

레티노인산이 corneodesmosome에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김 문 영

레티노인산이 corneodesmosome에 미치는 영향

지도교수 김 수 찬

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학과

김 문 영

김문영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006년 12 월 일

감사의 글

먼저 본 논문을 완성하기까지 모든 과정에서 세심한 배려로 지도해주시고 많은 조언과 격려를 해주신 김수찬 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 관심과 조언을 해주신 정기양 교수님, 유옥 교수님께 진심으로 감사드립니다.

논문을 마무리하는 지금, 2년 남짓한 기간들이 얼마나 짧은 시간이었는지 새삼 느낍니다. 그 동안 많은 실수와 시행착오를 겪을 때 많은 도움을 주신 피부과학교실의 이정선 선생님과 연구원 여러분들에게도 감사의 마음을 전하며, 마지막으로 물심양면으로 저에게 힘이 되어주신 부모님께 사랑과 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 실험재료	6
2. 실험방법	6
가. 전자현미경 관찰	6
나. 각질형성세포배양	7
다. 배양 각질형성세포에 레티노인산 처리	7
(1)웨스턴 블롯(Western blot)분석	8
(가)단백질 추출	8
(나)전기영동 및 웨스턴 블롯 분석	8
III. 결과	10
1. 전자현미경 소견	10
2. 레티노인산 처리후 배양 각질형성세포에서의 각질교소체의 구성 단백질 및 kallikrein의 웨스턴 블롯 결과	11
IV. 고찰	17
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	27

그림 차례

그림 1. 각질교소체와 교소체	4
그림 2. 2% Retinol 용액을 도포한 무모생쥐 피부의 전자현미경 소견	10
그림 3. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 desmoglein 1, desmoglein 3 측정 결과	11
그림 4. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 desmoglein 1, desmoglein 3 측정 결과	12
그림 5. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 desmocollin 1, desmocollin 3 측정결과	13
그림 6. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 desmocollin 1, desmocollin 3 측정결과	14
그림 7. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 kallikrein 5, kallikrein 7 측정 결과	15

그림 8. 10^{-6}M 및 10^{-7}M 레티노인산 처리 48시간 후
배양각질형성세포에서 발현된 kallikrein 5,
kallikrein 7 측정 결과 16

국문요약

레티노인산이 corneodesmosome에 미치는 영향

레티노이드(retinoid)는 비타민A의 천연 또는 합성 유도체로서 각질형성세포의 증식과 분화 조절, 피지선의 크기 감소, 면역 조절 및 항염증 기능이 있으므로 여드름, 건선 등의 피부질환 치료제로 사용되고 있으나, 종종 레티노인산의 국소 도포로 인해 홍반이나 각질층 박리 등의 자극성피부염이 유발되는 것으로 알려져 있다. 국소 도포시 나타나는 이러한 자극성 피부염은 레티노인산이 각질형성세포에 다양한 사이토카인이나 케모카인의 분비를 유발시킬 뿐 아니라, 각질세포 탈락을 증가 시키기 때문에 발생한다고 추측할 수 있다.

각질교소체(corneodesmosome)는 각질세포를 서로 부착시켜주는 구조물로서 desmoglein(DSG)1, desmocollin(DSC)1 및 corneodesmosin(CDSN)으로 구성되어 있다. 각질세포의 탈락은 각질교소체가 kallikrein이라는 단백분해효소에 의해 용해됨으로써 이뤄지는데, 특히 kallikrein(KLK)5(stratum corneum trypsin-like enzyme; SCTE)와 kallikrein 7(stratum corneum chymotrypsin-like enzyme; SCCE)이 각질세포 탈락에 중요한 역할을 한다.

본 연구에서는 레티노인산에 의해 증가하는 각질세포 탈락의 기전을 밝히기 위하여 레티노인산이 각질교소체 구성단백 형성에 미치는 영향과 각질세포 탈락을 일으키는 kallikrein에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 저칼슘(0.06mM)과 및 고칼슘(1.5mM) 배양액으로 배양한 각질형성세포에 $10^{-7}M$ 과 $10^{-6}M$ 농도의 레티노인산 처리 후 각질교소체 구성 단백질인 DSG1, DSC1 과 각질교소체 분해효소인 KLK5, KLK7 의 단백발현을 웨스턴 블롯을 시행하여 결과를 측정하고 비교하였다.

그 결과 저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포 모두에서 $10^{-6}M$ 과 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 후 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3 모두 단백발현이 감소 되었다. 반면 KLK7은 레티노인산에 영향을 받지 않았고 KLK5만 고농도 칼슘 배양액에서 레티노인산 처리 후 단백발현의 감소를 보였다.

따라서 레티노인산에 의한 각질세포 탈락의 기전은 레티노인산이 각질교소체 구성 성분인 DSG1과 DSC1의 발현을 감소시키기 때문으로 생각 할 수 있다. 또한 레티노인산이 KLK의 발현에는 큰 영향을 못 미치고 오히려 고농도 칼슘 배양액에서 KLK5가 감소하는

것을 보여 KLK이 레티노인산에 의한 각질세포 탈락에는 관여하지 않는다고 생각된다.

핵심 되는 말: 레티노인산, 각질교소체(corneodesmosome),
각질세포탈락, Desmoglein, Desmocollin, Kallikrein

레티노인산이 corneodesmosome에 미치는 영향

<지도교수 김 수 찬>

연세대학교 대학원 의과학과

김 문 영

I. 서론

레티노인산(retinoic acid; RA)은 생체 내 활성형태의 레티노이드로서 각질형성세포의 증식과 분화 조절, 피지선의 크기 감소, 콜라겐 분해 방지, 면역 조절 및 항염증 기능 등이 있어 여드름, 피부노화, 건선 등의 피부질환 치료제로서 널리 사용될 뿐만 아니라, 피부암, T 세포 림프종 등의 악성 종양 치료에도 사용된다. 그러나, 종종 레티노인산의 국소도포로 인해 홍반이나 각질층 박리 등의 염증반응이 유발될 수 있으므로 의약품이나 화장품 제제로서 이용 시 제한이 있다. 이러한 염증반응의 발생기전은 레티노인산 도포 후 각질형성세포에서 사이토카인이나 케모카인의 분비가 유발될 뿐만 아니라, 각질세포의 탈락(desquamation)이 증가되기 때문이라고 생각된다.

