

각질형성세포에서 레티노인산(All-trans Retinoic Acid)에 의한 IL-8 발현의 기전

연세대학교 의과대학 피부과학교실, 피부생물학 연구소

정예리 · 강태원 · 오성민 · 정승용 · 김수찬

A Mechanism for the Up-regulation of the IL-8 Gene Expression in Keratinocytes by All-trans Retinoic Acid

Yae Lee Chung, M.D., Tae-Won Kang, M.D., Sung Min Oh, Seung Yong Chung, Soo-Chan Kim, M.D.

Department of Dermatology and Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Retinoic acid (RA) has been reported to induce the up-regulation of inflammatory cytokines such as IL-1, TNF- α and IL-8 in dermal fibroblasts and keratinocytes. There is no evidence to support a direct interaction between the RA-mediated transcriptional machinery and IL-8 gene transcription.

Objective: The aim of this study is to clarify the mechanism of the up-regulation of IL-8 in keratinocytes by RA.

Methods: The IL-1, IL-8, TNF- α and MCP-1 mRNA expressions in HaCaT cells stimulated by RA were measured by quantitative RT-PCR. The effects of a NF- κ B inhibitor and IL-1 receptor antagonist (ra) on the IL-8 mRNA expression were measured by quantitative RT-PCR. Electrophoretic motility shift assay (EMSA) was conducted on the RA-stimulated HaCaT cells that were or were not treated with NF- κ B inhibitor to measure the NF- κ B binding activity in each group. The phospho-I κ B activity in the HaCaT cells after stimulation with RA was also measured by Western blotting.

Results: An up-regulation of the IL-8 gene expression by RA was demonstrated in the HaCaT cells. The inhibition assay revealed the involvement of the NF- κ B binding site of the IL-8 gene in the RA-enhanced promoter activity. EMSA demonstrated that RA enhanced the formation of the DNA-NF- κ B complex. There was no evidence to support IL-1 as an intermediate stimulus between the RA-mediated transcriptional machinery and IL-8 gene transcription. Western blot analysis revealed increased phospho-I κ B activity in the HaCaT cells after stimulation with RA.

Conclusion: Our result suggested that the IL-8 gene expression of HaCaT cells after RA stimulation is caused by the activation of IKK and the dissociation of I κ B from NF- κ B and the transcription of NF- κ B in the nucleus.

(Korean J Dermatol 2009;47(6):674~682)

Key Words: HaCaT cells, IL-8, NF- κ B, Retinoic acid

서 론

레티노이드는 합성 및 자연 상태의 비타민 A로서 생체

내에서 레티노인산(retinoic acid, RA)으로 변형되어 기능을 한다¹⁻³. 세포내 활성상태인 레티노인산은 각질형성세포의 증식과 분화를 조절할 뿐만 아니라 피지선을 억제하여 건선이나 여드름 치료제로 사용되고 있다. 그리고 진피의 콜라겐 분해효소를 억제하기 때문에 피부 주름의 개선제로 흔히 이용된다¹⁻³. 그러나 레티노인산의 국소 도포는 홍반과 인설을 동반한 자극성 피부염을 유발하므로 그 사용에 제한이 있다⁴⁻⁶. 이러한 자극성 피부염의 원인으로 사이토카인이 관여되리라 생각되며, 레티노인산을 국소 도포한 마우스 피부와 레티노인산을 투여한 배양 각질형성세포에서

<접수: 2009년 4월 24일, 게재허가: 2009년 5월 29일 >
*이 연구는 연세학술연구비 지원(2004년)으로 이루어졌음.
교신저자: 김수찬
주소: 135-720 서울시 강남구 언주로 712
강남세브란스병원 피부과
전화: 02)2019-3362, Fax: 02)3463-6136
E-mail: kimsc@yuhs.ac

IL-1과 IL-8 유전자 발현이 증가됨이 보고된 바 있다.^{7,8}

레티노인산은 핵 내에서 레티노인산 수용체(retinoic acid receptor, RAR)와 결합하여 '레티노인산과 레티노인산 수용체의 복합체'를 형성한다. 이 복합체가 전사인자로 작용하여 표적 유전자의 전사 개시를 위한 표적 유전자 프로모터(target gene promoter)의 레티노인산 반응 영역(retinoic acid response elements, RARE)에 결합하여 표적 유전자의 발현을 유도하여 여러가지 기능을 나타낸다⁹⁻¹¹. 그러나 각질형성세포에서 레티노인산에 의한 사이토카인 발현이 어떤 기전에 의한 것인지 아직 밝혀져 있지 않다^{13,14}.

IL-8은 호중구나 T세포의 화학주성에 관계하거나 세포 사이의 결합이나 호중구의 활성화 또는 histamine의 분비를 조절하는 등의 역할을 하는 사이토카인으로서 여러 세포에서 자극 특이적인 방법으로 분비된다. 인간의 IL-8 프로모터의 5' flanking region에는 AP-1, AP-2, AP-3, glucocorticoid receptor, NF- κ B, NF-IL-6 등의 전사인자가 결합할 수 있는 반응 영역(response element)이 있어 IL-8의 분비를 조절한다. 이 중에서 NF- κ B는 IL-8 유전자 발현에 핵심적인 역할을 한다¹⁵. 하지만 IL-8 프로모터에는 레티노이드가 결합하는 반응 영역이 없으므로 레티노이드에 의한 IL-8 유전자 발현의 기전을 밝히는 연구가 필요하다.

