

# 천포창 혈청이 각질형성세포의 세포고사에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 피부과학교실, 피부생물학연구소

오성민 · 정승용 · 이정은 · 김수찬

=Abstract=

## The Effect of Pemphigus Sera on Apoptosis of Keratinocytes

Sung Min Oh, M.S., Sung Yong Jung, M.S., Jung Eun Lee, M.D., Soo Chan Kim, M.D.

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

**Background:** Pemphigus is an autoimmune blistering disease of skin and mucous membrane characterized by loss of adhesion between keratinocytes, a process known as acantholysis. The target molecules of autoantibodies are desmogleins which belong to cadherin family proteins of desmosome. Independently from the autoantibodies involved, the question whether apoptosis plays a role in the pathogenesis of pemphigus has not been addressed.

**Objectives:** The purpose of this study was to determine if pemphigus sera induce apoptosis in HaCaT cells and to elucidate the mechanism of apoptosis induced by pemphigus sera.

**Methods:** We treated pemphigus sera on HaCaT cells for 48 h and investigated whether apoptosis was induced or not through FACS analysis and TUNEL staining. In addition, we performed western blot analysis to detect cleavage of PARP, cytosolic cytochrome c and activation of caspase-8, 3, which play a major role in apoptosis. Soluble Fas ligand protein level in pemphigus sera was compared with the level in normal sera by ELISA. Pemphigus sera from which IgG was eliminated, were treated on HaCaT cells to elucidate the role of IgG in pemphigus sera-induced apoptosis.

**Results:** Using FACS analysis with Annexin-V and PI staining, we have shown that pemphigus sera induced apoptosis in HaCaT cells. TUNEL staining assay also confirmed the apoptosis were induced in HaCaT cells after treatment of pemphigus sera. Western blot analysis showed activation of caspase-3, release of cytochrome c, cleavage of PARP and decrease of procaspase-8 which is proform of active caspase-8 in HaCaT cells treated with pemphigus sera. We could not detect increased Fas ligand protein level in pemphigus sera compared with the level in normal sera. Moreover, since the removal of IgG obliterated the apoptosis inducing effects of pemphigus sera in HaCaT cells, IgG might be involved in the activation of caspase-8 and caspase-3.

**Conclusion:** We concluded that treatment of pemphigus serum induces the apoptosis of HaCaT cells through, at least in part, activation of caspase-8, caspase-3 and cytochrome c related mechanism, and that IgG in the pemphigus serum rather than Fas ligand is involved in the apoptosis. These results suggest that apoptosis may play an important role in the pathomechanism of pemphigus lesion. (Korean J Dermatol 2004;42(7):862~869)

**Key Words:** Apoptosis, Keratinocyte, Pemphigus serum, Autoantibody, Fas ligand

〈접수: 2004년 5월 4일〉

본 연구는 (주) 태평양 연구비 지원으로 이루어졌음.

교신저자: 김수찬

주소: 135-270 서울특별시 강남구 도곡동 146-92

영동세브란스병원 피부과

전화: 02)3497-3360 Fax: 02)3463-6136

E-mail: kimsc@yumc.yonsei.ac.kr

## 서 론

천포창(pemphigus)은 피부와 점막에 수포를 형성하며 조직학적으로 각질형성세포와 각질형성세포 사이의 결합이 풀어지는 현상, 즉 극세포해리(acantholysis)를 특징으로 하는 만성 수포성 질환이다<sup>1</sup>. 천포창 환자는 혈청 내에

cadherin 가족에 속하는 desmoglein (Dsg)에 대한 자가항체를 가지고 있으며 이 자가항체가 교소체(desmosome) 구성 성분인 Dsg에 결합함으로써 극세포해리(acantholysis)를 일으키는 자가항체에 의한 자가면역 수포성질환이다<sup>2,5</sup>.

천포창 자가항체에 의한 극세포해리의 기전은 자가항체가 Dsg에 결합함으로써 각질형성세포에서 plasminogen activator가 유리된다는 가설과 각질형성세포에서 신호전달이 일어나 Dsg이 인산화됨으로써 극세포해리가 일어난다는 가설이 있으며 자가항체가 Dsg에 결합하여 그 입체구조를 변형시킴으로써 Dsg의 기능이 소실되어 극세포해리가 일어난다는 가설이 있다<sup>1,6,7</sup>.

한편 천포창의 병변에서 세포고사가 관찰되며<sup>8</sup> 천포창 환자의 혈청에 존재하는 Fas ligand에 의해 caspase-8이 활성화되어 세포고사가 일어난다는 연구 보고가 있다<sup>9</sup>. 그러나 천포창 혈청에 의한 세포고사가 어떤 기전에 의해서 일어나는지 정확히 밝혀지지 않았고 세포고사와 극세포해리와의 관계도 밝혀진 바 없다.

