

## 레티노인산이 배양 각질형성세포의 사이토카인 생성에 미치는 영향

김지윤 · 정승용 · 오성민 · 김수찬

연세대학교 의과대학 피부과학교실, 피부생물학 연구소

### The Effects of Retinoic Acid on Cytokine Expression in Cultured Keratinocytes

Ji-Yun Kim, Sung-Yong Jung, Sung-Min Oh, and Soo-Chan Kim

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

Keratinocytes not only play a role in maintaining physical barrier function against infection and injury but also are actively involved in skin immune responses through production of various cytokines.

Retinoids, vitamin A and its natural and synthetic derivatives, regulate the proliferation and differentiation of keratinocytes and have immunomodulatory properties. In addition, topical retinoic acid (RA) also has inhibitory effect on ultraviolet light induced collagenase production from fibroblasts. RA are used commonly for the treatment of skin diseases such as acne and photoaging, but the usage is restricted because RA frequently has induced irritant contact dermatitis.

In this study, we hypothesized that RA induced irritant contact dermatitis is closely related to production of cytokines from keratinocytes.

We performed real time quantitative polymerase chain reaction to measure mRNA expression pattern of cytokines, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, IL-10, after 6, 12, and 24 hours incubation of RA with concentration of  $10^{-6}$ M and  $10^{-7}$ M to transformed keratinocyte cell (HaCaT cell).

As a result, after 6 hours incubation of  $10^{-6}$ M RA, mRNA expression of IL-8 increased. After 12 hours incubation, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, and IL-10 mRNA increased. After 24 hours incubation, we observed that expression of IL-1 $\alpha$ , IL-8, MCP-1 and IL-10 mRNA increased. In the case of  $10^{-7}$ M RA, IL-8 mRNA expression increased after 6 hours of incubation. After 12 hours incubation, IL-1 $\alpha$ , IL-8 and IL-10 mRNA increased. After 24 hours incubation, IL-1 $\alpha$ , MCP-1 and IL-10 mRNA increased.

In conclusion, RA induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, and MCP-1 in HaCaT cells. Therefore pro-inflammatory cytokines induced by RA from keratinocytes may play a role in RA induced irritant contact dermatitis. In addition, RA also induced mRNA expression of anti-inflammatory cytokine, IL-10, and IL-10 may play a role in suppression of contact dermatitis.

**Key words :** Keratinocytes, Retinoic acid, Cytokines

저자연락처 : 김 수 찬 (135-720) 서울시 강남구 도곡동 146-92, 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 피부과,  
 Tel: 02) 3497-3362, Fax: 02) 3463-6136, E-mail: kimsc@yume.yonsei.ac.kr

\* 본 연구는 연세대학교 의과대학 일반교수연구비 (2001-13)와 (주) 태평양 연구비지원으로 이루어졌음.

## 서 론

피부는 외부환경으로부터의 감염이나 손상에 대해 신체를 보호하는 물리적 장벽으로서의 기능뿐만 아니라 면역학적 방어기관으로써의 기능을 수행한다<sup>1</sup>. 각질형성세포(keratinocyte)는 표피의 대부분을 차지하는 세포로서 다양한 사이토카인(cytokines)과 케모카인(chemokines)을 생산하는 등 피부의 면역반응에 능동적으로 참여한다. 각질형성세포는 Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-20, Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , Interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, Macrophage inflammatory protein (MIP)-2, Interferon gamma inducible protein (IP)-10, Eotaxin, Tymus and activation regulated chemokine (TARC), Regulated upon activation, normal T expressed and secreted (RANTES) 등을 생산할 수 있으며, 각질형성세포 유래의 이들 사이토카인 및 케모카인은 피부의 염증 및 면역 반응에 중요한 역할을 수행한다<sup>2-7</sup>.

레티노이드(retinoids)는 비타민 A와 그 천연 또는 합성 유도체를 총칭하는 말로서, 천연 레티노이드와 방향환 수에 따라 제1, 2, 3세대 합성 레티노이드로 분류된다. 레티노이드는 각질형성세포를 포함한 다양한 세포의 증식과 분화를 조절할 뿐만 아니라 면역 조절 기능이 있어 여러 면역세포들의 활성화 및 성숙, 분화에 관여하는 사이토카인 유전자의 발현을 조절할 수 있다<sup>8,9</sup>.

레티노인산(retinoic acid)은 각질형성세포의 분화와 증식을 조절할 수 있기 때문에 여드름, 건선 등의 피부질환 치료제로서 사용되고 있으며, 콜라겐 분해 효소의 전사인자인 AP-1을 억제하는 작용이 있어 피부 주름을 치료하기 위한 약물로서 임상에 이용되고 있다<sup>10,11</sup>. 그러나 종종 레티노인산의 국소 도포로 인해 홍반이나 각질층박리 등의 염증반응이 유발될 수 있기 때문에 의약품 및 화장품 제제로서 이용시 제한이 있다<sup>12,13</sup>. 현재까지 레티노인산의 국소 도포시 유발되는 자극성 피부염에 대한 기전에 대해 알려진 바는 거의 없으나, 레티노인산 투여로 인해 각질형성세포로부터 생산되는 사이토카인이 염증을 유발할 수 있음을 예상할 수 있으며, 자극성 피부염 유발을 억제하기 위한 방법을 찾기 위해선, 레티노인산 투여로 인해 각질형성세포에서 어떤 사이토카인이 발현되는지 이해하는 것이 중요하다<sup>14,15</sup>.

레티노인산 투여로 인한 각질형성세포에서의 사이토카인 생산은 mRNA나 단백질 수준에서 확인할 수 있는데, 본 실험에서는 각질형성세포주인 HaCaT 세포<sup>16,17</sup>에 레티노인산

을 투여한 후 염증성 사이토카인인 IL-1 $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$  그리고 이들 사이토카인들에 의해 발현 유도되는 CXC 케모카인인 IL-8과 CC케모카인인 MCP-1의 mRNA 발현 양상과 함께, 항염증성 사이토카인으로 알려져 있는 IL-10 mRNA의 발현 양상을 실시간 정량 중합효소연쇄반응(real time quantitative polymerase chain reaction)을 이용하여 측정하였다. 그 결과 레티노인산 투여로 인해 각질형성세포주인 HaCaT 세포로부터 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, IL-10 mRNA의 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 HaCaT 세포는 형질전환된 각질형성세포로서 정상 각질형성세포와 형태 및 반응 양식이 동일하면서 계대배양이 제한되지 않아 유지하기가 매우 편리한 장점이 있다<sup>16,17</sup>.

### 2. 실험방법

#### 가. HaCaT 세포 배양

HaCaT 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% antibiotic/antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 RPMI-1640 (Gibco BRL)을 세포배양액으로 이용하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 유지되는 항온기 (incubator)에서 배양하였다. 계대배양은 배양 플라스크 (culture flask) 면적의 80% 정도를 차지할 때까지 배양한 다음, 0.05% trypsin과 53mM EDTA를 첨가한 Hanks' balanced salt solution (HBSS with phenol red, without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>)를 이용하여 세포를 배양 플라스크로부터 분리한 다음 20% FBS가 포함된 배양액으로 trypsin을 중화한 후 원심분리하여 여러 차례 계대배양하였다.