교소체(desmosome)는 상피세포의 세포막에 존재하여 세포와 세포를 연결시키는 주요 부착 구조물이며 교소체 내에서 세포간 접착에 중요한 역할을 하는 단백으로서 코어(core)에 존재하는 desmoglein(DSG)과 desmocollin(DSC)이 있다^{1,2}. DSG 과 DSC은 교소체에 존재하는 cadherin족 단백질로서 각각 1,2,3의 아형이 있으며 표피층에서 각 아형이 존재하는 부위가 다르다. 즉, DSG3와

DSC3는 기저세포층에 많이 존재하며 DSG2 와 DSC2는 역시 기저 세포층에 존재하지만 그 양은 많지 않다. DSG3와 DSC3은 표피 상층부에 많이 존재한다.

각질교소체(corneodesmosome)는 특이하게 변형된 교소체로서 각질층에서 세포 사이 결합을 유지시키며 corneodesmosin(CDSN), DSG1, DSC1의 단백질로 구성되어 있다. 그러나 교소체에 존재하는 DSG3와 DSC3는 각질교소체에는 존재하지 않는다. 표피가 과립층에서 각질층으로 이행되면서 교소체는 형태학적으로 큰 변화를 보인다. 각질교소체에서는 케라틴 필라멘트가 부착되어 있는 세포질판(cytoplasmic plaque)은 더 이상 보이지 않으며 세포 바깥의 코어 부위에서 보이는 특징적인 삼층의 구조 대신에 균일한 전자밀도가 높은 썩기 같은 모양을 보인다. (그림 1)

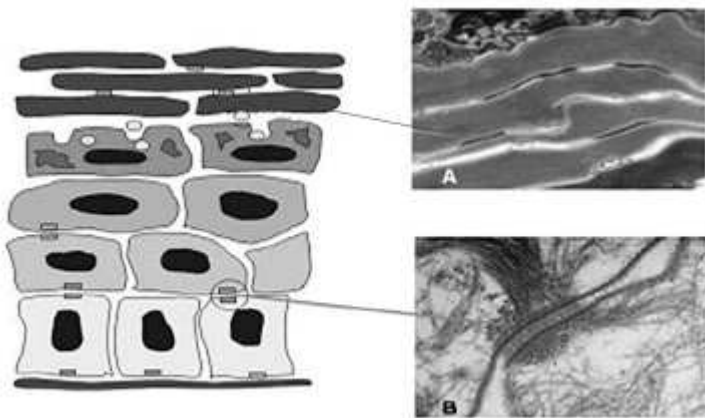


그림 1. 각질교소체(corneodesmosome) (A) 와 교소체(desmosome) (B)의 전자 현미경 소견

각질세포의 탈락은 각질교소체가 kallikrein이라는 단백질분해효소에 의해 용해 됨으로써 이루어 진다. 사람 조직 Kallikrein(KLK)가족에는 15개의 serine 단백질분해효소가 있는데, KLK5(stratum corneum trypsin-like enzyme; SCTE)와 KLK7(stratum corneum chymotrypsin-like enzyme; SCCE)은 각질층 및 과립층과 부속기관에서 발견된다^{8,9}. KLK7은 CDSN과 DSC1을 분해시키고 KLK5는 DSC1뿐 아니라 DSG1과 CDSN을 분해 시킨다고 보고되었다³⁻⁶.

이에 본 연구는 레티노인산에 의해 증가하는 각질세포 탈락의 기전을 밝히기 위하여 레티노인산이 각질교소체 구성단백 형성에 미치는 영향과 각질세포 탈락을 일으키는 kallikrein에 미치는 영향을 단백질발현단계에서 측정하여 비교하고자 하였다. 본 실험에서는 저칼슘농도(0.06mM)와 고칼슘농도(1.5mM)로 배양한 각질형성세포에 레티노인산을 처리한 후, 교소체의 코어 구성단백인 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3, 각질교소체와 단백질분해효소인 KLK5와 KLK7의 발현을 웨스턴 블롯(Western blot)을 이용하여 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 세포는 정상 사람의 포피(foreskin)에서 얻은 각질형성세포를 이용하였다. 그리고 레티놀 도포 후 피부의 전자현미경 관찰을 위해 무모생쥐(hairless mouse)의 피부조직을 이용하였다.

2. 실험방법

가. 전자현미경 관찰

무모생쥐의 등 부위에 알코올에 녹인 2%의 레티놀을 5일간 매일 1회씩 도포하였다. 레티놀 도포부위와 알코올 도포부위의 피부를 3x3mm의 조각으로 떼어내 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90mM potassium oxalate, 1.4% sucrose가 함유된 고정액에 넣고 하룻 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 탈수 시켰다. 탈수 후 100% propylene oxide로 각각 15분간 2회 조직을 침투시키고 통상적인 방법으로 포매 시킨 후 투과 전자현미경(H-500, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

나. 각질형성세포 배양

정상 사람의 표피를 1.2 unit/ml dispase 용액에 4°C에서 밤새 담근 후 진피로부터 표피를 분리하고 표피를 0.05% trypsin-EDTA 용액에 넣은 후에 3분간 vortex하여 각질형성세포를 분리시켰다. 즉시, 10% fetal bovine serum(Gibco, Carlsbad, CA)이 포함된 Hank's balanced salt solution(Gibco)을 넣고 trypsin 을 중화시켰다. 세포배양액은 epidermal growth factor(100ng/ml), bovine pituitary extract(70 µg/ml), hydrocortisone(0.5 µg/ml), insulin(5 µg/ml)등을 함유한 keratinocyte growth media(KGM; Cambrex, Walkersville, MD)를 사용하였다. KGM의 칼슘농도는 0.06mM로 조정하고 배양은 37°C, 5% CO₂ 로 유지되는 배양기(incubator)에서 배양 dish에 배양하였다. 저칼슘 배양을 위해서는 칼슘농도 0.06mM의 KGM을 그대로 사용하였으며 고칼슘 배양을 위해서는 KGM에 300mM 칼슘용액을 적당량 첨가하여 칼슘농도가 1.5mM이 되도록 하였다.

다. 배양 각질형성세포에 레티노인산 처리

각질형성세포가 배양 dish 면적의 80% 정도 차지하면 10⁻⁶M과 10⁻⁷M all-*trans*-retinoic acid (Sigma, St. Louis, MO)를 배양액에 첨가 한 후 24시간과 48시간 동안 배양하였다.