본 연구에서는 천포창 혈청이 형질전환된 각질형성세포인 HaCaT세포의 세포고사에 미치는 영향과 그 기전을 알아보기 위하여 천포창 혈청에 의한 세포고사의 유발을 fluorescence-activated cell sorter (FACS) 분석과 TUNEL 염색을 통하여 알아보고, 세포고사에서 중요한 역할을 하는 단백질인 procaspase-8, caspase-3, poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) 및 cytochrome c를 western blot으로 분석하였다. 또한 천포창 혈청 내의 Fas ligand가 세포고사에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 시행하여 정상인의 혈청과 천포창 환자의 혈청 내의 Fas ligand 농도를 비교 측정하였으며, protein A를 이용하여 IgG를 제거한 천포창 혈청을 HaCaT 세포에 투여하여, 천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사에 있어서의 IgG의 역할에 대해 알아보았다.

실험결과 천포창 혈청을 투여한 후 48 시간 동안 배양한 HaCaT 세포에서 FACS 분석을 통하여 세포고사를 관찰할 수 있었으며, TUNEL 염색에서도 세포고사를 확인하였다. Western blot을 시행하여 caspase-8의 전구체인 procaspase-8이 감소하였음을 관찰할 수 있었으며, executioner caspase인 caspase-3의 활성화와 PARP의 절단을 관찰하였다. 또한 미토콘드리아에서 세포질 내로 방출되어 나온 cytochrome c도 측정함으로써 세포고사 유발을 확인하였다. 한편, 천포창 혈청 내의 IgG를 제거한 천포창 혈청을 투여한 HaCaT 세포에서는 procaspase-8의 단백질 양 변화를 관찰할 수 없었고, caspase-3의 활성화 역시 발견할 수 없었다. ELISA를 통한 천포창 혈청 내의 Fas ligand 농도 측정 결과, 천포창 혈청과 정상인 혈청의 Fas ligand 농도의 유의적인 차이는 발견

할 수 없었다.

이상의 결과로 보아 천포창 혈청은 death receptor를 통한 caspase-8과 caspase-3의 활성화 뿐 아니라 미토콘드리아로부터의 cytochrome c 방출을 통하여 HaCaT 세포의 세포고사를 유도하며, 세포고사는 천포창 혈청 내의 Fas ligand 보다는 IgG 자가항체의 영향 때문인 것으로 사료된다. 또한 천포창 혈청에 의해 유발되는 세포고사가 극세포해리 형성에 중요한 역할을 하리라 생각된다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에 이용된 HaCaT 세포는 형질전환된 각질형성 세포로서 정상 각질형성세포와 형태 및 반응 양식이 동일하면서 계대 배양이 제한되지 않아 유지하기가 매우 편리한 장점이 있다<sup>10,11</sup>.

### 2. 실험 방법

#### 1) HaCaT 세포 배양

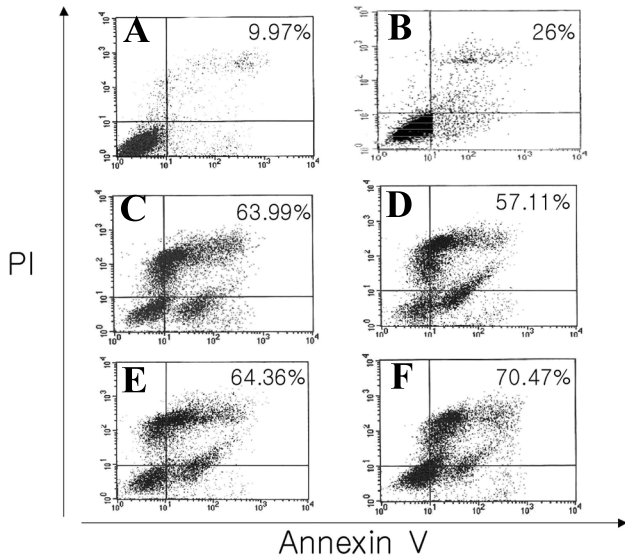
HaCaT 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL)을 첨가한 RPMI-1640 (Biowhittaker, Baltimore, MD, USA)을 세포 배양액으로 사용하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 유지되는 항온기 (incubator)에서 배양하였다. 계대 배양은 세포가 배양 플라스크 면적의 80% 정도를 차지할 때까지 배양한 다음, 0.05% trypsin (Gibco BRL)과 53 mM EDTA (Amersham, Piscataway, NJ, USA)를 첨가한 Hanks' balanced salt solution (Biowhittaker)를 이용하여 세포를 배양 플라스크로부터 분리하고 20%의 FBS가 포함된 배양액으로 trypsin을 중화시킨 후 원심 분리하여 여러 차례 계대 배양 하였다.