#### 나. 레티노인산이 각질형성세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향

10% FBS가 포함된 배양액으로 배양된 HaCaT 세포가 배양 플라스크 면적의 80% 정도를 차지하면, 5% FBS가 포함된 배양액에 0.1% 에탄올, 10<sup>-6</sup>M 및 10<sup>-7</sup>M 레티노인산(all-trans retinoic acid; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 각각 첨가하여 6시간, 12시간, 24시간 동안 배양하였다. 실험에 사용된 레티노인산은 99.9% 에탄올에 녹여 10<sup>-3</sup>M 농도로 만들어 적사광선을 차단하고 -20°C에 보관하였다가 각 실험에 필요한 최적 농도로 희석하여 사용하였다.

### (1) RNA 분리 및 정량

배양한 HaCaT 세포로부터 RNA를 분리하기 위해, TRIzol reagent (Gibco BRL) 500  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 다음 스크래퍼 (scraper)를 이용하여 배양 플라스크 바닥으로부터 HaCaT 세포를 분리하여 실온에 5분간 두었다가, chloroform (Sigma) 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에 3분간 둔 다음 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액만 분리하였다. 분리한 상층액에 isopropyl alcohol (Sigma) 500  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 잘 혼합한 다음 10분간 실온에 두었다가 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 바닥에 남은 침전물에 75% 에탄올 1  $\text{ml}$ 을 첨가하여 살짝 흔든 다음 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 남아 있는 에탄올을 공기중에서 완전히 건조시켜 제거하고 남은 RNA 침전물에 0.1% diethylpyrocarbonate (Gibco BRL) 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 RNA를 다시 녹였다. 각각의 정상 대조군과 실험군으로부터 분리한 RNA를 60°C 수조에서의 10분간 가열로 변성시킨 다음 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 RNA 농도 및 순수도를 측정하였다. Formaldehyde를 첨가한 1% agarose gel에 분광광도계를 이용해 정량한 RNA 1  $\mu\text{g}$ 과 RNA buffer (Sigma)를 1:2의 비율로 섞어 함께 전기영동시켜 UV-투시계 (transilluminator) 및 정량 소프트웨어 시스템인 Gel doc program (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 18S (1.9 kb) 및 28S (5.1 kb)의 RNA 밴드를 확인하고, 전기영동시킨 agarose gel 상의 RNA 밴드 각각이 차지하는 density ( $\text{INT}/\text{mm}^2$ )를 측정함으로써 다시 한번 농도를 보정하였다.

### (2) 역전사(reverse transcription)

각각의 정상 대조군과 실험군으로부터 분리하여 정량, 보정한 RNA 1  $\mu\text{g}$ 에 RNA PCR Kit Ver.2.1 (TaKaRa Shuzo Co. Otsu, Shiga, Japan)을 이용하여 역전사 반응을 실행하였다. 약술하면 10×RNA PCR buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM

dNTP mixture, 40 units/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor, 2.5 pmol/ $\mu\text{l}$  Oligo-dT primer, 5 units/ $\mu\text{l}$  reverse transcriptase를 각각 최종 반응농도 1×RNA PCR buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP mixture, 1 units/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor, 0.125 mM Oligo-dT primer, 0.25 units/ $\mu\text{l}$  reverse transcriptase가 되도록 조절하여 RNase free dH<sub>2</sub>O을 이용해 최종량을 통일한 다음, 45°C 45분, 95°C 1분, 4°C 5분의 온도 순환 조건 (thermal cycling condition)으로 진행시켜 불안정한 상태의 RNA로부터 안정한 형태의 cDNA로 역전사시켰다.

### (3) 실시간 정량 중합효소연쇄반응

(real time quantitative polymerase chain reaction)

각각의 정상 대조군과 실험군으로부터 TRIzol reagent (Gibco BRL)를 이용하여 RNA를 분리한 후, RNA를 역전사시켜 보다 안정한 형태로 만든 cDNA와 표적 사이토카인 유전자의 primer 및 5'[FAM]-3'[TAMRA]로 디자인한 TaqMan probe 그리고 2×TaqMan PCR master mix를 섞어 만든 각각의 반응 혼합액을 96 wells 7700 plate (12×8)에, 한 실험 개체당 3 well씩 반복하여 25  $\mu\text{l}$ 씩 채운 다음, ABI 7700-Ver. 2.0 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여, 50°C 2분(1회), 95°C 10분(1회), [95°C 15초, 60°C 1분](40회)의 온도 순환 조건으로 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 진행시켰다. 실시간 정량 중합효소연쇄반응에 사용된 각 사이토카인의 primer 및 TaqMan probe는 표 1과 같다.

또한 각각의 정상 대조군과 실험군 사이의 cDNA 농도 차이로 인한 최종 실시간 정량 중합효소연쇄반응의 증폭 산물의 결과 해석상의 오류를 없애기 위한 사람의 내인성 조절 유전자 (human endogeneous control gene)로서 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 5'[JOE]-3'[TAMRA] probe)를 이용하였으며, 실시간 정량 중합효소연쇄반응의 최종 증폭 산물의 양 (amplicon amount)은 probe 형광물질의

**표 1.** 실시간 정량 중합효소연쇄반응 실험에 사용된 사이토카인 유전자의 Primers 및 Probes 염기 서열

	Forward primer	[FAM]5'-probe-3'[TAMRA]	Reverse primer
IL-1 $\alpha$	TGAAACCTCTAAAACATCCAAGCTT	CCTTCAAGGAGAGCATGGTGGTAGT	TTCAGAACCTTCCCGTTGGT
TNF- $\alpha$	CCTGCCCAATCCCTTTATT	CCCCCTCCTTCAGCCACCCCTCAACC	CCAATTCTCTTTGAGCCAGAA
MCP-1	GCTGTGATCTTCAAGACCATTGTG	CCAAGGAGATCTGTGCTGACCCCAA	TGGAATCTGAACCCACTTCTG
IL-8	CCGGAAGGA ACCATTCTCACT	TGTAAACATGACTTCCAAGCTGGCGTG	ATCAGGAAGGCTGCCAAGAG
IL-10	TGAGAACAGCTGCACCCACTT	CAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCG	GCTGAAGGCATCTCGGAGAT
GAPDH	GAAGGTGAAGGTGGAGTC	[JOE]CAAGCTTCCGTTCTCAGCC[TAMRA]	GAAGATGGTGTATGGGATTTC

값이 기준선 (base line) 값을 지나는 시점의 중합효소연쇄반응 진행 횟수, 즉  $C_t$  (threshold cycle) 값을 이용하여 계산하였다.

각각의 정상 대조군과 실험군의 실시간 정량 중합효소연쇄반응 결과인  $C_t$  값을 GAPDH의  $C_t$  값으로 빼고 ( $\Delta C_t$ ), 각각의  $\Delta C_t$  값을 다시 정상 대조군의  $C_t$  값으로 뺀  $\Delta \Delta C_t$  값을 이용해  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 의 공식으로 계산 및 도표화함으로써 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 통한 정상 대조군과 실험군 각각의 표적 사이토카인 유전자의 증폭량을 상대 비교 정량하여

평균  $\pm$  표준오차로 표시하였다.