(1) 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

(가) 단백질 추출

배양한 각질형성세포에 용해 완충액 [5% 2-mercaptoethanol과 200mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF; Sigma)가 함유된 1.5% SDS-0.0625M tris-HCL buffer(pH6.3)]을 100mm dish당 500 μ l 첨가하여 세포를 세포 scraper(Costar, Cambridge, MA)를 이용하여 모은 후 완전히 세포가 파쇄 되도록 Vibra Cell™ (Sonic & Materials, Danbury, CT)을 이용하여 얼음 위에서 초음파 처리하였다. 4분간 끓인 후 13,800rpm에서 40분간 원심분리하고 상층액을 얻었다. 그리고 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 Bradford 방법으로 단백질을 정량 하였다.

(나) 전기영동 및 웨스턴 블롯

각질형성세포로부터 추출한 단백질을 NuPAGE gel(3-8% Novex Tris-Acetate Gel)에 lane당 단백질농도가 30 μ g이 되도록 loading하고 160V로 전기영동 시켰다. 전기영동 시킨 gel의 단백질을 30V에서 2시간 동안 PVDF membranes(PALL, Pensacola, USA)에 전이 하였다. PVDF membrane을 tris-buffered saline(TBS)으로 세척한 후, blocking solution[5% skim milk in TBS(pH7.6)]에 넣어 상온에서 2시간 동안 서서히 흔들어주면서 반응시킨 후 blocking solution에 일차 항체인 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3(원액, Progen, Heidelberg, Germany), KLK5,7(1:200희석, Santa Cruz, CA), β -actin(1:10,000희석, Sigma)으로 4°C에서 24시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 PVDF membrane을 0.1% tween 20이 포함된 TBS(TBS-T)로 15분 간격으로 3회 세척 하였다. 사용한 이차 항체는 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3과 β -actin에 대해서는 blocking

solution에 1:1000으로 희석 시킨 peroxides conjugated anti-mouse IgG (DAKO, Glostrup, Denmark)를 사용하였고 KLK5,7에 대해서는 anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TBS-T로 10분 간격으로 3회 세척을 하였다. 발색반응은 enhanced chemiluminescence 시약(ECL, Pierce, Rockford, IL)과 ECL-PLUS(Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 X-ray필름(Kodak, Rochester, NY)에 감광 시켰고 optical density(O.D)는 Quantity One software(Bio-Rad)를 이용하여 측정하고 비교 하였다.

III 결과

1. 전자현미경 소견

2% Retinol 을 도포한 피부에서 알코올만 도포한 피부에 비해 각질층의 탈락이 증가되어 각질층의 두께가 얇아졌다 (그림2. A, B). 또한 retinol 도포 피부에서 각질세포 간의 간격이 증가되었고 퇴화된 각질 교소체를 보였다 (그림2. C, D).

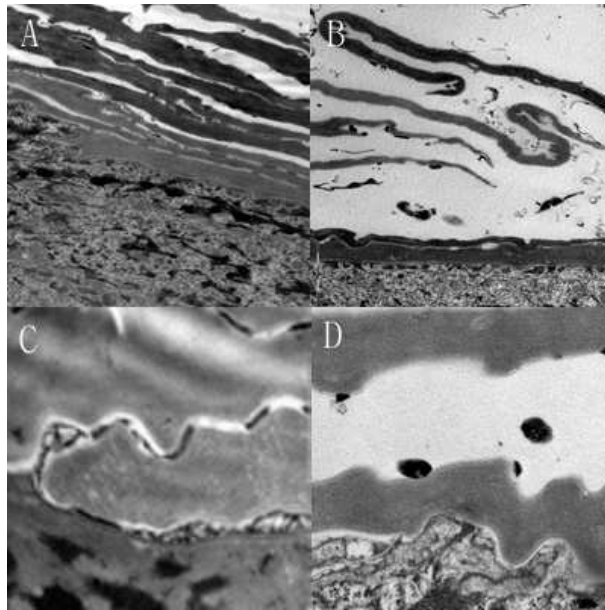


그림2. 2% Retinol 용액을 도포한 무모생쥐 피부의 전자현미경 소견 (A) 알코올 (x20,000) (B) Retinol (x20,000) (C) 알코올 (x30,000) (D) Retinol (x30,000)

2. 레티노인산 처리 후 배양 각질형성세포에서의 각질교소체의 구성단백 및 kallikrein의 웨스턴블롯 결과

(1) $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSG1과 DSG3. 저농도(0.06mM)와 고농도(1.5mM)의 칼슘 배양액으로 배양한 각질형성세포 모두에서 DSG1과 DSG3 발현의 감소가 뚜렷하게 보였다(** $p < 0.05$, * $p < 0.01$), ANOVA.

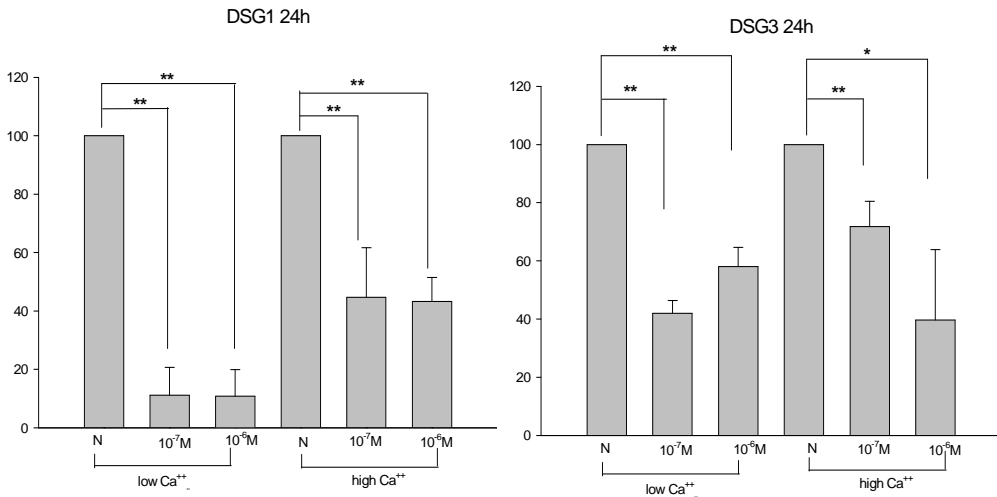
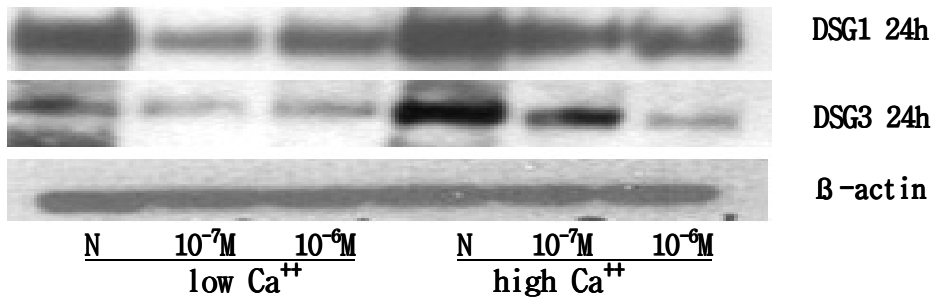


그림3. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSG1과 DSG3.

