

아토피피부염에서 각질형성세포의

Thymic Stromal

Lymphopoietin 발현

연세대학교 대학원

의과학과

오 문 호

아토피피부염에서 각질형성세포의

Thymic Stromal

Lymphopoietin 발현

연세대학교 대학원

의과학과

오 문 호

아토피피부염에서 각질형성세포의
Thymic Stromal
Lymphopoietin 발현

지도 이 광 훈 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

오 문 호

오문호의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005 년 6 월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 따뜻한 배려로 지도해 주시고 격려해 주시고 학문의 길과 방향에 깨우침을 주신 은사 이광훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한, 많은 관심과 조언으로 도움을 주신 이민걸 교수님, 홍천수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 연구 진행에 많은 도움을 주신 임상의학 연구센터의 장남수 선생님, 이주희 선생님, 박창욱 선생님께도 깊은 감사를 드립니다.

지금까지 늘 사랑과 관심으로 곁에서 지켜봐 주시고 모든 방면으로 후원해 주신 부모님께 무한한 감사와 이기쁨을 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 연구대상	7
2. 조직생검	7
3. 면역조직화학염색	7
4. 생검조직에서 각질형성세포 1차배양	8
5. 공초점 레이저 현미경 검사	8
6. 정상 각질형성세포 계대배양	9
7. 각질형성세포에 사이토카인 처리	9
8. 면역형광 유세포분석법	9
9. Western blot 분석	10
10. RT-PCR	11
III. 결과	13
1. 정상인 피부조직과 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직, 병변 피부조직에서의 TSLP 발현	13
1) 면역조직화학염색을 이용한 TSLP 발현 비교	13
2) 정상인과 아토피피부염환자의 병변 피부조직으로부터 분리 배양한 각질형성세포의 TSLP 발현 비교	14
2. 사이토카인을 처리한 정상 각질형성세포에서 TSLP발현	15
1) 면역형광 유세포분석법 소견	15
2) 면역블롯 소견	17
3) TSLP mRNA의 RT-PCR 소견	17
IV. 고찰	19
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	29

그림 및 표 차례

- 그림 1. 정상인과 아토피피부염 환자의 비병변 및 병변 피부조직에서의 TSLP 발현13
- 그림 2. 정상인 피부와 아토피피부염 환자의 비병변 및 병변 피부조직에서 분리 배양한 각질형성세포에서 공초점 레이저 형광 현미경을 이용한 TSLP의 발현15
- 그림 3. 배양한 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치후 TSLP 발현의 FACS 소견16
- 그림 4. 배양한 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치후 TSLP 발현의 면역블롯 소견17
- 그림 5. 배양한 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치후 TSLP mRNA 발현의 RT-PCR 소견18

국문요약

아토피피부염에서 각질형성세포의 thymic stromal lymphopoietin 발현

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)은 IL-7과 유사한 구조를 갖고 있는 사이토카인으로 피부의 각질형성세포, 상피세포, 평활근세포 및 폐의 섬유모세포 등에서 발현된다. TSLP는 수지상 세포를 활성화시켜 helper T 세포를 Th2 세포로 분화시키며, Th2 세포의 분화는 아토피피부염의 증상을 유발시키는데 중요하다.

본 연구에서는 정상인과 아토피피부염 환자의 각질형성세포에서 TSLP의 발현에 차이가 있는지 또 아토피피부염과 관련된 사이토카인들이 각질형성세포의 TSLP 발현을 조절할 수 있는지 알아보기 위해 정상인의 피부조직 및 아토피피부염 환자의 병변 피부조직과 동일피부조직에서 일차 배양한 각질형성세포에서 TSLP 발현의 차이를 관찰하였으며 계대배양한 정상 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치 후 TSLP의 발현변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 정상인 및 아토피피부염 환자의 비병변, 병변 피부조직 표피의 각질형성세포에서 TSLP의 발현이 관찰되었으며 아토피피부염 환자의 병변 피부조직의 각질형성세포에서 정상 피부조직과 비병변 피부조직의 각질형성세포에 비해 강한 TSLP 발현을 보였다. 배양한 정상 각질형성세포에서도 flow cytometry, western blot, RT-PCR 검사상 TSLP의 발현이 관찰되었으나 사이토카인을 처치하지 않은 각질형성세포에 비해 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF를 처치한 각질형성세포에서 TSLP의 발현에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 본 연구를 통해 각질형성세포에서 TSLP의 발현이 아토피피부

염의 병변 활성화와 상관성이 있음을 알수 있었다.