## 결 과

### 1. $10^{-6}M$ 및 $10^{-7}M$ 레티노인산 투여 6시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과

$10^{-6}M$  및  $10^{-7}M$  레티노인산 투여 후 6시간이 경과했을 때, IL-8 mRNA의 발현이 증가하였으나 나머지 사이토카인들은 발현이 증가되지 않았다 (Fig. 1).

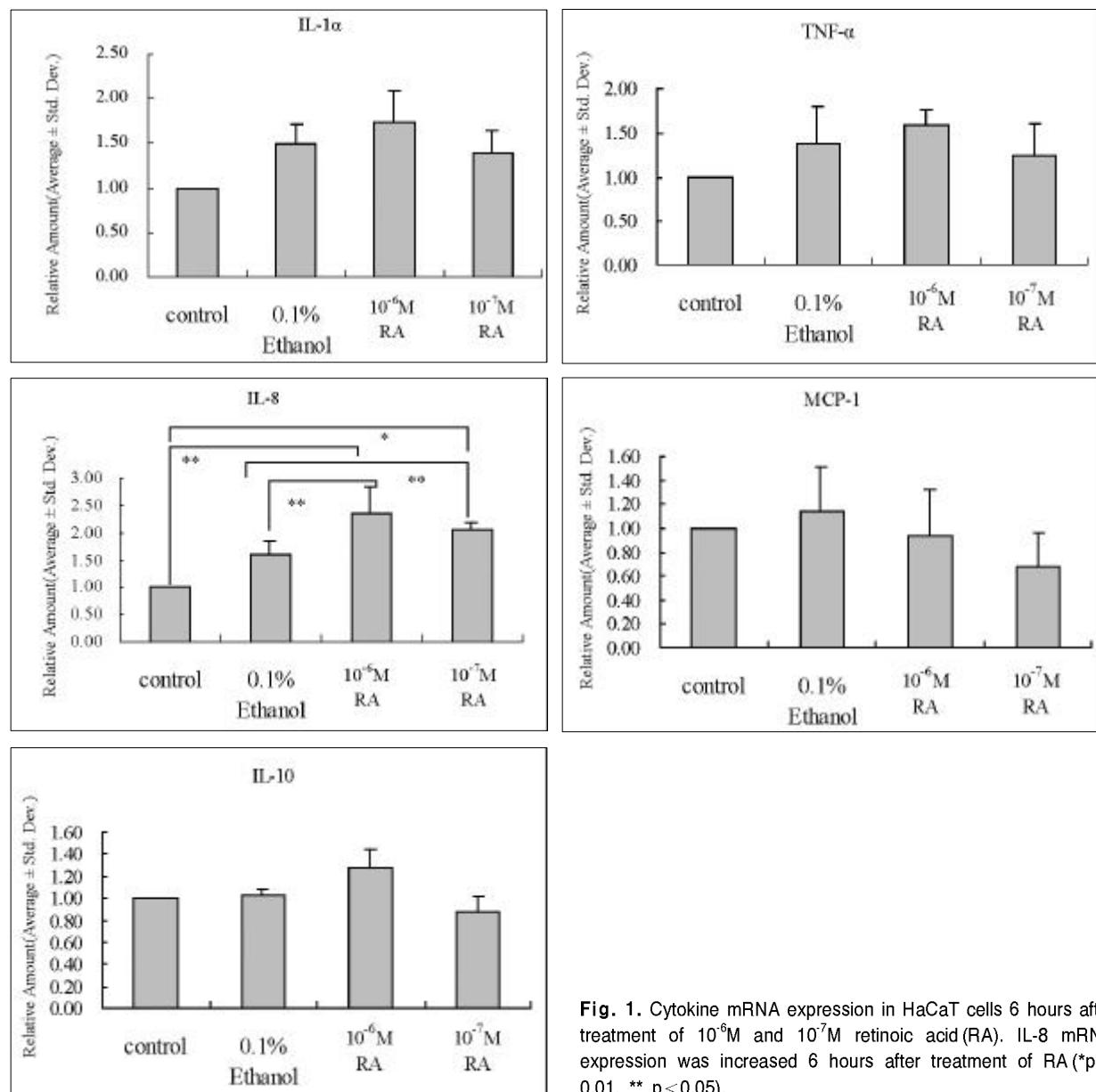


Fig. 1. Cytokine mRNA expression in HaCaT cells 6 hours after treatment of  $10^{-6}M$  and  $10^{-7}M$  retinoic acid (RA). IL-8 mRNA expression was increased 6 hours after treatment of RA (\* $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ ).

## 2. $10^{-6}$ M 및 $10^{-7}$ M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과

$10^{-6}$ M 및  $10^{-7}$ M 레티노인산 투여 후 12시간이 경과했을 때, 두 농도 모두에서 IL-1 $\alpha$ , IL-8, 및 IL-10의 발현이 증가하였으며, TNF- $\alpha$ 는  $10^{-6}$ M 레티노인산 투여 후 발현이 증가하였다(Fig. 2).

## 3. $10^{-6}$ M 및 $10^{-7}$ M 레티노인산 투여 24시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과

$10^{-7}$ M 레티노인산 투여 후 24시간이 경과했을 때 두 농도

모두에서 IL-1 $\alpha$ , MCP-1과 IL-10 mRNA의 발현이 증가하였으며,  $10^{-6}$ M 농도에서 IL-8 mRNA 발현이 증가하였다(Fig. 3).

## 4. $10^{-6}$ M 레티노인산 투여 후 HaCaT 세포에서의 시간 경과에 따른 사이토카인 mRNA 발현 양상

$10^{-6}$ M 레티노인산 투여 6시간, 12시간 및 24시간 이후까지 IL-8 mRNA 발현이 증가하였고, IL-1 $\alpha$ 와 IL-10 mRNA는 12시간과 24시간 이후 발현이 증가하였으며, MCP-1 mRNA는 24시간 이후에, TNF- $\alpha$  mRNA는 6시간 이후에만 발현이 증가하였다(Fig. 4).

