

Minocycline이 표피
각질형성세포의 증식과 고사에
미치는 영향

연세대학교 대학원
의과학과
정 승 용

Minocycline이 표피
각질형성세포의 증식과 고사에
미치는 영향

지도 김 수 찬 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

정 승 용

정승용의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

감사의 글

부족한 저를 받아주시고 지도 편달해주시고, 논문을 완성할 수 있게 끝까지 모든 방면에서 끊임없는 배려로 지도해 주신 김 수찬 지도 교수님께 진심으로 감사 드리며, 또한 많은 관심과 교정의 노고로 격려해 주신 유 옥 교수님과 이 종은 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 연구 진행에 많은 도움을 주신 영동세브란스 중앙연구실 연구원분들 에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 무한한 사랑과 믿음으로 보살펴주신 부모님과 형, 형수님 그리고 조카 상수에게 이 기쁨을 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 재료	
가. 사용 세포	7
나. 시약 및 항체	7
2. 실험방법	
가. HaCaT 세포 배양	8
나. MTT 분석	8
다. 세포주기 분석	9
라. TUNEL 염색	10
마. Annexin-V와 PI 염색	10
바. Sub-G1 DNA content 측정	11
사. 단백질 추출	11
아. Western blot 분석	12
III. 결과	
1. Minocycline이 각질형성세포의 증식에 미치는 영향	14

2. Minocycline에 의해 유도된 각질형성세포의 세포주기 정지	14
3. Minocycline에 의해 유도된 각질형성세포의 고사 가.TUNEL 염색	15
나.Sub-G1 DNA content	15
다.Annexin-V와 PI 염색	16
4. Minocycline에 의해 유도된 각질형성세포 고사와 연관된 신호전달 단백질 발현 양상	16
 IV. 고찰	 23
 V. 결론	 27
 참고문헌	 29
 영문요약	 33

그림 차례

- 그림 1. Minocycline이 각질형성세포의 증식에 미치는 영향 17
- 그림 2. Minocycline에 의한 각질형성세포의 세포 주기 정지 유발 18
- 그림 3. Minocycline에 의한 각질형성세포 고사 유발 19
- 그림 4. Minocycline 투여후 각질형성세포의 sub-G1 phase DNA content 증가 20
- 그림 5. Annexin-V 와 PI 염색을 이용한 minocycline에 의한 각질형성세포의 고사 관찰 21
- 그림 6. 세포고사에 관련된 신호전달 단백질 발현 양상 22

국문요약

Minocycline이 표피 각질형성세포의 증식과 고사에 미치는 영향

Tetracycline의 합성 유도체인 minocycline은 많은 피부 질환에서 유용하게 쓰이는 항생제로, 감염성 피부질환 이외에 여러가지 피부질환에서 광범위하게 치료 효과를 나타낸다. 임상적으로 사용되는 대표적인 피부질환으로는 여드름, 주사, 피저성 농피증, 급성 두창상 태선양 비강진, 지속성 수장 족저 농피증, 유천포창, 융합성 망상 유두종증(confluent and reticulated papillomatosis) 등이 있다. Minocycline이 치료 효과를 나타내는 질병 중 융합성 망상 유두종증은 표피에서 유두종변화와 극세포증, 과각화증을 특징으로 하는 질환으로, 이 질병은 각질형성세포의 비정상적인 각질화 과정이 병인으로 여겨지고 있다. 이와 같이 융합성 망상 유두종증에서 minocycline이 좋은 치료효과를 나타내므로, minocycline이 각질형성세포의 증식에 영향을 미칠 것이라는 가정을 하였다.

과거 본 연구실에서 시행한 연구결과에 의하면 minocycline은 각질형성세포의 증식과 분화를 억제하였다. 또한, minocycline이 각질형성세포의 세포간 부착을 저해하지만 세포간 부착에 중요한 단백질인 desmoglein 발현에는 영향을 미치지 않았다. 하지만 minocycline이 어떤 기전으로 각질형성세포의 증식을 억제하는지는 아직까지 밝혀진바 없다. 또한 minocycline이 각질형성세포의 고사를 유발하는지도 밝혀진바 없었기 때문에 본 연구자는 minocycline이 각질형성세포에서 고사를 유발한다는 가정 하에

이를 증명하기 위하여 실험을 진행 하였다.

Minocycline(10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 각질형성세포에 투여 하였을 때 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 세포고사가 유발 되었으며, 투여 농도에 비례하여 세포고사가 증가 하는 것이 확인 되었다. 세포주기 정지는 minocycline 투여 3시간 후부터 G0/G1 phase에서 발생하였으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여하였을 때 대조군에 비하여 9% 의 G0/G1 phase 정지가 증가하는 것을 확인하였다. 또한 minocycline을 투여한 각질형성세포에서 24시간 이후 세포고사가 발생한다는 것을 TUNEL염색을 통하여 확인 했고, FACS를 이용한 Annexin-V 와 PI 염색 실험에서 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 48시간 동안 투여했을 때 각질형성세포의 83% 에서 세포고사가 유발되었다. 또한, DNA content 분석에서 minocycline을 24시간 이상 투여했을 때 sub-G1 phase가 농도에 비례하여 증가하기 시작하여, 48시간 동안 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여 하였을 때 sub-G1 phase 의 DNA content가 66% 까지 증가 하였다. Minocycline에 의해 유도되는 세포고사는 고사신호전달 단백질인 caspase-8 을 활성화 시켰으며, mitochondria 에서 cytochrome c를 유리시켜 caspase-3 의 활성화에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 minocycline에 의한 각질형성세포의 고사에는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway가 모두 관여한다고 생각된다.

이상의 결과 minocycline은 투여 3시간 및 6시간 후에 G0/G1 phase 정지를 유발하여 각질형성세포의 증식을 억제 시키고, 24시간후 부터 caspase-8을 활성화 시키고 cytochrome c를 유리시킴으로서 각질형성세포의 세포고사를 유발한다는 것을 확인하였다.