핵심되는 말 : 아토피피부염, 각질형성세포, thymic stromal lymphopoietin

아토피피부염에서 각질형성세포의 thymic stromal lymphopoietin 발현

<지도교수 이 광 훈 교수>

연세대학교 대학원 의과학과

오 문 호

I. 서 론

아토피피부염은 유소아에서 발생하여 흔히 성인까지 지속되는 만성 염증성 질환이다.^{1,2} 아토피피부염의 발병률은 최근들어 사회의 공업화, 산업화에 따른 환경 오염, 생활습관의 변화, 유전적 영향 등에 의해 점차 증가되는 추세를 보이고 있다.^{3,4} 아토피피부염의 병인으로는 유전적 배경과 면역학적 기전, 환경적 요인 등의 다양한 인자가 복합되어 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷ 유전적 소인, type 1 of helper T cell (Th1)/type 2 of helper T cell (Th2) 세포간의 불균형, 랑게르한스 세포 자극 증가, interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 사이토카인 체계 이상, 프로스타글란딘 대사 장애, 각질형성세포의 내인적 이상, 호산구의 세포고사지연, 표피 지방 대사의 장애, 초항원의 역할 등이 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있지만 주된 발병 기전이 무엇인지는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다.⁸⁻¹²

급성기의 아토피피부염 환자의 말초혈액과 피부 병변에서는 대부분 IgE의 발현이 증가되어 있고 IL-4, IL-13 등의 사이토카인

과 그 수용체의 발현 및 상기 사이토카인을 생산해내는 T세포가 증가되어 있다.¹²⁻¹⁴ 반면 interferon (IFN)- γ 를 생산하는 T세포는 감소되어 있다.^{15,16} 아토피피부염 환자에서 Th2 사이토카인의 분비는 IgE 과민반응을 유도하는 직접적인 원인으로, 알레르겐이 들어온 후 수지상 세포의 알레르겐 인식 및 전달, 사이토카인의 분비와 IgE의 과발현 등 여러 가지 경로를 통하여 아토피피부염을 일으키게 된다.

급성기의 아토피피부염에서 Th2 면역반응이 우세하게 나타나는 데에는 여러 가지 요인이 관여한다.^{1,17} IL-4 수용체 유전자와 signal transducer and activator of transcription factor (STAT)-6 유전자의 다형성 등 유전적인 원인과^{1,15} 함께 항원 노출시 발생하는 사이토카인이나 항원전달 세포의 종류 등이 Th2 세포로 전환시키는 인자로 보고 되고 있다.¹ 활성화된 T 세포에서 CD2 수용체의 낮은 발현과 CD2 의존성 IL-12 자극에 대한 낮은 반응성 때문에 Th1의 면역 반응이 유도되지 못해서 Th1과 Th2의 균형이 깨지게 된다는 보고도 있다.¹⁹⁻²² 근래의 보고에 의하면 아토피피부염에서 각질형성세포에서 분비되는 thymic stromal lymphopoietin (TSLP)가 Th2 면역반응으로의 유도에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져있다.²³

TSLP는 IL-7과 유사한 구조를 갖고 있는 사이토카인으로서²⁴ murine thymic stromal cell line에서 처음 발견되었다.²⁵⁻²⁸ 사람의 TSLP는 피부의 각질형성세포, 상피세포, 평활근세포 및 폐의 섬유모세포 등에서 발현되고 B세포, T세포, 수지상 세포, 자연살세포, 과립구세포, 대식세포 등에서는 발현이 되지않는 것으로 보고되어 있다. 마우스에서 TSLP는 초기 B세포와 T세포의 분화를 촉진

시키지만 수지상 세포에 대해서는 작용이 미약한 것으로 보고되었다.²³ 이에 비하여 사람의 TSLP는 CD11c⁺ 수지상 세포를 활성화시키며 활성화된 수지상 세포는 T 세포로부터 IL-5, IL-13, tumor necrosis factor (TNF)- α 등의 2형 사이토카인의 분비를 촉진시키며,²⁹ IL-10과 IFN- γ 와 같은 1형 사이토카인의 분비를 억제하는 작용을 통해 알레르기성 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져있다.

아토피피부염의 각질형성세포에서 TSLP가 과발현되는 소견을 보이는 것에 비해 건선, 접촉피부염 등의 피부질환에서는 각질형성세포의 TSLP가 정상 대조군에 비하여 큰 변화를 보이지 않아 TSLP가 아토피피부염에 특이함이 제시되었으나²⁹ TSLP가 어떤 기전에 의하여 발현되는지에 대해서는 자세히 규명된 바가 없다.

각질형성세포는 각종 피부질환에서 여러 가지 자극에 의해 IL-4, TNF- α , IFN- γ 등 다양한 사이토카인을 생성 분비하며 transforming growth factor (TGF)- β , keratinocyte growth factor (KGF) 등에 대한 다양한 사이토카인 수용체를 갖고 있다.⁴¹ IL-4는 주로 Th2 세포에서 생성되어 아토피 질환에 관여한다고 알려져 있으며³⁰ B 세포의 IgE 생성과 비만세포의 활성화에 중요한 역할을 한다. TNF- α 는 여러 사이토카인의 생성, 세포의 성장, 분화 그리고 자연고사 및 괴사 등의 다양한 기능에 관여하는 염증성 사이토카인으로 알려져 있다.^{31,32} TGF- β 는 많은 정상 세포와 조직에서 분비되는 분자량 25 kDa의 이중체 단백질로써 생체내에서 면역반응, 세포의 증식과 분화조절, 상처 치유, 세포 기질의 합성, 그리고 세포유착에 관여하는 다기능성 사이토카인으로 알려져 있다.³³⁻³⁵ KGF는 각질형성세포의 분화조절에 관여하는 사이토카인으로서 마우스의 thymic

stromal cell line에서 TSLP의 발현을 증가시켰다는 보고가 있다.³⁶

본 연구에서는 정상인과 아토피피부염 환자의 각질형성세포에서 TSLP의 발현에 차이가 있는지, 또 아토피피부염과 관련된 사이토카인들이 각질형성세포의 TSLP 발현을 조절할 수 있는지 알아보기 위해 첫째, 정상인의 피부조직 및 아토피피부염 환자의 병변 피부조직과 동일피부조직에서 일차 배양한 각질형성세포에서 면역조직화학염색법과 공초점 레이저 형광현미경 검사를 통해 TSLP 발현의 차이를 관찰하고, 둘째, 면역형광 유세포분석법 (flow cytometry), 면역블롯, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 계대배양한 정상 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치후 TSLP의 발현변화를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