NF- κ B는 사이토카인의 발현을 통해 면역반응과 염증반응을 매개하는 중요한 전사인자이다. 다양한 신호에 의해 자극되면 NF- κ B에 붙어 있는 I κ B는 I κ B kinase (IKK)에 의해 인산화 되면서 분리되어 분해(degradation)되고, NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동하여 여러 가지 유전자들의 발현을 활성화시키게 된다. 그 중에서도 IL-1 및 IL-8, TNF- α 는 NF- κ B에 의해서 활성화되며, 이들은 다시 NF- κ B를 직접적으로 자극하여 자가 조절성 고리를 형성하여 다른 사이토카인을 생산하게 함으로써 염증반응을 증폭시킨다¹⁶. NF- κ B는 사이토카인 생성 외에도 부착분자와 nitric oxide (NO) 및 cyclooxygenase (COX-2)와 같은 효소의 생산도 유발하여 염증반응을 일으키며 세포고사를 억제하여 세포를 보호하는 역할도 함께 하고 있다^{17,18}.

이번 연구에서는 각질형성세포에 레티노인산을 투여한 후 IL-1, TNF- α , IL-8, MCP-1의 mRNA 유전자 발현을 실시간 정량 PCR로 측정하였다. 그리고 사이토카인 발현에 주로 관여하는 전사인자인 NF- κ B의 작동여부를 electrophoretic motility shift assay (EMSA)로 확인하고, NF- κ B 억제제를 이용하여 NF- κ B가 작동하지 않을 때 IL-8의 발현여부를 확인하였다. 그리고 레티노인산이 I κ B의 인산화를 증가시켜 NF- κ B의 활성화를 유도하는지 알아보았다. 또한 레티노인산이 NF- κ B를 통해 IL-8 유전자 발현에 영향을 줄 때 직접적인 자극보다는 간접적인 경로가 있을 가능성을 생각하였다. 따라서 중간 자극제로서 가능성이 있는 IL-1의 영향으로 NF- κ B가 활성화되어 IL-8 유전자가 발현되는지를 알아 보기 위해 IL-1 receptor antagonist (ra)를 이용하여 IL-1의 영향을 배제한 후 레티노인산에 의한 IL-8 유전자 발현을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 HaCaT세포는 형질 전환된 각질형성 세포로 정상 각질형성세포와 형태 및 반응 양식이 동일하면서 지속적인 계대배양이 가능한 장점이 있다.

2. 실험방법

1) HaCaT세포 배양

HaCaT세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% antibiotic/antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 RPMI-1640 (Gibco BRL)을 세포배양액으로 이용하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

2) 레티노인산의 처리

10% FBS가 포함된 배양액으로 배양된 HaCaT세포가 culture flask 면적의 80% 정도를 차지하면, 각 culture flask에 0.1% ethanol, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M 및 10⁻⁸ M의 레티노인산 (all-trans-retinoic acid, ATRA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 2% FBS가 포함된 배양액에 각각 첨가하여 1시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 배양하였다.

3) 실시간 정량 PCR를 이용한 사이토카인 mRNA의 정량

(1) RNA분리 및 정량: 배양한 HaCaT세포로부터 RNA를 분리하기 위하여 TRIzol reagent (Gibco BRL)을 사용하여 제작사의 설명서에 따라 분리하였다. 각 대조군과 실험군으로부터 분리한 RNA를 60°C water bath에서 10분간 가열시켜 single strand로 분리한 후 spectrophotometer (Bio-photometer, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 RNA농도 및 순수도를 측정하였다.

(2) 역전사 반응(Reverse transcription): 각각의 대조군과 실험군으로부터 분리하여 정량, 보정한 RNA 1 μ g에 RNA PCR Kit Ver2.1 (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 제작사의 설명서에 따라 역전사반응을 실행하였다.

(3) 실시간 정량 PCR (Real time quantitative polymerase chain reaction): cDNA와 표적 사이토카인 유전자의 primers로 디자인한 Light Cycler probes 그리고 Light Cycler reaction protocol에 따라 만든 mixture를 섞어 만든 각각의 반응 혼합액을 capillary에, 한 실험 개체당 20 μ l씩 채운 다음, 95°C 1분(1회), 95°C 10초(1회), [60°C 15초, 72°C 8초](40회)의 thermal cycling condition에서 Light Cycler (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 실시간 정량 PCR을 진행시켰다. 실시간 정량 PCR에 사용된 각 사이토카인의 primers 및 Light Cycler probes는 Table 1과 같다.

인체 glucose-6-phosphate dehydrogenase (h-G6PDH) 유전자를 기준 표지자로 이용하였다. 최종 PCR 증폭 산물의 양은 h-G6PDH 기준 유전자를 5 \times 10⁶에서 5 \times 10²까지 10 배 단위로 단계적으로 희석하여 각각의 cycle에 해당하는