#### 2) 천포창 혈청의 투여

면역형광검사의 역가 1:160 이상의 심상성 천포창 (pemphigus vulgaris; PV) 환자 2명과 낙엽상 천포창 (pemphigus foliaceus; PF) 환자 2명으로부터 얻은 혈청을 55°C에서 30 분간 놓아두어 보체를 비활성화 시킨 후에 pore size 0.22 μm의 syringe filter (PALL, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 세균을 제거하였다. 이 혈청을 25%의 농도가 되도록 세포 배양액에 투여하고 48 시간 동안 배양하였다.

#### 3) Fluorescence activated cell sorter (FACS) 분석

세포고사 분석실험은 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)사의 annexin-V FITC kit의 프로토콜에 따라 수행하였다. HaCaT 세포에 천포창 혈청을 투여하고 48시간 동

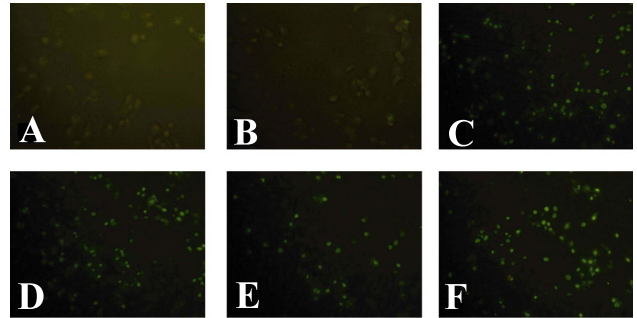


**Fig. 1.** Pemphigus sera induced apoptosis determined by flow cytometric analysis. HaCaT cells were treated with either normal serum (B) or pemphigus sera (C-F) for 48h, and stained with FITC-conjugated annexin V and propidium iodide (PI) to assess viable cells (annexin V-negative and PI negative, lower left quadrant), early apoptotic cells (annexin V-positive, PI negative, lower right quadrant), and late apoptotic/nonviable cells (annexin V-positive and PI positive, upper right quadrant). The percentage of apoptotic cells were increased in cells treated with pemphigus sera. The indicated percentage means early plus late apoptotic cells. (A: media only, B: normal serum, C: PF1, D: PF2, E: PV1, F: PV2)

안 배양한 후에 53 mM EDTA를 함유한 0.05% trypsin 용액을 이용하여 세포를 배양 플라스크 바닥에서 떼어냈다. 세포를 차가운 PBS로 2 회 세척한 후  $1 \times 10^6$  개의 세포를 annexin-V binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>] 1 ml를 첨가하여 부유시켰다. 여기서 100  $\mu$ l만 취하여 annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Pharmingen)에 들어있는 annexin-V 용액 5  $\mu$ l와 propidium iodide (PI) 용액 5  $\mu$ l을 첨가하여 살짝 섞어준 뒤 실온에서 빛을 차단하여 15 분간 반응시켰다. 400  $\mu$ l의 binding buffer를 더 첨가하여 1 시간 이내에 flow cytometry (BD biosciences, Bedford, MA, USA)로 세포고사를 관찰하였다.

**4) TUNEL 염색**

Lab-Tek II chamber slide (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA)에서 배양한  $1 \times 10^5$  개의 HaCaT 세포에 천포창 혈청을 투여하고 48 시간이 지난 후에 PBS로 세척하였다. PBS에 녹인 4% paraformaldehyde 용액 200