(2) 10^{-6}M 및 10^{-7}M 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSG1과 DSG3. 저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포에서 레티노인산 처리 후 48시간에 DSG1과 DSG3의 단백질발현이 뚜렷하게 감소 하였다(** $p<0.05$, * $p<0.01$), ANOVA.

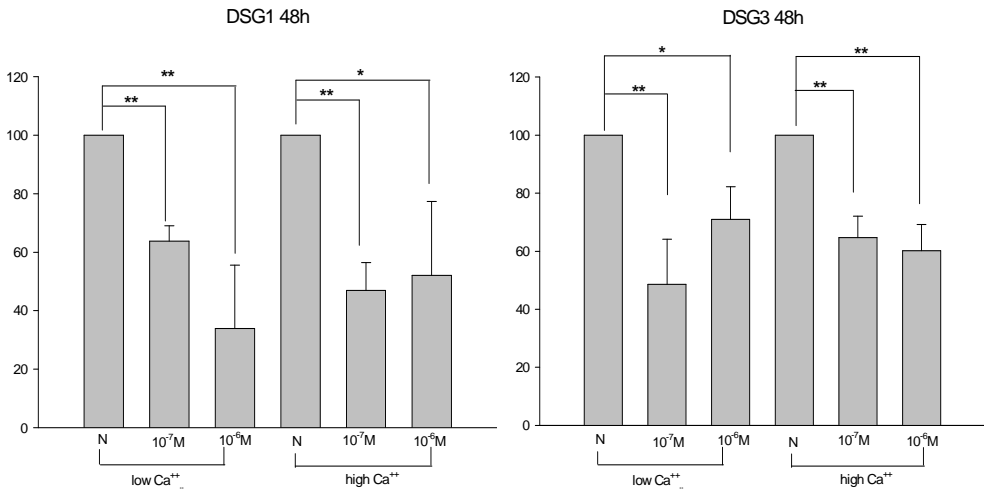
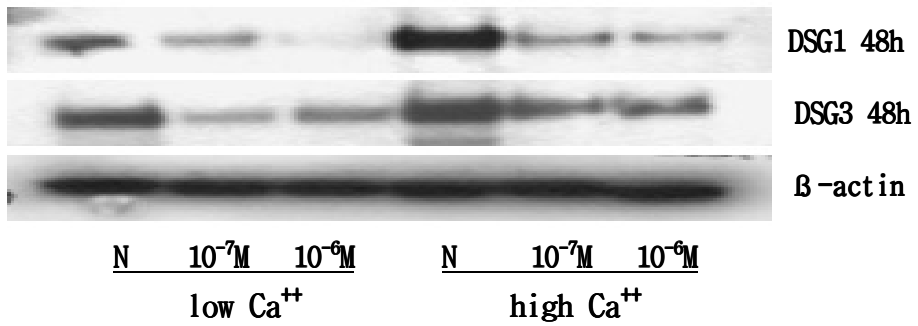


그림4. 10^{-6}M 및 10^{-7}M 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSG1과 DSG3.

(3) 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSC1과 DSC3. 저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포에서 DSC1의 단백질발현이 뚜렷하게 감소 되었다. DSC3는 저농도 칼슘배양액에서 레티노인산 처리 후 감소 하였다(** $p < 0.05$, * $p < 0.01$), ANOVA.

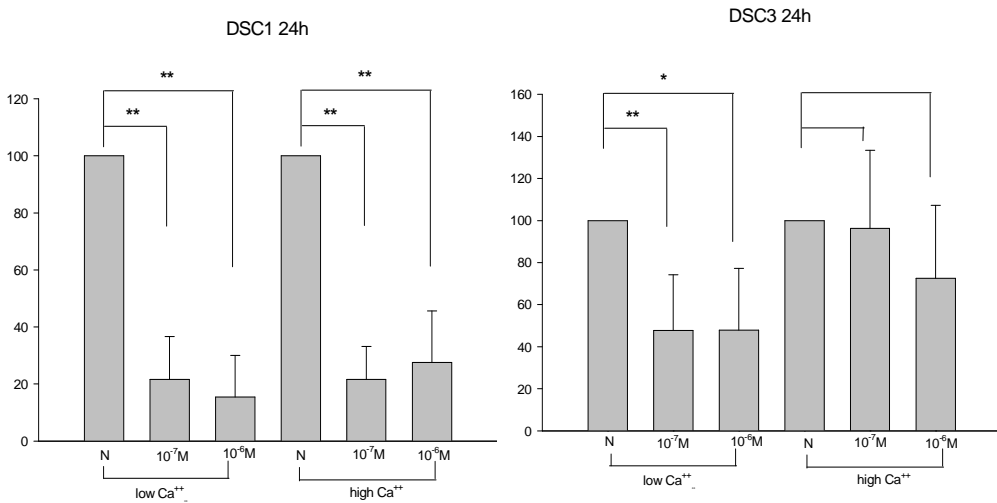
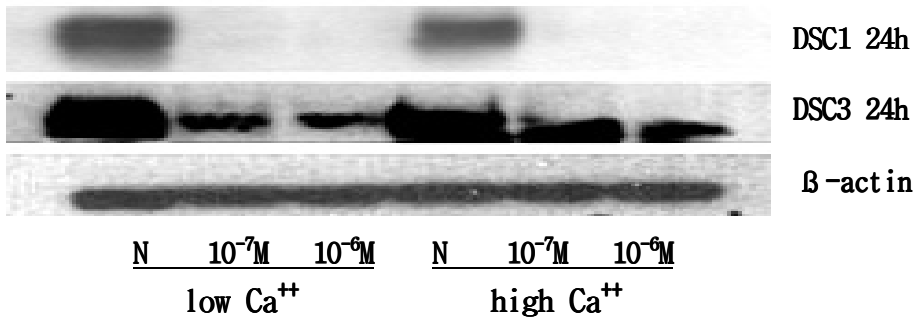


그림5. 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSC1과 DSC3 .

