

레티노이드와 Benzalkonium
Chloride에 의한 접촉피부염의
비교

연세대학교 대학원
의학과
이 정 은

레티노이드와 Benzalkonium Chloride에 의한 접촉피부염의 비교

지도 교수 김 수 찬

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의학과

이 정 은

이정은의 석사 학위 논문을
인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

먼저 본 논문을 완성하기까지 모든 과정에 끊임없는 격려와 세심한 배려로 지도해 주시고 피부과 의사로서, 의학을 연구하는 학자로서 모범이 되어주신 김수찬 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 논문의 진행 과정 중에 관심과 조언을 아끼지 않으신 유 욱 교수님, 이광훈 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 연구 진행의 전 과정에 많은 도움을 주신 피부과학 교실원, 이정선 연구원, 김문영 대학원생께도 감사를 드립니다.

마지막으로 부족한 저를 지금까지 키워주시고 사랑과 격려를 아끼지 않으신 부모님과 학업과 수련에 최선을 다할 수 있도록 배려해 주신 시부모님, 바쁜 와중에도 많은 격려와 지원을 해 준 사랑하는 남편과 제 삶에서 가장 소중한 아들 현빈이와 태중의 둘째 아이에게 무한한 사랑과 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

저자 씀

차 례

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 실험 동물	6
2. 실험 방법	6
가. 접촉피부염 유발	6
나. 경표피 수분 소실(TEWL)과 귀두께(ear thickness)의 측정	6
다. 광학현미경적 검사	6
라. 면역조직화학적 검사	7
마. 전자현미경 검사	7
바. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)	8
III. 결과	10
1. 경표피 수분 소실(TEWL)의 변화	10
2. 귀두께(ear thickness)의 변화	10
3. 병리조직학적 변화	11
4. 면역조직화학적 검사 소견	12
5. 전자현미경 소견	15
6. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 결과	17
IV. 고찰	24
V. 결론	30
참고 문헌	32
영문 요약	37

++그림 차례

그림 1. 경표피 수분 소실(TEWL)의 변화	10
그림 2. 귀두께(ear thickness)의 변화	11
그림 3. 병리조직학적 변화	12
그림 4. 면역조직화학적 검사 소견-PCNA	13
그림 5. 면역조직화학적 검사 소견-involucrin	13
그림 6. 면역조직화학적 검사 소견-loricrin	14
그림 7. 면역조직화학적 검사 소견-filaggrin	14
그림 8. 전자현미경 소견-각질층의 변화	15
그림 9. 전자현미경 소견-충판소체의 변화	16
그림 10. 전자현미경 소견-각질교소체의 변화	17
그림 11. RT-PCR로 증폭한 각 cDNA의 agarose gel electrophoresis	18
그림 12. IL-1 α 의 RT-PCR 결과	19
그림 13. IL-8의 RT-PCR 결과	19
그림 14. TNF- α 의 RT-PCR 결과	20
그림 15. COX-1의 RT-PCR 결과	21
그림 16. COX-2의 RT-PCR 결과	21
그림 17. HB-EGF의 RT-PCR 결과	22
그림 18. CD44의 RT-PCR 결과	23

표 차례

표 1. RT-PCR primer 염기 서열	9
------------------------------------	---

레티노이드와 Benzalkonium Chloride에 의한 접촉피부염의 비교

레티노이드는 비타민 A의 천연 또는 합성 유도체를 말하며 레티노이드의 생체 내 활성 형태인 레티노인산은 여러 피부질환의 치료에 사용되고 있다. 레티노인산은 각질형성세포(keratinocyte)의 증식과 분화를 조절할 뿐만 아니라, 피지선 억제, 세포간 접합 분자 발현의 감소, 항염증 작용 및 항노화 작용이 있어 여드름, 건선, 피부암, T세포 림프종 및 광노화의 치료에 이용된다. 그러나 레티노이드를 국소 도포제로 사용하는 많은 환자들은 '레티노이드 피부염(retinoid dermatitis)'이라고 불리는 일종의 자극성 접촉피부염을 경험하게 되는데 특징적으로 홍반, 인설, 건조, 작열감, 소양감 등을 호소하며 환자들 중 다수가 이러한 불편감 때문에 치료를 중단한다.

레티노이드에 의한 접촉피부염은 일반적인 자극제에 의한 접촉피부염과 다른 기전에 의한 것으로 알려져 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 레티노이드에 의한 자극성 피부염은 레티노인산 수용체인 RAR- γ 에 의한 것으로 알려져 있으며 이것은 RXR- α 와 이종접합체를 형성하여 표적 유전자의 전사를 시작하는 신호를 전달한다. 그러나 이러한 신호 전달이 어떠한 기전을 통하여 자극성 피부염을 일으키는지는 명확하지 않다. 최근에는 이러한 과정에 사이토카인과 cyclooxygenase (COX) 같은 효소들이 관여할 것으로 생각하고 있다. 또한 레티노이드에 의한 표피의 증식에 heparin binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)와 CD44가 관여한다는 보고가 있다.

본 연구에서는 레티노이드에 의한 접촉피부염이 일반적인 자극제에 의한 접촉피부염에 비해 특이한 점이 있는지를 밝히기 위해서 무모 생쥐의 피부에 레티노이드와 자극제인 benzalkonium chloride (BKC)를 국소 도포한 뒤 경표피 수분 소실(transepidermal

water loss, TEWL)과 귀두께를 측정하고 병리조직 검사, 면역조직화학 검사, 전자 현미경 검사 등을 시행하였고 IL-1 α , IL-8, TNF- α 와 같은 사이토카인, COX와 같은 효소, HB-EGF 같은 성장 인자 및 CD44의 mRNA 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하여 비교해 보았다.

실험 결과 TEWL과 귀두께는 레티노이드와 BKC를 도포한 피부에서 기제를 도포한 피부에 비해 증가하였으며 두 물질 간의 차이는 없었다. 병리조직학적으로 레티노이드를 도포한 피부가 BKC를 도포한 피부에 비해 표피의 증식이 현저하였으며 면역조직화학 검사 상 표피의 증식과 분화가 레티노이드에서 BKC보다 증가된 소견을 보였으나 분화 표지자 중 filaggrin은 오히려 감소되었다. 전자현미경 검사에서는 레티노이드를 도포한 피부에서 BKC를 도포한 조직에 비해 각질층의 탈락과 층판소체의 분비 증가, 각질세포(corneocyte) 간의 접합 감소와 퇴화된 각질교소체(corneodesmosome)가 보였다. RT-PCR 결과 IL-8, TNF- α , COX-2가 레티노이드와 BKC를 도포한 피부에서 각 기제를 도포한 피부에 비해 증가하였으나 두 물질 간의 차이는 없었다. HB-EGF의 경우 레티노이드를 도포한 피부만 기제 및 BKC를 도포한 피부에 비해 증가한 소견을 보였고 CD44의 경우 레티노이드와 BKC를 도포한 피부와 기제를 도포한 피부 사이에 차이가 없었다.

본 연구 결과 레티노이드에 의한 접촉피부염과 대표적인 자극제인 BKC에 의한 접촉피부염에서 염증성 사이토카인, COX-2와 같은 염증 유발 물질은 동일하게 증가하지만, HB-EGF의 증가, 표피의 급격한 증식, filaggrin의 불완전한 발현, 각질교소체의 퇴화, 각질층의 조기탈락 등은 레티노이드 피부염에 특이한 소견으로 생각되며 이로 인한 피부 장벽의 손상과 염증 반응이 레티노이드 피부염의 중요한 기전으로 생각된다.

핵심되는 말 : 레티노이드, benzalkonium chloride, 접촉피부염

레티노이드와 Benzalkonium Chloride에 의한 접촉피부염의 비교

<지도 교수 김 수 찬>

연세대학교 대학원 의학과

이 정 은

I. 서론

레티노이드(retinoid)는 비타민 A의 천연 또는 합성 유도체를 말하며 천연 레티노이드와 방향환 수에 따라 제 1,2,3 세대 합성 레티노이드로 분류된다¹. 이러한 레티노이드의 생체 내 활성 형태를 레티노인산(retinoic acid)이라고 하며 레티노인산은 다양한 작용으로 여러 피부질환의 치료에 사용되고 있다^{2,3}. 레티노인산은 각질형성세포(keratinocyte)의 증식과 분화를 조절할 뿐만 아니라, 피지선 억제, 교소체와 같은 세포간 접합 분자 발현의 감소, 면역 조절 및 항염증 작용 등이 있어 여드름, 건선 등의 피부 질환이나 피부암, T세포 림프종 등의 악성 종양의 치료에도 이용된다^{4,5}. 또한 자외선 조사로 생성된 콜라겐 분해 효소인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 생성을 억제할 수 있기 때문에 광노화의 치료제로서 사용되기도 한다⁶⁻⁹.

이러한 레티노이드를 국소 도포 치료제로 사용하는 많은 환자들은 ‘레티노이드 피부염(retinoid dermatitis)’이라고 불리는 일종의 자극성 접촉 피부염을 경험하게 되는데 특징적으로 홍반, 인설, 건조, 작열감, 소양감 등을 호소하며 레티노이드 국소 도포로 치료 효과를 볼 수 있는 환자들 중 다수가 이러한 불편감 때문에 치료를 중단한다¹⁰⁻¹². 국소 도포 레티노인산을 사용한 환자들 중 일부는 이러한 증상들이 1-2주 뒤에 소실되기도

하지만¹²⁻¹⁶ 0.05% 레티노인산을 이용한 장기간의 임상 연구에서는 약 반수의 환자들이 치료 24주 후에도 여전히 홍반, 인설, 작열감을 느끼는 것으로 보고하고 있다¹⁷.