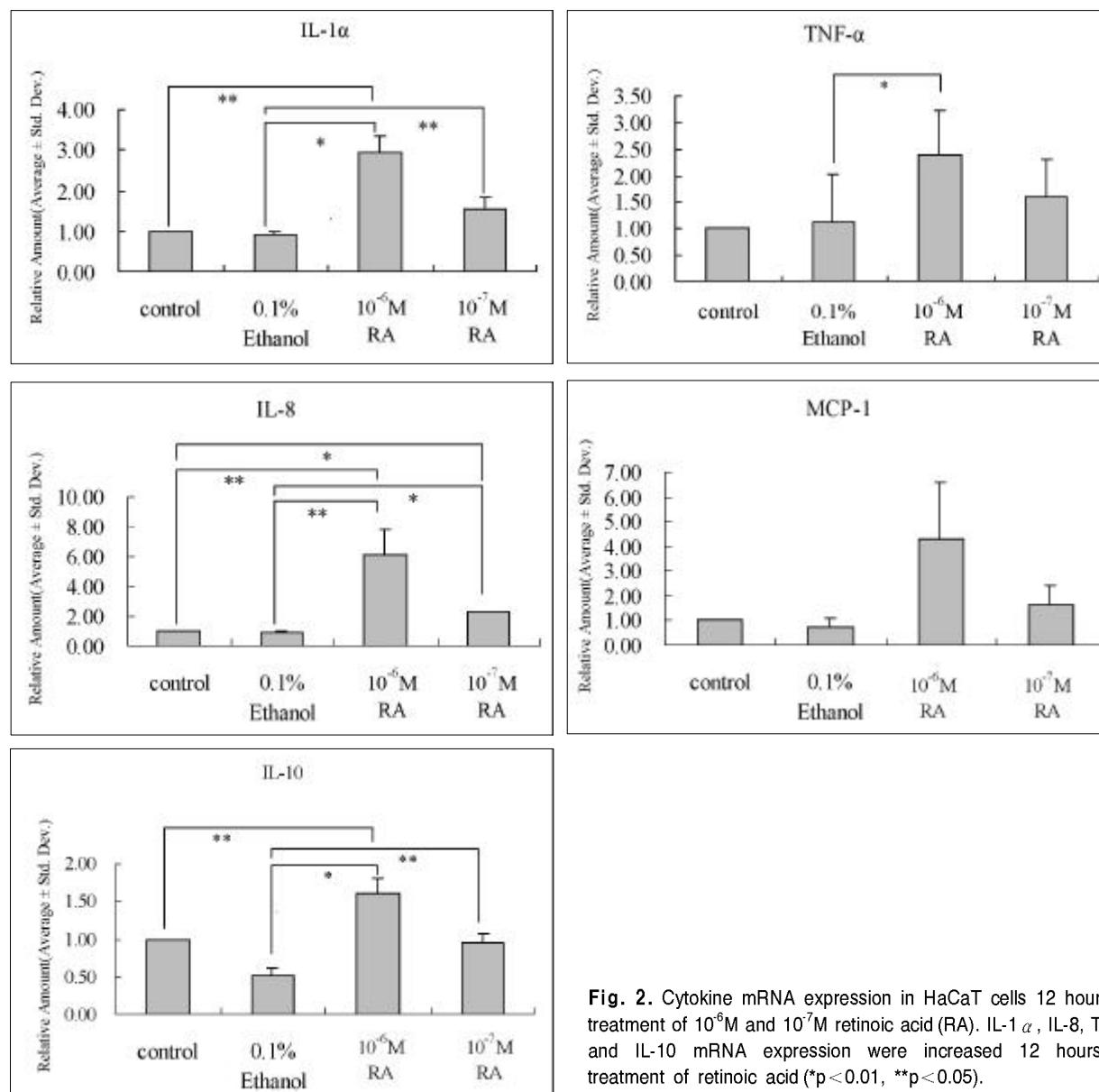


Fig. 2. Cytokine mRNA expression in HaCaT cells 12 hours after treatment of  $10^{-6}$ M and  $10^{-7}$ M retinoic acid (RA). IL-1 $\alpha$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-10 mRNA expression were increased 12 hours after treatment of retinoic acid (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

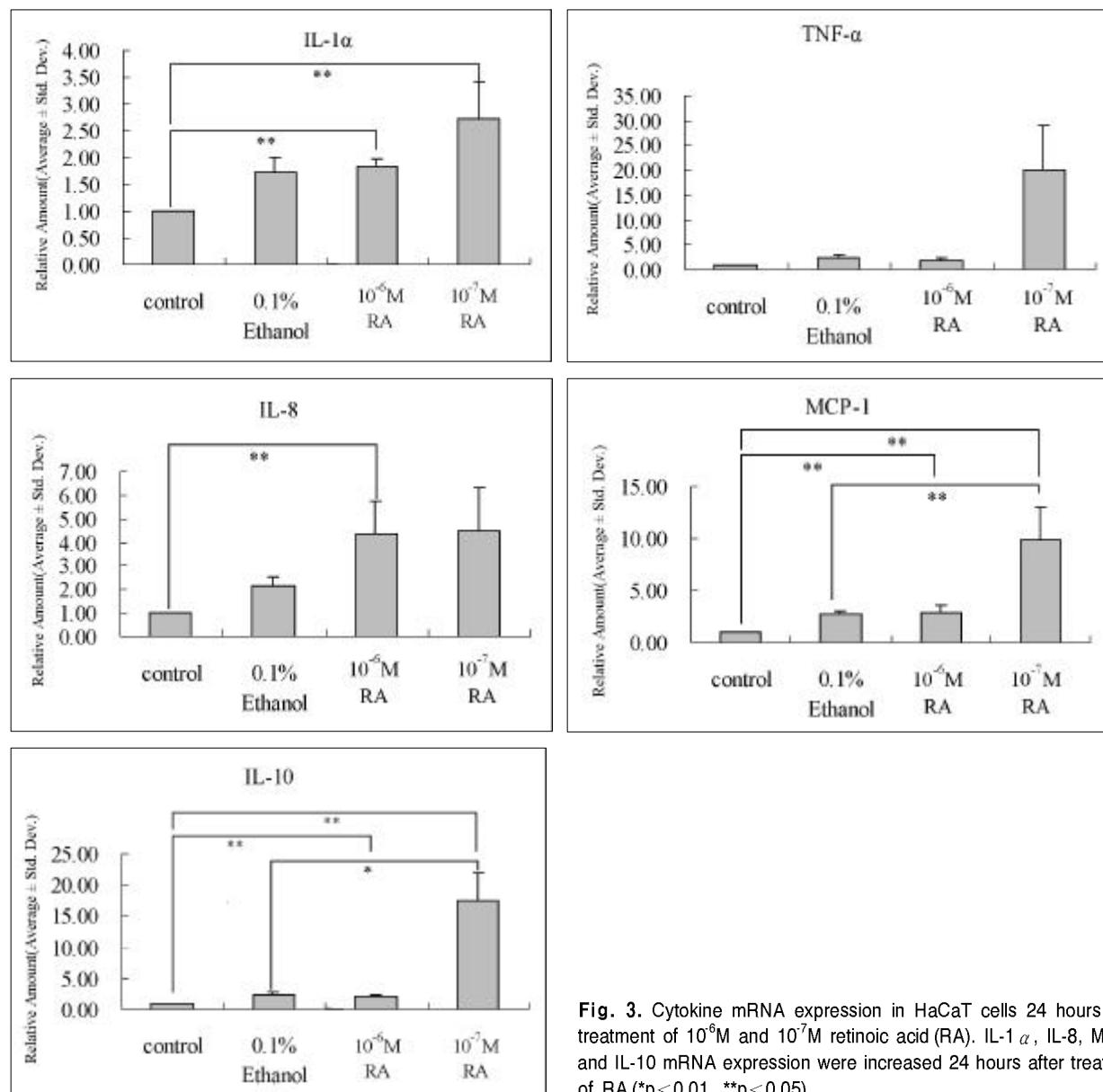


Fig. 3. Cytokine mRNA expression in HaCaT cells 24 hours after treatment of  $10^{-6}$ M and  $10^{-7}$ M retinoic acid (RA). IL-1 $\alpha$ , IL-8, MCP-1 and IL-10 mRNA expression were increased 24 hours after treatment of RA (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