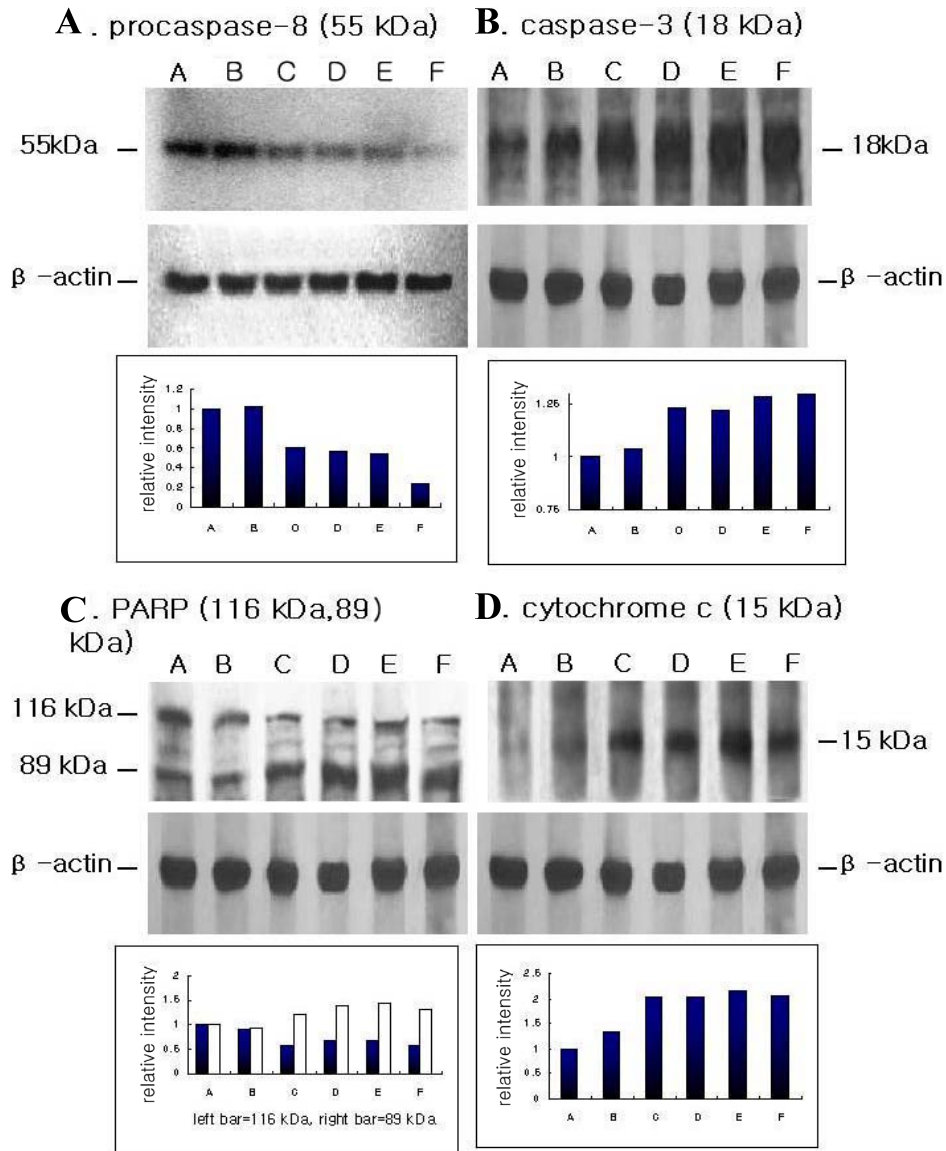


**Fig. 2.** Identification of apoptosis by TUNEL staining. HaCaT cells were plated in chamber slides and cultured in RPMI. Cells were then treated for 48h with the addition 25% serum from either healthy subjects (B) or pemphigus patients (C-F). Pemphigus sera induced HaCaT cell apoptosis. Note bright, condensed nuclei of apoptotic cells. (A: media only, B: normal serum, C: PF1, D: PF2, E: PV1, F: PV2) (TUNEL stain,  $\times 400$ )

$\mu$ l를 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 세포를 고정시킨 후 chamber slide를 PBS로 세척하고 blocking 용액(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol) 200  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 10 분간 blocking 시킨 후 PBS로 세척하였다. 투과성 용액(0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate) 200  $\mu$ l를 첨가하여 얼음 위에서 2 분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하고 In situ cell death detection kit (Roche, Indianapolis, IN, USA)에 들어있는 fluorescein labeled nucleotides, terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt)가 포함된 TUNEL reaction mixture 용액 50  $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 빛을 차단하여 반응시켰다. 이후 PBS로 3 회 세척한 후 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 200 배와 400 배 배율로 관찰하였다. 형광현미경의 excitation 파장은 460-490 nm, detection 파장은 515 nm 파장의 필터를 사용하였다.

**5) Western blot**

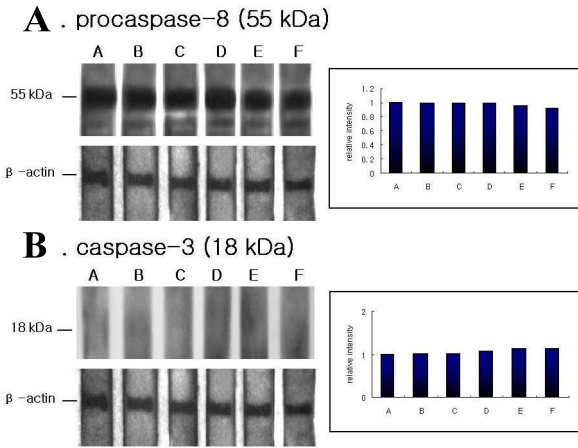
HaCaT 세포에 천포창 혈청을 투여한 후 48 시간 동안 배양한 세포( $1 \times 10^6$  cells)를 PBS로 2 회 세척하여 RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC (deoxycholic acid, 0.1% SDS)]를 이용하여 세포를 분해하여 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액만 따로 모아서 세포 추출액을 얻었다. 세포 추출액을 단백질 농도 30 $\mu$ g으로 정량하여 14% polyacrylamide gel에 125 V로 전기영동 시킨 후 nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 blotting 시켰다. Membrane은 Red Ponceau S 용액으로 염색시켜 단백질을 확인하였고 2 시간 동안 blocking buffer [1 $\times$ TBS (pH 7.4), 0.1% tween-20, 5% nonfat milk]로 blocking한 후 각각 goat anti-procaspase-8 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)는 1:100으로, rabbit anti-caspase-3 항체