연세대학교 의과대학 세브란스병원 피부과 및 알레르기 특수 클리닉에 내원하여 Hanifin 및 Rajka⁴¹의 기준에 의해 아토피 피부염으로 진단된 환자를 대상으로 하였다.

2. 조직생검

아토피피부염 환자에서 피부조직 생검을 시행한 후 조직을 채취하여 O.C.T에 넣고 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에서 동결보관하였다. 채취한 조직의 일부분은 70% 알콜에 적신 다음 PBS에 세척하여 조직에서 각질형성세포를 일차 분리하였다.

3. 면역조직화학염색

정상인의 피부조직, 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직 및 병변 피부조직에서 TSLP 발현을 관찰하기 위해서 sheep polyclonal anti-human TSLP 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 하였다. O.C.T에 잠긴 조직을 $8\mu\text{m}$ 크기로 동결절편하여 saline coating 슬라이드에 부착시킨 다음 아세톤에서 30분간 고정하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 비특이적 결합을 억제하기 위해 5% normal goat serum으로 20분 동안 처리한 다음 5% bovine serum을 첨가한 PBS에 1:200으로 희석한 sheep polyclonal anti-human TSLP (R&D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA) 항체에 실온에서 2시간 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3회 세척한 다음 peroxidase-conjugated rabbit

anti-sheep IgG antibody (R&D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA)에 30분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하여 ACE (3-amino-9-ethylcarbazole) 용액으로 발색시킨 다음 count 염색을 시행 하고 80% glycerol을 떨어뜨린 후 밀봉하였다.

4. 생검조직에서 각질형성세포 1차배양

아토피피부염 환자에서 피부조직 생검을 시행한 후 조직을 채취하여 70% 알콜에 적신다음 PBS에 세척하고 수술용가위를 이용하여 진피층을 제거한 뒤 피부절편을 만들어 100mm 배양판에 넣고 5 ml의 0.5% trypsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액을 가하여 37°C에서 1시간 방치한 후 표피층을 분리하여 여기에 0.5 ml의 fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA)을 첨가하여 trypsin을 중화시켰다. 이를 1~2분간 진탕하고 실온에서 약 3분간 방치하여 조직절편을 침전시킨 후 각질형성세포와 멜라닌세포가 각각 포함된 상층의 부유액만을 취하여 bovine pituitary extract (BPE), human endothelial growth factor (EGF), insulin, 5% fetal bovine serum (FBS), hydrocortisone이 함유된 human keratinocyte medium-2 (Cambrex, Walkersville, MA, USA)를 사용하여 37°C, CO₂ 항온기에서 계대배양하였다.

5. 공초점 레이저 현미경 검사

생검조직에서 분리 배양한 각질형성세포 TSLP 발현을 관찰하기 위하여 직접면역형광 염색을 시행한 후 공초점 레이저 현미경 (Leica TCSNT, Heidelberg, Germany)으로 관찰하였다.

Lab-Tek chamber (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA)에 정상인의 피부조직, 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직 및 병변 피부조직에서 분리한 각질형성세포를 2×10^4 씩 배양한 다음 methanol로 10 분간 고정시킨 후 항체를 1:200으로 희석하여 첨가한 후 30 분간 실온에 방치하였다. PBS로 3회 세척 후 FITC가 부착된 이차 항체를 첨가한 후 다시 실온에서 30 분간 반응시킨 다음 세척하였다. 밀봉한 다음 TSLP의 발현을 공초점 레이저 현미경을 이용하여 관찰하였다.

6. 정상 각질형성세포 계대배양

정상인의 각질형성세포 (Cambrex, Walkersville, MA, USA)를 구입하여 사용하였다. 각질형성세포를 준비하여 0.1% 젤라틴을 처리한 조직 배양용기에서 KGM-2 (Cambrex, Walkersville, MA, USA)를 사용하여 37°C, CO₂ 항온기에서 계대배양하였다.

7. 각질형성세포에 사이토카인 처리

Passage 3 까지 계대배양한 각질형성세포를 6 well 배양판에 분주를 한 후 각각 800 U/ml의 IL-4, 25 ng/ml의 KGF, 10 ng/ml의 TGF- β , 20 ng/ml의 TNF- α 를 첨가하여 16시간 배양하였다.