Table 1. Cytokine primers and hybridization probe for quantitative RT-PCR

IL-1			
Primers	Forward	5'-GTATGTGACTGCCCAAGA-3'	
	Reverse	5'-CAAGCACACCCAGTAGTCT-3'	
Amplicon size	190 bp		
Hybridization probe	5'-AGTGCCGTGAGTTTCCAGAAGAAGA-3'		
	3' Label: Fluorescein		
	5'-GAGGTTGGTCTCACTACCTGTGATGGTT-3'		
	5' Label: LCR640 3' Label: Phosphorylated		
GenBank access number	NM_000575		
TNF- α			
Primers	Forward	5'-CAGCCTGTAGCCCATGTT-3'	
	Reverse	5'-ATGGCAGAGAGGAGGTTGAC-3'	
Amplicon size	261 bp		
Hybridization probe	5'-GAGGGCCTGTACCTCTATCTACTCCCA-3'		
	3' Label: Fluorescein		
	5'-GTCCTCTCAAGGGCCAAGGCTG-3'		
	5' Label: LCR640 3' Label: Phosphorylated		
GenBank access number	NM_000594		
IL-8			
Primers	Forward	5'-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3'	
	Reverse	5'-CTTCTCCACAACCCTCTG-3'	
Amplicon size	200 bp		
Hybridization probe	5'-GTCCACTCTCAATCACTCTCAGTTCTTTGATA-3'		
	3' Label: Fluorescein		
	5'-ATTTGGGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG-3'		
	5' Label: LCR640 3' Label: Phosphorylated		
GenBank access number	BC013615		
MCP-1			
Primers	Forward	5'-CGCTAGCCAGATGCAAT-3'	
	Reverse	5'-TTGGGTTGTGGAGTGGGT-3'	
Amplicon size	255 bp		
Hybridization probe	5'-CGAGCCTCTGCACTGAGATCTTCCTA-3'		
	3' Label: Fluorescein		
	5'-TGGTGAAGTTATAGCAGCAGGTGACTGGG-3'		
	5' Label: LCR640 3' Label: Phosphorylated		
GenBank access number	M28226		

실험군의 양으로 나누어 비교 정량하였다.

4) EMSA를 이용한 NF- κ B 활성도 측정

(1) HaCaT세포로부터 nuclear extract 제작: T75 플라스크에 키운 HaCaT세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS 1 ml를 넣은 후 scraper로 세포를 긁어 1.5 ml eppendorf tube에 옮겼다. 1,200 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 pH 7.9의 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂와 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF로 구성된 buffer액 400 μ l를 넣고 다시 녹인 후 얼음 위에 10분간 두었다. 그 후 4°C에서 3분간 12,000 rpm으로 원심 분리한 후 다시 상층액을 제거하였다. pH7.9의 20 mM HEPES, 20% (V/V) glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5

mM DTT와 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)로 구성된 buffer액 100 μ l를 넣고 vortex한 후 20분간 얼음 위에 두었다. 4°C에서 3분간 12,000 rpm으로 원심 분리한 후 상층액(nuclear extract)을 단백질농도 2 μ g/ μ l로 맞춘 후 -70°C에 보관하였다.

(2) Gel-shift assay: Nuclear extract 10 μ g과 5 X incubation buffer 5 μ l, 증류수 25 μ l을 섞은 후 4°C에서 15분간 방치하고 P³²로 표지된 NF- κ B oligonucleotide (Promega, Madison, WI, USA) probe 2 μ l를 넣고 실온에서 20분간 방치하였다. NF- κ B의 probe는 NF- κ B oligo (1.75 pmol/ μ l) 2 μ l와 T4 polynucleotide kinase 10 \times buffer 1 μ l, r32P-ATP 1 μ l, dH₂O 5 μ l와 T4 polynucleotide kinase 1 μ l를 섞어 총

용량 10 μ l을 37°C에서 10분간 둔 후에 0.5 M EDTA 1 μ l 으로 반응을 정지시켰다. 89 μ l의 TE buffer를 첨가한 후 unincorporated nucleotide를 제거하기 위하여 G-25 spin column통과시켜 1,300 rpm으로 5분간 원심분리 후 하층액만 취하여 만들었다.

NF- κ B의 염기서열은 다음과 같다. NF- κ B: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'. Probe를 첨가 후 상온에서 20분간 보관한 후 0.1% bromphenol blue (BPB) dye를 각 샘플마다 2 μ l씩 넣고 6% non denaturing polyacrylamide gel에 150 V, 10 mA에서 2시간 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝나면 vacuum gel dryer (Bio-Rad)에서 건조시킨 후 X-ray film에 노출하여 감광시켰다.

5) NF- κ B 억제제 처리 후 IL-8 mRNA의 발현

NF- κ B의 억제제로는 Bay 11-7082 (Biomol, Plymouth, PA, USA)을 사용하였다. 10 μ M의 Bay 11-7082를 레티노인산 투여 1시간 전에 HaCaT세포에 주고 실시간 정량 PCR을 시행하여 IL-8 mRNA의 발현여부를 확인하였다.

6) IL-1ra 처리 후 IL-8 mRNA 발현

IL-1 수용체를 억제하기 위해 IL-1ra (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 50 ng/ml을 레티노인산 처리 24시간 전에 배양한 HaCaT세포에 미리 투여하였다. IL-1ra 처리 24시간 후에 레티노인산 10^{-6} M 및 10^{-7} M을 투여한 후 앞에서 설명한 방법대로 IL-8 mRNA 발현을 실시간 정량 PCR을 시행해 정량하였다.

7) Phospho-I κ B- α 항체를 이용한 Western blot

레티노인산을 처리하여 12시간, 24시간 배양한 HaCaT세포를 100 μ l의 SDS sample buffer를 이용하여 세포를 해리시킨 후 즉시 scraper를 이용하여 세포를 바닥에서 떼어 낸

후 micro tube로 옮겨서 10~15초간 초음파로 분해한 후 95~100°C정도로 5분간 가열해 얼음에 보관하였다. 이 후 5분간 원심분리하고 SDS-PAGE gel에 세포추출액을 20 μ l씩 넣어 nitrocellulose membrane에 전이하였다. SDS sample buffer의 조성은 62.5 mM Tris-HCl, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% w/v bromophenol blue이다. 전이 후에 nitrocellulose membrane을 25 ml TBS로 5분간 상온에서 보관 후 25 ml의 blocking buffer를 이용하여 상온에서 3시간 둔 후 Phospho-I κ B- α 항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 10 ml primary antibody dilution buffer를 첨가 한 후 4°C에서 약간씩 흔들어 주며 하룻밤 두었다. 다음에 TBS-Tween을 이용하여 5분간 3차례 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody (1 : 2,000)와 HRP-conjugated anti-biotin antibody (1 : 1,000)와 blocking buffer를 이용하여 1시간 상온에서 진동을 주며 보관 후 TBS-Tween을 이용하여 3차례 세척하였다.