핵심되는 말: apoptosis, keratinocyte, minocycline, proliferation

Minocycline이 표피 각질형성세포의 증식과 고사에 미치는 영향

<지도교수 김 수 찬>

연세대학교 대학원 의과학과

정 승 용

I . 서 론

Tetracycline의 합성 유도체인 minocycline은 많은 피부 질환에서 유용하게 쓰이는 항생제이다¹. Minocycline은 항생제로서의 작용 외에 면역억제 작용으로는 백혈구의 탐식기능을 저하시키고³, 림프구 기능을 저하시키며⁴, 보체계를 억제하는⁵ 등의 작용이 있으며, 항염증 작용으로는 중성호성 백혈구의 화학주성 억제작용⁶ 이 있고, 이외에도 *Corynebacterium acne*에서 분비되는 lipase를 억제하는 작용과⁷, collagenase를 억제하는 작용⁸ 등이 보고되었다.

Minocycline은 감염성 피부 질환 이외에 여러가지 피부 질환에서 광범위하게 치료효과를 나타내는데, 임상적으로 많이 사용 되는 대표적인 피부질환으로는 여드름(acne)⁹, 주사(rosacea)¹⁰, 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum)¹¹, 급성 두창상 태선양

비강진(pityriasis lichenoides et varioliformis acuta)¹², 수장
죽저 농피증(pustulosis palmoplantaris)¹³, 유천포창(bullous
pemphigoid)¹⁴, 융합성 망상 유두종증(confluent and reticulated
papillomatosis)¹⁶ 등이 있다.

Minocycline이 치료효과를 나타내는 질병 중에서 융합성 망상
유두종증은 표피에서 유두종 변화와 극세포증, 과각화증을
특징으로 하는 질환으로, 이 질환의 원인으로 다음의 세가지
가설이 제시되었다. 첫째는 *Pityrosporum orbiculare*에 의한
진균감염¹⁷, 둘째는 당뇨병이나 갑상선질환과 연관이 있는 호르몬
장애¹⁸, 셋째는 각질형성세포의 각질화 과정에서 생긴 이상¹⁹ 등이다.
현재는 각질형성세포의 각질화 과정에서의 이상이 가장 중요한
병인으로 여겨지고 있으며²⁰, minocycline이 융합성 망상
유두종증에서 좋은 치료효과를 나타내는 것이, 각질형성세포의
증식에 영향을 미치기 때문이라고 추정을 할 수 있다.

과거 본 연구실에서는 minocycline이 각질형성세포의 증식과
분화를 억제한다는 사실을 밝힌 바 있으며, 이외에도
minocycline이 각질형성세포의 세포간 부착을 저해하지만 세포간
부착에 중요한 단백질인 desmoglein 발현에는 영향을 미치지
않는다는 것을 밝혀 내었다. 하지만 아직 minocycline이
각질형성세포에서 어떤 기전으로 증식을 억제하는 지는 아직 밝혀
지지 않았으므로, 그 기전을 밝히기 위하여 실험을 진행하였으며,
minocycline이 세포고사에 미치는 영향도 조사하였다.

본 연구에서는 minocycline이 각질형성세포에서 G1/G0 phase의
세포주기 정지를 유발함을 확인 하였으며, propidium iodide(PI)와
annexin-V 염색을 이용한 flow cytometry와, TUNEL 염색을

이용하여 minocycline이 각질형성세포의 고사를 유발함을 확인했다. 또한 minocycline이 유도하는 세포고사가 어떤 기전을 통해 발생하는지 밝히기 위하여 minocycline 투여후 세포고사와 연관된 신호전달 단백질인 caspase-8, cytochrome c, caspase-3를 western botting 분석을 통하여 확인 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 사용 세포

본 실험에서 사용된 HaCaT 세포는 형질전환된 각질형성세포로서 정상 각질형성세포와 형태 및 반응 양식이 동일 하면서 계대배양이 제한되지 않아 유지하기가 매우 편리한 장점이 있다.

나. 시약 및 항체

세포 배양에 필요한 우태아 혈청, 항생제, RPMI-1640 배지 등은 Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. 세포주기 측정 및 sub-G0 DNA content 실험에서 propidium iodide, ribonuclease A 는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, 세포고사 측정을 위한 실험에서는 In situ cell death detection kit는 Roche (Mannheim, Germany) 제품을 사용했고, annexin-V FITC apoptosis detection kit는 BD (Pharmingen, San Diego, CA, USA) 제품을 이용 하였다.

Western blot 분석 실험에 필요한 caspase-8, cytochrome c 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였고, caspase-3 일차항체는 BD 제품을 이용하였다. 이차항체로 peroxidase conjugated anti-rabbit IgG, anti-goat

IgG는 DAKO (Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였다. PVDF transfer membrane은 Pall Corporation (Ann Arbor, MI, USA) 제품을 이용했고, hyperfilm ECL 과 ECL plus western blotting detection system은 Amersham (Biosciences, Buckinghamshire, UK) 제품을 이용하였다.

2. 실험 방법

가. HaCaT 세포 배양

HaCaT 세포는 10% 우태아혈청 과 1% antibiotic/antimycotic 를 첨가한 RPMI-1640 을 세포배양액으로 이용하여, 37°C, 5% CO₂로 유지되는 항온기(incubator) 에서 배양하였다. 계대배양은 배양 플라스크 면적의 80% 정도를 차지할 때까지 배양한 다음, 0.05% trypsin과 53mM EDTA를 첨가한 Hanks' balanced salt solution(HBSS with phenol red, without Ca²⁺ or Mg²⁺)을 이용하여 세포를 배양 플라스크로부터 분리한 다음 20% FBS가 포함된 배양액으로 trypsin을 중화한 후 원심 분리하여 여러차례 계대배양 하였다.

나. MTT 분석

HaCaT 세포를 96 well plate에 well당 1 X 10⁴ 개의 세포를 분주하고 배양액(10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic, RPMI-1640)을 각 well당 100 μ l씩 첨가한 후 약 24시간 배양을 하였다.

이후 실험을 진행했는데, 실험군의 minocycline 농도는 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/ml 농도로 조절된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 50 μl 씩 첨가하였다. 이후 각질형성세포를 4시간 동안 더 배양한 뒤에 각질형성세포 배양 상층액을 suction을 이용하여 조심스럽게 제거하였다. Dimethylsulfoxide (Sigma)용액 200 μl 를 첨가하고 shaker 에서 10분간 흔들 후 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하고 대조군에 대한 백분율을 구하였으며, 이 실험을 3회 반복 하였다.