### 5. $10^{-7}$ M 레티노인산 투여 후 HaCaT 세포에서의 시간 경과에 따른 사이토카인 mRNA 발현 양상

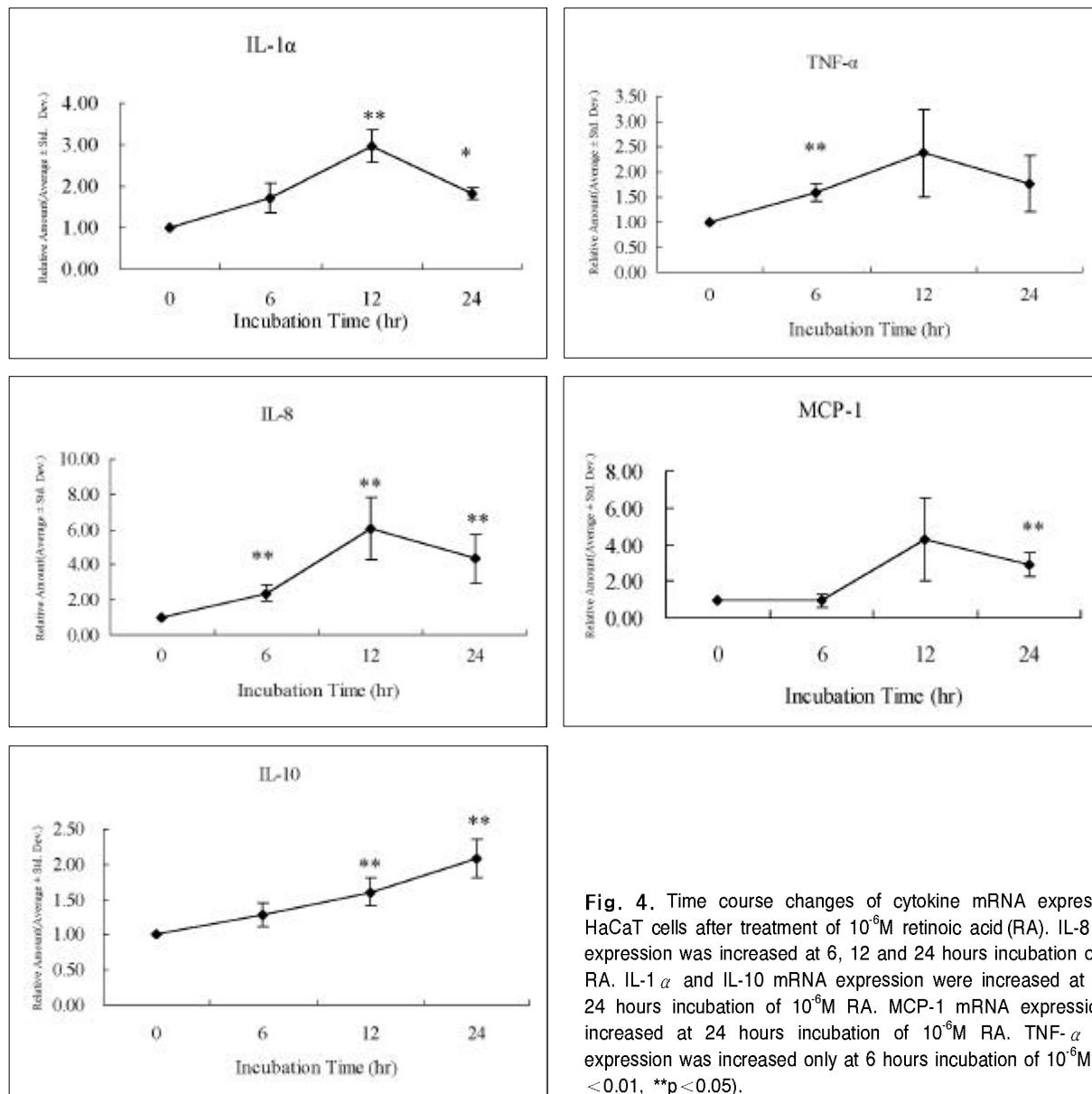
$10^{-7}$ M 레티노인산 투여 6시간 후부터 24시간 이후까지 IL-8 mRNA 발현이 증가되었고 24시간 이후에 IL-1 $\alpha$ 와 IL-10 mRNA 발현의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

### 고 찰

레티노인산은 생체 내 활성 형태의 레티노이드로서 각질 형성세포의 증식과 분화 조절, 세포내 접합분자의 발현 감

소, 프로스타글란딘의 합성 억제, 피지선 크기의 감소, 면역 조절 및 항염증 기능 등이 있어 여드름, 건선 등의 피부질환 치료제로서 널리 쓰일 뿐만 아니라, 피부암, T 세포 림프종 등의 악성종양 치료에도 사용된다<sup>10,11,13,18</sup>. 또한 자외선 조사로 생성되는 콜라겐 분해 효소인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 생성을 억제할 수 있기 때문에 광노화의 치료제로서 사용되기도 한다<sup>12</sup>. 그러나 레티노인산의 국소적 도포로 인해 자극성 피부염이 유발될 수 있기 때문에 그 사용에 제한을 받고 있다<sup>19,20-22</sup>.

레티노인산을 피부에 도포하면 표피 각질형성세포의 원형질막을 통과하여 세포질 내로 들어가 레티노인산의 세



**Fig. 4.** Time course changes of cytokine mRNA expression in HaCaT cells after treatment of  $10^{-6}$ M retinoic acid (RA). IL-8 mRNA expression was increased at 6, 12 and 24 hours incubation of  $10^{-6}$ M RA. IL-1 $\alpha$  and IL-10 mRNA expression were increased at 12 and 24 hours incubation of  $10^{-6}$ M RA. MCP-1 mRNA expression was increased at 24 hours incubation of  $10^{-6}$ M RA. TNF- $\alpha$  mRNA expression was increased only at 6 hours incubation of  $10^{-6}$ M RA (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).

포내 운반에 관여하는 세포 내 레티노인산 결합 단백질 (cellular retinoic acid binding protein, CRABP)과 결합하고, 핵 내에 비활성형으로 존재하고 있던 특이적 레티노인산 수용체와 결합함으로써 활성화된다<sup>23,24</sup>. 활성형의 “레티노인산-수용체 결합체”는 특정 유전자의 발현 여부를 조절할 수 있는 전사인자로 작용하여, 유전자 촉진체 (gene promoter)의 레티노인산 반응영역 (retinoic acid response elements, RARE)에 결합함으로써 표적 유전자의 전사를 유도한다<sup>25-28</sup>. 또한 레티노인산 수용체가 AP-1 전사인자의 구성단백질인 c-Jun 또는 c-Fos와 결합함으로써 AP-1의 전사인자로서의 작용을 방해하여 AP-1이 관여하는 특정 유전자의 발현을 간접적인

방법으로 억제하는 기전이 알려져 있다<sup>29-33</sup>.