레티노이드는 sodium lauryl sulfate (SLS)나 benzalkonium chloride (BKC) 같은 세제(detergent)들과는 다른 기전에 의해 자극성 피부염을 유발하리라 생각되어 왔으며 레티노이드에 의한 자극성 피부염이 레티노이드의 약리학적 작용과는 관계가 없는 비특이적인 부작용인지, 또는 레티노이드가 특이 수용체에 신호를 전달하여 자극성 피부염을 유발하는 것인지에 대한 연구들이 진행되어 왔다¹⁰. 최근의 연구들에 의하면 레티노이드 피부염은 수용체의 활성화를 통한 것으로 밝혀지면서 다른 일반적인 자극제들에 의한 피부염과 다른 기전에 의한 것으로 생각하고 있다¹¹. 레티노인산은 세포의 핵 내에서 레티노인산 수용체(retinoic acid receptor, RAR)와 결합하여 복합체를 형성하고 이것이 전사인자로 작용하여 표적 유전자의 전사를 시작하는 부위인 프로모터의 레티노인산 반응 부위(retinoic acid response element, RARE)에 결합하여 표적 유전자의 발현을 유도함으로써 여러가지 기능을 나타낸다¹⁸⁻²⁰. 현재까지 알려진 바에 의하면 레티노이드에 의한 자극성은 3가지의 레티노인산 수용체(RAR- γ , α , β) 중 RAR- γ 에 의한 것으로 알려져 있으며 RAR- γ 는 인간 피부의 레티노인산 수용체의 90%를 차지하며 RXR (retinoid X receptor)- α 와 이종접합체(heterodimer)를 형성하여 신호를 전달한다²¹⁻²⁴. 그러나 레티노이드와 레티노이드 수용체와의 결합을 통한 신호 전달이 어떠한 기전을 통하여 자극성 피부염을 일으키는지는 명확하지 않다. 최근에는 이러한 자극성 피부염을 유발하는 데 사이토카인이 관여할 것으로 생각하고 있으며 실제로 레티노이드를 국소 도포한 생쥐의 피부에서와 레티노이드를 첨가한 배양 각질형성세포에서 IL-1과 IL-8이 증가하는 것이 보고되었다^{25,26}.

Cyclooxygenase (COX)는 prostaglandin을 생성하는 효소로서 COX-

1은 대부분의 세포에서 지속적으로 표현하고 있으며 세포의 항상성 유지에 관여하나, COX-2는 염증이나 세포 분열 등이 있으면 발현이 증가된다. 레티노이드에 의해 COX의 발현이 증가하는지 여부는 논란의 여지가 많으나 lipopolysaccharide가 있을 때 9-*cis* 레티노인산(9-*cis* retinoic acid)에 의해 prostaglandin E synthase와 COX-2가 증가하였다는 보고가 있었다²⁷.

레티노이드를 국소 도포한 뒤 관찰되는 표피의 증식은 heparin binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) 때문으로 알려져 있으며 실제로 배양 각질형성세포에 레티노이드를 처리한 뒤 HB-EGF mRNA가 증가하였다는 보고가 있었다²⁸. 또한 생쥐의 피부에 레티노이드를 도포한 뒤 표피의 기저상층 각질형성세포(suprabasal keratinocyte)에서 HB-EGF의 발현이 증가되어 있으며^{29,30} 생체 내 인간 표피에서도 HB-EGF와 amphiregulin이 EGF 수용체를 활성화하여 표피의 증식을 일으킨다는 보고도 있었다³¹. 또한 최근의 연구에 따르면 세포외 기질(extracellular matrix)의 구성 성분인 hyaluronate와 이것의 수용체인 CD44가 레티노이드를 도포하였을 때 증가하였으며 CD44는 pro-HB-EGF와 연결되어 있어 레티노이드에 의한 표피의 증식과도 연관성이 있다고 하였다³².

이에 본 연구는 레티노이드에 의한 접촉피부염이 세제인 BKC에 의한 접촉피부염과 다른 기전에 의한 것이라는 가설 아래 레티노이드와 BKC가 표피에 미치는 영향을 비교하였다. 무모 생쥐(hairless mouse)의 피부에 레티노이드와 자극제인 BKC를 국소 도포한 뒤 경표피 수분 소실(transepidermal water loss, TEWL)과 귀두께(ear thickness)를 측정하였고 조직학적 검사, 전자현미경 검사를 시행하였으며 표피의 증식과 분화 표지자들의 발현 정도를 비교해 보고, IL-1 α , IL-8, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인과 염증과 연관이 있는 COX 같은 효소, HB-EGF 같은 성장 인자, CD44의 발현을 비교해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

생후 6주 된 암컷 무모 생쥐를 각각 8마리씩 2군으로 나누어 동일한 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 내외의 온도와 $50\pm 10\%$ 의 습도가 유지되는 공간에서 키웠다. 실험이 진행되는 동안 생쥐들은 사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

2. 실험 방법

가. 접촉피부염 유발

레티노이드 군의 8마리의 암컷 무모 생쥐들의 왼쪽 귀와 등에는 2% *all-trans*-retinol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 도포하고 오른쪽 귀와 등에는 기제인 ethanol (Merck, Germany)을 도포하였다. BKC 군의 8마리의 암컷 무모 생쥐들의 왼쪽 귀와 등에는 2.5% BKC (Sigma-Aldrich)를 도포하고 오른쪽 귀와 등에는 기제인 acetone (DUSAN Pure Chemicals Co., Korea)을 도포하였다. 각 용액은 $20\ \mu\text{l}$ 씩 하루 1회 4일 간 도포하였다.

나. 경표피 수분 소실(TEWL)과 귀두께(ear thickness)의 측정

각 군의 무모 생쥐의 등에서 Tewameter (Courage+Khazaka, Köln, Germany)를 이용하여 경표피 수분 소실 양을 측정하고 dial thickness gauge (Peacock, Japan)를 이용하여 귀의 두께를 측정하였다.

다. 광학현미경적 검사

약물 및 기제를 도포한 피부 조직을 얻은 뒤 포르말린에 고정 후 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매 과정을 거쳐서 Hematoxylin-eosin stain을 하여 광학현미경으로

관찰하였다.

라. 면역조직화학적 검사

연속 절편을 poly-L-lysine 처리된 slide에 붙인 후 xylene으로 탈랍시키고 알코올에 탈수시킨 후 5분 간 3% H₂O₂에 처리하여 내인성 peroxidase를 차단하였다. 5분 간 증류수로 수세한 후 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에 담구어 5분 간 극초단파로 가열하였다. 가열이 끝나면 15분 간 냉장고에서 식힌 후 증류수로 씻고 PBS로 5분 간 수세하였다. 일차 항체는 monoclonal mouse anti-human proliferative cell nuclear antigen (PCNA) (DAKO, Glostrup, Denmark), polyclonal rabbit anti-mouse involucrin (Convance Research Products, Denver, PA, USA), loricrin (Convance), filaggrin (Convance)을 이용하고 1:100으로 희석하여 반응시켰다. 항체 반응 시간은 실온에서 45분 간 하였으며 이차 항체는 LSAB 방법을 이용한 CAP-PLUS kit (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 이용하였으며 발색은 NovaRED substrate kit (Vector, Burlingame, CA, USA)를 이용하였고 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

마. 전자현미경 검사

0.5 mm³의 피부 조직을 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90 mM potassium oxalate, 1.4% sucrose가 함유된 고정액에 넣고 하루 밤 동안 고정한 후 고정액을 제거하고 조직을 두 시간 동안 얼음을 채운 osmium/pyroantimonate에 후고정한 후 pH 10의 차가운 증류수로 10분간 세척하였다. 조직들은 0.1M sodium cacodylate buffer에 10분간 행구고 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 전자현미경(Joel, Tokyo, Japan)으로

관찰하였다.

바. 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

각 군의 무모 생쥐의 귀를 연골을 중심으로 반으로 가른 후 20 mM EDTA/PBS 용액에 37℃에서 1시간 저장하여 표피와 진피를 forcep을 이용하여 분리하고 등에서도 약물 및 기제를 도포한 피부 조직을 절제한 후 20 mM EDTA/PBS 용액에 37℃에서 1시간 처리하여 표피와 진피를 forcep을 이용하여 분리하여 표피 조직을 얻었다. 표피 조직에서 acid-guanidium thiocyanate-phenol chloroform (AGPC)를 응용한 trizol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 분리한 RNA를 formaldehyde denaturing gel에 전기영동하여 28s, 18s band를 확인하고 BioPhotometer (Eppendorf, Germany)를 이용해 정량하여 최종 농도를 표본마다 1 µg/ml로 일정하게 임의 조정하였다. RNA-PCR kit ver. 3.0 (Takara, Otsu, Japan)을 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. cDNA 증폭 조건을 간단히 기술하면 94℃에서 30초 간 denature하고 60℃에서 30초 간 annealing한 다음 72℃에서 1분 30초 간 extension하였으며 이를 35주기 반복하였다. PCR 산물을 4% Nusieve 3:1 agarose gel (FMC, Rockland, ME, USA)로 전기영동하여 이를 GelDoc2000 documentation system (Biorad, Hercules, CA, USA)을 이용해서 DNA 양을 비교 분석하였다. 이 때 모든 조직에서 발현되는 house keeping gene인 GAPDH를 control로 사용하였다. RT-PCR을 시행한 사이토카인, COX, HB-EGF와 CD44의 primer는 표 1과 같다.

표 1. RT-PCR primer 염기 서열

	Forward primer	Reverse primer
IL-1 α	CTCTAGAGCACCATGCTACAGAC	TGGAATCCAGGGGAAACACTG
IL-8(KC)	ATAACGCGTATGCAGCGCCTATCGCCAATGAGCTG	CCAGATCTTACTTGGGGACACCTTT
TNF- α	GGCAGGTCTACTTTAGAGTCATTGC	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG
COX1	AGTCGCAGGAGTCTCTCGCTCTGG	CAGGAAATGGGTGAACGAGGGGCT
COX2	TTCAAAGAAGTGCTGGAAAAGGTTCT	AGATCATCTCTACCTGAGTGTCTT
HB-EGF	TCCGTCTGTCTTCTTGTCATCGT	TAGCCACGCCCAACTTCACT
CD44	GGCAGAAGAAAAAGCTGGTG	GGAATGACGTCTCCAATCGT
GAPDH	AATGGTGAAGGTCGGTGTGA	CTGGAAGATGGTGATGGGC

III. 결과

1. 경표피 수분 소실(TEWL)의 변화

생쥐의 등에서 측정한 TEWL은 retinol을 도포한 피부가 기제인 ethanol을 도포한 피부에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p<0.0001$). 또한 BKC를 도포한 피부가 기제인 acetone을 도포한 피부에 비해 통계학적으로 유의한 TEWL의 증가를 보였다($p=0.005$). 그러나 레티노이드와 BKC 간의 TEWL은 통계학적으로 차이가 없었다($p=0.115$)(그림 1).