Blocking buffer의 조성은 1 \times TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v nonfat dry milk를 150 ml 되게 만든 다음, 15 ml 10 \times TBS와 135 ml water를 넣어 섞는다. 그 후 7.5 g의 nonfat dry milk를 더 넣고 잘 섞은 다음 0.15 ml Tween-20 (100%)을 섞었다. Primary antibody dilution buffer의 조성은 1 \times TBS, 0.1% Tween-20 with 5% BSA를 20 ml되게 만든 다음 2 ml 10 \times TBS와 18 ml water를 섞은 후 1.0 g의 BSA를 넣고 섞을 때 20 μ l Tween-20 (100%)을 넣었다. 세척한 membrane을 10 ml LumiGLO (0.5 ml 20 \times LumiGLO, 0.5 ml 20 \times Peroxide and 9.0 ml Milli-Q water)을 첨가 후 1분간 상온에서 약간 흔들어 주면서 관찰 후 membrane이 마르지 않는 한도 내에서 과도한 용액은 제거 후 비닐 랩 (saran wrap)으로 싸 후 10초간 X-ray film에 현상하였다.

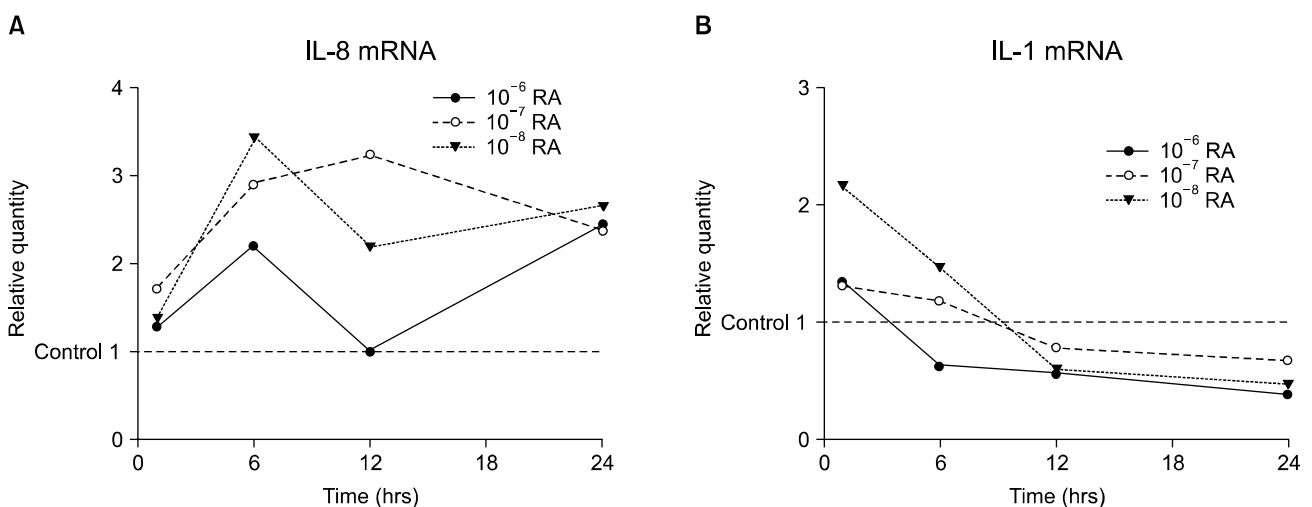


Fig. 1. Expression level of IL-8 and IL-1 mRNA in HaCaT cells stimulated by 10^{-6} , 10^{-7} , and 10^{-8} M retinoic acid for 24 hours. (A) Expression of IL-8 mRNA were increased for 1~24 hours after 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M retinoic acid stimulation, (B) Expression of IL-1 mRNA were increased for 1~6 hours after 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M retinoic acid stimulation.

결 과

1. 레티노인산 투여 후 HaCaT세포에서의 사이토카인 발현량 측정을 위한 실시간 정량 PCR실험

10⁻⁶, 10⁻⁷ 및 10⁻⁸M 레티노인산 투여 1, 6, 12, 24시간

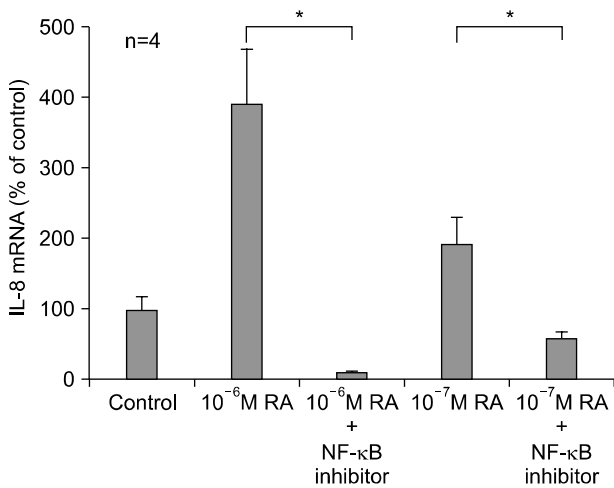


Fig. 2. Down regulation of the IL-8 mRNA expression in HaCaT cells pretreated with NF-κB inhibitors. *p<0.01

후 HaCaT세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M 농도에서 IL-8 mRNA는 1, 6, 12, 24시간에 증가되었다(Fig. 1A). IL-1 mRNA의 발현은 1, 6시간에 증가하였다가 다시 감소하였으며(Fig. 1B), TNF-α 및 MCP-1 mRNA는 발현이 증가되지 않았다.