다. 세포주기 분석

HaCaT 세포가 6 well culture flask 에서 60-70% 정도 자랐을 때 각 well당 minocycline 농도를 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 투여했다. 각각의 세포를 시간별로 trypsin 을 이용하여 분리한 후 원심분리 하여 세포만을 획득하고, 이 pellet을 phosphate buffered saline(PBS)으로 2번 씻어 주었다. 씻어준 pellet은 500 μl 의 PBS를 첨가하여 suspension 을 만든 후 차가운 ethanol을 서서히 첨가하면서 vortex 해 세포를 고정하였다. 고정한 세포는 이후 원심 분리를 통하여 ethanol을 완전히 제거한 후 차가운 PBS로 세척했으며, 이후 propidium iodide(PI) 용액 50 μl 와 RNase A 50 μl 를 첨가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 incubation 했다. 이때 빛에 노출되는 것을 방지하기 위하여 호일로 완전히 감싸주었다. Incubation 후 flow cytometry (Becton Dickinson,

Bedford, MA, USA)를 이용하여 세포주기를 분석하였다. 세포주기 분석에는 ModFit LT™ software (BD Biosciences) 를 이용하였다.

라. TUNEL 염색

Chamber slide에 HaCaT 세포를 배양한 후에 PBS에 녹인 4% paraformaldehyde 용액으로 상온에서 1시간 동안 고정시킨 후 PBS로 세척하고 blocking 용액 (3% H₂O₂ in methanol)으로 상온에서 10분 동안 blocking 시켰다. 이후 PBS로 세척하고 투과성 용액 (0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate)으로 얼음 위에서 2분 동안 반응시킨 다음 PBS로 세척했다. In situ cell death detection kit를 사용하여 37°C 에서 1시간 동안 빛을 차단시키고 반응시켰다. PBS로 세척한 후 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 200 배 배율로 관찰하였다.

마. Annexin-V 와 PI 염색

Annexin-V 와 PI 염색을 이용한 세포고사 측정 실험은 BD Biosciences의 annexin-V FITC kit 의 실험방법에 따라 수행하였다. 세포고사 초기에 일어나는 세포막의 특징적인 변화는 annexin-V를 사용하여 확인 할 수 있다. HaCaT 세포에 24시간, 48시간 동안 10, 20, 30, 50, 60 $\mu\text{g/ml}$ 의 minocycline을 투여하고, 죽어서 이미 배지 위로 뜬 세포와 바닥에 붙어 살아남은 세포를 함께 모아 PBS로 세척하였다. 그리고 2×10^6 cell/ml 를 annexin-V 반응 완충액(10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) 100

μl 로 잘 섞어 주고, 각각 annexin-V FITC buffer(1% BSA, 0.1% sodium azide, Tris buffer, pH 7.4) 5 μl 와 PI buffer(Propidium Iodide 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in PBS) 10 μl 을 넣어 상온에서 15 분간 반응시킨 후에 annexin-V 반응 완충액을 400 μl 씩 더 첨가해 주었다. 결과는 flow cytometry 로 측정했고, CellQuest Pro™ software (BD Biosciences)를 이용하여 HaCaT 세포에서 세포괴사나 세포고사가 일어났는지 분석하였다.

바. Sub-G1 DNA content 측정

HaCaT 세포가 6 well culture flask 에서 60-70% 정도 자랐을 때 각 well에 minocycline 농도를 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되도록 투여하였다. 12시간, 24시간, 48시간 별로 trypsin 을 이용하여 세포를 모은 뒤 propidium iodide solution 50 μl 와 RNase A 50 μl 를 첨가한 후 37 °C에서 30분간 incubation 하였다. Incubation 후 flow cytometry (Becton Dickinson)를 이용하여 sub-G1 DNA content를 분석하였다. Sub-G1 DNA content 분석 에는 Cell Quest Pro™ software (BD Biosciences) 를 사용하였다.

사. 단백질 추출

Western blot 분석을 수행하기 위한 단백질 추출에는 다음과 같은 방법을 사용하였다. 배양 flask로 부터 분리한 HaCaT 세포에 용해 완충액 [0.5 M EDTA, 62.5mM Tri-HCl (pH 6.8), 2-mercaptoethanol, 200 mM PMSF, 10% SDS]를 대략 400 μl 정도

첨가한 후 완전히 부유 시켜주었다. 부유시킨 후 완전히 세포가 파쇄 되도록 Vibra cell™ (Sonic & Materials, Danbury, CT, USA)을 이용하여 초음파 분쇄를 했다.

미토콘드리아와 세포질 단백을 분리하기 위해서, 용해 완충액을 넣은 세포를 13,000g로 4℃ 에서 20분간 원심분리 해서 미토콘드리아 단백을 얻었고, 상층액을 다시 13,000g로 4℃ 에서 20분간 원심분리 해서 세포질 단백을 얻었다.

아. Western blot 분석

15% SDS-PAGE 겔을 만든 후 lane 당 단백농도가 50 μ g 이 되도록 loading하고 겔당 30 mA의 전류를 주어 전기영동 시켰다. 전기영동시킨 겔의 단백을 30V 에서 2시간 동안 PVDF membrane 으로 전이 시켰다.

PVDF membrane을 떼어내어 TBS(tris-buffered saline)으로 세척해 준 후, blocking solution [5% non-fat milk, 0.01% tween-20 in TBS(pH 7.6)]에 넣어 상온에서 2시간 동안 서서히 흔들며 주면서 반응시킨 다음 blocking solution에 일차 항체인 caspase-8 (1:100), caspase-3 (1:2000), cytochrome c (1:100), β -actin (1:5000)을 희석해서 1 시간 동안 서서히 흔들며 주며 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PVDF membrane을 0.1% tween-20가 포함된 TBS로 10분 간격으로 3회 세척 해준 후 blocking solution에 1/10,000 으로 희석된 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, anti-goat IgG 이차 항체를 30분 동안 서서히 흔들며 주며 반응시켰다. 다시 0.1% Tween-20이 포함된 TBS로 10분

간격으로 3회 세척한 후, 각각의 단백질들의 발현정도를 확인하였다. 발현 정도는 ECL Plus Western blotting detection system를 이용해서 hyperfilm ECL에 현상 시켰다.