8. 면역형광 유세포분석법

사이토카인을 처리하지 않은 각질형성세포와 사이토카인을 처리한 각질형성세포를 5 mM EDTA와 1% BSA가 함유된 HBSS를 넣고 조직 배양판으로부터 세포를 수집하여 HBSS로 3회 세척 후 항체염색을

위해 각 시험관에 분주하였다. BSA-PBS로 적절히 희석한 후 일차 항체로 항 TSLP polyclonal antibody (R&D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA)를, 이차 항체로 FITC-conjugated rabbit anti-sheep IgG (R&D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 염색후 FACS를 시행하였다. 세포질 염색은 조직 배양판으로부터 세포를 수집한 후 PERM solution (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 500 μ l씩 첨가하여 상온의 암실에서 10분간 처리하였다. 여러 가지 사이토카인 처리군을 시험관에 분주하고 0.5%의 BSA가 함유된 PBS로 적절히 희석한 일차항체를 각 시험관에 10 μ l씩 넣은 후 얼음 속에서 30분간 반응시키고, BSA-PBS로 3회 세척 후, BSA-PBS를 이용하여 1:20으로 희석한 이차항체를 넣고 30분간 반응시켰다. BSA-PBS로 다시 3회 세척한 후 fluorescence activating cell sorter (FACStar, Becton-Dickinson, Lincoln, NJ, USA)를 이용하여 TSLP 분자의 발현 양상을 측정하였다.

9. Western blot 분석

사이토카인으로 처리된 각질형성세포에서 TSLP 단백질의 발현변화를 관찰하기 위하여 면역 블롯을 시행하였다. 사이토카인을 처리하지 않은 각질형성세포와 각 사이토카인을 처리한 각질형성세포를 각각 microcentrifuge tube에 옮기고 lysis buffer 로 pro-prep (Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)을 20분간 처리한 후 10,000 x g, 4°C에서 10분 간 원심분리한 후, 상층액을 분리하여 같은 조건에서 다시 원심분리한 후 상층액을 전체 세포 용해물의 시료로 사용하였다. SDS-PAGE gel을 전기영동기에 장착한 후, running 완충액을 부은 후 시료를 집적시킨 다음, 전압을 100-120V로 일정하게 맞추고

bromophenol blue 지시약이 바닥에 올 때까지 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 gel에서 running gel 부분만 분리한 후 transfer 완충액을 담은 통에 nitrocellulose (NC) membrane과 thick paper를 적시고 running gel을 15분 이상 반응시킨 후, 125 mA의 조건 하에서 1시간 전이를 시행하였다. Membrane을 Ponceau-S 용액에 2분 정도 담가 염색하고 증류수로 씻어 transfer된 단백대를 확인하였다. Blocking 완충액(5% blotting grade blocker non-fat dry milk solution, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 membrane을 담그고 흔들면서 60분간 blocking을 실시하였다. Blocking 완충액에 human TSLP에 대한 일차항체(R&D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA)를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하여 가하고 60분 정도 반응시켰다. TBS-T 완충액으로 5분씩 3회 정도 반복해서 씻은 후 blocking 완충액에 1:2000으로 희석한 FITC-conjugated rabbit anti-sheep IgG (R&D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA)를 이차 항체로 하여 첨가한 후 60분간 반응시켰다. TBS-T 완충액으로 5분씩 3회 반복해서 씻은 후 3,3',5,5'-tetra methylbenzidine (Sigma, St. louis, MO, USA) 으로 발색반응을 일으켰다.

10. RT-PCR

1) 총 RNA 분리: 사이토카인을 16시간 처리한 각질형성세포 와 정상 대조군을 RNeasy mini kit (Qiagen Co., Hilden, Germany)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA의 농도는 260 nm의 파장에서 UV-1601PC 분광광도계 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 를 이용하여 측정하였다.

2) First strand cDNA 합성: 분리한 총 RNA 2 μg 으로부터 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV) (Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN, USA) 과 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. First strand cDNA의 생성 여부를 알기 위해 생성된 반응산물 10 μl , Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 0.5U와 human beta actin primers (sense primer: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', antisense primer: 5'-CTCCTTAATGTACACGCACGATTTTC-3')를 각각 20 μmole 씩 혼합하여 PCR을 시행하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600을 이용하여 95°C에서 5분 반응시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 23회 시행하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 산물 10 μl 를 2% agarose gel에서 전기영동한 후 238 bp의 밴드의 유무를 확인하였다.

3) TSLP primer를 이용한 PCR: TSLP primer를 이용하여, 94°C에서 5분, 60°C에서 45초를 35회 시행하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 산물 15 μl 를 2% agarose gel에서 전기영동한 후 밴드 유무를 관찰하였다.

III. 결 과

1. 정상인 피부조직과 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직, 병변 피부조직에서의 TSLP 발현

1) 면역조직화학염색을 이용한 TSLP 발현 비교

TSLP 항체를 이용하여 면역조직화학염색법으로 관찰한 결과 정상인 피부조직 및 아토피피부염 환자의 비병변 및 병변 피부조직 표피의 각질형성세포에서 모두 양성 반응을 보여 TSLP는 정상적인 각질형성세포에서도 발현됨을 알수 있었다. 그러나 아토피피부염 환자의 병변 피부조직의 각질형성세포에서 정상 피부조직과 비병변 피부조직의 각질형성세포에 비해 강한 양성 반응을 보였다(그림 1).