2. NF-κB 억제제를 투여한 후 IL-8 mRNA 실시간 정량 PCR의 결과

NF-κB 억제제(Bay 11-7082) 투여 후 10⁻⁶ 및 10⁻⁷ M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M 두 농도에서 IL-8 mRNA 발현이 유의하게 저하되었다(Fig. 2).

3. NF-κB 억제제 투여 전후의 레티노인산 처리 후 HaCaT세포에서의 NF-κB결합 활성도 측정을 위한 EMSA

1) NF-κB에 대한 억제제(Bay 11-7082) 투여 전과 후에 10⁻⁶ 및 10⁻⁷ M 레티노인산 처리 12시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 NF-κB 결합 활성도

10⁻⁶ 및 10⁻⁷ M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT 세포에서 NF-κB결합 활성도 측정 결과, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M 두 농도에서 농도에 비례하여 NF-κB결합 활성도가 증가되었다

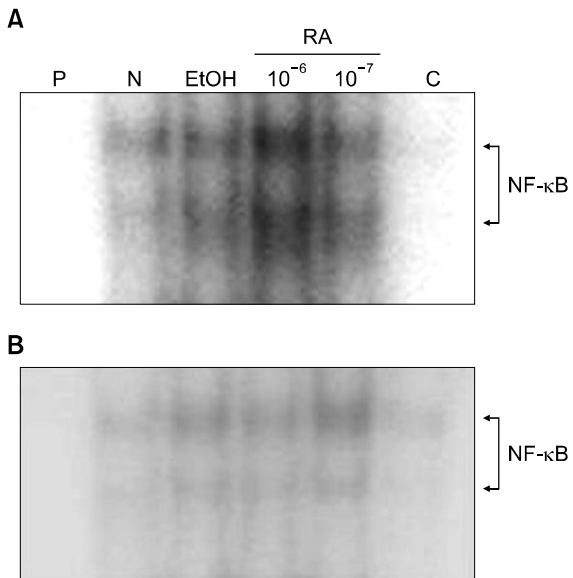


Fig. 3. NF-κB binding activity in HaCaT cells by EMSA after treated with all-trans retinoic acid for 12 hours. (A) Without NF-κB inhibitor, NF-κB binding activity was increased after 12 hours in HaCaT cells in 10⁻⁶, 10⁻⁷ M retinoic acid treated group, (B) After addition of NF-κB inhibitor, NF-κB binding activity was not increased after 12 hours in 10⁻⁶, 10⁻⁷ M retinoic acid treated group (P: probe only, N: normal, EtOH: ethanol, RA: retinoic acid, C: competitor).

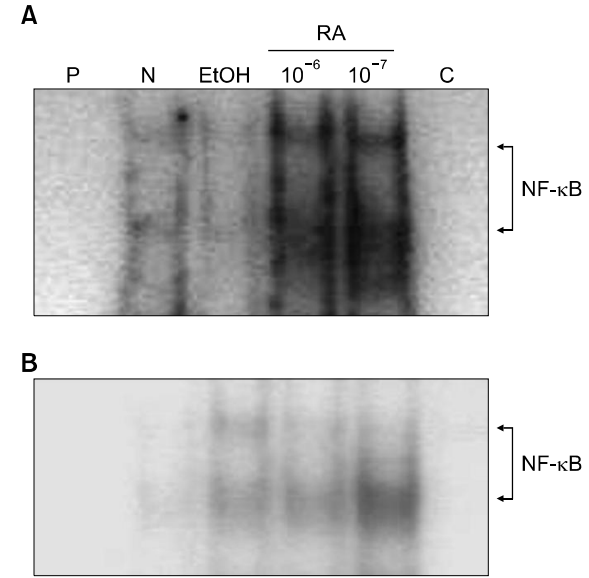


Fig. 4. NF-κB binding activity in HaCaT cells by EMSA after treated with all-trans retinoic acid for 24 hours. (A) Without NF-κB inhibitor, NF-κB binding activity was increased after 24 hours in HaCaT cells in 10⁻⁶, 10⁻⁷ M retinoic acid treated group, (B) After addition of NF-κB inhibitor, NF-κB binding activity was not increased after 24 hours in 10⁻⁶, 10⁻⁷ M retinoic acid treated group (P: probe only, N: normal, EtOH: ethanol, RA: retinoic acid, C: competitor).

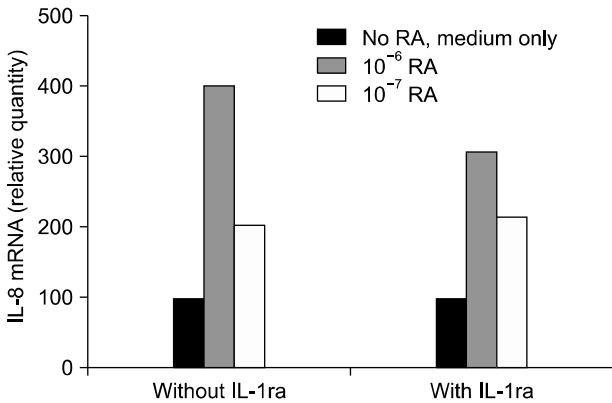


Fig. 5. Effect of IL-1 receptor antagonist (ra) on the IL-8 mRNA expression in HaCaT cells stimulated by retinoic acid

(Fig. 3A). 반면에 NF- κ B에 대한 억제제를 투여했을 경우에는 NF- κ B 결합 활성도에는 큰 변화가 없었다(Fig. 3B).