**Fig. 3.** Western blot analysis of procaspase-8, caspase-3, PARP and cytochrome c after treatment with pemphigus sera for 48h in HaCaT cells. Degradation of procaspase-8 (A), activation of caspase-3 (B), cleavage of PARP (C) and cytochrome c release in cytosol (D) after treatment with pemphigus sera in HaCaT cells. (A: media only, B: normal serum, C: PF1, D: PF2, E: PV1, F: PV2)

(BD Pharmingen)는 1:2000으로, rabbit anti-PARP 항체 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)는 1:1000으로, goat anti-cytochrome c 항체(Santa Cruz Biotechnology)는 1:100으로 1차 항체 희석 용액(1×TBS, 0.05 % tween-20, 5 % BSA)으로 희석하여 4°C에서 밤새 반응시킨 다음 TBS/0.1 % tween-20 용액으로 10 분씩 3 회 세척하고, goat anti-procaspase-8 항체와 goat anti-cytochrome c 항체는 peroxidase-conjugated anti-goat 2차 항체(DAKO, Glostrup, Denmark)로, rabbit anti-PARP 항체와 rabbit anti-caspase-3 항체는 peroxidase-conjugated anti-rabbit 2차 항체(DAKO)를

사용하여 TBS/0.05% tween-20 용액에 1:1000 비율로 희석 해서 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. Caspase-3에 대한 1차 항체는 활성화 형태의 caspase-3와 반응하는 항체를 사용하였다. TBS/0.1% tween-20 용액으로 10 분씩 3 회 세척한 후 ECL 용액(Amersham)으로 5 분간 반응시켜 X-ray film (Agfa, Kontich, Belgium)에 감광시켰다. 같은 농도의 단백질로 전기영동 되었는지 확인하기 위해 mouse anti- $\beta$ actin 항체(Sigma, St Louis, MO, USA)와 peroxidase-conjugated anti-mouse 2차 항체(DAKO)를 사용하여 반응시켰다.



**Fig. 4.** Western blot analysis of procaspase-8 and caspase-3 after treatment with IgG eliminated pemphigus sera in HaCaT cells. The results showed no degradation of procaspase-8 (A) and no activation of caspase-3 (B) after treatment with IgG eliminated pemphigus sera. (A: media only, B: normal serum, C: PF1, D: PF2, E: PV1, F: PV2)

**6) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

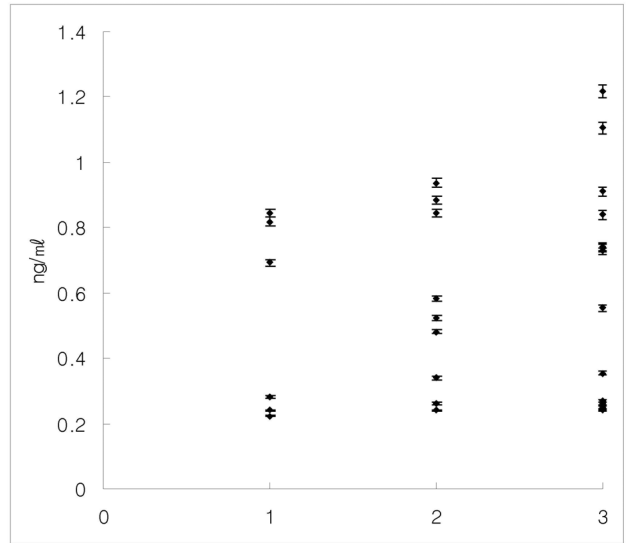
천포창 혈청 내의 Fas ligand 농도를 정량하기 위해 sFas ligand ELISA kit (MBL, Nagoya, Japan)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 시행하였다. 약술하면, 혈청 100 μl를 항체가 부착되어 있는 96-well plate에 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 kit에 포함된 세척 용액으로 4 회 세척하고 kit에 포함된 결합 용액 100 μl를 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 4 회 세척한 후 kit에 포함된 기질 용액 100 μl를 첨가하여 실온에서 30 분간 반응시킨 후 반응 중지 용액(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100 μl를 첨가하여 반응을 중지시키고 곧바로 흡광도 450 nm에서 단백 농도를 측정하였다.

**7) 천포창 혈청 내의 IgG 제거**

IgG의 Fc 부분과 강하게 결합하는 protein A를 함유하고 있는 Pansorbin 용액(Calbiochem, San Diego, CA, USA)을 천포창 혈청 300 μl에 30 μl를 첨가하여 4 °C에서 밤새 반응시키고 14,000 rpm으로 원심 분리하여 IgG가 결합된 pellet은 제거하고 상층액만 따로 보관 하였다.