Ⅲ. 결 과

1. Minocycline이 각질 형성세포의 증식에 미치는 영향

대조군과 농도별로 minocycline을 투여한 각 실험군을 배양 12시간, 24시간, 48시간 후에 MTT assay를 이용하여 대사 활성을 평가하였다.

Minocycline 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 12시간 투여한 실험군에서 대조군에 비해 약 82%의 세포 생존율을 보였고, 투여 농도에 비례하여 세포증식이 억제되어 60 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 50%의 세포 생존율을 보였다. 24시간, 48시간 실험군에서는 minocycline 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 30%의 세포 생존율을 나타내었고, 30 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 약 6%의 생존율을 보였다(그림 1).

2. Minocycline에 의해 유도된 각질형성세포의 세포주기 정지

Minocycline이 HaCaT 세포의 세포주기에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 FACS를 이용하여 nuclear DNA의 양을 측정하였다(그림 2A).

Minocycline 투여 3시간 후 대조군에서는 30%의 G0/G1 phase가 보였는데 반해, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여했을 때 G0/G1 phase가 36%로 증가하였다(그림 2B). 또한 minocycline 투여 6시간 후 G0/G1 phase의 비율이 대조군에서 30%인데 반해, 투여 농도가 증가함에 따라 G0/G1 phase도 증가하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 39%를 보였다

(그림 2C). 이 결과, minocycline이 HaCaT 세포에서 G0/G1 phase 정지를 유발하는 것을 알 수 있었다.

3. Minocycline에 의해 유도된 각질형성세포의 고사

가. TUNEL 염색 결과

Chamber slide에서 배양한 HaCaT 세포에 minocycline을 10, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 24시간, 48시간 동안 투여한 후 TUNEL 염색후 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 24시간 48시간 모두에서 대조군에 비해 minocycline을 투여한 실험군에서 TUNEL 염색된 HaCaT 세포가 많이 관찰 되었다(그림 3).

나. HaCaT 세포의 Sub-G1 DNA content 분석 결과

Minocycline에 의해 HaCaT 세포에서 세포고사가 유도되는 것을 확인하기 위한 방법으로 Sub-G1 DNA content를 분석하였다.

12시간 동안 농도별로 minocycline을 투여한 실험군에서 Sub-G1 DNA content는 거의 변화가 없었다. 그러나 24시간 동안 투여한 실험군에서는 minocycline 농도에 비례하여 sub-G1 DNA content가 증가하여, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 minocycline을 투여 했을 때 41%로 증가하였다. Minocycline을 48시간 동안 투여한 실험에서도 minocycline을 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여 했을때 66% 로 농도에 비례하여 증가하는 것을 보였다(그림 4).

이 결과, minocycline을 24시간 이상 투여했을 때, 투여 농도에 비례하여 각질형성세포의 세포고사가 유발되는 것을 확인 하였다.

다. Annexin-V 와 PI 염색

Minocycline에 의해서 세포고사가 일어나는지 알아보기 위해서 FACS를 이용하여 annexin-V 와 PI 염색을 함으로써 세포고사를 관찰하였다. Minocycline을 농도별로 24시간, 48시간 투여한 후 분석한 결과, 투여 농도와 시간에 비례하여 세포고사가 증가하는 것을 확인 하였다(그림 5).

4. Minocycline에 의해 유도된 각질형성세포 고사와 연관된 신호전달 단백질 발현 양상

Minocycline을 농도별로 24시간, 48시간 투여하였을 때, procaspase-8 이 활성화 되어 감소 되었고, mitochondria에서 세포질로 유리된 cytochrome c 가 증가하는 것을 보였으며, caspase-3 가 활성화되는 것을 확인하였다(그림 6). 그러므로 minocycline에 의해 유발된 각질형성세포의 세포고사에는 caspase-8이 활성화되는 extrinsic pathway 뿐 아니라 mitochondria에서 cytochrome c 를 세포질로 유리시켜 caspase-9이 활성화되는 intrinsic pathway 모두 관여함을 알 수 있었다.

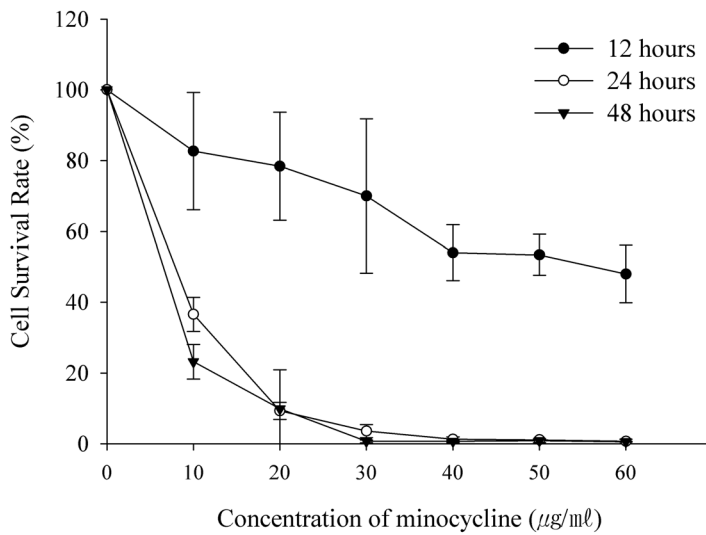
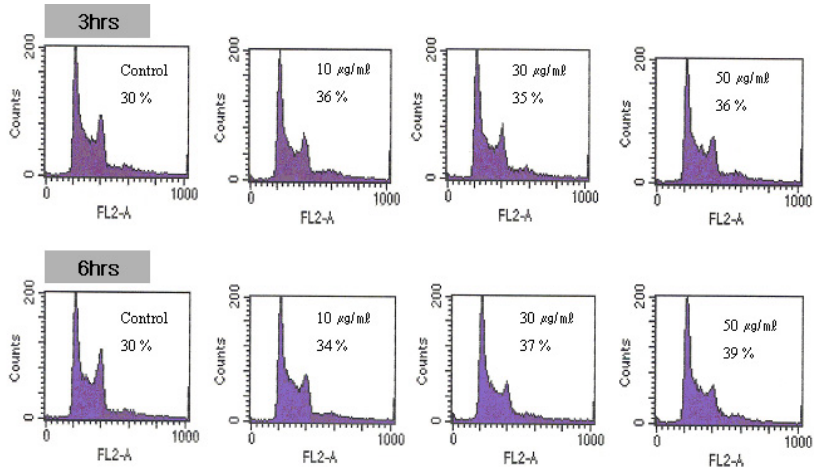