2) NF- κ B 억제제 투여 전후의 10⁻⁶ 및 10⁻⁷ M 레티노인산 처리 24시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 NF- κ B 결합 활성도

10⁻⁶ 및 10⁻⁷ M 레티노인산 투여 24시간 후 HaCaT 세포에서 NF- κ B결합 활성도 측정 결과, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M 두 농도에서 NF- κ B결합 활성도가 증가되었다(Fig. 4A). 반면에 NF- κ B에 대한 억제제를 투여했을 경우에는 NF- κ B 결합 활성도에는 큰 변화가 없었다(Fig. 4B).

4. IL-1ra가 레티노인산에 의한 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-1ra처리 전후에 레티노인산을 10⁻⁶, 10⁻⁷ M 투여하여 IL-8 mRNA의 발현을 비교하였을 때 IL-1ra를 처리하지 않은 좌측의 그래프와 IL-1ra 처리 후의 우측의 그래프에서 IL-8 mRNA발현에 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

5. Phospho-I κ B- α 항체를 이용한 Western blot

10⁻⁶ M 레티노인산 투여 12시간과 24시간 모두에서 세포질 내의 인산화 된 I κ B의 농도가 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 6).

고 찰

각질형성세포는 표피를 구성하는 세포로 단순한 물리적 장벽의 기능뿐만 아니라 많은 종류의 사이토카인을 분비하여 면역 기능과 염증반응에 관여한다²⁰. 외부 자극을 받으면 각질형성세포는 IL-1, TNF- α 와 같은 일차 사이토카인을 분비하여 IL-8이나 MCP-1, IP-10과 같은 케모카인의 생성을 유도함으로써 활성화된 염증세포들이 자극 부위로 모이게 하여 염증반응을 일으킨다²¹⁻²³.

레티노인산의 국소도포로 유발될 수 있는 자극성 피부

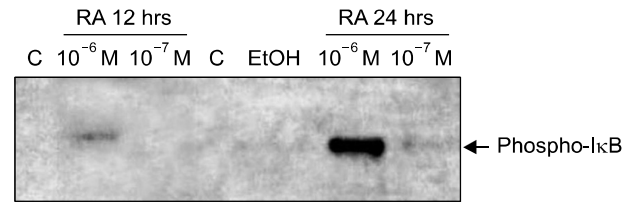


Fig. 6. Western blot analysis revealed increased phospho-I κ B activity in the cytoplasm of HaCaT cells at 12, 24 hours after stimulation with 10⁻⁶ M retinoic acid (C: control, EtOH: ethanol, RA: retinoic acid).

염은 다른 화학물질에 의한 전형적인 자극성 피부염에 비하여 다소 지연되어 나타나며 레티노인산으로 인한 염증 유발 기전에 IL-1, TNF- α , IL-8, IL-10 등의 사이토카인이 관여한다고 알려졌으나 이들 염증성 사이토카인이 발현되는 기전에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다²⁴⁻²⁶. 본 연구에서도 레티노인산 투여 후 IL-1, IL-8같은 사이토카인의 증가를 확인하였는데, IL-1은 자극 초기에만 증가하나 IL-8은 레티노인산 투여 24시간 후에도 증가하는 모습을 보였다.

레티노인산이 유전자 발현을 조절하는 방법으로는 몇 가지가 알려져 있다. 첫째로 레티노인산은 핵 수용체인 레티노인산 수용체(RAR α , β , γ)와 레티노이드 X 수용체(retinoid X receptor, RXR α , β , γ)에 결합하고 이들 수용체에 특이한 DNA 염기서열에 결합하여 리간드에 의한 전사조절에 관여하게 된다^{10,27}. 즉, RAR은 대개 RXR과 서로 합하여 이형이량체(heterodimer)를 형성하는데, 이 이형이량체는 특정 유전자 위쪽 프로모터에 존재하는 특이한 호르몬 반응 단위에 결합함으로써 특정 유전자의 발현을 전사적으로 활성화 시킨다¹⁰. 레티노인산 수용체에 의한 유전자 발현 조절의 두 번째 방법으로는 서로 연관되지 않는 전사인자와의 단백질-단백 직접결합에 의한 반응을 들 수 있다. 즉, 레티노인산은 AP-1에 반응하는 유전자에 대해서 억제하는 역할을 하는데, 이는 RAR이 AP-1 전사인자 복합체 중 하나인 c-JUN과 결합하여 AP-1이 반응 영역(response element)에 결합하는 것을 방지하며 대표적인 예가 collagenase promoter이다^{28,29}. 마지막으로 RAR과 연관이 전혀 없는 여러 유전자들도 레티노인산이 다른 전사인자를 활성화 시키거나 억제시킴으로써 유전자 발현을 조절하게 된다³¹.

NF- κ B는 사이토카인과 스트레스 또는 생물리화적인 자극에 의해 활성화되어 여러 유전자의 발현에 영향을 미침으로써 염증반응과 면역반응에 핵심적인 역할을 하는 전사인자이다. 불활성화 상태의 NF- κ B는 I κ B라는 NF- κ B의 억제제에 의해 세포질 내에 머물러 있다가 활성화되면 I κ B는 I κ B kinases (IKK)에 의해 인산화되면서 분해되고 NF- κ B는 핵 안으로 들어가 유전자와 결합한다¹⁶. 이러한 NF- κ B 경로는 여러 다양한 자극에 의해 세포마다 특이하

게 활성화되어 유전자 발현에 서로 다른 효과를 나타낸다³¹.