**8) 세포질 내 cytochrome c 분리**

천포창 혈청을 투여하고 48 시간 동안 6-well plate에서 배양한 세포 (1×10<sup>6</sup> cells)를 PBS로 세척하고 1.5 ml 용량의 microtube (Eppendorf, Hamburg, Germany)에 모아서 20 mM HEPES/KOH (pH 7.4), 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 구성된 완충액 500 μl를 첨가하여 균질화기(IKA, Rawang, Mala-



**Fig. 5.** Fas ligand ELISA of pemphigus sera. There are no significant difference of Fas ligand level between pemphigus sera and healthy control sera [1:control sera (n=6), 2:PF sera (n=10), 3:PV sera (n=13)] (*p*>0.05).

ysia)로 균질화시켜 500 x g, 25 °C에서 5 분 동안 원심분리 시켰다. 상층액은 따로 모아서 13,000 x g, 4 °C에서 20 분 동안 다시 원심분리 시켰다. 원심분리 후의 pellet은 미토콘드리아 분획이며, 상층액은 100,000 g, 4 °C에서 60 분간 다시 원심분리 시켜서 세포질 분획(상층액)을 얻었다.

**결 과**

**1. Fluorescence activated cell sorter (FACS) 분석**

천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사를 Fluorescence-activated cell sorter (FACS)분석으로 알아보았다. 48 시간 동안 배양한 후 아무것도 투여하지 않은 세포와 정상인 혈청을 투여한 세포에서는 각각 9.97%, 26%로 세포고사가 일어난 반면, 천포창 환자의 혈청을 투여한 세포에서는 57.11% 부터 70.47%로 세포고사가 많이 일어났다. 이것으로 천포창 혈청에 의해 HaCaT 세포에서 세포고사가 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 1).

**2. TUNEL 염색**

아무것도 투여하지 않은 세포와 정상인 혈청을 투여한 세포에 비해 천포창 환자의 혈청을 투여한 세포에서 더 많은 세포고사를 관찰함으로써 천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사를 확인하였다(Fig. 2).

**3. Western blot**

천포창 환자의 혈청을 처리한 세포에서는 아무것도 처

리하지 않은 세포와 정상인 혈청을 투여한 세포에 비해 활성화 형태의 caspase-8의 전구체인 procaspase-8이 감소하였음을 볼 수 있었다. 이와 함께 활성화 형태의 caspase-3와 미토콘드리아에서 세포질로 방출된 cytochrome c도 천포창 환자의 혈청을 처리한 세포에서 관찰하였다. 또한 PARP의 절단을 확인함으로써 세포고사가 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 3).

#### 4. IgG 제거한 천포창 혈청을 투여한 HaCaT 세포의 western blot 결과

혈청 내의 IgG가 천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사에서 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여 혈청 내의 IgG를 제거한 천포창 환자의 혈청을 HaCaT 세포에 투여한 결과, 아무것도 투여하지 않은 세포와 정상인 혈청을 투여한 세포와 비교했을 때 procaspase-8의 단백질 양 변화가 거의 없었다. 또한 caspase-3의 활성화도 관찰할 수 없었다. 즉, 천포창 혈청 내의 IgG가 천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사에서 중요한 역할을 하였으리라 생각된다(Fig. 4).

#### 5. Fas ligand ELISA 결과

천포창 환자의 혈청과 정상인 혈청 내의 Fas ligand 단백질 농도 차이를 알아보기 위하여 Fas ligand ELISA를 시행하였다. 실험 결과 정상인 혈청과 천포창 환자 혈청 내의 Fas ligand 단백질 농도는 유의적 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5).

### 고 찰

천포창은 피부와 점막에 수포를 형성하는 대표적인 자가면역 수포성질환으로 혈청 내에 있는 자가항체가 수포를 형성하는 역할을 한다<sup>1,2</sup>. 천포창의 자가 항체는 Dsg에 결합하여 극세포해리(acantholysis)를 일으키는데, 그 기전에 대해서는 세 가지의 가설이 있다<sup>3,4</sup>. 첫째는, 각질형성 세포 표면의 Dsg에 자가항체가 결합하면 각질형성세포에서 plasminogen activator가 유리됨으로써 plasminogen이 활성화되어 plasmin이 유리되면 Dsg과 같은 세포결합물질을 단백질 분해시킨다는 것<sup>12-14</sup>과 둘째는 자가항체가 desmoglein에 결합하면 protein kinase C가 활성화되고 Dsg을 인산화시켜 Dsg과 plakoglobin의 결합이 풀어지게 되고 Dsg 기능의 손실이 초래되어 결국 극세포해리를 일으킨다는 것이다<sup>6</sup>. 세번째는 자가항체가 Dsg에 결합하여 Dsg의 입체구조를 변형시킴으로써 Dsg의 기능이 소실되어 극세포해리가 일어난다는 것이다<sup>7</sup>.