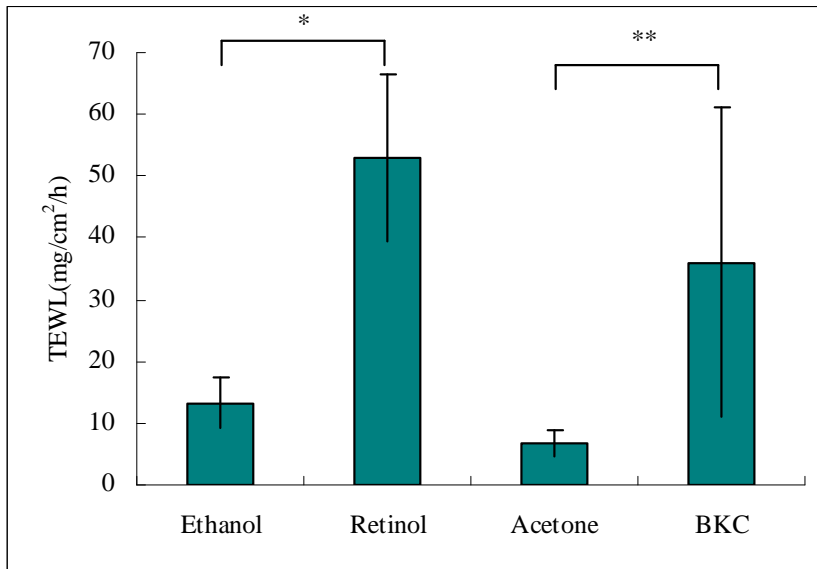


그림 1. 경표피 수분 소실(TEWL)의 변화. Retinol과 BKC 모두 각 기제에 비해서 TEWL의 증가를 보였다. 그러나 retinol과 BKC 사이의 TEWL은 통계학적으로 차이가 없었다. * $p<0.0001$, ** $p=0.005$, Student's t-test

2. 귀두께(ear thickness)의 변화

Retinol을 도포한 귀에서 기제인 ethanol을 도포한 귀에 비해

통계학적으로 유의한 귀두께의 증가를 보였다($p=0.001$). 또한 BKC를 도포한 귀에서 기제인 acetone을 도포한 귀에 비해 통계학적으로 유의한 귀두께의 증가를 보였다($p<0.0001$). 그러나 레티노이드와 BKC 사이에서는 통계학적으로 유의한 귀두께의 차이를 보이지 않았다($p=0.366$)(그림 2).

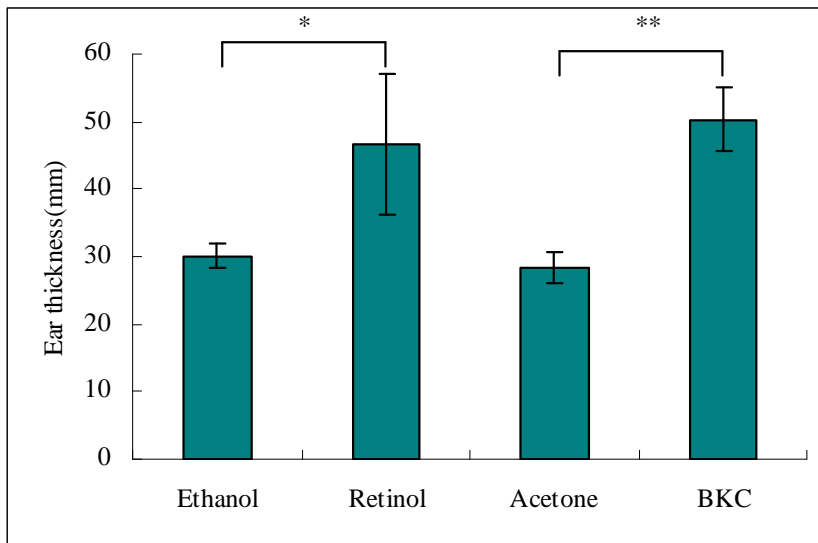


그림 2. 귀두께(ear thickness)의 변화. Retinol과 BKC 모두 각 기제에 비해 심한 귀부종을 유발하였다. 그러나 retinol과 BKC 사이의 귀부종의 차이는 없었다. * $p=0.001$, ** $p<0.0001$, Student's t test

3. 병리조직학적 변화

Hematoxylin-eosin stain에서 ethanol과 acetone을 도포한 피부에서는 표피의 두께도 정상 표피와 비슷하였으며 염증 세포도 거의 없었다. 그러나 retinol과 BKC를 도포한 피부에서는 표피의 증식과 염증 세포의 침윤이 나타났다. 그러나 retinol을 도포한 피부에서는 표피의 증식이 BKC를 도포한 피부보다 더 현저하게 나타났다(그림 3).

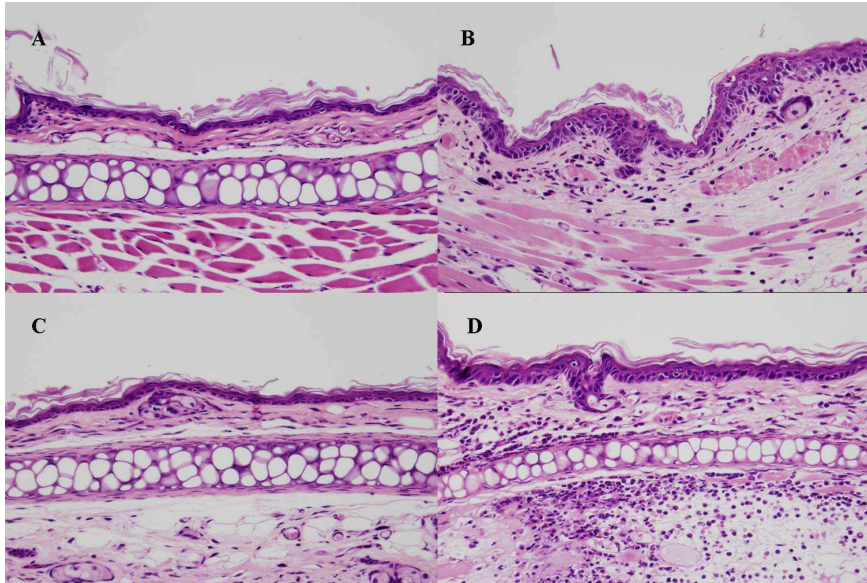


그림 3. 병리조직학적 변화. (A) ethanol (B) retinol (C) acetone (D) BKC. 표피의 증식과 진피의 염증 세포의 침윤이 retinol과 BKC를 도포한 피부에서 나타났으며 표피의 증식은 retinol을 도포한 피부에서 더욱 현저하게 나타났다. (Hematoxylin-eosin stain, X 400)

4. 면역조직화학적 검사 소견

표피의 증식 정도를 알기 위해 PCNA를 이용한 면역조직화학 염색 소견 상 ethanol과 acetone은 정상 표피와 비교해서 차이가 없었다. 반면 retinol과 BKC의 경우 기저층에서 PCNA 발현이 증가되어 표피의 증식이 나타난 것을 알 수 있었으며 이것은 retinol에서 좀 더 뚜렷하게 나타났다(그림 4). 표피의 분화 정도를 알기 위한 involucrin, loricrin, filaggrin을 이용한 면역조직화학 염색 소견 상 ethanol과 acetone은 역시 정상 표피와 차이가 없었고 retinol과 BKC의 경우 유극층 상부와 과립층에서 involucrin, loricrin, filaggrin의 발현이 증가되어 분화가

증가되었다는 것을 알 수 있었다. Retinol과 BKC의 비교에서 involucrin과 loricrin은 BKC를 도포한 피부보다 retinol을 도포한 피부에 비해 증가되어 있었으며 특히 loricrin은 retinol을 도포한 피부에서 현저히 증가되었다. 그러나 filaggrin의 경우 오히려 BKC에서 retinol보다 좀 더 증가되었다(그림 5,6,7).

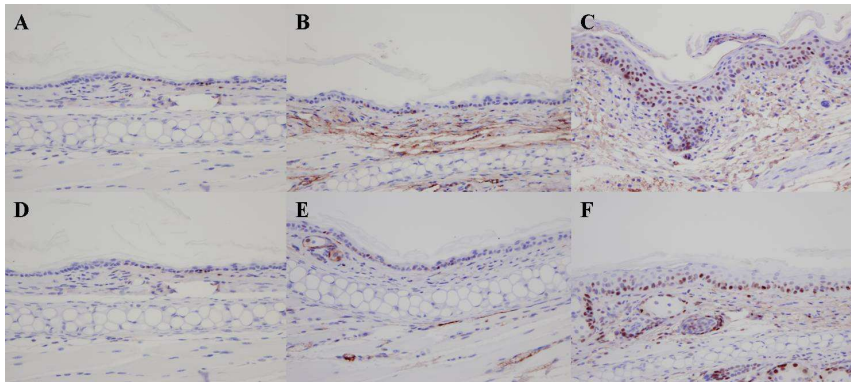


그림 4. 면역조직화학적 검사 소견-PCNA. (A), (D) 정상 표피 (B) ethanol (C) retinol (E) acetone (F) BKC. PCNA 표현은 retinol과 BKC를 도포한 피부에서 정상이나 각 기제들을 도포한 피부보다 증가하였으며 retinol을 도포한 피부에서 BKC를 도포한 피부에 비해 좀 더 증가되었다. (X 400)