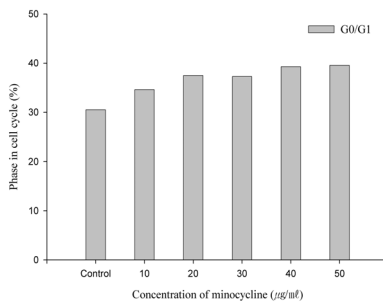
그림 1. Minocycline 이 각질형성세포의 증식에 미치는 영향.

Minocycline을 농도, 시간별로 투여 한 후 MTT assay를 시행하여 대조군에 대한 실험군의 생존 백분율을 구하였다. 실험 결과 minocycline 투여 농도 및 시간에 비례하여 세포 증식이 억제되었다.

A



B



C

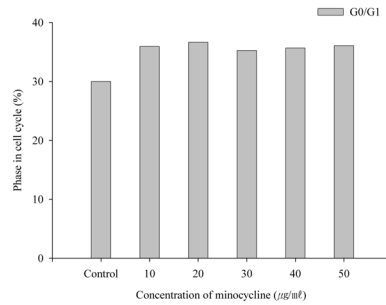


그림 2. Minocycline에 의한 각질형성세포의 세포주기 정지 유발.

(A) FACS 결과 histogram

(B) Minocycline 3시간 투여 후 G0/G1 phase 비율

(C) Minocycline 6시간 투여 후 G0/G1 phase 비율

Minocycline을 농도별로 투여 후 3시간, 6시간 후 세포주기를 분석했다. Minocycline 농도가 증가함에 따라 G0/G1 phase는 증가하였다.

Minocycline concentration

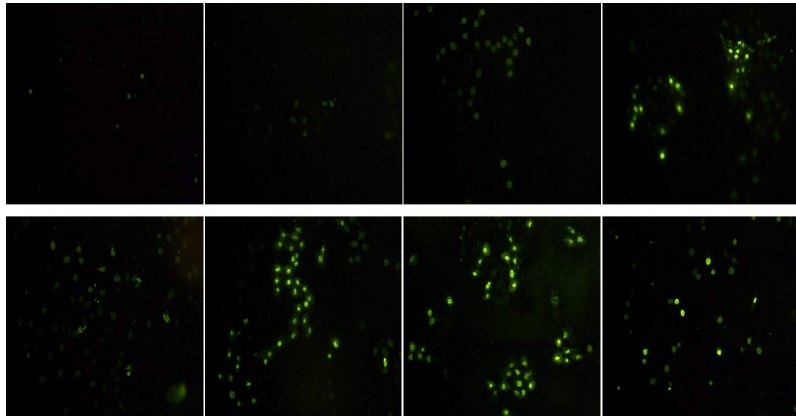
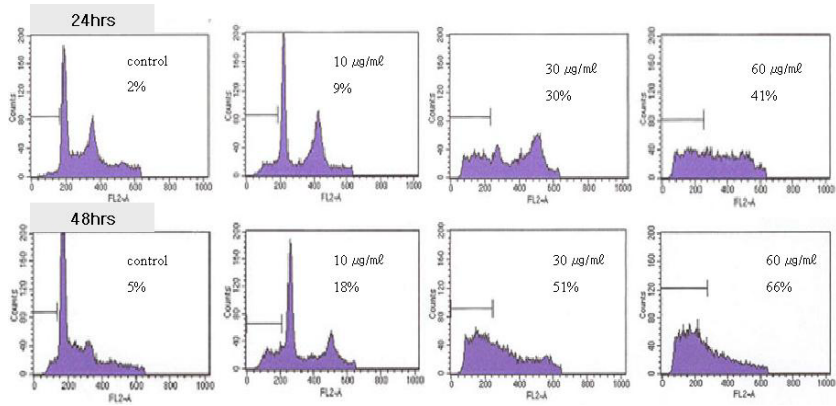


그림 3. Minocycline에 의한 각질형성세포의 세포고사 유발.

Minocycline을 10, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 24시간, 48시간 동안 투여한 후 TUNEL 염색을 통해서 세포고사를 확인 하였다. Minocycline에 의해서 각질형성세포에서 세포고사가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다(TUNEL stain, $\times 200$).

A



B

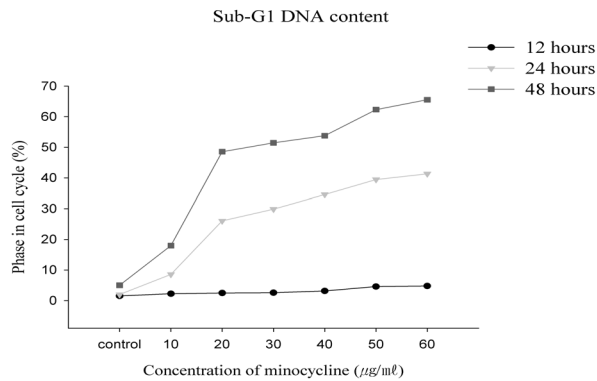


그림 4. Minocycline 투여 후 각질형성세포의 sub-G1 phase DNA content 증가.

(A) Minocycline을 24, 48시간 동안 투여 한 후 sub-G1 phase DNA content를 분석한 FACS histogram

(B) Minocycline을 농도별로 12, 24, 48시간 동안 투여 한 후 sub-G1 DNA content를 분석한 결과

Minocycline을 10 μg/ml 이상의 농도로, 24시간 이상 투여 했을 때 sub-G1 DNA content 가 증가하는 것을 확인하였다.