레티노인산 투여에 의한 사이토카인의 발현 증가 또는 감소에 대한 다양한 결과가 보고되어 있다. 레티노인산 투여에 의해 각질형성세포나 혈관내피세포로부터 IL-1, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인이 발현 증가된다는 보고<sup>34,35</sup>와 레티노인산이 각질형성세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 ICAM-1 발현을 증가시킨다는 보고<sup>36</sup>, 난소상피종양 세포주에서 IL-8 발현을 증가시킨다는 보고<sup>37</sup> 등이 있다. 근래에 레티노인산 투여로 인한 세포내 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현 조절 기전을 밝히기 위해 많은 실험들이 진행되고 있는데, IL-8 유전자 촉진체 (promoter) 일부를 형질도입시킨 흑색종세포 주내에

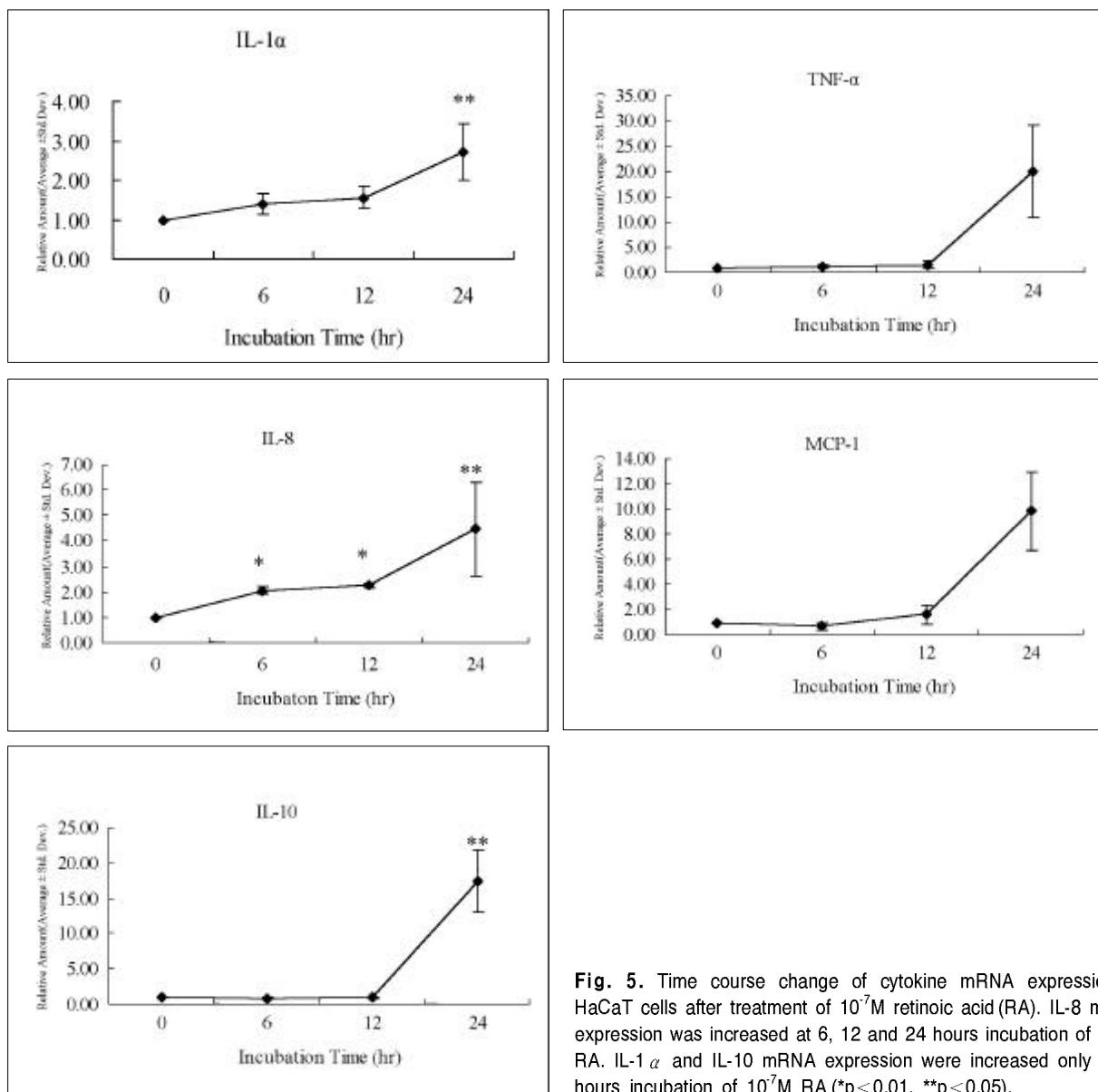


Fig. 5. Time course change of cytokine mRNA expression in HaCaT cells after treatment of  $10^{-7}$ M retinoic acid (RA). IL-8 mRNA expression was increased at 6, 12 and 24 hours incubation of  $10^{-7}$ M RA. IL-1 $\alpha$  and IL-10 mRNA expression were increased only at 24 hours incubation of  $10^{-7}$ M RA (\*p<0.01, \*\*p<0.05).

투여한 레티노인산이 NF- $\kappa$ B를 활성화시킴으로써 IL-8 mRNA의 전사적 발현을 증가시켰음을 확인한 실험<sup>33</sup>, 그리고 기관지 상피세포에 투여한 레티노인산이 NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 IL-8 mRNA의 전사적 발현을 증가시킬 수 있음을 밝힌 실험<sup>38</sup> 등이 보고된 바 있다. 이 실험 결과들을 토대로 레티노인산에 의한 사이토카인의 발현 증가는 레티노인산이 NF- $\kappa$ B를 활성화시킴으로써 사이토카인 유전자의 전사적 활성화를 상승적으로 유도하는 기전에 의한 것이라 생각할 수 있다<sup>28,33,39</sup>. 반면에 레티노인산 투여에 의해 T 림프종 세포주로부터 IFN- $\gamma$ 의 발현이 감소되었다는 보고<sup>40</sup>와 레티노인산 투여로 인해 쥐의 대식세포로부터 IL-12가 발현 억제

되어 이에 따라 IFN- $\gamma$ 의 발현이 감소되었다는 보고<sup>41</sup> 등이 있다. 이 외에도, 쥐의 대식세포에서 레티노인산 투여로 인해 활성화된 레티노인산 수용체 (RXR)가 NF- $\kappa$ B와 결합함으로써 IL-12의 발현에 관여하는 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 전사적 활성 감소로 IL-12 유전자의 전사적 발현이 차단되어 IFN- $\gamma$ 의 생성을 억제시킨다는 실험 결과가 보고된 바 있다<sup>39,41</sup>.

생리적, 화학적 또는 생물학적 자극에 대한 생체 내 방어 기전인 염증반응은 각종 사이토카인의 유도로부터 시작되며, 이들 사이토카인의 작용에 의해 다양한 증상이 나타나게 된다. 사이토카인은 각질형성세포를 비롯한 피부의 여러 세

포로부터 생성되어 국소적 전신적 면역반응을 조절하는데 필수적인 역할을 수행한다. 사이토카인의 생산은 사이토카인 유전자의 전사 수준과 전사 후 수준에서 조절될 수 있으며, 다양한 자극으로 인해 사이토카인 유전자의 5' 말단 상류(upstream)에 결합된 NF- $\kappa$ B, NF-AT, AP-1 등의 전사인자가 활성화되어 사이토카인 유전자 발현이 유도된다<sup>4,6,31</sup>. 특정 자극으로 인해 유발된 염증 반응은 염증성 사이토카인과 이들 사이토카인에 의해 발현 유도되어 백혈구에 대한 특이적 주화성을 갖는 케모카인, 그리고 항염증성 사이토카인의 발현 등 여러가지 복잡한 기전이 관여하는데, 본 실험에서는 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 레티노인산을 투여 함으로써 염증성 사이토카인(IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )과 케모카인(IL-8, MCP-1), 그리고 항염증성 사이토카인(IL-10)의 발현이 증가하였음을 관찰하였다.