(4) 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSC1과 DSC3. 저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포에서 레티노인산 처리 48시간 후 DSC1과 DSC3의 단백질발현이 뚜렷하게 감소되었다(** $p < 0.05$, * $p < 0.01$), ANOVA.

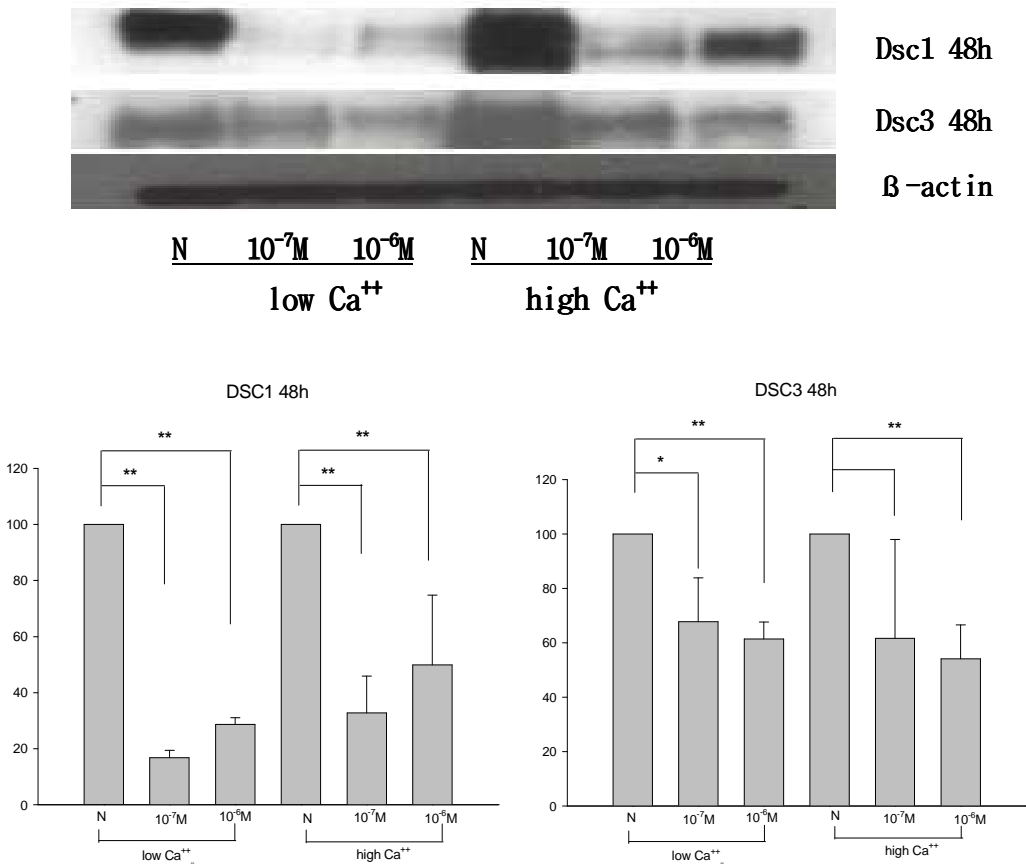


그림6. 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 DSC1과 DSC3.

(5) 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 KLK5와 KLK7. 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포에서 KLK5가 감소를 보였고, KLK7은 큰 변화가 없었다(** $p < 0.05$, * $p < 0.01$), ANOVA.

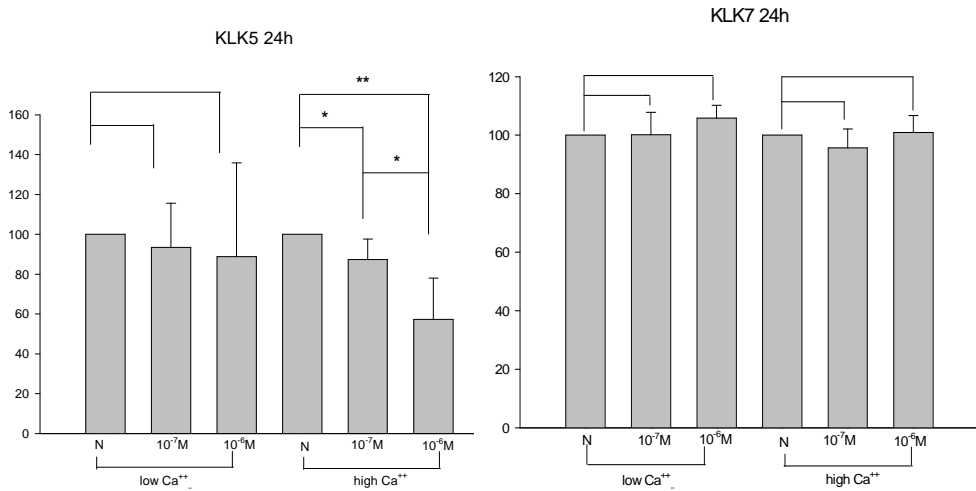
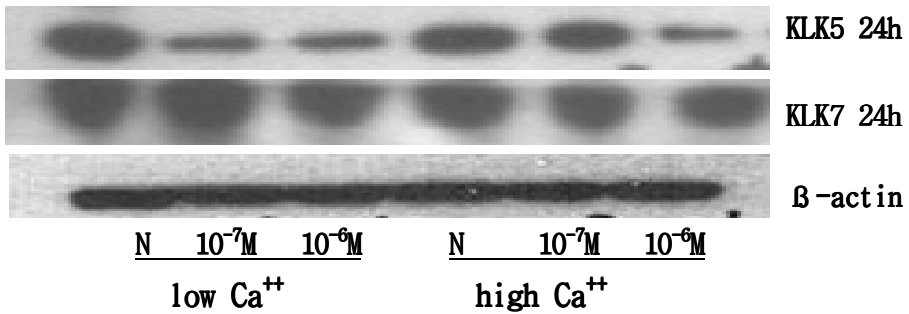


그림7. 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 24시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 KLK5와 KLK7 .