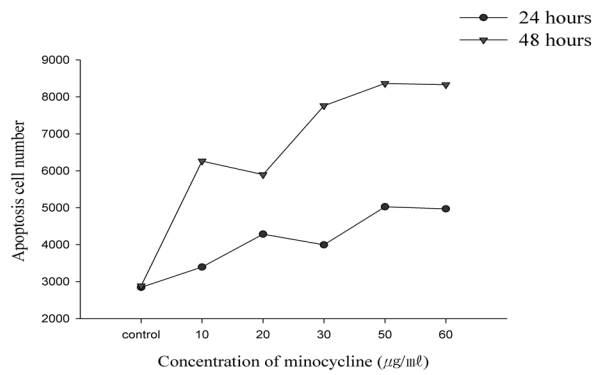
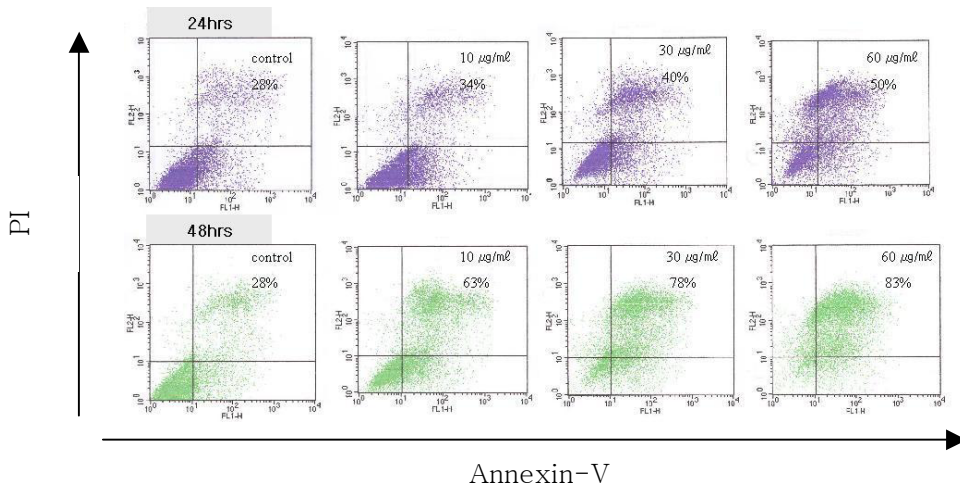


그림 5. Annexin-V 와 PI 염색을 이용한 minocycline에 의한 각질형성세포의 세포고사 관찰.

Minocycline을 24시간, 48시간 동안 농도별로 투여한 후 annexin-V 와 PI 염색을 이용하여 FACS로 분석한 결과 minocycline투여 후 세포고사가 증가하는 것을 확인하였다. 좌측 하단을 살아있는 세포를 나타내고, 우측하단은 초기 세포고사를 나타내며 우측 상단은 후기 세포고사를 나타낸다. 초기 세포고사와 후기 세포고사 를 합산한 세포고사 백분율을 각각의 그림 우측 상단에 표기 하였다.

β -actin

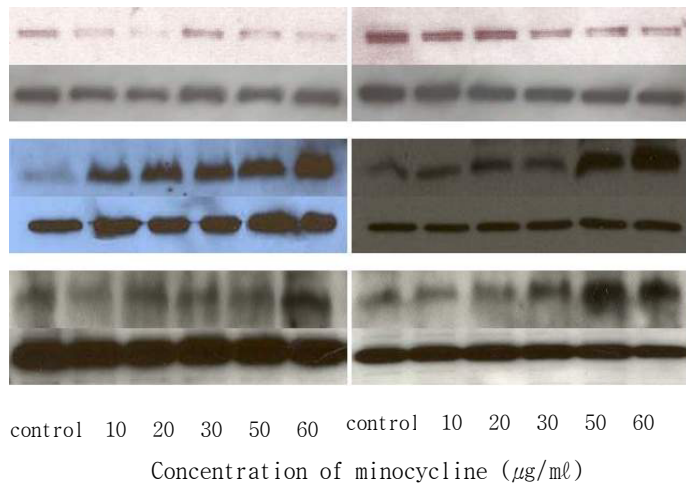


그림 6. 세포고사에 관련된 신호전달 단백질 발현양상

Minocycline을 24시간, 48시간 투여한 후 western blotting 분석 결과 minocycline 투여 농도에 따라 procaspase-8이 감소하였고, mitochondria에서 분비된 cytochrome c 의 양이 세포질에서 증가하였으며, 최종적으로 세포 고사를 유발하는 활성화된 cleaved caspase-3 의 양이 증가 되는 것을 확인 할 수 있었다.

IV. 고찰

본 연구는 tetracycline의 합성유도체인 minocycline이 각질형성세포의 증식과 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여, MTT 검사법으로 세포증식을 측정하고, FACS를 이용하여 각질형성세포의 세포주기 와 세포고사를 확인 하였다. 또한 세포고사와 관련된 신호전달 경로를 밝히기 위해서, 신호전달 단백질인 caspase-8, cytochrome c 및 caspase-3의 발현 양상을 조사 하였다.

세포주기의 과정은 여러 신호전달과 cyclin, cyclin dependent kinase(CDK)와 같은 조절인자에 의하여 주도 면밀하게 조절되고, 그 중 G0/G1 phase에서 S phase로의 전환은 cyclin D, E나, CDK 2, 4, 5, 및 6이 복합체를 형성하여 retinoblastoma tumor suppressor(Rb)가 인산화 되면 Rb로부터 E2F가 분리되어 E2F가 활성화되면서 일어난다고 밝혀졌다. 반대로, G0/G1 phase의 arrest는 Rb가 탈 인산화 되어 E2F 와 Rb family (p130, p107포함)가 복합체를 형성하여 E2F가 불활성화 되어 유발된다고 알려져 있다¹⁹.