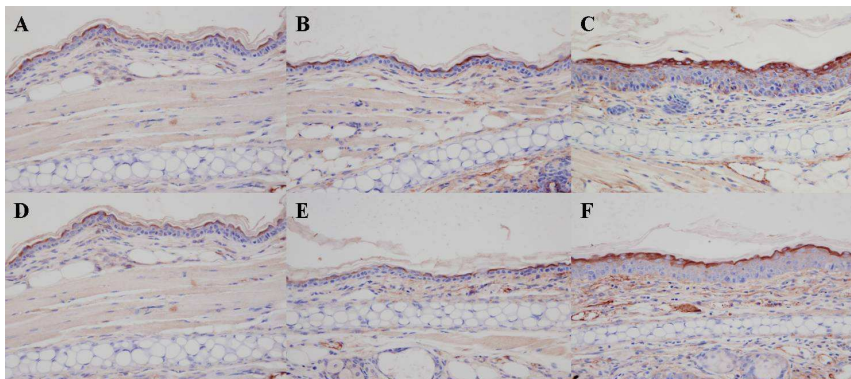


그림 5. 면역조직화학적 검사 소견-involucrin. (A), (D) 정상 표피 (B) ethanol (C) retinol (E) acetone (F) BKC. Involucrin의 표현은

retinol과 BKC를 도포한 피부에서 증가하였으며 retinol을 도포한 피부에서 BKC를 도포한 피부보다 약간 더 증가되었다. (X 400)

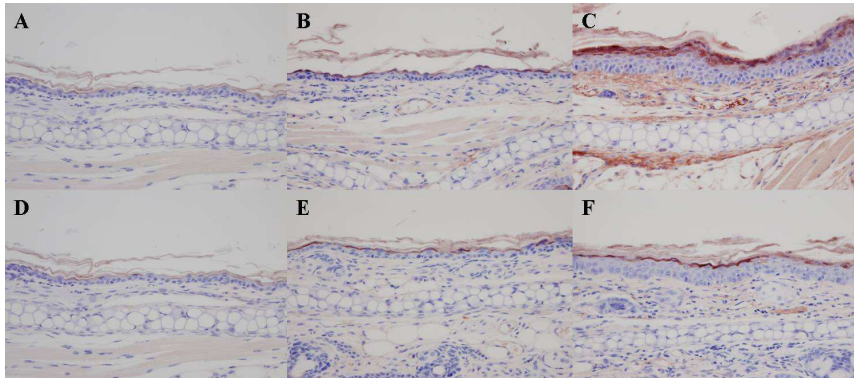


그림 6. 면역조직화학적 검사 소견-loricrin. (A), (D) 정상 표피 (B) ethanol (C) retinol (E) acetone (F) BKC. Loricrin의 표현은 retinol과 BKC를 도포한 피부에서 증가되어 있으나 retinol을 도포한 피부에서 BKC를 도포한 피부보다 현저하게 증가되었다. (X 400)

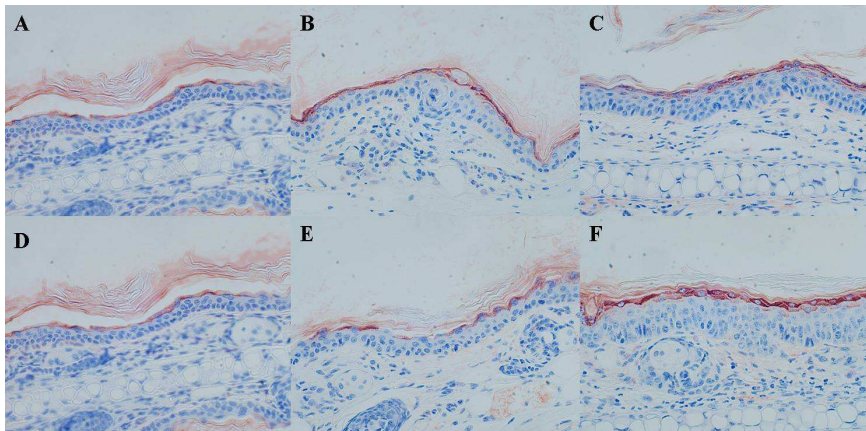


그림 7. 면역조직화학적 검사 소견-filaggrin. (A), (D) 정상 표피 (B) ethanol (C) retinol (E) acetone (F) BKC. Filaggrin의 표현은 retinol과 BKC를 도포한 피부에서 증가되었으나 BKC를 도포한 피부에서 retinol을 도포한 피부에 비해 약간 더 증가되었다.

(X400)

5. 전자현미경 소견

각 기제들과 BKC를 도포한 조직에 비해 retinol을 도포한 피부에서 각질세포(corneocyte)의 탈락이 증가되었으며(그림 8) 층판소체(lamellar body)의 분비가 증가되었다(그림 9). 또한 각질세포 간의 간격이 증가되어 있었으며 퇴화된 각질교소체(corneodesmosome)의 형태를 보였다(그림 10).

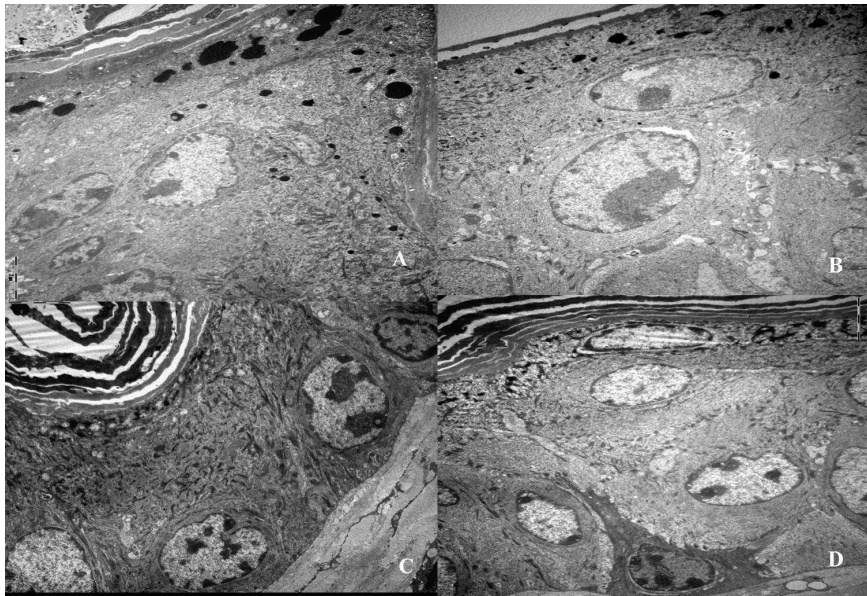


그림 8. 전자현미경 소견-각질층의 변화. (A) ethanol (B) retinol (C) acetone (D) BKC. Retinol을 도포한 피부에서 다른 조직에 비해 각질층의 탈락이 증가되어 각질층의 두께가 얇아져 있다.

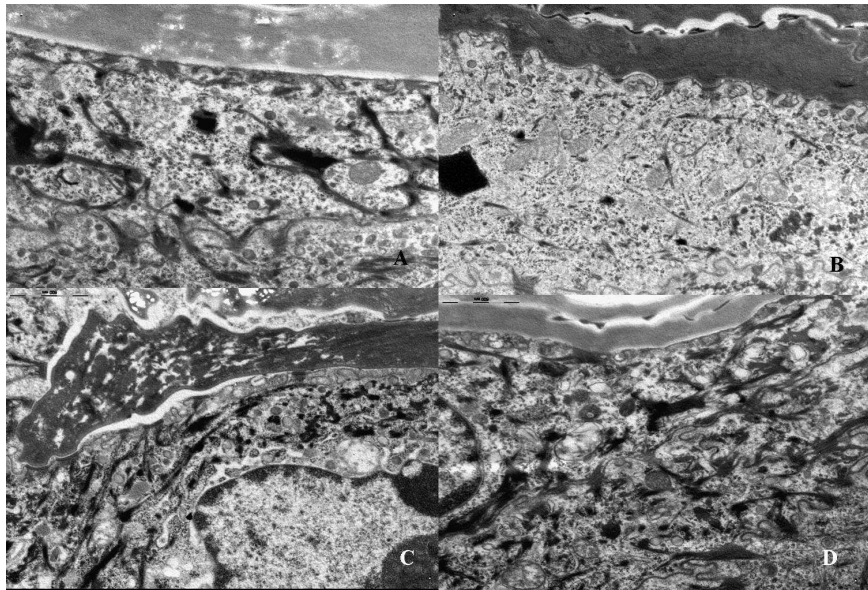


그림 9. 전자현미경 소견-충판소체의 변화. (A) ethanol (B) retinol (C) acetone (D) BKC. Retinol을 도포한 조직에서 다른 조직에 비해 충판소체의 분비가 증가되어 있다.

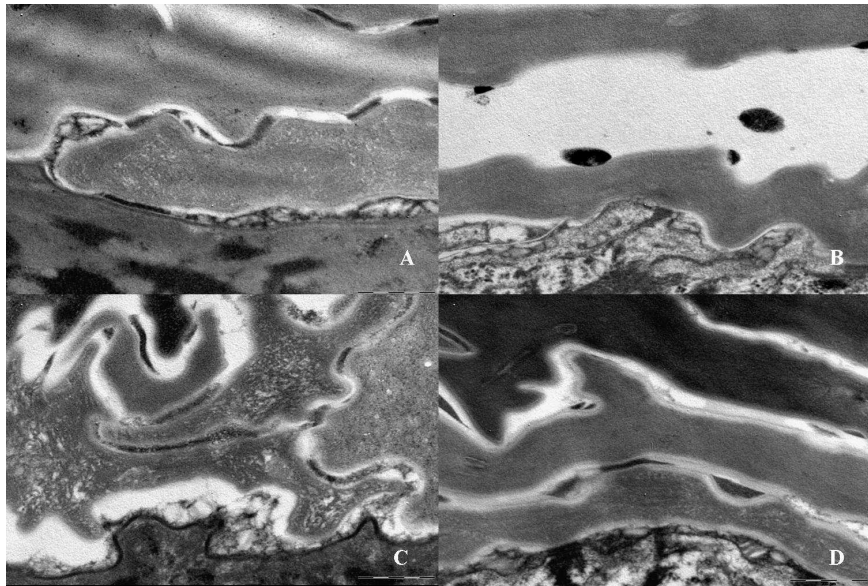


그림 10. 전자현미경 소견-각질교소체의 변화. (A) ethanol (B) retinol (C) acetone (D) BKC. Retinol을 도포한 조직에서 다른 조직에 비해 각질세포 간의 간격이 증가되어 있으며 퇴화된 각질교소체를 보였다.

6. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 결과

IL-1 α , COX-1, CD44는 retinol, BKC, 그리고 각 기제들 간의 비교에서 의미 있는 차이는 없었으나(그림 12,15,18), IL-8, TNF- α , COX-2는 retinol과 BKC가 각 기제에 비해 의미 있는 증가를 보였으며(그림 13,14,16) HB-EGF의 경우 retinol은 기제에 비해 증가하였으나 BKC는 기제와 별다른 차이가 없었다(그림 17).

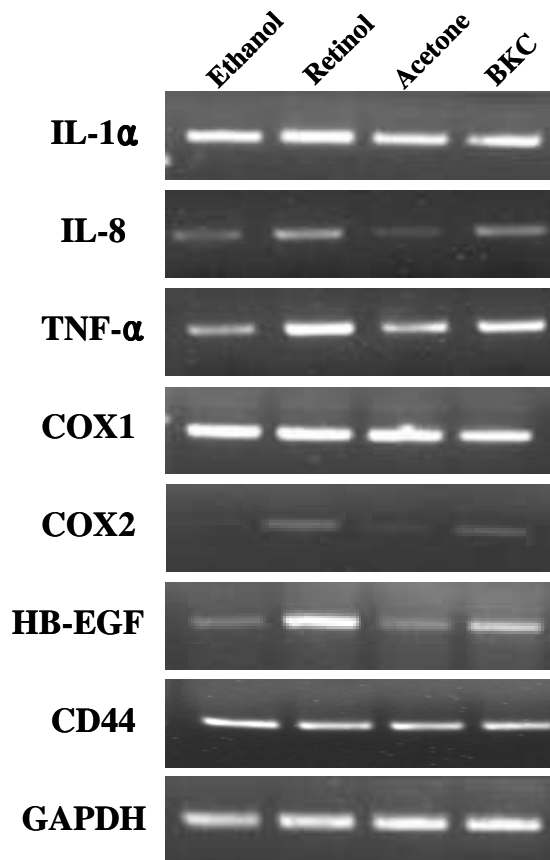


그림 11. RT-PCR로 증폭한 각 cDNA의 agarose gel electrophoresis

가. IL-1 α 의 변화

IL-1 α 는 retinol, BKC, 그리고 각 기제인 ethanol과 acetone에서 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.145$, ANOVA)(그림 12).

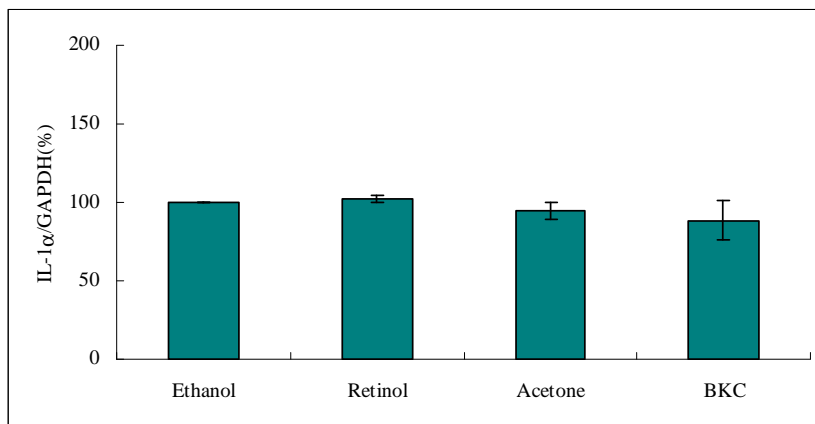


그림 12. IL-1 α 의 RT-PCR 결과. Retinol, BKC, 그리고 각 기체인 ethanol과 acetone에서 유의한 차이를 보이지 않았다. $p=0.145$, ANOVA

나. IL-8의 변화

IL-8은 retinol이 ethanol에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였고($p=0.012$), BKC도 acetone에 비해 의미있게 증가하였다($p=0.006$). 그러나 retinol과 BKC 간의 유의한 차이는 없었다($p=0.157$)(그림 13).

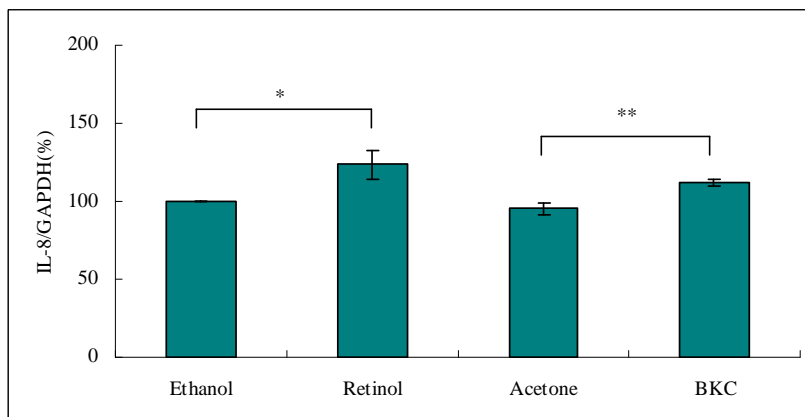


그림 13. IL-8의 RT-PCR 결과. Retinol과 BKC가 각 기체인 ethanol과 acetone에 비해 의미있게 증가하였으나 retinol과 BKC 간의 유의한 차이는 없었다. * $p=0.012$, ** $p=0.006$, Student's t-test

다. TNF- α 의 변화

TNF- α 도 IL-8과 마찬가지로 retinol이 ethanol에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였고($p=0.001$), BKC도 acetone에 비해 의미있게 증가하였다($p=0.046$). 그러나 레티노이드와 BKC 사이의 의미있는 차이는 없었다($p=0.460$)(그림 14).

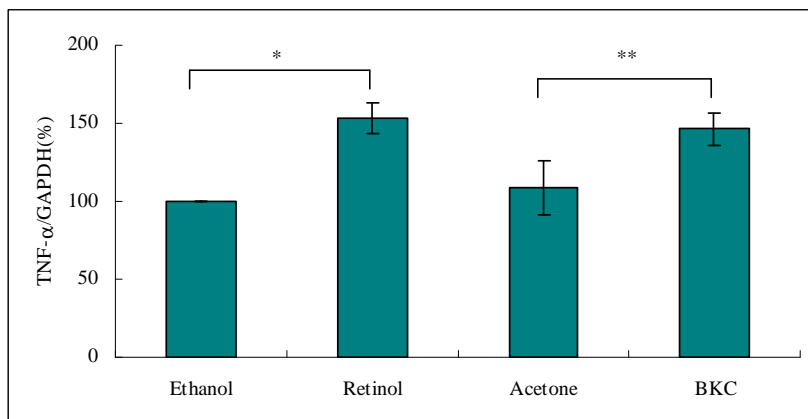


그림 14. TNF- α 의 RT-PCR 결과. Retinol과 BKC는 각 기체인 ethanol과 acetone에 비해 의미있는 증가를 보였으나 retinol과 BKC 간의 유의한 차이는 없었다. * $p=0.001$, ** $p=0.046$, Student's t-test.

라. COX-1의 변화

COX-1은 retinol, BKC, 그리고 각 기체인 ethanol과 acetone에서 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.997$, ANOVA)(그림 15).

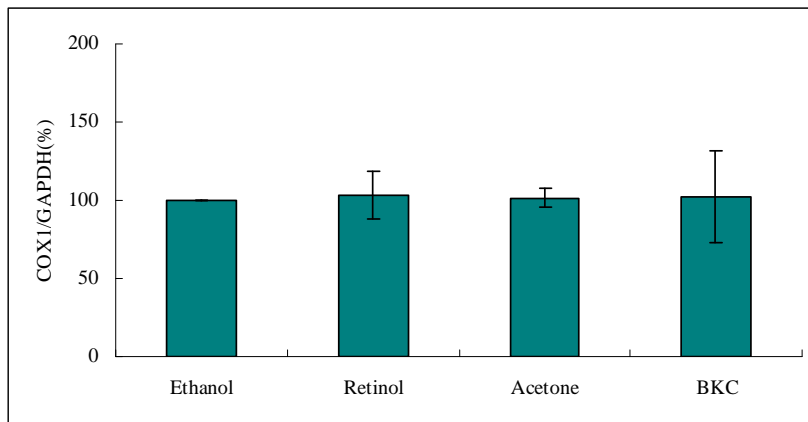


그림 15. COX-1의 RT-PCR 결과. Retinol, BKC, 그리고 각 기체인 ethanol과 acetone에서 유의한 차이를 보이지 않았다. $p=0.997$, ANOVA

마. COX-2의 변화

COX-2는 COX-1과는 달리 retinol이 ethanol에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였고($p<0.0001$), BKC도 acetone에 비해 의미있게 증가하였다($p=0.005$). 그러나 retinol과 BKC 사이에 의미 있는 차이는 없었다($p=0.221$)(그림 16).

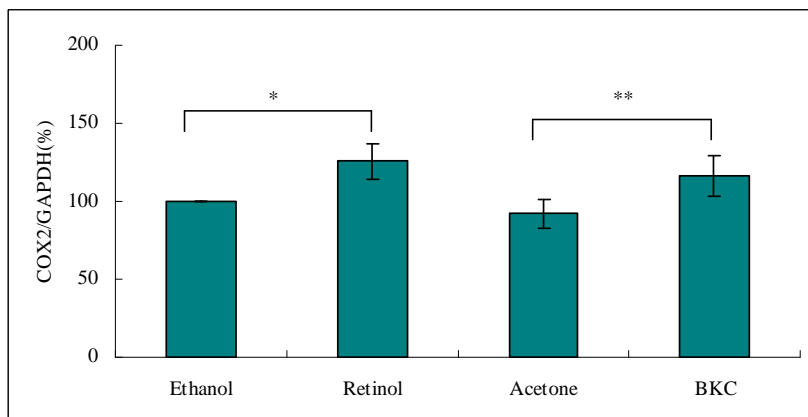


그림 16. COX-2의 RT-PCR 결과. Retinol과 BKC는 각 기제인 ethanol과 acetone에 비해 의미있는 증가를 보였으나 retinol과 BKC 간에 유의한 차이는 없었다. * $p < 0.0001$, ** $p = 0.005$, Student's t-test.