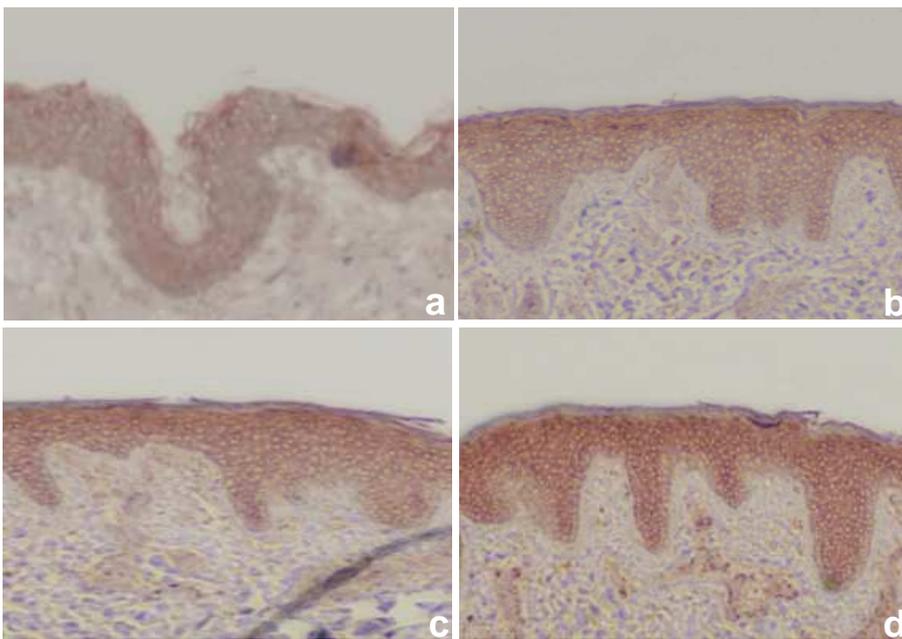


그림 1. 정상인과 아토피피부염 환자의 비병변 및 병변 피부조직에서의 TSLP 발현. 음성 대조군(a)에 비해 모든 피부조직의 각질형성세포에서 TSLP의 발현을 관찰할 수 있으며, 정상 피부조직(b) 및 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직(c)보다 아토피피부염 환자의 병변 피부조직의 각질형성세포(d)에서 강한 양성 반응을 관찰할 수 있다.

2) 정상인과 아토피피부염 환자의 병변 피부조직으로부터 분리 배양한 각질형성세포의 TSLP 발현 비교

정상인 및 아토피피부염 환자의 생검조직에서 각질형성세포를 분리하여 계대배양한 후 TSLP의 발현을 관찰한 결과 모든 군에서 일차 항체를 처리하지 않은 음성 대조군보다 TSLP의 발현이 관찰되었다. 아토피피부염 환자의 병변부에서 분리 배양한 각질형성세포에서 정상인과 아토피피부염 환자의 비병변부위에서 분리 배양한 각질형성세포에 비해 TSLP가 뚜렷이 강하게 발현됨을 관찰하였다(그림 2).

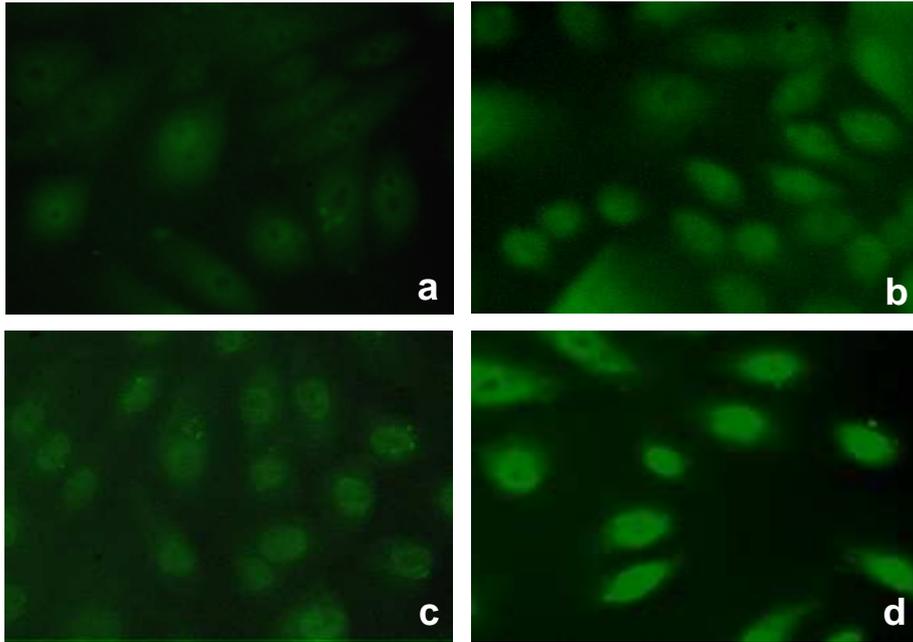


그림 2. 정상인 피부와 아토피피부염 환자의 비병변 및 병변 피부조직에서 분리 배양한 각질형성세포에서 공초점 레이저 형광 현미경을 이용한 TSLP의 발현. 아토피피부염 환자의 병변 피부조직에서 분리배양한 각질형성세포에서 정상 및 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직에서 분리배양한 각질형성세포에 비해 TSLP의 발현이 더 강하게 발현된 것을 관찰할수 있다.(a:일차 항체를 처리하지 않은 음성 대조군)

2. 사이토카인을 처리한 정상 각질형성세포에서 TSLP발현

1) 면역형광 유세포분석법 소견

IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF를 처리한 각질형성세포를 FACS를 시행하여 TSLP의 발현 변화를 관찰한 결과 사이토카인을 처리하

지 않거나, 처치한 각질형성세포 모두에서 TSLP의 발현이 관찰되었다. 그러나, 사이토카인을 처치하지 않은 각질형성세포에 비해 사이토카인을 처치한 각질형성세포에서 유의한 TSLP의 발현 차이를 관찰할 수 없었다(그림 3).