한편, 세포고사는 여러 단백질들간의 상호 작용으로 일어나는 정밀한 세포 내 방어 기전으로 알려져 있으며²⁰, 이를 유발하는 원인으로는 유전자 불안전성(genome instability), 세포독성 물질, 바이러스 감염 등 여러 가지가 있다. 이중에서도 특히 유전자 불안정성을 유발하는 자극이 가해지면, 세포는 세포 주기를 G0/G1 phase에 정지 시키면서 손상된 유전자를 복구하는데, 이 과정에 p53이 중요한 역할을 한다고 보고 되어 있다²¹. 만약 유전자 손상이 심하면 p53은 세포사멸을 촉진시킴으로써 비정상 세포를

제거하는데, 이 과정에서 caspase family, Bcl-2 family 등이 중요하게 작용한다²². 세포고사의 기전에서 mitochondria는 중요한 작용을 하는 기관으로 알려져 있다. Mitochondria는 bcl-2 family 단백질들의 상호간의 균형을 통하여 mitochondria의 membrane permeabilization (MMP)을 조절함으로써²³ death effector로 알려진 cytochrome c와 Smac/DIABLO들이 mitochondria로부터 나와 caspase들을 활성화 시키는 것으로 알려져 있다²⁴. Mitochondria로부터 방출되는 cytochrome c와 Smac/DIABLO들에 의해서 활성화 되는 caspase는 caspase-9과 caspase-3인데, 이들 중 caspase-9은 initiator caspase로 mitochondria로부터 전해 지는 신호를 통해 활성화 된 후 effector caspase인 caspase-3를 활성화 시켜서 결국 세포고사를 유발한다²⁵. 이와 같이 mitochondria로부터 cytochrome c가 방출되어 caspase-3의 활성화에 의해 일어나는 세포고사 경로를 intrinsic pathway라고 한다²⁶. 또한 세포에 TNF나 Fas ligand등 세포사멸 수용체를 자극하는 세포고사 신호가 들어오면 세포내의 initiator caspase인 procaspase-8이 활성화 형태의 caspase-8으로 잘라지게 된다²⁷. Caspase-8은 procaspase-3를 caspase-3로 자르고 caspase-3는 결국 세포고사를 유발시킨다. 세포막의 수용체에서 기인하는 caspase-8의 활성화와 이에 따른 caspase-3의 활성화에 의한 세포고사 경로를 extrinsic pathway라고 한다²⁶.

본 실험 결과, minocycline을 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이상의 농도로 투여 하였을 때, 농도와 시간에 비례하여, 각질형성세포의 증식이 억제되는 것을 MTT 검사법으로 확인 하였다. 또한 FACS를 이용해서 세포주기를 분석한 결과, 배양된 각질형성세포에 3시간, 6시간

동안 minocycline을 투여 했을 때, 각질형성세포의 세포주기가 G0/G1 phase에서 투여 농도에 비례하여 정지된다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 실험 결과, 각질형성세포의 증식이 minocycline에 의해서 억제된다는 것을 확인 할 수 있었다. 이 같은 minocycline의 각질형성세포 증식 억제작용이 극세포증을 보이는 융합성 망상 유두종증에 대한 치료효과와 연관성이 있을 가능성이 있다. 또한 minocycline을 투여하고 24시간, 48시간 배양한 각질형성세포에서 세포고사가 유발되었음을 FACS를 이용한 sub-G1 DNA content 분석 과 annexin-V 와 PI 염색을 통하여 확인 할 수 있었다. TUNEL 염색에서도 역시 minocycline을 투여하였을 때, 투여하지 않은 대조군에 비하여 세포고사가 더 많이 유발되는 것을 관찰 하였다. 또한, western blot 결과 procaspase-8 이 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 이것은 caspase-8의 전구체인 procaspase-8이 감소한 만큼 caspase-8이 증가 하였다고 해석 할 수 있다. 그리고 mitochondria에서 세포질로 유리된 cytochrome c와 활성화된 caspase-3도 관찰 할 수 있었다. 이 결과 minocycline에 의해 유발된 각질형성세포의 세포고사는, caspase-8이 활성화되는 extrinsic pathway 뿐만 아니라, mitochondria에서 cytochrome c를 세포질로 유리시켜 caspase-9이 활성화되는 intrinsic pathway 모두 관여한다고 볼 수 있다.

결론적으로 각질형성세포에 minocycline을 투여 하였을 때, 투여 초기 3시간, 6시간에서는 세포주기 G0/G1 phase에서 정지를 유발시켜 각질형성세포의 증식을 억제한다고 생각된다. 또한 24시간 이상 투여 하였을 때, 각질형성세포에서 투여 농도와 시간에 비례해서 세포고사를 유발하고, minocycline에 의해 유발된

세포고사에는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway가 모두
관여한다고 여겨진다.

V. 결 론

Minocycline은 tetracycline의 합성유도체이면서 감염성 질환뿐만 아니라 염증성 피부질환에도 광범위하게 쓰여지고 있다. 본 연구에서는 minocycline이 각질형성세포의 증식과 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 진행 하였다. HaCaT 세포를 배양하여, minocycline투여 후 cell cycle 분석을 실시하여 증식에 미치는 영향을 확인 하였다. 또한, 세포고사를 유발하는지 확인하기 위하여, TUNEL 염색, sub-G1 DNA content 분석, 그리고 annexin-V 와 PI 염색 후 FACS로 세포고사 분석을 하였다. 세포고사에 관련된 신호전달 단백질 발현량을 western blotting 실험을 통하여 분석하였다. 이상의 실험을 통하여 minocycline이 각질형성세포의 증식과 고사에 미치는 영향을 조사 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MTT 분석을 통하여 minocycline이 HaCaT 세포의 증식을 억제하는 것을 확인 하였다.
2. Minocycline을 HaCaT 세포에 투여한 후 세포주기를 분석한 결과, 3시간, 6시간 투여 후 G0/G1 phase 정지를 유발 하였다.
3. 세포고사를 관찰하기 위하여, TUNEL 염색, sub-G1 DNA content 분석, annexin-V 와 PI 염색을 한 결과, minocycline투여 24시간 후부터 세포고사를 유발하는 것을 확인 하였다.
4. 세포고사에 관련된 신호 전달 단백질인 caspase-8,

cytochrome c, 그리고 caspase-3의 발현량을 관찰하기 위해서 western blotting을 실시하였다. 그 결과, procaspase-8이 감소하고, 세포질의 cytochrome c의 양이 증가하는 것을 확인 하였다. 또한 caspase-3의 활성이 증가하는 것을 관찰 하였다.