IL-1 $\alpha$ 는 그 자신 또는 TNF- $\alpha$ 나 기타 외부 자극에 의해 NF- $\kappa$ B가 활성화됨으로써 전사적 발현이 증가되는 초기 염증 유발 사이토카인으로서 백혈구를 직접 활성화하진 않지만, 염증성 백혈구를 활성화시키는 케모카인 합성을 유도하여, 국소적 염증 반응을 진행 또는 증폭시킬 수 있다<sup>4</sup>. TNF- $\alpha$ 는 급성염증반응과 특이면역반응의 중요한 연결자로서 보통 매우 많은 양으로 합성되어 거의 모든 형태의 세포에서 발현되는 수용체를 쉽게 포화시킬 수 있으며, 그 생물학적 효과는 분비된 사이토카인의 양에 의존하는데, 소량 생성되었을 경우 국소적으로 백혈구 및 내피세포에 작용하며, 새로운 표면수용체를 혈관내피세포에 발현되도록 함으로써 내피세포에 호중구가 부착되게 하여 염증이 생긴 국소 부위에 백혈구가 축적되게 하거나, 단핵구 및 다른 형태의 세포를 자극하여 더욱 많은 백혈구를 염증부위로 끌어들이기 위해 케모카인을 분비하도록 한다. 또한 많은 양이 생성되었을 경우에는 혈류로 들어가 내분비 호르몬과 같은 작용을 할 수 있다<sup>4</sup>.

케모카인은 케모카인 수용체를 발현하고 있는 백혈구에 대한 화학주성 사이토카인으로서, 백혈구를 혈액으로부터 케모카인 분비의 근원지로 이동시키며, 시스테인 잔기의 위치와 거리에 따라 CXC, CC, C, CX<sub>3</sub>C의 4개 그룹으로 구분할 수 있다<sup>6</sup>. CXC 케모카인인 IL-8은 급성 염증 반응시 CXCR1, CXCR2를 발현하고 있는 호중구를 활성화시켜 혈액으로부터 염증 부위로 이동시키는 호중구 주화성 뿐만 아니라 골수에서 말초혈로의 호중구 동원, 호중구의 활성화 및 CD11/18 등의 접착분자 발현 항진, 호중구의 혈관내피세포로의 접착 증강 등 염증 반응에 관여하는 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>42,43</sup>. CC 케모카인인 MCP-1은 염증 반응시 각질형성세포로부터 생성 증가되어 호중구를 제외한

다른 염증반응 세포들을 염증부위로 끌어들일 수 있으며, 단구(monocyte)를 혈액에서 감염부위로 이동시켜 감염된 조직에서 대식세포가 되게 한다<sup>44</sup>.

IL-10은 거식세포로부터 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인이 분비되는 것을 억제하며 세포매개성면역을 억제하는 항염증성 사이토카인으로서 각질형성세포로부터 분비된 IL-10은 각질형성세포로부터 발현된 염증성 사이토카인으로 인한 반응을 억제할 수 있다<sup>45,46</sup>.

본 실험에서는 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-7</sup>M 레티노인산 투여하고 6, 12, 24시간 후 염증성 사이토카인 및 케모카인인 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1과 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현양을 mRNA 수준에서 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 이용하여 측정한 결과, 10<sup>-6</sup>M 레티노인산 투여 6시간 후 IL-8 mRNA의 발현 증가를 관찰할 수 있었으며 12시간 후에는 IL-8 이외에도 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 mRNA 발현이 증가되었다. 24시간 후에는 IL-1 $\alpha$ , IL-8, MCP-1, IL-10 mRNA의 발현 증가를 관찰할 수 있었다. 10<sup>-7</sup>M 레티노인산을 투여한 경우에는 6시간 경과 후 IL-8 mRNA 발현 증가를 확인할 수 있었고 12시간 후에는 IL-8 이외에 IL-1 $\alpha$  와 IL-10 mRNA의 발현이 증가되었으며 24시간 후에는 IL-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-10 mRNA의 증가를 관찰할 수 있었다. 즉 레티노인산을 각질형성세포에 투여했을 때 IL-8 mRNA가 가장 먼저 그리고 지속적으로 발현이 증가되는 사이토카인임을 알 수 있었다. 즉 레티노인산에 의해 각질형성세포에서 분비되는 사이토카인 중 IL-8이 가장 예민한 사이토카인임을 알 수 있었다. 또한 IL-8이 일차 사이토카인인 IL-1 $\alpha$ 나 TNF보다 먼저 발현이 증가되는 것은 의외의 결과로 IL-1 $\alpha$ 나 TNF와 관계없이 증가할 수 있음을 보여주었다. 염증유발성 일차 사이토카인인 IL-1 $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$  중 IL-1 $\alpha$  mRNA는 레티노인산 투여 12시간 후와 24시간 후에 발현이 증가되어 IL-1 $\alpha$  역시 레티노인산에 의해 각질형성세포에서 예민하게 발현 증가되는 사이토카인임을 알 수 있었으나 TNF- $\alpha$  mRNA는 10<sup>-6</sup>M 레티노인산 투여 12시간 후에만 발현이 증가되어 레티노인산에 의한 TNF- $\alpha$ 의 발현은 현저하지 않음을 알 수 있었다. MCP-1 mRNA는 레티노인산 투여 24시간 후에야 발현이 증가되어 MCP-1 mRNA의 발현은 비교적 늦게 증가한다는 것을 알 수 있었다. 항염증성 사이토카인인 IL-10 mRNA는 12시간과 24시간 후 지속적으로 발현이 증가되어 레티노인산 투여 후 각질형성세포에서 염증성 사이토카인 뿐 아니라 항염증성 사이토카인도 증가하여 염증반응이 조절되는 신체의 항상성 기능으로 해석할 수 있을 것이다. 결론적으로 레티노인산 투여 후 각질형성세포로부터 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, IL-10 등의 사이토카

인 mRNA 발현이 증가되었음을 확인하였다. 따라서 레티노인산에 의한 자극성 피부염 유발기전에 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 등의 염증성 사이토카인이 관여하리라 생각되며, 이들 사이토카인에 의해 유발된 염증반응은 레티노인산 투여 후 역시 발현 증가되는 항염증성 사이토카인인 IL-10에 의해 억제될 수 있으리라 예상할 수 있다.

그러나 아직까지 레티노인산 투여에 의한 각질형성세포에서의 사이토카인 발현과 분비가 어떤 기전에 의해 일어나는지는 밝혀진 바 없다. 향후 레티노인산 투여로 인한 각질형성세포에서의 사이토카인 발현 조절의 신호전달기전을 밝히기 위해서 NF- $\kappa$ B, AP-1 등과 같은 전사인자의 영향 및 역할 규명을 위한 실험이 계속 진행되어야 할 것이다.