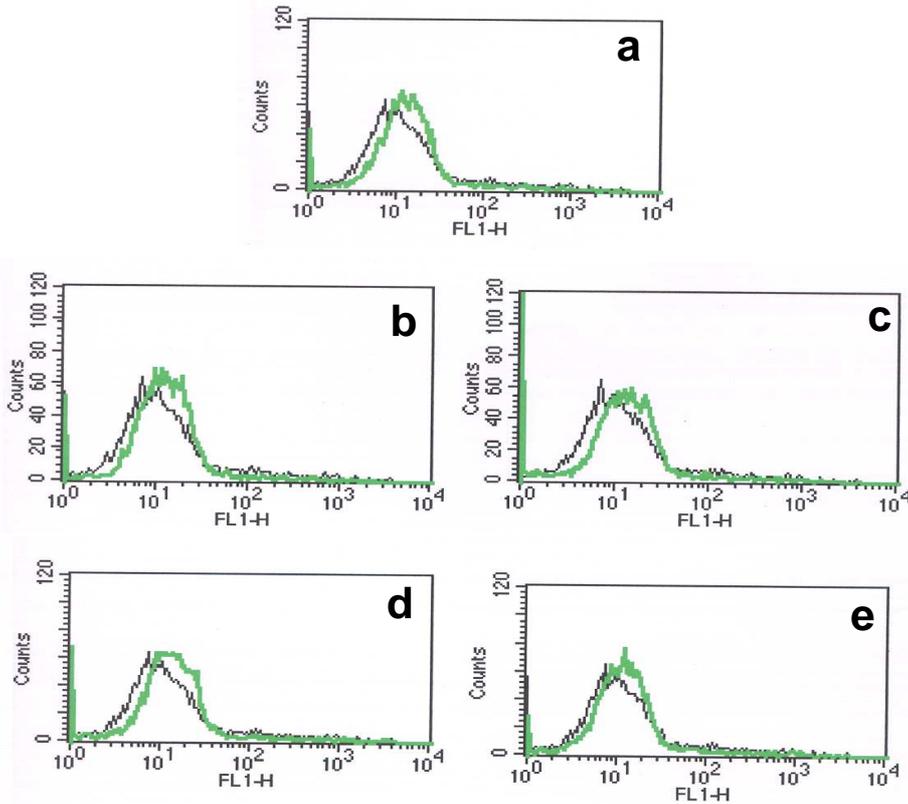


그림 3. 배양한 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치 후 TSLP 발현의 FACS 소견. IL-4(b), TNF- α (c), TGF- β (d), KGF(e)를 처치한 각질형성세포에서 TSLP의 발현이 관찰되었으나 사이토카인을 처치하지 않은 각질형성세포와 비교 하였을때 (a) 차이

가 없었다.

2) 면역블롯 소견

사이토카인을 처리하지 않은 각질형성세포 및 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF을 16시간 처리한 각질형성세포에서 단백질을 추출한 후 면역블롯을 이용하여 TSLP의 발현을 관찰한 결과 각 군간에 TSLP의 발현에 차이가 없었다(그림 4).

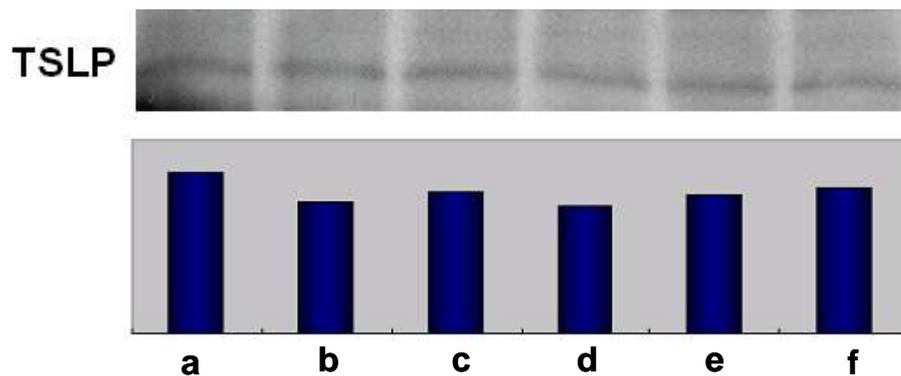


그림 4. 배양한 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처리 후 TSLP 발현의 면역블롯 소견. IL-4(c), TNF- α (d), TGF- β (e), KGF(f)를 처리한 각질형성세포에서 단백질을 추출하여 TSLP의 발현을 관찰한 결과 사이토카인을 처리하지 않은 각질형성세포(b)와 차이를 보이지 않았다.(a: 양성 대조군 recombinant human TSLP, R&D biotechnology, Minneapolis, MN, USA)

3) TSLP mRNA의 RT-PCR 소견

사이토카인을 처리하지 않은 각질형성세포 및 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF을 16시간 처리한 각질형성세포에서 RT-PCR을 시행

한 결과 사이토카인을 처리하지 않은 군과 처리한 군과의 차이는 없었다(그림 5).