한편 천포창 병변 조직에서 극세포해리 외에 세포고사가 관찰된다는 연구가 보고되고 있다<sup>8,9</sup>. 그러므로 천포창

에서 세포고사가 극세포해리 등의 병변을 일으키는데 어떤 역할을 하리라 추측할 수 있다. 그러나 어떠한 기전으로 세포고사가 일어나는지에 대해서는 아직 잘 밝혀지지 않았다.

세포고사는 DNA 절단, 세포의 축소, 핵의 응축등의 과정이 특징적으로 일어나며 주위에 염증 반응을 일으키지 않고 세포가 분해되어 소멸되는, 세포사멸의 특정한 형태이다<sup>15,16</sup>. 세포막의 TNF 수용체나 Fas 수용체같은 death receptor에 세포고사 신호가 들어오면 세포내의 initiator caspase인 procaspase-8이 활성화 형태의 caspase-8으로 잘리게 된다<sup>16-18</sup>. Caspase-8은 procaspase-3를 caspase-3로 자르고 caspase-3는 결국 세포고사를 유발시키며 116kDa의 PARP가 116kDa과 89kDa으로 잘려진 것을 확인함으로써 세포고사가 유발되었음을 알 수 있다<sup>19-22</sup>. 세포막의 수용체에서 기인하는 caspase-8의 활성화와 이에 따른 caspase-3의 활성화에 의한 세포고사 경로를 extrinsic pathway 라고 한다<sup>23</sup>. Extrinsic pathway 외에 Bax 단백질과 같은 pro-apoptotic 단백질에 의한 자극이 mitochondria에서 cytochrome c를 세포질 내로 유리시키고 세포질로 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor1 (Apaf-1)과 결합하여 caspase-9를 활성화시키고 결국 caspase-3를 활성화 시켜서 세포고사를 유발한다<sup>24,25</sup>. 이와 같이 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 방출되어 caspase-3의 활성화에 의한 세포고사 경로를 intrinsic pathway라고 한다<sup>23,26,27</sup>. 또한 extrinsic pathway에서 활성화 된 caspase-8은 Bid 단백을 tBid로 자르고 tBid는 미토콘드리아에 들어감으로써 미토콘드리아 내에 있는 cytochrome c가 세포질로 방출되게 한다<sup>28</sup>. 최근에는 endoplasmic reticulum (ER) stress에 의해서도 세포고사가 유발된다는 연구가 보고되고 있다<sup>29,30</sup>.

본 실험에서는 천포창 환자의 혈청에 의해 각질형성세포에서 세포고사가 유발되는지를 알아보기 위하여 FACS 분석과 TUNEL 분석을 시행하였고, 이러한 세포고사가 어떤 기전에 의해서 일어나는지 알아보기 위하여 procaspase-8, caspase-3, PARP 그리고 cytochrome c를 western blot을 통하여 측정하였다. 또한 혈청 내에 있는 Fas ligand가 세포고사에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 ELISA를 시행하였으며 천포창 혈청 내의 IgG 자가항체가 세포고사 유발에 있어서 어떠한 역할을 하는지 규명하기 위해 protein A를 이용하여 IgG를 제거한 천포창 혈청을 HaCaT 세포에 투여함으로써 그 역할을 알아보았다.

실험결과 천포창 혈청을 투여하고 48 시간 동안 배양한 HaCaT 세포에서 세포고사가 유발되었음을 Annexin-V와 PI 염색을 이용한 FACS 분석을 통하여 알 수 있었다. TUNEL 분석에서도 천포창 혈청을 투여하지 않은 HaCaT

세포보다 천포창 혈청을 투여한 HaCaT 세포에서 더 많이 세포고사가 유발됨을 관찰하였다. Western blot 결과 procaspase-8의 감소를 볼 수 있었다. Procaspase-8의 감소는 활성화 형태인 caspase-8의 증가를 의미하며 이는 caspase-8이 활성화 되었음을 의미한다. 또한 활성화된 caspase-3와 잘려진 형태의 PARP도 관찰하였다. 이 같은 결과는 천포창 혈청에 의한 세포고사가 death receptor에 의한 extrinsic pathway에 의해 유발되었음을 말해준다. 또한 미토콘드리아로부터 방출되는 cytochrome c 역시 세포질에서 관찰되어 미토콘드리아를 경유하는 intrinsic pathway에 의해서도 세포고사가 일어남을 알 수 있었다. Fas ligand ELISA 결과 정상인의 혈청과 천포창 환자의 혈청 내의 Fas ligand 농도는 별 차이가 없었다. Protein A를 이용하여 혈청 내의 IgG를 제거한 천포창 환자의 혈청을 투여한 HaCaT 세포에서는 procaspase-8의 단백질 양 변화가 없었고 caspase-3 역시 활성화 되지 않았음을 관찰하였다.