바. HB-EGF의 변화

HB-EGF는 retinol에서 기제인 ethanol에 비해 증가하였으나($p = 0.002$), BKC는 기제인 acetone에 비해 유의한 증가는 없었다($p = 0.063$). 또한 retinol과 BKC를 비교하였을 때 retinol에서 BKC에 비해 HB-EGF의 증가가 통계학적으로 유의하게 나타났다($p = 0.003$)(그림 17).

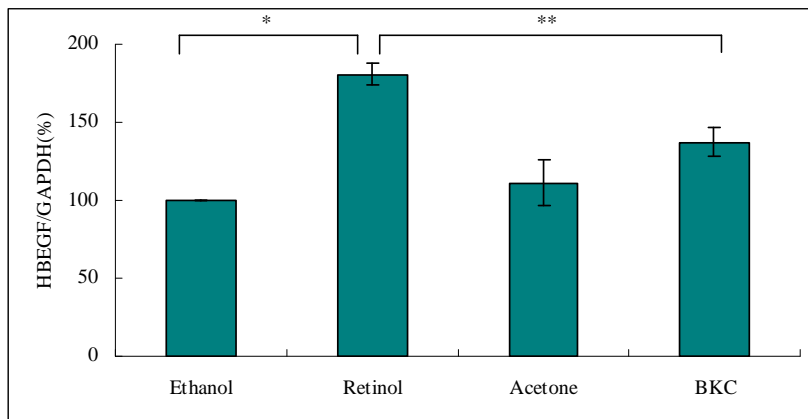


그림 17. HB-EGF의 RT-PCR 결과. Retinol은 기제인 ethanol에 비해 의미있는 증가를 보였으며 BKC와의 비교에서도 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 그러나 BKC는 기제인 acetone에 비해 유의한 증가를 보이지 않았다. * $p = 0.002$, ** $p = 0.003$, Student's t-test.

사. CD44의 변화

CD44는 retinol과 BKC, 각 기제들인 ethanol과 acetone에서

유의한 차이가 없었다($p=0.564$, ANOVA)(그림 18).

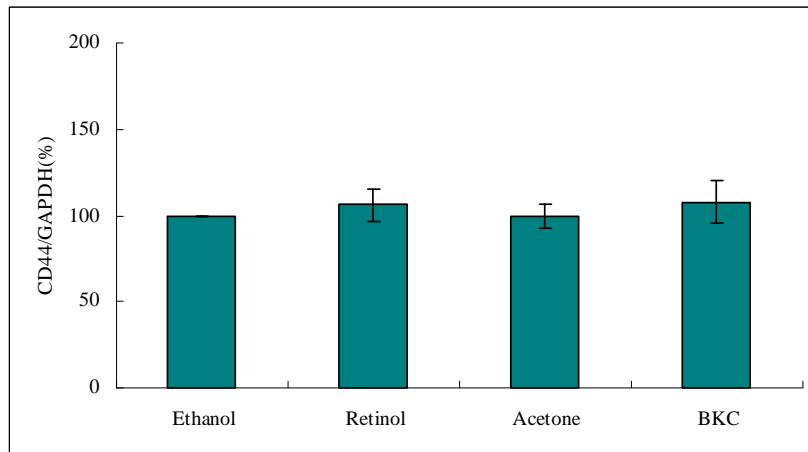


그림 18. CD44의 RT-PCR 결과. Retinol, BKC, 그리고 각 기체인 ethanol과 acetone에서 유의한 차이를 보이지 않았다. $p=0.564$, ANOVA

IV. 고찰

레티노이드는 각질형성세포의 증식과 분화를 조절할 뿐만 아니라, 피지선 억제, 세포 간 접합 분자 발현의 감소, 면역 조절 및 항염증 작용 등이 있어 여드름, 건선, 피부암, T세포 림프종 등의 다양한 피부 질환의 치료에 사용되는 약물이다^{4,5}. 또한 자외선 조사로 생성된 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 생성을 억제하며 TGF- β 의 증가를 통한 섬유아세포(fibroblast)의 증식을 일으켜 진피의 콜라겐의 증가시키는 효과가 있기 때문에 광노화의 국소 도포 치료제로서 많이 사용된다^{6,9}.

그러나 레티노이드를 국소 도포제로 사용하는 많은 환자들은 ‘레티노이드 피부염’이라고 불리는 일종의 자극성 접촉 피부염을 경험하게 되는데 특징적으로 홍반, 인설, 건조, 작열감, 소양감 등을 호소하며 레티노이드 국소 도포로 치료 도중에 많은 환자들이 이러한 불편감 때문에 치료를 중단한다¹⁰⁻¹².

자극성 접촉피부염은 산이나 알칼리, 유기 용매 또는 세제에 의해서 피부장벽이 손상되며 각질형성세포가 손상받고 사이토카인 등 염증 유발 물질이 분비됨으로써 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나 레티노이드 도포로 인한 피부 장벽의 손상이나 자극성 접촉피부염의 기전에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 레티노이드는 SLS나 BKC와 같은 세제들과는 다른 기전으로 자극성 피부염을 유발하는 것으로 생각되며 레티노이드에 의한 자극성 피부염이 레티노이드의 약리적 작용과는 관계가 없는 비특이적인 부작용인지, 아니면 레티노이드가 특이 수용체에 신호를 전달하여 나타내는 약리적 작용인지에 대한 연구들이 진행되어 왔다¹⁰. 최근의 연구들에 의하면 레티노이드 피부염은 수용체의 활성화와 같은 약리작용을 통한 것으로 밝혀지면서 다른 일반적인 자극제들에 의한 피부염과 다른 기전에 의해 발생하는 것으로 생각되고 있다¹¹. 레티노인산은 세포의 핵 내에서 레티노인산 수용체(RAR)와 결합하여 복합체를 형성하고 이것이 전사 인자로 작용하여 표적 유전자의 프로모터의 레티노인산 반응 부위에

결합함으로써 표적 유전자의 발현을 유도하여 여러가지 기능을 나타낸다¹⁸⁻²⁰. 현재까지 알려진 바에 의하면 레티노이드에 의한 자극성은 3가지의 레티노인산 수용체(RAR- γ , α , β) 중 RAR- γ 에 의한 것으로 알려져 있으며 RAR- γ 는 인간 피부의 레티노인산 수용체의 90%를 차지하며 RXR- α 와 이종접합체를 형성하여 신호를 전달한다²¹⁻²⁴. RAR- γ 에 의한 신호 전달과 레티노이드에 의한 자극성에 대한 연관성은 유전자 변형 생쥐 모델을 통해서 알 수 있는데 RAR- γ 을 결핍시킨 생쥐에서 레티노인산을 국소 도포하였을 때 표피의 증식이나 인설 등이 일어나지 않았다²². 그러나 레티노이드와 레티노이드 수용체와의 결합을 통한 신호 전달이 어떠한 기전을 통하여 자극성 피부염을 일으키는지는 명확하지 않다.

본 연구에서 레티노이드와 BKC를 도포한 피부에서 TEWL과 귀부종을 비교한 결과 비슷한 정도의 자극성 피부염을 유발하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 자극성 피부염 유발 방법이 레티노이드와 BKC에 의한 자극성 피부염을 비교 관찰하는데 적합함을 알 수 있었다.

레티노이드에 의한 자극성 피부염의 기전으로 생각할 수 있는 가설은 다음과 같다. 첫째, 일반적인 자극성 피부염과 같이 사이토카인 및 COX와 같은 염증 유발 물질이 분비되기 때문일 것으로 생각할 수 있다. 실제로 레티노이드를 국소 도포 후 생쥐의 피부에서와 레티노이드를 첨가한 배양 각질형성세포에서 IL-1과 IL-8이 증가하는 것이 보고되었다^{25,26}. 그러나 또 다른 연구에서는 레티노이드를 도포한 인간 피부에서 IL-1 α 와 IL-1 β mRNA 증가가 없어 레티노이드에 의한 자극성에 IL-1이 관여하는 지에 대해서는 명확하지 않다³³. 본 연구에서도 IL-1 α 의 발현은 레티노이드와 BKC 모두 각 기제에 비해 증가하지 않았다. IL-8은 CXC 케모카인에 속하는 것으로서 각질형성세포 뿐 아니라 단핵구, 대식세포, 섬유아세포, 혈관내피세포 등 다양한 세포에서 생산되며 세균의 lipopolysaccharide (LPS), 바이러스, 다른 염증성

사이토카인 등에 의해 유도된다³⁴. 본 연구에서는 염증 유발 사이토카인인 IL-8, TNF- α 발현이 레티노이드와 BKC를 도포한 피부에서 각 기체에 비해 모두 증가되었으며 레티노이드와 BKC 간의 차이는 없었다. COX는 prostaglandin을 생성하는 효소로서 COX-1은 대부분의 세포에서 지속적으로 표현하고 있으며 세포의 항상성 유지에 관여하나, COX-2는 염증이나 세포 분열 등이 있으면 표현이 증가된다. 레티노이드에 의해 COX의 발현이 증가하는지 여부는 논란의 여지가 많으나 LPS가 있을 때 9-*cis* 레티노인산(9-*cis* retinoic acid)에 의해 prostaglandin E synthase와 COX-2가 증가하였다는 보고가 있었다²⁷. 그러나 U937 단핵구 세포에 레티노인산(all-*trans*-retinoic acid 혹은 9-*cis*-retinoic acid)을 처리하였을 때 COX-1은 증가하나 COX-2는 증가하지 않았다는 보고가 있었으며³⁵ 인간의 피부 편평상피세포암 세포에서는 오히려 종양 세포에서 증가되어 있던 COX-2의 발현이 9-*cis*-레티노인산으로 억제되었다는 보고가 있었다³⁶. 본 연구에서는 COX-1은 변화가 없었으며 COX-2는 레티노이드와 BKC에서 증가되었으며 두 물질 간의 차이는 없었다. 이와 같이 염증성 사이토카인인 IL-8과 TNF- α 및 COX-2의 증가 등이 레티노이드 뿐만 아니라 BKC에 의한 자극성 접촉피부염에서도 공통적으로 관찰되어 레티노이드에 특이한 현상은 아님을 알 수 있었다.