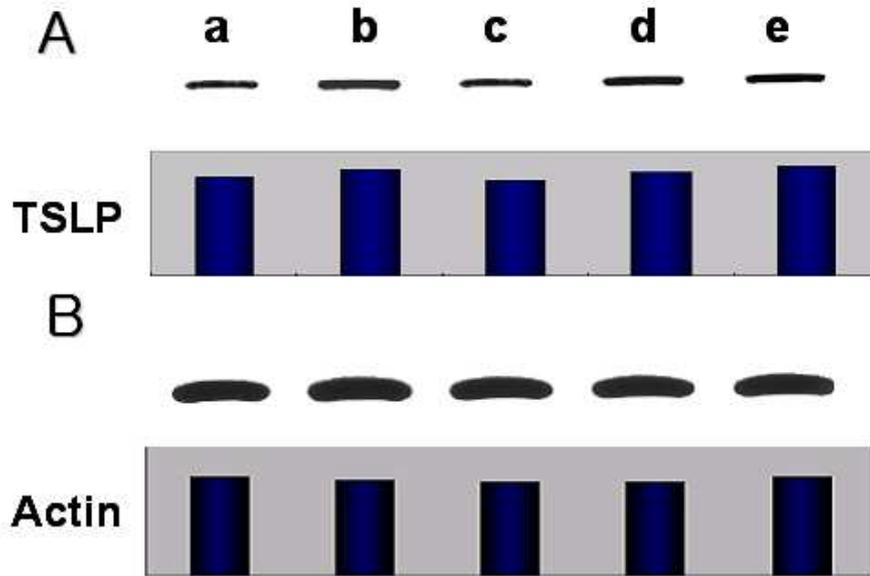


그림 5. 배양한 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처리 후 TSLP mRNA 발현의 RT-PCR 소견. RT-PCR을 통해 TSLP mRNA의 발현을 비교한 결과, 사이토카인을 처리한 각질형성세포와 사이토카인을 처리하지 않은 각질형성세포군 간에 TSLP mRNA 발현에 차이가 관찰되지 않았다. A:TSLP, B: beta actin (a: 음성대조군, b: IL-4, c: TNF- α , d: TGF- β , e: KGF)

IV. 고찰

아토피피부염은 심한 소양증과 특징적인 피부 소견을 보이는 만성, 재발성 염증성 질환으로 유소아기의 약 9-12%에서 발생한다. 최근 들어 사회의 공업화, 산업화에 따른 환경 오염, 생활 습관의 변화, 유전적 영향 등에 의해 점차 증가하는 추세에 있다.^{3,4}

최근 TSLP에 대한 연구가 많이 진행되면서 마우스에서는 TSLP가 B세포 성숙 과정에 주로 관여하지만 인간에서는 TSLP가 수지상 세포와 연관되어 작용하는 것으로 알려져 있다.³⁸⁻⁴⁰ TSLP는 Th1 세포와 Th2 세포의 균형을 조절하는데 중요한 역할을 하는 사이토카인으로서 TSLP의 수지상 세포의 활성화에 대하여 최근 많은 기전들이 밝혀지고 있다.²⁹ TSLP에 의하여 활성화된 수지상 세포는 다른 인자에 의해 활성화된 경우와는 달리 naive CD4⁺ T 세포의 증식을 촉진하지만 전염증성 사이토카인을 생성하지는 않고 Th2 세포의 분화를 유발하는 케모카인인 thymus and activation-regulated chemokine (TARC)과 macrophage derived chemokine (MDC)을 발현한다.²⁹ 이런 사실들은 TSLP가 알레르기성 질환에서 중요한 조절인자로 작용한다는 것을 제시한다. 종전의 연구에서 알레르기성 염증질환 특히 아토피피부염 환자의 병변 피부조직의 각질형성세포에서는 비병변 피부조직에서보다 TSLP의 발현이 많이 발현되고 기타 피부질환의 병변 피부조직의 각질형성세포에서는 발현이 정상 대조군과 차이가 나지 않음을 보고하면서 TSLP가 아토피피부염의 기전과 밀접한 관계가 있음을 시사하였다.²⁹

사람 TSLP는 피부의 각질형성세포, 상피세포, 평활근세포 및

폐의 섬유모세포 등에서는 많이 발현되는 반면 B세포, T세포, 수지상세포, 자연살세포, 과립구세포, 대식세포 등에서는 발현이 되지 않는 것으로 보고되어 있다. 정상인 조직과 아토피피부염 환자의 비병변 조직에서는 면역조직화학염색소견에서 시행하였을 때 TSLP의 발현이 관찰되지 않은 반면 아토피피부염 환자의 각질형성세포에서는 TSLP의 발현이 관찰되었다.²⁹