이상과 같이 세포주기 분석 및 여러 세포고사를 확인 할 수 있는 실험을 수행한 결과, minocycline 투여 3시간, 6시간 후 G0/G1 phase 정지를 유발하여 각질형성세포의 증식을 억제 시키고, 24시간후 부터 caspase-8과 cytochrome c가 작용하여 세포고사를 유발하는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Humbert P, Treffel P, Chapuis JF, Buchet S, Derancourt C, Agache P: The tetracycline in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1991;25: 691-697.
2. Forgren A, Schmeling D, Quie PG: Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. *J Infect Dis* 1974;130:412-415.
3. Thong YH, Ferrande A: Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses to tetracycline analogues. *Clin Exp Immunol* 1979;35:443-446.
4. Ingham E: The effect of tetracyclines and erythromycin on complement activation in vitro. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1990;70:531-534.
5. Esterly NB, Koransky JS, Furey NL, Trevisan M: Neutrophil chemotaxis in patients with acne receiving oral tetracycline therapy. *Arch Dermatol* 1984;120:1308-1313.
6. Hassing GS: Inhibition of *Corynebacterium acne* lipase by tetracycline. *J Invest Dermatol* 1971;56:189-192
7. Sheridam P: Tetracyclines block collagenase activity. *JAMA* 1984;252: 1989-1990.
8. Cunliffa WJ, Forster RA, Greenwood ND, Hetherington C, Holland KT, Holmes RL, Khan S, Roberts CD, Williams M, Williamson B: Tertacycline and acne vulgaris: a clinical

- and laboratory investigation. Br Med J 1973;4:332-335.
9. Sneddon IB: A clinical trial of tetracycline in rosacea. Br J Dermatol 1966;78:649-652.
 10. Lynch WS, Bergfeld WF: Pyoderma gangrenosum responsive to minocycline hydrochloride. Cutis 1978;21:535-537.
 11. Shelly WB, Griffith RF: Pityriasis lichenoides et varioliformis acute: a report of a case control by a high dosage of tetracycline. Arch Dermatol 1969; 100:596-597.
 12. Thomsen K, Osterbye P: Pustulosis palmaris et plantaris. Br J Dermatol 1973;89:293-296.
 13. Thornfeldt CR, Menkes AW: Bullous pemphigoid controlled by tetracycline. J Am Acad Dermatol 1987;16:305-310.
 14. Sassolas B, Platin P, Guillet G: Confluent and reticulated papillomatosis; treatment with minocycline. J Am Acad Dermatol 1992;26:501-502.
 15. Roberts SOB, Lachapelle JM: Confluent and reticulated papillomatosis(Gougerot and Carteaud) and *Pityrosporum orbiculare*. Br J Dermatol 1969;81:841-845.
 16. Hamilton D, Tavafoghi V, Shafer J, Hambrick GW: Confluent and reticulated papillomatosis of Gougerot and Carteaud. J Am Acad Dermatol 1980;2:401-410.
 17. Bruynzeel-Koomen CA, de Wit RF: Confluent and reticulated papillomatosis successfully treated with

the aromatic etretinate. Arch Dermatol 1984;120:1236-1237.

18. Lee SH, Choi EH, Lee WS, Kang WH, Band DS: Confluent and reticulated papillomatosis; a clinical, histopathological, and electron microscopic study. J Dermatol 1991;18:725-730.
19. Westphal, J.R., Van' t Hullenger, R., Peek, R., Willems, R.W., Crickard, K., Crickard, U., Askaa, J., Clemmensen, I., Ruiter, D.J. and De Waal, R.M.: Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. Int. J. Cancer 2000;86(6):768-76.
20. Katja, C.Z., Christine, B. and Douglas, R.G. The machinery of programmed cell death. Pharmacol. Ther. 2001;92:57-70.
21. Amanda, K.P. and Timothy, C.H. Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. Trends. Cell. Biol. 2001;11(10):426-433.
22. Karen, H. V. p53: Death star. 2000;103:691-694.
23. Sartorius, U., Schmitz, I. and Krammer, P.H. Molecular mechanism of death receptor mediated apoptosis. Apoptosis 2001;2:9-20.
24. Atan, G., Jennifer, J., Michael, C.W. and Stanley, J.K. Enforced dimerization of Bax results in its

translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis.
EMBO 1998;17(14):3878-3885.

25. Shi, Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. Structure(Camb) 2002;10:285-288.
26. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:401-410.
27. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. Apoptosis 2002;7:313-319.

Abstract

The effect of minocycline on proliferation and apoptosis of the keratinocyte

Sung Yong Jung

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo-Chan Kim)

Minocycline is one of the most widely used antibiotics in dermatology. In addition to the infectious conditions, it also has been used for the treatment of various noninfectious dermatological diseases, such as “acne, pustulosis palmaris and plantaris, bullous pemphigoid, and dystrophic epidermolysis bullosa”. Pharmacological mechanisms of minocycline in these diseases can be explained by its anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Recently, minocycline has been proved to be effective for confluent and reticulated papillomatosis (CRP), which is characterized by hyperkeratosis, acanthosis and papillomatosis without any evidence of infection, inflammation and immune-dysfunction. Since the mechanism of action of minocycline for CRP cannot be

explained by its known pharmacological effect, we examined the effect of minocycline on proliferation and apoptosis of the HaCaT cell. MTT assay showed that the proliferation of HaCaT cell was inhibited by minocycline. FACS analysis using propidium iodide staining and annexin-V staining showed that minocycline induce growth arrest at G0/G1 phase and minocycline also induce apoptosis in HaCaT cell. In addition, activation of caspase-8, caspase-3 and cytochrome c was detected in minocycline treated HaCaT cell by western blotting analysis. Therefore, apoptosis in HaCaT cell was triggered by minocycline, leading to activation of caspases via both extrinsic pathway and intrinsic pathway. These results suggested minocycline has an inhibitory effect on the proliferation of the keratinocyte and also induce apoptosis of the keratinocyte.

Key Words: apoptosis, keratinocyte, minocycline, proliferation