(6) 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 KLK5와 KLK7. 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포에서 KLK5가 레티노인산 10^{-6} M 처리 후 감소하였고, KLK7은 큰 변화가 없었다(* $p < 0.01$), ANOVA.

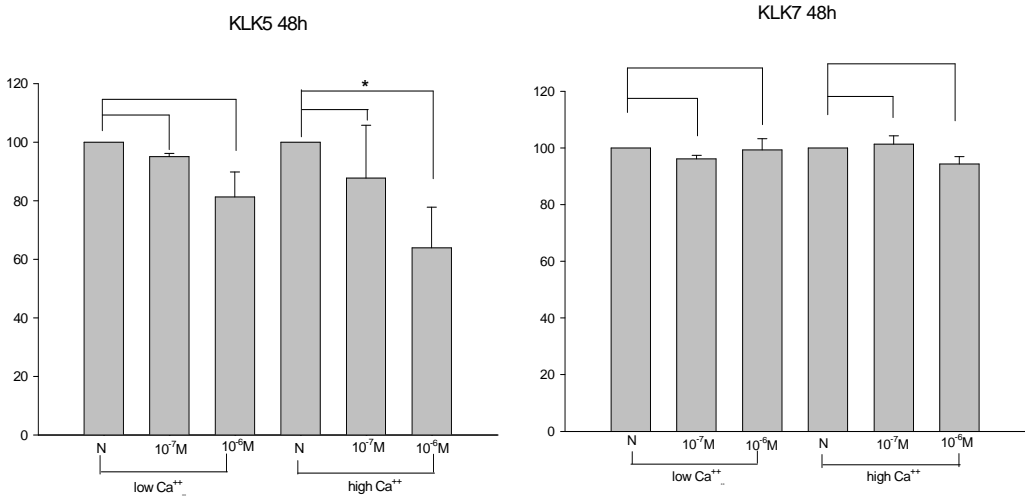
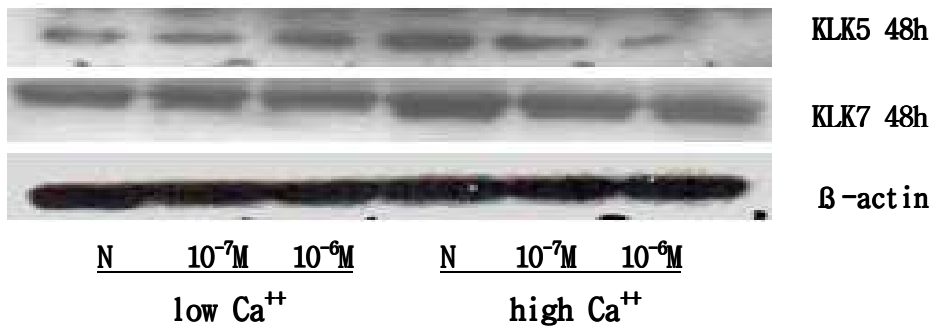


그림8. 10^{-6} M 및 10^{-7} M 레티노인산 처리 48시간 후 배양 각질형성세포에서 발현된 KLK5와 KLK7 .

IV. 고찰

레티노이드(retinoid)는 비타민 A의 천연 또는 합성 유도체를 말하며 천연 레티노이드와 방향환 수에 따라 제 1,2,3 세대 합성 레티노이드로 분류된다⁷. 이러한 레티노이드의 생체 내 활성 형태가 레티노인산(retinoic acid)이며 레티노인산은, 다양한 작용으로 여러 피부질환의 치료에 사용되고 있다^{8,9}. 레티노인산은 각질형성세포의 증식과 분화를 조절할 뿐만 아니라, 프로스타글란딘의 합성억제, 피지선 억제, 세포간 접합 분자 발현의 감소, 면역 조절 및 항염증 작용 등이 있어 여드름, 건선 등의 질환이나 피부암, T 세포 림프종 등의 악성 종양의 치료에도 이용되며^{10,11}. 자외선 조사로 생성된 콜라겐 분해 효소인 matrix metalloproteinase1(MMP-1)의 생성을 억제할 수 있기 때문에 광노화의 치료제로서 사용되기도 한다¹². 그러나 레티노인산이 국소 도포제로 사용 시 홍반이나 각질층 박리 등의 자극성피부염을 유발할 수 있어 의약품이나 화장품으로 사용 시 제한이 되고 있다¹³⁻¹⁶. 이러한 자극성 피부염의 발생원인은 레티노인산이 각질형성세포에 다양한 사이토카인이나 케모카인의 분비를 유발시킬 뿐만 아니라, 각질세포의 탈락(desquamation)이 증가되는 것과도 연관이 있을 것으로 생각된다.

교소체(desmosome)는 상피세포의 세포와 세포를 부착시켜 정상적인 표피의 구조를 유지시키며 세포의 이동과 증식, 분화에 매우 중요한 역할을 하게 된다. 교소체의 구조는 전자현미경적 구조상 세포질 내 접착판(Plaque)과 세포막과 세포막 사이의 코어(core)로 구성된다. 접착판의 구성 단백질은 세포질 내에

존재하는 케라틴 필라멘트와 교소체를 연결시키는 물질로서 plakin 가족 단백질에 속하는 desmoplakin 1 과 desmoplakin 2 가 있으며 Armadillo 대유전자 가족에 속하는 plakoglobin 과 plakophilin 등이 있다^{1,2}. 세포와 세포사이의 코어에 있는 막통과 단백질은 cadherin 가족에 속하는 당단백으로서 desmoglein(DSG)과 desmocollin(DSC)이 있는데 각각 3 형의 동질형이 존재한다^{1,29}. 특히 DSG3 는 심상성 천포창 환자의 항체가 결합하는 항원이며 DSG1 은 낙엽상 천포창 환자의 항체가 결합하는 항원으로서 천포창 발생기전에서 극세포 해리증을 유발하게 하는 표적 단백질로 각질형성세포의 세포간 부착에 매우 중요한 역할을 한다. DSG 와 DSC 의 각각의 동질형들은 조직과 분화도에 따라 분포가 다르다. 즉 단순 상피에는 DSG2 와 DSC2 만이 존재하며 중층 편평 상피에는 모든 동질형이 존재하나, DSG 의 동질형은 각질형성세포의 분화에 따라 각각 다르게 표현된다³⁰.