IL-8은 C-X-C 케모카인에 속하는 8.4 kDa의 케모카인으로 단핵구/대식세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 활막세포, 각질형성세포, 상피세포 등 다양한 세포와 위암세포나 뇌 신경종양 등의 종양세포에서도 생산된다³². IL-8의 전형적인 유도인자는 염증반응의 자극으로 IL-1, TNF, bacterial lipopolysaccharides, 바이러스, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, double-strand RNA 등이 있다. IL-8 유전자의 3' flanking region에는 ATTTA 모티프가 존재하여 여러 가지 사이토카인을 불안정화시키는 역할을 하고, IL-8의 프로모터인 5' flanking region에는 여러 가지 전사인자, 즉 AP-1, AP-2, AP-3, HSE, HNF-a, IRF-1, glucocorticoid 수용체, NF- κ B, NF-IL-6와 octamer factor가 결합할 수 있는 유전자들을 포함한다^{33,34}. 그러므로 NF- κ B가 IL-8 유전자의 전사에 핵심적인 역할을 한다고 추정할 수 있다.

본 연구에서는 레티노인산을 HaCaT세포에 투여하였을 때 시간에 따른 차이는 있었지만 IL-1과 IL-8의 증가를 확인할 수 있었다. 또한 레티노인산에 의해 IL-8이 증가되는 기전이 NF- κ B의 경로에 의한 것이라는 가설 하에 EMSA로 레티노인산 투여 후 농도와 시간에 따라 NF- κ B 발현이 증가됨을 확인하였으며, NF- κ B에 대한 억제제를 투여한 후 레티노인산을 처리하면 IL-8의 발현이 의미있게 감소되는 것을 알 수 있었다. 또한 레티노인산 처리 후 세포질 내에 인산화된 I κ B의 양이 증가되는 것을 확인하였다. 하지만 레티노인산에 의해서 IL-8이 증가하는 것은 증명되어 있으나 IL-8 유전자의 조절부위에 전형적인 레티노인산의 반응 단위가 존재하지 않으므로 레티노인산이 어떻게 IL-8의 발현을 증가시키는지에 대해서는 밝혀져 있지 않

며 다만 NF- κ B와 연관된다고 추정되어 왔다^{13,33}. 저자들은 이에 레티노인산 투여 후 초기에만 증가하는 IL-1 같은 일차 사이토카인이 중간 자극제 역할을 하여 IL-1이 IL-1 수용체에 결합 후 IKK를 활성화 시켜 NF- κ B가 핵 내로 진입하여 IL-8의 프로모터에 결합함으로써 IL-8 유전자 발현을 조절할 수 있다는 가설을 세우고 IL-1수용체에 대한 길항제를 투여하여 IL-1에 의한 NF- κ B의 활성화를 억제했을 때 IL-8의 발현이 증가되는지를 확인하였다. 결과에서 보듯이 IL-1ra 처리 후에 레티노인산을 투여하였을 때 발현되는 IL-8 mRNA의 양은 큰 차이가 없어 IL-1이 IL-8 유전자 발현에 영향을 미쳤다고 볼 수는 없었다. 결론적으로 레티노인산을 각질형성세포에 처리 후 NF- κ B 작동에 의해 IL-8 유전자 발현이 증가된 것은 레티노인산이 IKK에 의한 I κ B의 해리를 증가시켜 NF- κ B의 핵 내 진입을 용이하게 함으로써 IL-8 유전자 발현에 영향을 미쳤을 것이라고 생각된다(Fig. 7). 하지만 레티노인산이 어떤 경로를 통해 IKK를 활성화 시키는지에 대해서는 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

레티노인산을 각질형성세포에 투여하였을 때 증가하는 대표적 사이토카인인 IL-8의 유전자 발현에 레티노인산이 어떤 경로로 작용하는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다. 첫째, 레티노인산을 각질형성세포에 투여하였을 때 IL-1과 IL-8 mRNA의 발현이 증가하였다. 둘째, 레티노인산을 각질형성세포에 투여하면 각질형성세포 내의 I κ B의 인산화가 증대되었고 NF-

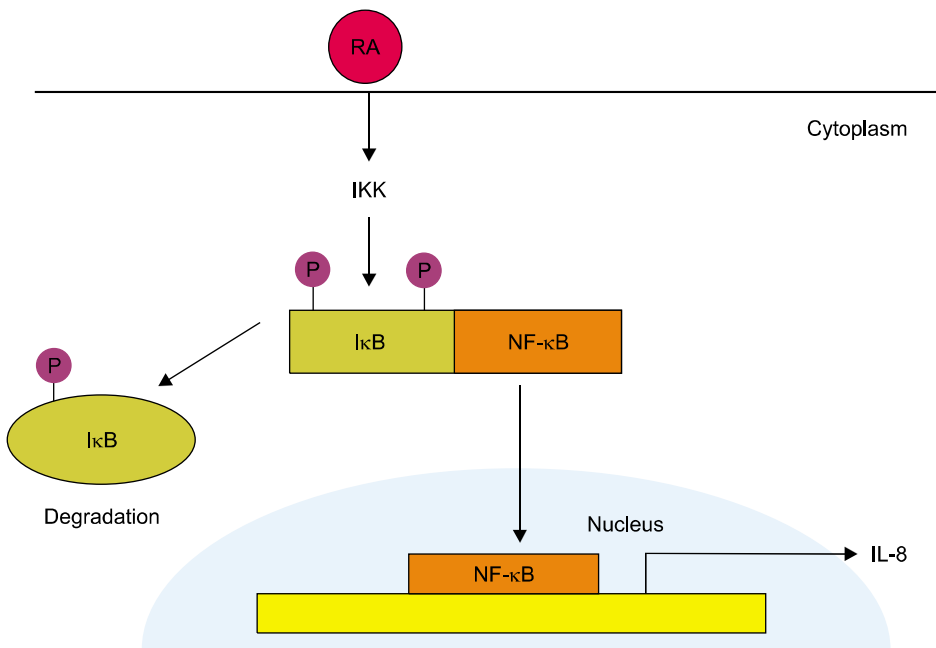


Fig. 7. A proposed mechanism of retinoic acid induced IL-8 gene expression in keratinocytes via I κ B degradation.