결론적으로, 천포창 혈청에 의해 각질형성세포에서 세포고사가 유발되며 세포고사가 천포창에서의 극세포해리 증 유발에 어떤 역할을 하리라 추측할 수 있다. 천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사는 death receptor와 caspase-8, caspase-3 활성화를 통한 extrinsic pathway 뿐만 아니라, 미토콘드리아를 경유하는 intrinsic pathway의 두 가지의 경로가 모두 관련되어 일어 난다고 볼 수 있다. 또한 천포창 혈청에 의한 HaCaT 세포의 세포고사는 혈청 내의 Fas ligand 보다는 IgG 자가항체에 의한 것으로 생각 된다.

## 결 론

천포창 혈청을 투여한 후 48 시간 동안 배양한 HaCaT 세포에서 세포고사가 유발되었음을 FACS 분석 및 TUNEL 염색을 통하여 확인할 수 있었다. 또한 세포고사에서 중요한 인자인 procaspase-8의 감소와 caspase-3의 활성화, PARP의 절단 그리고 세포질 내의 cytochrome c 증가를 western blot을 통하여 확인하였다. 그러나 천포창 혈청 내의 IgG를 제거한 천포창 혈청을 HaCaT 세포에 처리하고 48 시간 동안 배양한 후 western blot으로 확인한 결과 procaspase-8이 감소하지 않았으며 caspase-3 역시 활성화 되지 않았다. 그러므로 혈청 내의 IgG 자가항체를 제거한 천포창 혈청을 투여한 HaCaT 세포에서는 세포고사가 유발되지 않았음을 알 수 있었다. 천포창 혈청 내에 있는 Fas ligand가 세포고사를 유발하였는지 알아보기 위하여 Fas ligand ELISA를 시행하였으나 천포창 혈청과 정상 혈청사이에 Fas ligand 농도의 뚜렷한 차이를 발견하지 못했다.

따라서 천포창 혈청에 의한 각질형성세포의 세포고사는 caspase-8, caspase-3의 활성화에 의한 extrinsic pathway 뿐 아니라 미토콘드리아에서 cytochrome c 방출을 통하여 유도되는 intrinsic pathway도 관여하는 것으로 생각된다. 또한 혈청 내의 Fas ligand 보다는 혈청 내의 IgG 자가항체가 천포창 혈청에 의한 각질형성세포의 세포고사를 유발하는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Stanley JR. Pemphigus, In Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Dermatology in general medicine*. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003:558-567
2. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Eng J Med* 1982;306:1189-1196
3. Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 1999;20:92-102
4. Amagai M, Klaus-Kovtun, Satnley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991;67:869-877
5. Stanley JR. Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous disease due to defective epidermal cell adhesion. *Adv Immunol* 1992;53:291-325
6. Aoyama y, Owada MK, Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris IgG, induces phosphorylation desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* 1999;29:2233-2240
7. Futei Y, Amagai M, Sekiguchi M, Nishifuji K, Fujii Y, Nishikawa T. Use of domain swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2000;115:829-834
8. Gniadecki R, Jemec GBE, Thomsen BM, Hansen M. Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases. *Arch Dermatol Res* 1998;290:528-532
9. Puviani M, Marconi A, Cozzani E, Pincelli C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. *J Invest Dermatol*. 2003;120:164-167
10. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid

- human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106:761-771
11. Boelsma E, Verhovene CH, Ponc M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *J Invest Dermatol* 1999;112:489-498
  12. Morioka S, Lazarus GS, Jensen PJ. Involvement of urokinase-type plasminogen activator in acantholysis induced by pemphigus IgG. *J Invest Dermatol* 1987;89:474-477
  13. Seishima M, Satoh S, Nojiri M, Osada K, Kitajima Y. Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997;109:650-655
  14. Hashimoto K, Wun TC, Baird J, Lazarus GS, Jensen PJ. Characterization of keratinocyte plasminogen activator inhibitors and demonstration of the prevention of pemphigus IgG-induced acantholysis by a purified plasminogen activator inhibitor. *J Invest Dermatol* 1989;92:310-314
  15. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;156:3-15
  16. Haake AR, Polakowska RR. Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J Invest Dermatol* 1993;101:107-112
  17. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273:2926-2930
  18. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002;7:313-319
  19. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415-1430
  20. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776
  21. Boulares H, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Lyer S, et al. Role of poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:22932-22940
  22. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-290
  23. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-410
  24. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998;17:3878-3885
  25. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang XD. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489
  26. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-519
  27. Alnemri ES. Hidden powers of the mitochondria. *Nat cell biol* 1999;1:40-42
  28. Douglas R, Green, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312
  29. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999;13:1211-1233
  30. Wang X, Shao Z, Zetoune FS, Zeidler MG, Gowrishankar K, Vincenz C. NARDD, a novel membrane protein with a death domain involved in mediating apoptosis in response to ER stress. *Cell Death Differ* 2003;10:58