤, 세라마이드, 자유 지방산의 양은 증가 되었다. 이상의 결과

초음파가 칼슘 이온의 표피 기울기의 변화를 유발하였고, 이러한 변화에 의해 표피 지질 합성에 관여하는 효소들의 mRNA가 증가 되고 표피 지질의 합성이 증가 되는 것으로 사료된다. 향후 초음파의 피부 질환 치료에의 적용 가능성 여부와, 표피 지질의 형태학적 변화가 나타남에도 불구하고 경표피 수분 손실량에 변화가 없는 이유를 규명할 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Hadley NF. Lipid water barriers in biological systems. *Prog Lipid Res* 1989;28:1-33
- Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1-26
- Epstein EH Jr, Williams ML, Elias PM. Steroid sulfatase, X-linked ichthyosis, and stratum corneum cell cohesion. *Arch Dermatol* 1981;117:761-772
- 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
- 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
- Nicolaides N. Skin lipid: their biochemical uniqueness. *Science* 1974;186:19-26
- Jackson SM, Wood LC, Lauer S, Taylor JM, Cooper AD, Elias PM et al. Effect of cutaneous permeability barrier disruption on HMG CoA reductase, LDL receptor, and apolipoprotein E mRNA levels in the epidermis of hairless mice. *J Lipid Res* 1992;33:1307-1314
- Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 1991;87:1668-1673
- Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 1992;24:57-82
- Elias PM. Dynamics of the epidermal barrier: New implications for percutaneous drug delivery, topical therapeutic and disease pathogenesis. *Prog Dermatol* 1992;2:1-8
- Doan N, Reber P, Megbaji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:409-419

12. Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin Sci* 1968;35:273-285
13. Dyson M. Role of ultrasound in wound healing. In: Kloth LC, McCulloch JM, Feedar JR eds. *Wound healing: Alternatives in management*. Philadelphia: PA, Davis, 1990:259-285
14. Paul BJ, LaFratta CW, Dawson AR, Canestrari R. Use of ultrasound in the treatment of pressure sores in patient with spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil* 1960;41:438-441
15. Hogan RDB, Burke KM, Frankin TD. The effect of ultrasound on the microvascular hemodynamics in skeletal muscle: Effects during ischaemia. *Microvasc Res* 1982;23:370-379
16. Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendoza S, Mendisa S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol* 1990;16:801-807
17. Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatol Rehabil* 1975;14:237-249
18. Lee SW, Choi EH. The effect of ultrasound on the skin of aged and young mice. *Kor J Invest Dermatol* 2001;8: 209-218
19. Cho NJ, Jiang S, Choi EH, Ahn SK, Lee SH. Calcium gradient and skin barrier changes after sonophoresis (Abst). *J Invest Dermatol* 2000;114:838
20. Ponec M, Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int J of Pharm* 2000;203:211-235
21. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-917
22. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest* 1992;90:482-487
23. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Methods for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy methyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1977;74:5350-5357
24. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80:44-49
25. Elias PM, Williams ML, Maloney ME, Bonifas JA, Brown BE, Grayson S et al. Stratum corneum lipids in disorders of cornification: Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J Clin Invest* 1984;74:1414-1421.
26. Holleran WM, Man MQ, Gao WN, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function; Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest* 1991;88:1338-1345
27. Proksch E, Elias PM, Feingold KR. Regulation of 3 hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in murine epidermis: modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements. *J Clin Invest* 1990;85:874-882
28. Ottay KA, Wood LC, Grunfeld C, Elias PM, Feingold KR. Cutaneous permeability barrier disruption increases fatty acid synthetic enzyme activity in the epidermis of hairless mice. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 401-405
29. Holleran WM, Feingold KR, Man MQ, Gao WN, Lee JM, Elias PM. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J Lipid Res* 1991;32:1151-1158
30. Harris IR, Farrel AM, Grunfeld C, Holleran WM, Elias PM, Feingold KR. Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in epidermis. *J Invest Dermatol* 1997;109:783-787
31. Stachowitz S, Alessandrini F, Abeck D, Ring J, Behrendt H. Permeability barrier disruption increases the level of serine palmitoyl transferase in human epidermis. *J Invest Dermatol* 2002;119:1048-1052
32. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991;96:523-526
33. Harris IR, Farrel AM, Holleran WM, Jackson S, Grunfeld C, Elias PM et al. Parallel regulation of sterol regulatory element binding protein-2 and the enzymes of cholesterol and fatty acid synthesis but not ceramide synthesis in cultured human keratinocytes and murine epidermis. *J Lipid Res* 1998;39:412-422
34. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. The lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992;270:503-512
35. Lee SH, Elias PM, Feingold KR. A role of ions in

- barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol* 1994;103:976-979
36. Choi EH, Ahn SK, Lee SH. The effect of changed in the epidermal calcium gradient by repeated iontophoresis on the skin barrier. *J Skin Barrier Res (Korean)* 2001; 3:62-67.
37. Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. *Cosmet Toilet* 1997;112: 49-59
38. Choi EH, Kim MJ, Yeh BI, Ahn SK, Lee SH. Iontophoresis and sonophoresis stimulate epidermal cytokine expression at energies that do not provoke a barrier abnormality: lamellar body secretion and cytokine expression are linked to altered epidermal calcium levels. *J Invest Dermatol* 2003;121:1138-1144
39. Wood LC, Elias PM, Calhaoun C. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from preformed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996;106:397-403
40. Wood LC, Elias PM, Sequeria-Martin SM. Occlusion lowers cytokine mRNA levels in essential fatty acid deficient and normal mouse epidermis but not after acute barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1994;103:834-838
41. Wood LC, Feingold KR, Sequeria-Martin SM. Barrier function coordinately regulates epidermal IL-1 and IL-1 receptor antagonist mRNA levels. *Exp Dermatol* 1994;3: 261-266
42. Man MQ, Wood LC, Elias PM. Cutaneous barrier repair and pathophysiology following barrier disruption in IL-1 and TNF type I receptor deficient mice. *Exp Dermatol* 1999;8:261-266
43. Ahn SK, Hwang SM, Jiang S, Choi EH, Lee SH. The changes of epidermal calcium gradient and transitional cells after prolonged occlusion following tape stripping in the murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 189-195
44. Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo JA, Weiner LS. Low intensity pulsed ultrasound increase calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc* 1989;12:15-21
45. Sachs F. Mechanical transduction by membrane ion channel: A mini reviews. *Mol Cell Biochem* 1991;104: 57-60
46. Wang N, Burtler JP, Ingber DE, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993;260:1124-1127
47. Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB, The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vivo' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasound* 1980;18:33-37
48. Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficacy, mechanism and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002;243:1-15
49. Joshi A, Raje J. Sonicated drug delivery. *J Con Real* 2002;83:13-22
50. Alvarez-Roman R, Merino G, Kalia AN, Naik A, Guy RH. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. *J Pharm Sci* 2003;92:1138-1146
51. Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery. *DDT* 2004;15:670-676