둘째, 레티노이드 피부염에서 관찰되는 각질세포 조기 탈락 및 각질교소체의 이상으로 인한 피부장벽 손상과 이에 따른 염증 반응이 레티노이드에 의한 자극성 접촉피부염의 기전으로 생각할 수 있다. 전자현미경을 통해 각질형성세포를 관찰한 결과는 레티노이드를 도포한 조직에서는 각질층이 많이 탈락되어 두께가 감소되어 있었고 층판소체의 각질층으로의 분비가 증가되어 있었다. 이는 피부장벽 소실을 보상하기 위한 현상으로 생각된다. 또한 각질세포 간의 간격이 증가되어 있으며 각질교소체의 형태도 비정상적이었다. 따라서 레티노이드 국소 도포 시 관찰되는 퇴화된 각질교소체, 각질세포의 조기 탈락 등으로 인한 피부

장벽의 소실이 레티노이드에 의한 자극성 접촉피부염의 기전 중 하나라고 생각된다. 각질세포의 접착에 중요한 역할을 하는 각질교소체는 desmoglein 1, desmocollin 1과 corneodesmosin으로 구성되어 있으며 각질교소체를 분해하는 효소로는 kallikrein 5 (stratum corneum tryptic enzyme, SCTE)와 kallikrein 7 (stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE)이 있다. 레티노이드가 이들 각질교소체 구성 단백질과 kallikrein에 영향을 미쳐 각질세포의 조기 탈락을 유도하리라 가정할 수 있으나 아직 실험적으로 입증된 바는 없다.

셋째, 레티노이드 피부염에서 관찰되는 급격한 각질형성세포의 증식과 이에 따른 불완전한 분화에 의해 피부장벽이 손상되고 염증반응이 유발되는 것이 레티노이드에 의한 자극성 피부염의 기전이라 생각할 수 있다. 레티노이드는 각질형성세포의 증식과 분화에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 생체 내에서와 배양 각질형성세포에서의 효과가 서로 달라 느린 증식 속도를 보이는 생체 내의 정상 각질형성세포의 증식은 촉진하는 반면 건선이나 저칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포와 같이 증식이 항진된 각질형성세포의 증식은 오히려 억제시킨다³⁷⁻⁴⁰. 또한 생체 내에서는 각질형성세포의 말기 분화(terminal differentiation) 과정을 억제하지 않으나 배양 각질형성세포에서는 분화를 억제시키며 동시에 교소체 구성 단백질의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다⁴¹. 본 연구 결과 Hematoxylin-eosin 염색에서는 레티노이드를 도포한 피부에서 표피의 증식이 BKC에 비해서 현저하게 나타났으며 PCNA 면역조직화학 염색을 통해서도 레티노이드가 BKC보다 표피의 증식을 더 많이 유도한다는 것을 확인할 수 있었다. 분화의 표지자인 involucrin과 loricrin은 레티노이드를 도포한 피부에서 BKC보다 발현이 증가되어 있었다. 그러나 또다른 분화 표지자인 filaggrin은 오히려 레티노이드를 도포한 피부에서 BKC를 도포한 피부보다 발현이 감소되었는데 그 이유는 각질형성세포의 분화 과정에서 involucrin, loricrin, filaggrin이 발현되는 시점이 각각 다를 뿐 아니라 급격한 각질형성세포의

증식으로 오히려 분화 표지자 중 일부는 제대로 발현되지 못할 수도 있을 것으로 생각한다.

레티노이드 국소 도포에 의한 표피의 증식은 HB-EGF의 작용에 의한 것으로 알려져 있으며 실제로 배양 각질형성세포에 레티노이드를 처리한 뒤 HB-EGF mRNA가 증가하였다는 보고가 있었다²⁸. 또한 생쥐의 피부에 레티노이드를 도포한 뒤 표피의 기저상층 각질형성세포에서 HB-EGF의 발현이 증가되어 있으며^{29,30}, 생체 내 인간 표피에서도 HB-EGF와 amphiregulin이 EGF 수용체를 활성화하여 표피의 증식을 일으킨다는 보고도 있었다³¹. 또한 최근의 연구에 따르면 세포외 기질의 구성 성분인 hyaluronate와 이것의 표피에 존재하는 수용체인 CD44가 레티노이드를 도포하였을 때 증가하였으며 CD44는 pro-HB-EGF와 연결되어 있어 레티노이드에 의한 표피의 증식과도 연관성이 있다고 하였다³². 본 연구에서도 HB-EGF의 증가가 BKC에서는 관찰되지 않았으나 레티노이드에서는 현저한 증가가 나타나 HB-EGF가 레티노이드에 의한 표피의 증식에 관여할 것이라는 것을 알 수 있었다. 그러므로 HB-EGF 증가와 이에 따른 각질형성세포의 증식은 레티노이드의 특이한 약리 작용이라고 할 수 있으며 각질형성세포의 급격한 증식과 이에 따른 불완전한 분화 및 피부장벽 손상이 레티노이드 피부염의 한가지 기전으로 생각된다. 그러나 레티노이드에 의한 진피의 기질 증가와 관련될 것이라 생각되는 CD44의 경우 retinaldehyde (RAL)을 생쥐에 도포한 뒤 표피에서 CD44의 표현이 증가되고 hyaluronate synthase의 mRNA가 증가하였다는 이전의 보고와는 달리 본 연구에서는 retinol을 국소 도포한 피부에서 CD44 발현의 증가를 보이지 않아 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다³². BKC를 도포한 피부에서도 레티노이드 보다는 정도가 약하지만 표피의 증식이 일어났으며 이는 IL-8에 의한 것으로 생각되며 본 연구에서도 레티노이드와 BKC를 도포한 피부 모두에서 IL-8의 증가를 보였다.

결론적으로 레티노이드와 BKC는 공통적으로 IL-8과 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인과 COX-2 같은 염증 시 증가하는 효소를 증가시켜 자극성 접촉피부염을 유발시킨다고 볼 수 있다. 그러나 HB-EGF의 증가와 이로 인한 각질형성세포의 증식과 각질형성세포의 급격한 증식으로 인한 표피의 불완전한 분화, 각질세포의 조기 탈락과 각질교소체의 이상으로 인해 피부 장벽의 손상 등은 레티노이드 피부염에서 관찰되는 레티노이드의 특이한 작용으로 생각된다.

V. 결론

레티노이드에 의한 접촉피부염이 BKC에 의한 접촉피부염과 어떠한 차이가 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였으며 각 8마리의 무모 생쥐에 2% retinol, 2.5% BKC와 더불어 각 기제들인 ethanol과 acetone을 도포하여 접촉피부염을 유발하였다. 경표피 수분 소실량 및 귀두께를 측정하였고 병리조직 검사, 면역조직화학적 검사 및 전자현미경 검사를 시행하였으며 IL-1 α , IL-8, TNF- α , COX-1, COX-2, HB-EGF, CD44의 mRNA 발현 여부를 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하여 결과를 비교하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 경표피 수분 소실과 귀부중에서는 레티노이드와 BKC 간의 차이가 없었으며 이는 본 실험에서 사용한 접촉피부염 유발 방법이 레티노이드와 BKC에 의한 접촉피부염을 비교하는 데 적합함을 의미한다.
2. 조직학적으로 레티노이드에서 BKC에 비해 표피의 증식이 현저하였고 분화 표피자 중 involucrin과 loricrin은 증가하였으나 filaggrin은 오히려 감소하였다. 전자현미경 검사상 각질층의 탈락과 감소, 층판소체의 분비와 각질세포 간의 접합 감소와 퇴화된 각질교소체를 관찰할 수 있었다.
3. IL-8, TNF- α , COX-2의 발현이 레티노이드와 BKC에서 모두 증가되었으며 이러한 염증 유발 인자의 발현에서는 두 물질 간에 차이가 없었다.
4. HB-EGF는 레티노이드에서만 증가되었으며 BKC와의 비교에서도 유의한 차이가 있어 HB-EGF의 발현 증가가 레티노이드에 의한 접촉피부염에 특이한 것으로 생각하였다.

결론적으로 레티노이드에 의한 접촉피부염과 대표적인 자극제인 BKC에 의한 접촉피부염에서 염증성 사이토카인, COX-2 와 같은 염증 유발 물질은 동일하게 증가하지만, HB-EGF의 증가, 표피의

급격한 증식, filaggrin의 불완전한 발현, 각질교소체의 퇴화, 각질층의 조기 탈락 등은 레티노이드 피부염에 특이한 소견으로 생각되며 이로 인한 피부 장벽의 손상과 염증 반응이 레티노이드 피부염의 중요한 기전으로 생각된다.