레티노이드 피부염에서 관찰되는 각질세포 조기 탈락 및 각질 교소체의 이상으로 인한 피부장벽 손상과 이에 따른 염증 반응이 레티노이드에 의한 자극성 접촉피부염의 기전으로 생각할 수 있다. 전자현미경을 통해 각질 형성세포를 관찰한 결과는 레티노이드를 도포한 조직에서는 각질층이 많이 탈락되어 두께가 감소되어 있었고 층판소체의 각질층으로의 분비가 증가되어 있었다. 또한 각질세포 간의 간격이 증가되어 있으며 각질교소체의 형태도 비정상적이었다. 따라서 레티노이드 국소 도포 시 관찰되는 퇴화된 각질 교소체, 각질세포의 조기 탈락 등으로 인한 피부장벽의 소실이 레티노이드에 의한 자극성 접촉 피부염의 기전 중 하나라고 생각된다.

각질 세포의 접착에 중요한 역할을 하는 각질교소체는 특이하게 변형된 교소체로서 각질층에서 세포 사이 결합을 유지시키며 CDSN, DSG1, DSC1 등의 단백질로 구성되어 있다.

피부는 기저세포층의 줄기세포가 분열하면서 새로운 각질형성세포가 만들어지며 각질형성세포가 표피상층부로 올라가면서 분화를 하게 된다. 최종 분화된 각질형성세포는 각질층에서 각질세포가 되며 이들 각질세포들은 결국 탈락하게 된다. 각질세포가 탈락하려면 각질세포를 서로 결합시켜주는 각질교소체가 분해되어야 한다. 그러므로 각질교소체의 분해가 각질세포가 탈락되는 과정에 매우 중요하다. 각질교소체는 교소체와 마찬가지로 cadherin족 단백질과 desmoplakin, plakoglobin 등으로 구성되어 있다. 그러나 교소체와 달리 각질교소체에는 cadherin족 단백질 중 DSG1과 DSC1만 존재하며 DSG3과 DSC3는 존재하지 않는다. 또한 각질교소체에 특이한 구성성분으로 CDSN이 있다. CDSN도 층판소체(lamellar body)에 의해 각질층의 세포 밖으로 분비되는데 transglutaminase에 의해 각질교소체 단백질과 결합된다. CDSN은 각질교소체의 코어부위에 존재하며 cornified envelope 과 결합되어 있다. CDSN은 DSG1과 DSC1을 감싸고 있어서 이들 교소체 cadherin 단백질이 쉽게 분해되지 못하도록 하는 것 같다. 각질세포의 탈락은 CDSN이 kallikrein이라는 단백질분해효소에 의해 용해 됨으로써 이루어 지는데 사람 조직 Kallikrein 가족에는 15개의 serine 단백질분해효소가 있으며, KLK5와 KLK7은 각질층 및 과립층과 부속기관에서 발견된다^{18,19}. KLK7은 CDSN과 DSC1을 분해 시키고 KLK5는 DSC1뿐만 아니라 DSG1과 CDSN을 분해 시킨다고 보고 되었다³⁻⁶.

칼슘과 비타민A의 유도체인 레티노이드가 교소체 구성단백의 발현에 영향을 미치어 표피세포의 분화에 중요한 인자로 작용함이 여러 연구결과를 통해 밝혀진바 있다. 또한 HaCaT세포는 DSG2, DSG3와 DSC3는 발현하지만 DSG1과 DSC1은 발현하지 않는다. 레티노인산을 처리한 HaCaT세포는 DSG2, DSG3와 DSC3의 전사레벨의 감소 때문에 교소체의 상실이 일어난다. 이런 이유에 의해 mRNA 발현에 있어 HaCaT세포 보다는 각질형성세포에서 더 분화가 잘 일어남을 알 수 있다²⁶⁻²⁷.

이에 본 연구는 레티노인산에 의해 증가하는 각질세포 탈락의 기전을 밝히기 위하여 레티노인산이 corneodesmosome 구성단백 형성에 미치는 영향과 각질세포 탈락을 일으키는 kallikrein에 미치는 영향을 단백질발현단계에서 측정하여 비교하고자 하였다.

본 실험에서는 저농도(0.06mM)과 고농도(1.5mM)로 칼슘 배양농도를 각각 달리하여 배양한 각질형성 세포에 10^{-6} M과 10^{-7} M 레티노인산을 처리 24시간과 48시간 후 교소체의 코어 구성 단백질 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3와 각질교소체 단백질분해효소인 KLK5와 KLK7을 웨스턴 블롯을 이용하여 측정하였다.

그 결과 저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포 모두에서 10^{-6} M과 10^{-7} M 레티노인산 처리 후 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3 모두 단백질발현이 감소 되었다. 반면 KLK7은 레티노인산에 영향을 받지 않았고 KLK5만 고농도 칼슘 배양액에서 레티노인산 처리 후 단백질발현의 감소를 보였다.

따라서 레티노인산에 의한 각질세포 탈락의 기전은 레티노인산이 각질교소체 구성 성분인 DSG1과 DSC1의 발현을 감소시키기 때문으로 생각 할 수 있다. 또한 레티노인산이 KLK의 발현에는 큰

영향을 못 미치고 오히려 고농도 칼슘 배양액에서 KLK5가 감소하는 것을 보여 KLK이 레티노인산에 의한 각질세포 탈락에는 관여하지 않는다고 생각된다.

향후 각질교소체의 구성 단백질인 CDSN이 레티노인산에 의해 어떤 변화를 보이는지를 연구해야 하며 레티노인산이 각질교소체 구성단백과 KLK의 mRNA발현에 미치는 영향에 대한 실험을 진행하면 레티노인산에 의한 각질교소체 탈락의 기전에 대해 좀더 확실히 밝힐 수 있을 것이다.

V. 결론

저칼슘(0.06mM)과 고칼슘(1.5mM) 배양액으로 배양한 각질형성세포에 레티노인산 처리 후 교소체 구성 단백질 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3와 각질교소체 단백질분해효소인 KLK5, KLK7의 단백질발현을 각각 웨스턴 블롯을 시행하여 결과를 측정하고 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포 모두에서 10^{-6} M과 10^{-7} M 레티노인산 처리 후 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3 모두 단백질발현이 감소 되었다. 반면 KLK7은 레티노인산에 영향을 받지 않았고 KLK5만 고농도 칼슘 배양액에서 레티노인산 처리 후 단백질발현의 감소를 보였다.