### 참 고 문 헌

- Cruz PD. *The epidermis: an outpost of the immune system*. In Freinkel RK, Woodley DT, eds. *The biology of the skin*, New York: The Parthenon Publishing Group, 2001;255-63
- Grone A. *Keratinocytes and cytokines*. Vet Immunol Immunopathol 2002;88:1-12
- Sauder DN. *The role of epidermal cytokines in inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol 1990;95 (suppl 5):27-8
- McDonald CJ. *Immunomodulatory and cytotoxic agents in dermatology*. In: Gupta AK, Prussick R, Shivji GM, Sauder DN, editors. *Cytokines*. 1st ed. Brown University, Providence, Rhode Island: Marcel Dekker INC; 1997:71-123
- Corsini E, Galli CL. *Cytokines and irritant contact dermatitis*. Toxicol Lett 1998;102:277-82
- Zlotnik A, Yoshie O. *Chemokines-A new classification system and their role in immunity*. Immunity 2000;12:121-7
- Wetzler C, Kampfer H, Pfeilschifter J. *Keratinocyte-derived chemotactic cytokines-Expressional modulation by nitric oxide in vitro and during cutaneous wound repair in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 2000;274:689-96
- McDonald CJ. *Immunomodulatory and cytotoxic agents in dermatology*. In: McDonald CJ, editors. *Retinoids*. 1st ed. Brown University, Providence, Rhode Island: Marcel Dekker INC; 1997:149-55
- 윤재일. 레티노이드 (Retinoid). 임상피부과 1996;2:65-66
- Elson ML. *The role of retinoids in wound healing*. J Am Acad Dermatol 1998;45 (suppl 5):79-142
- Saurat JH. *Retinoids and psoriasis: Novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment*. J Am Acad Dermatol 1999;41:2-6
- Weiss JS, Ellis CN, Headington JT, Tincoff T, Hamilton TA, Voorhees JJ. *Topical tretinoin improves photoaged skin. A double-blind vehicle-controlled study*. JAMA 1988;259:527-32
- 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
- Fisher GJ, Esmann J, Christopher EM. *Cellular, immunologic and biochemical characterization of topical retinoic acid-treated human skin*. J Invest Dermatol 1991;96:699-707
- Hsu HC, Tsai WH, Chen PG, Hsu ML, Ho CK, Wang SY. *In vitro effect of granulocyte-colony stimulating factor and all-trans retinoic acid on the expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules in acute promyelocytic leukemic cells*. Eur J Haematol 1999;63:11-8
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D. *Nomal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol 1988;106:761-71
- Boelsma E, Verhovene CH, Ponec M. *Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT)*. J Invest Dermatol 1999;112: 489-98
- Levine N. *Role of retinoids in skin cancer treatment and prevention*. J Am Acad Dermatol 1998;39:62-6
- Davies PJA, Berry SA, Shipley GL, Eckel RH, Hennuyer N, Crombie DL, et al. *Metabolic effects of retinoids: Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity*. Mol Pharmacol 2001;59:170-6
- Islam TC, Skarin T, Sumitran S, Toftgard R. *Retinoids induce apoptosis in cultured keratinocytes*. Br J Dermatol 2000;143: 709-19
- Gidlof AC, Romert A, Olsson A, Torma H, Eriksson U, Sirsjo A. *Increased retinoid signaling in vascular smooth muscle cells by proinflammatory cytokines*. Biochem Biophys Res Commun 2001;286:336-42
- Standeven AM, Johnson AT, Escobar M, Chandraratna RA. *Specific antagonist of retinoid toxicity in mice*. Toxicol Appl Pharmacol 1996;138:169-75
- Giguere V. *Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: Complex interplay in retinoid signaling*. Endocrine Review 1994;15:61-79
- Elder JP, Astrom A, Pettersson U, Tavakkol A, Griffiths CE, Krust A, et al. *Differential regulation of retinoic acid receptors and binding proteins in human skin*. J Invest Dermatol 1992;98:673-9
- Perlmann T. *Retinoid metabolism: a balancing act*. Nature Genetics 2002;31:7-8
- Petkovich PM. *Retinoic acid metabolism*. J Am Acad Dermatol 2001;45 (Suppl 5):136-42
- Kang SW. *Metabolism and molecular action of retinoids in human skin*. Clinical Dermatology (Seoul) 1997;3:8-10
- Minucci S, Ozato K. *Retinoid receptors in transcriptional*

- regulation.* Curr Opin Genet Dev 1996;6:567-74
29. Beckett D. *Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation.* J Mol Biol 2001;314:335-52
  30. Moon KY, Hahn BS, Lee J, Kim YS. *A cell-based assay system for monitoring NF- $\kappa$ B activity in human HaCaT transfected cells.* Anal Biochem 2001;292:17-21
  31. Benkoussa M, Brand C, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P. *Retinoic acid receptors inhibit AP-1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP-1-responsive promoter.* Mol Cell Biol 2002;22:4522-34
  32. Wanner R, Zhang J, Henz BM, Rosenbach T. *AP-2 gene expression and modulation by retinoic acid during keratinocyte differentiation.* Biochem Biophys Res Commun 1996;223:666-9
  33. Harant H, Martin R, Andrew PJ, Foglar E, Dittrich C, Lindley IJD. *Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic Acid and tumor necrosis factor- $\alpha$  involves the transcription factor NF- $\kappa$ B.* J Biol Chem 1996;271:26954-61
  34. Bernard FX, Pedretti N, Rosdy M, Deguercy A, *Comparision 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
  35. Green GS. *Retinoic acid effects on endothelial cell function: Interaction with interleukin-1.* Clin Immunol Immunopathol 1994;72:53-61
  36. Janssens S, Bols L, Vandermeeren M, Daneels G, Borgers M, Geysen J. *Retinoic acid potentiates TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 expression in normal human epidermal keratinocyte.* Biochem Biophys Res Commun 1999;255:64-9
  37. 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;210:898-906
  38. Chang M, Harper R, Hyde DM, Wu R. *A novel mechanism of retinoic acid-enhanced interleukin-8 gene expression in airway epithelium.* Am J Respir Cell Mol Biol 2000;22:502-10
  39. Na SY, Kang BY, Chung SW, Han SJ, Ma X, Trinchieri G, et al. *Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NF- $\kappa$ B.* J Biol Chem 1999;274:7674-80
  40. Cippitelli M, Ye J, Viggiano V, Sica A, Ghosh P, Gulino A, et al. *Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human interferon- $\gamma$  promoter.* J Biol Chem 1996;271:26783-93
  41. Kang BY, Chung SW, Kim SH, Kang SN, Choe YK, Kim TS. *Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4+ T cells.* Br J Pharmacol 2000;130:581-6
  42. Remick DG, Green LB, Newcomb DE, Garg SJ, Bolgos GL, Call DR. *CXC chemokine redundancy ensures local neutrophil recruitment during acute inflammation.* Am J Pathol 2001;159:1149-5744. Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B. *The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8.* J Immunol 1995;155:2151-7
  43. Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B. *The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8.* J Immunol 1995;155:2151-7
  44. Baggioolini M, Dahinden CA. *CC chemokines in allergic inflammation.* Immunol Today 1994;15:127-33
  45. Pretolani M. *Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential.* Clin Exp Allergy 1999;29:1164-71
  46. Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T. *Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia.* J Neurochem 1999;72:1466-71