κ B가 활성화 되었다. 셋째, 레티노인산에 의한 IL-8 유전자의 발현에 IL-1은 중간자극체로서 관여하지 않았다. 결론적으로 레티노인산에 의한 각질형성세포의 IL-8 유전자 발현의 증가는 NF- κ B를 통해서 이루어짐을 알 수 있었다. 그리고 NF- κ B의 활성화는 IL-1에 의한 영향과는 관련이 없음을 확인하였으며 레티노인산에 의해 IKK가 활성화되면 이로 인해 I κ B의 인산화와 해리가 촉진되어 NF- κ B 활성화가 증가 되었을 것으로 추정하였다.

참 고 문 헌

- 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
- 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
- Ballow M, Wang W, Xiang S. Modulation of B cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;(Suppl. 80):73-81
- Yun JI. Retinoid. *Clin Dermatol (Seoul)* 1996;2:65-66
- Kang SW. Metabolism and molecular action of retinoids in human skin. *Clin Dermatology (Seoul)* 1997;3:8-10
- MacGregor JL, Maibach H. The specificity of retinoid-induced irritation and its role in clinical efficacy. *Exog Dermatol* 2002;1:68-73
- Petkovich PM. Retinoid and metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2001;(Suppl. 45):136-142
- Harant H, Lindley 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 Commun* 1995;10:898-906
- Harant H, de 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
- Chang MM, Harper R, Hyde DM, Wu R. A novel mechanism of retinoic acid-enhanced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *Am J Resp Cell Mol Bio* 2000; 22:502-510
- Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanism of retinoid actions in skin. *FASEB J* 1996;10:1002-1013
- 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 partially NF- κ B activation in murine epidermal cells. *J Med Den Sci* 2002;49:27-35
- Na SY, Kang BY, Chung SW, Han SJ, Ma X, Trinchieri G, et al. Retinoid inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical association of retinoid X receptor and NF- κ B. *J Bio Chem* 1999;274:7674-7680
- Bernard FX, Pedretti N, Rosoy M, Deguercy A. Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis. *Exp Dermatol* 2002;11:59-74
- Roebuck KA. Regulation of Interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:429-438
- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatments of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:514-521
- Pahl HL. Activators and targets genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogenes* 1999;18:6853-6866
- Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossman M. The regulation and roles of Rel/NF- κ B transcriptional factors during lymphocytes activation. *Curr Opin Immunol* 1998;10:353-359
- Brockman JA, Scherer DC, McKinsey TA, Hall SM, Qi X, Lee WY, et al. Coupling of a signal response domain in I κ B α to multiple pathways for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* 1997;15:2809-2818
- Shimada S, Katz SI. The skin as an immunologic organ. *Arch Pathol Lab Med* 1998;112:231-234
- Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990;(Suppl. 94):101-107
- Grone A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88:1-12
- Sauder DN. The role of epidermal cytokines in inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol* 1990;(Suppl. 95):27-28
- Jessens S, Bols L, Vandermeeren M. Retinoic acid potentiates TNF- α -induced ICAM-1 expression in normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:64-69
- Green GS. Retinoic acid effects on endothelial cell function: interaction with IL-1. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:53-61
- Gidlöf AC, Romert A, Olsson A, Törmä H, Eriksson U, Sirsjö A. Increased retinoid signaling in vascular smooth muscle cells by proinflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:336-342
- Yu VC, Delsert L, Anderson B, Holloway JM, Devary OV, Năär AM, et al. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response element. *Cell* 1991;67:1251-1266
- Shüle R, Rangarajan P, Yang N, Kliewer S, Ransone LJ,

- Bolado J, et al. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6092-6096
29. de Grazia U, Felli MP, Vacca A, Farina AR, Maroder M, Cappabianca L, et al. Positive and negative regulator of the composite octamer of the Interleukin-2 enhancer by AP-1, Oct-2 and retinoic acid receptor. *J Exp Med* 1994;180: 1485-1497
30. Segars JH, Nagata T, Bours V, Medin JA, Franzoso G, Blanco JCG, et al. Retinoic acid induction of major histocompatibility complex class I genes in NTERA-2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF-kappa B (p50-p65) and retinoic acid receptor beta-retinoid X receptor beta heterodimers. *Mol Cell Biol* 1993;13:6157-6169
31. Schooley K, ZHV P, Dower SK, Qwarnström EE. Regulation of nuclear translocation of nuclear factor-kappa B relA: evidence for complex dynamic at the single cell level. *Biochem J* 2003;369:331-339
32. Roebuck KA. Regulation of Interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:429-438
33. Chang MMJ, Harper R, Hyde DM, Wu R. A novel mechanism of retinoic acid-enhanced Interleukin-8 gene expression in air way epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:502-510
34. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF. Synergistic transcriptional activation of the Interleukin-8 gene by NF-kappaB p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 1994;153: 153-164
-