그 결과 저농도와 고농도의 칼슘 배양액에서 배양한 각질형성세포 모두에서 10^{-6} M과 10^{-7} M 레티노인산 처리 후 DSG1, DSG3, DSC1, DSC3 모두 단백질발현이 감소 되었다. 반면 KLK7은 레티노인산에 영향을 받지 않았고 KLK5만 고농도 칼슘 배양액에서 레티노인산 처리 후 단백질발현의 감소를 보였다.

따라서 레티노인산에 의한 각질세포 탈락의 기전은 레티노인산이 각질교소체 구성 성분인 DSG1과 DSC1의 발현을 감소시키기 때문으로 생각 할 수 있다. 또한 레티노인산이 KLK의 발현에는 큰 영향을 못 미치고 오히려 고농도 칼슘 배양액에서 KLK5가 감소하는 것을 보여 KLK이 레티노인산에 의한 각질세포 탈락에는 관여하지 않는다고 생각된다.

참고문헌

1. Levine N: Role of retinoids in skin cancer treatment and prevention. *J Am Acad Dermatol* 39:62-66, 1998
2. 김주영, 김수찬. 교소체. *대한피부연구학회지* 1999; 138:169-175
3. N.Komatsu, K.Saijoh: Quantification of Human Tissue Kallikreins in the Stratum Corneum: Dependence on Age and Gender. *J Invest Dermatol* 2005; 125:1182-1189
4. Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al: Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 122:1235-1244, 2004
5. Simon M, Jonca N, Guerrin M, et al: Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J Biol Chem* 276:20292-20299, 2001
6. Suzuki Y, Koyama J, Moro O, Horii I, Kikuchi K, Tanida M, Tagami H: The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br J Dermatol* 134:460-464, 1996
7. Kuenzli S, Saurat JH: Retinoids. In; Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1ST ed. Spain: Mosby, 2003: 1991-2006

8. McDonald CJ: Immunomodulatory and cytotoxic agents in dermatology. In; McDonalds CJ, editors. Retinoids. 1ST ed. Brown University, Providence, Rhode Island: Marcel Dekker. INC; 1997: 149-155
9. Peck GL: Retinoid in dermatology *Dermatol* 116:283-284,1980
10. Kelly JW et al: Prevention of skin cancer treatment and prevention. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 62-66
11. Penn EJ, Hobson C, Rees DA, Magee AI: Structure and assembly of desmosome adjunction: biosynthesis, processing, and transport of the major protein and glycoprotein in cultures epithelial cells. *J Cell Biol* 1987; 105:57-68
12. Weiss JS, Ellis CN, Headinton JT, Tincoff T, Hamilton TA, Viirhees JJ: Topical tretinoin improves photoaged skin. A double-blind vehicle-controlled study. *JAMA* 1988; 259:527-532
13. Saurat JH: Retinoid and psoriasis: Novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol* 41:2-6,1999
14. Levine N: Role of retinoids in skin cancer treatment and prevention. *J Am Acad Dermatol* 39:62-66,1998
15. 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
16. 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

17. Ballow M, Wang W, Xiang S. Modulation of B cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 73-81
18. N.Komatsu, K.Saijoh, T Toyama, R. Ohka, N.Otsuki, G.Hussack, K.Takehara, E.P. Diamandis: Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *British Journal of Dermatology* 2005; 153:274-281
19. Yousef GM, Diamandis EP: Human tissue kallikreins: A new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem* 383:1045-1057, 2002
20. Chapman SJ, Walsh A: Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 282: 304-310, 1990
21. Halprin KM: Epidermal 'turnover time' -A re-examination. *Br J Dermatol* 86: 14-19, 1972
22. Kligman AM: In: Montagna W, Lobits WC Jr. Jr. (eds). *The Epidermis*. New York: Academic Press, 1964; p 287
23. S. Hatakeyama¹, S. Hayashi²; Retinoic acid disintegrated desmosomes and hemidesmosomes in stratified oral keratinocytes *J Oral Pathol Med* (2004) 33: 622-8
24. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*, 4th edn. New York: Garland Science, 2002; 1066-74.
25. Jones J, Downer CS, Speight PM. Changes in the expression of integrins and basement membrane proteins in benign mucous membrane pemphigoid. *Oral Disease* 1995; 1: 159-65.

26. Peck GL, Elias PM, Wetzel B. Effect of retinoic acid on embryonic chick skin. *J Invest Dermatol* 1977; 69:463-76
27. 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; 291:346-53
28. Eleonora Candi, Rainer Schmidt, Gerry Melino The cornified envelope a model of cell death in the skin 2005 Nature publishing group April 2005 volume 6
29. Penn EJ, Hobson C, Rens DA, Magee AI: Structure and assembly of desmosome adjunction: biosynthesis, processing, and transport of the major protein and glycoprotein in cultures epithelial cells. *J Cell Biol* 1987; 138:169-175
30. Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, et al. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993; 121:481-3

Abstract

The Effect of retinoic acid on corneodesmosome

Moon Young Kim

Department of Medical Science

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 discomforts.

Corneocyte cohesion within the cornified layer depends on

these modified desmosomes, which are known as corneodesmosomes. The main components of the corneodesmosomes are desmoglein 1, desmocollin 1 and corneodesmosin.

The desquamations of keratinocyte are induced by degradation of corneodesmosomes by proteinase of kallikrein. Several serine proteases, including the kallikrein 7 (stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE) and the kallikrein 5 (stratum corneum tryptic enzyme, SCTE) are playing a role on desquamation of corneodesmosomes.

In this study, we confirmed that retinol treatment induce increased corneocytes detachment(desquamations) and desquamations of corneodesmosomes by electronic microscopic study. The purpose of this study is to clarify the mechanism of retinoid induced corneocytes detachment. We hypothesized that retinoic acid influence the main components of corneodesmosomes and proteinases of corneodesmosomes (kallikrein). We performed Western blot study using cultured human keratinocytes cultured in low calcium (0.06mM) and high calcium (1.5mM) media with or without 10^{-6} M, 10^{-7} M retinoic acid.

In Western blot study, retinoic acid clearly inhibited DSG1 and DSC1. However KLK7 expression was not influenced by retinoic acid and KLK5 expression was decreased in high calcium media.

Therefore we concluded that decreased expression of DSG1 and DSC1 by retinoic acid induce increased desquamations.

Key words: Retinoic acid, Corneodesmosome, Desquamation,
Desmoglein, Desmocollin, Kallikrein