참고 문헌

1. Kuenzli S, Saurat JH. Retinoids. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1st ed. Spain: Mosby; 2003.p1991-2006.
2. McDonald CJ. Immunomodulatory and cytotoxic agents in dermatology. In: MacDonalds CJ, editors. *Retinoids*. 1st ed. Brown University, Providence, Rhode Island: Marcel Dekker. INC; 1997.p149-155.
3. Peck GI. Retinoid in dermatology. *Arch Dermatol* 1980;116:283-284.
4. Saurat JH. Retinoid and psoriasis: Novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol* 1999;41:2-6.
5. Levine N. Role of retinoids in skin cancer treatment and prevention. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:62-66.
6. Weiss JS, Ellis CN, Headington JT, Tincoff T, Hamilton TA, Vorhees JJ. Topical tretinoin improves photoaged skin. A double-blind vehicle-controlled study. *JAMA* 1988;259:527-532.
7. Erickson JM, Mawson AR. Possible role of endogenous retinoid (Vitamin A) toxicity in the pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *J Theor Biol* 2000;206:47-54.
8. Racke AE, Racke MK. Retinoic acid promotes the development of Th2 like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol* 2002;215:54-60.
9. Ballou M, Wang W, Xiang S. Modulation of B cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:73-81.
10. Webster GF, Berson D, Stein LF, Fivenson DP, Tanghetti EA, Ling M. Efficacy and tolerability of once-daily tazarotene 0.1% gel versus once-daily tretinoin 0.25% gel in the treatment of facial acne vulgaris: A randomized trial. *Cutis* 2001;67:4-9.
11. Leyden JJ, Lowe N, Kakita L, Draeos Z. Comparison of treatment of

acne vulgaris with alternate-day applications of tazarotene 0.1% gel and once-daily applications of adapalene 0.1% gel: A randomized trial. *Cutis* 2001;67:10-16.

12. Leyden JJ, Grove GL. Randomized facial tolerability studies comparing gel formulations of retinoids used to treat acne vulgaris. *Cutis* 2001;67:17-27.
13. Leyden JJ. Treatment of photodamaged skin with topical tretinoin: An update. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:1672-1675.
14. Bershad S, Poulin YP, Berson DS, Sabeau J, Brodell RT, Shalita AR, et al. Topical retinoids in the treatment of acne vulgaris. *Cutis* 1999;64:8-20.
15. Denig NI, Hoke AW, Maibach HI. Irritant contact dermatitis. *Postgrad Med* 1998;103:199-213.
16. Appa Y. Retinoid therapy: Comparative skin care. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999;12:111-119.
17. Olsen EA, Katz HI, Levine N, Nigra TP, Pochi PE, Savin RC, et al. Tretinoin emollient cream for photodamaged skin: Results of 48-week, multicenter, double-blind studies. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:217-226.
18. Harant H, Martin R, Andrew PJ, Foglar E, Dittrich C, Lindley I. Synergistic action of interleukin-8 gene transcription by all-*trans*-retinoic acid and tumor necrosis factor- α involves the transcriptional factor NF- κ B. *J Bio Chem* 1996;271:26954-26961.
19. Chang MJ, Harper R, Hyde DM, Wu R. A novel mechanism of retinoid acid-enhanced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *Am J Resp Cell Mol Bio* 2000;22:502-510.
20. Awad S, Yokozeki H, Miyazaki Y, Igawa K, Minatohara K, Satoh T, et al. Glucocorticoid induced the production and gene expression of IL-1 α through AP-1 and partly NF- κ B activation in murine epidermal cells. *J Med Den Sci* 2002;49:27-35.

21. Chen S, Ostrowski J, Whiting G, Roalsvig T, Hammer L, Curier SJ, et al. Retinoic acid receptor gamma mediates topical retinoid efficacy and irritation in animal models. *J Invest Dermatol* 2001;116:672-678.
22. Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of retinoid actions in the skin. *FASEB J* 1996;10:1002-1013.
23. Feng X, Peng ZH, Di W, Li XY, Rochette-Egly C, Chambon P, et al. Suprabasal expression of a dominant-negative RXR- α mutant in transgenic mouse epidermis impairs regulation of gene transcription and basal keratinocyte proliferation by RAR-selective retinoids. *Genes Dev* 1997;11:59-71.
24. Thacher SM, Standeven AM, Athanikar J, Kopper S, Castilleja O, Escobar M, et al. Receptor specificity of retinoid-induced epidermal hyperplasia: Effect of RXR-selective agonists and correlation with topical irritation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:528-534.
25. Petkovich PM. Retinoid and metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:136-142.
26. Harant H, Lindly I, Uthman A, Ballaun C, Krupitza G, Grunt T, et al. Regulation of interleukin-8 gene expression by all-*trans*-retinoic acid. *Biochem Biophys Res Com* 1995;210:898-906.
27. Tsukamoto H, Hishinuma T, Tayama R, Narahara K, Suzuki N, Tomioka Y, et al. The induction of prostaglandin E synthase and upregulation of cyclooxygenase-2 by 9-*cis* retinoic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004;74:61-74.
28. Yoshimura K, Uchida G, Okazaki M, Kitano Y, Harii K. Differential expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mRNA in normal human keratinocytes induced by a variety of natural and synthetic retinoids. *Exp Dermatol* 2003;12:28-34.
29. Chapellier B, Mark M, Messaddeq N, Calléja C, Warot X, Brocard J. Physiological and retinoid-induced proliferations of epidermis basal keratinocytes are differently controlled. *EMBO J* 2002;21:3402-3413.

30. Xiao J, Feng X, Di W, Peng Z, Li L, Chambon P, et al. Identification of heparin-binding EGF-like growth factor as a target in intercellular regulation of epidermal basal cell growth by suprabasal retinoic acid receptors. *EMBO J* 1999;18:1539-1548.
31. Rittié L, Varani J, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Retinoid-induced epidermal hyperplasia is mediated by epidermal growth factor receptor activation via specific induction of its ligands heparin-binding EGF and amphiregulin in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2006;126:732-739.
32. Kaya G, Grand D, Hotz R, Augsburg E, Carraux P, Didierjean L, et al. Upregulation of CD44 and hyaluronate synthases by topical retinoids in mouse skin. *J Invest Dermatol* 2005;124:284-287.
33. Fisher GJ, Esmann J, Griffiths CEM, Talwar HS, Duell EA, Hammerberg C, et al. Cellular, immunologic and biochemical characterization of topical retinoic acid-treated human skin. *J Invest Dermatol* 1991;96:699-707.
34. Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:429-438.
35. Jiang YJ, Xu T, Lu B, Mymin D, Kroeger EA, Dembinski T, et al. Cyclooxygenase expression is elevated in retinoic acid-differentiated U937 cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1633:51-60.
36. Kanekura T, Higashi Y, Kanzaki T. Inhibitory effects of 9-cis-retinoic acid and pyrrolidinedithiocarbamate on cyclooxygenase (COX)-2 expression and cell growth in human squamous carcinoma cells. *Cancer Letters* 2000;161:177-183.
37. Wanner R, Wolff B, Glowacki F, Kolde G, Wittig B. The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCaT keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* 1999;291:346-353.
38. Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured

- keratinocytes by vitamin A. *Cell* 1981;25:617-625.
39. Kim SC, Won JH. The effects of calcium and retinoic acid on epidermal desmosomes. *Kor J Dermatol* 1994;21:820-831.
40. Amagai M. Adhesion molecules I. Keratinocyte-keratinocyte interactions: cadherins and pemphigus. *J Invest Dermatol* 1995;104:146-152.
41. Eichner R, Gendimenico GJ, Kahn M, Mallon JP, Capetola RJ, Mezick JA. Effects of long-term retinoic acid treatment on epidermal differentiation in vivo: specific modifications in the programme of terminal differentiation. *Br J Dermatol* 1996;135:687-695.

Abstract

Contact dermatitis induced by Retinoid in comparison with Benzalkonium Chloride

Jung Eun Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo-Chan Kim)

The term retinoid has been traditionally used to describe both natural and synthetic derivatives of vitamin A. Retinoic acid, its biologically active form *in vivo*, has been used as a treatment agent in a number of skin diseases. Retinoic acid has many functions; regulation of the proliferation and differentiation of keratinocytes, inhibition of sebaceous glands, reduction of cell adhesion molecules, anti-inflammation and antiaging, so that it has been used for the treatment of acne, psoriasis, skin malignancies, T cell lymphoma and photoaging. However, many patients undergoing topical retinoid therapy experience 'retinoid dermatitis', a retinoid-specific irritant contact dermatitis, characterized by erythema, scaling, dryness, burning and pruritus. They discontinue the topical retinoid treatment due to these discomfort.

The mechanism of contact dermatitis by retinoid has been known to be different from that of other contact dermatitis by usual irritants. As known as so far, irritant dermatitis by retinoid is mediated by retinoid acid receptor- γ , which forms a heterodimer with retinoid X receptor- α and subsequently signals to initiate the transcription of the target genes. However, it is uncertain

how the signaling induces irritant dermatitis. Recently, cytokines and cyclooxygenases (COXs) are thought to be involved in the induction of irritation. In addition, heparin binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and CD44 were reported to be involved in the epidermal hyperplasia induced by retinoid.

In this study, we applied retinoid and benzalkonium chloride (BKC), an well known detergent, on the hairless mice and compared transepidermal water loss (TEWL), ear thickness, histopathology, immunohistochemistry, electron microscopic findings and expression of cytokines (IL-1 α , IL-8, TNF- α), COXs, HB-EGF and CD44 by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

As a result, both retinoid and BKC increased TEWL and ear thickness, but there was no statistically significant difference between them. Epidermal hyperplasia was more evident in retinoid-treated mouse skin in histopathology. Immunohistochemistry revealed epidermal hyperplasia and differentiation were increased in retinoid-treated mouse skin compared with BKC-treated mouse skin. Filaggrin, one of the markers of epidermal differentiation, however, was expressed more in BKC-treated mouse skin. Reduction of horny layer, increased secretion of lamellar bodies, weakened adhesion between corneocytes and abnormal corneodesmosomes were seen in retinoid-treated mouse skin by electron microscope. As results of RT-PCR, IL-8, TNF- α and COX-2 were increased in both retinoid and BKC-treated mice skin, but there was no statistically significant difference between them. HB-EGF was increased in only retinoid-treated mouse skin and there was statistically significant difference between retinoid and BKC though CD44 expression was not different from each other.

In conclusion, both retinoid and BKC increased inflammatory cytokines and

COX-2, however, retinoid specifically increased HB-EGF and induced abrupt epidermal hyperplasia, incomplete expression of filaggrin, abnormal corneodesmosomes and early loss of horny layer. Therefore, the mechanism of retinoid dermatitis is thought to be caused by the impairment of epidermal barrier and inflammation.

Key Words : retinoid, benzalkonium chloride, contact dermatitis