정상인의 비병변 피부조직 및 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직 각질형성세포에서 TSLP가 전혀 발현되지 않고 아토피피부염 환자의 병변 피부조직 각질형성세포에서만 발현되었던 종전의 보고에 비해 본 연구에서는 비병변 피부조직 각질형성세포에서도 TSLP 발현이 관찰되었다. 아토피피부염 환자의 병변 피부조직 각질형성세포에서는 비병변 피부조직 각질형성세포보다 강한 양성반응을 보여 주었다. 이는 TSLP가 정상인 각질형성세포에도 정상적으로 발현되고 아토피피부염환자의 병변 피부조직에서는 조절인자의 영향하에 국소적인 증가를 보여줄 것으로 사료되며 수지상세포의 활성화도 TSLP의 양적인 변화에 따라 영향을 받으리라 사료된다.

본 연구에서는 각 사이토카인과 TSLP의 관계가 알려져 있지 않으므로 2형 사이토카인인 IL-4, TNF- α 및 상처 조직의 회복에 관여하는 사이토카인인 TGF- β , KGF를 선택하여 정상 각질형성세포에서 TSLP 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 마우스 thymus epithelial cell line을 이용하여 TSLP의 발현을 관찰한 연구에서 KGF를 처치하지 않은 세포에 비해 KGF를 처치한 세포에서 TSLP 발현을 관찰하고 TSLP 발현이 KGF에 의해 조절됨을 보고 하였다.³⁶ 그러나 아직까지 사람의 조직에서 TSLP발현조절에 관한 연구는 보고된 바가 없었다. 본 연구결과 mouse thymic epithelial cell line 에서

와는 달리 KGF가 사람 각질형성세포 TSLP 발현에 영향을 주지 못하였으며 2형 사이토카인들인 IL-4, TNF- α 및 TGF- β 도 각질형성세포 TSLP 발현에 영향이 없음을 관찰 하였다.

본 연구의 결과 정상 조직 및 아토피피부염의 비병변 피부조직보다 병변 피부조직에서 TSLP가 많이 발현되었다. 정상 각질형성세포에서의 TSLP는 western blot, RT-PCR을 시행한 결과 사이토카인을 처리한 군과 사이토카인을 처리하지 않은 군간에 차이가 없었다. 이는 정상 각질형성세포와 아토피피부염 환자의 각질형성세포에서 TSLP 발현을 조절하는 기전이 다를 가능성이 있으며 아토피피부염에 특이한 국소인자가 TSLP 발현을 조절할 가능성을 보여준다. 또한 본 연구에서 사용하지 않은 다른 인자에 의해 각질형성세포의 TSLP 발현의 조절이 일어날 가능성도 있다.

향후 연구에서 아토피피부염 환자의 활성화된 병변부위에서 각질형성세포를 대량 분리하여 여러인자에 의한 TSLP 발현조절 작용을 관찰하여 볼 필요가 있다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 정상인과 아토피피부염 환자의 각질형성세포에서 TSLP의 발현에 차이가 있는지 또 아토피피부염과 관련된 사이토카인들이 각질형성세포의 TSLP 발현을 조절할수 있는지 알아보기 위해 정상인의 피부조직 및 아토피피부염 환자의 병변 피부조직과 동일 피부조직에서 일차 배양한 각질형성세포에서 TSLP 발현의 차이를 관찰하였으며 계대배양한 정상 각질형성세포에 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF 처치 후 TSLP의 발현변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상인 및 아토피피부염 환자의 비병변, 병변 피부조직 표피의 각질형성세포에서 TSLP의 발현이 관찰되었다.
2. 아토피피부염 환자의 병변 피부조직의 각질형성세포에서 정상인의 피부조직과 아토피피부염 환자의 비병변 피부조직의 각질형성세포에 비해 강한 TSLP 발현을 보였다.
3. 배양한 정상 각질형성세포에서도 Flow cytometry, Western blot, RT-PCR 검사상 TSLP의 발현이 관찰되었다.
4. 사이토카인을 처치하지 않은 각질형성세포에 비해 IL-4, TNF- α , TGF- β , KGF를 처치한 각질형성세포에서 TSLP의 발현에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

본 연구를 통해 각질형성세포에서 TSLP의 발현이 아토피피부염의 병변 활성화와 상관성이 있음을 알수 있었다.

참고문헌

1. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:S99-108.
2. Hanifin JM. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:211-226.
3. Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M, Peckham C. Changes in the reported prevalence of childhood eczema since 1938-45 war. *Lancet* 1984;2:1255-1258.
4. Wollenberg A, Kraft S, Opiel T, Bieber T. Atopic dermatitis; pathogenetic mechanisms. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:530-534.
5. Wollenberg A, Bieber T. Atopic dermatitis: from genes to skin lesions. *Allergy* 2000;55:205-213.
6. Novak N, Bieber T. The skin as a target for allergic diseases. *Allergy* 2000;55:103-107.
7. Hanifin JM. Critical evaluation of food and mite allergy in the management of atopic dermatitis. *J Dermatol* 1997;24:495-503.
8. Kevin DC. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol* 1994;102:128-137.
9. Coleman R, Trembath RC, Harper JI. Genetic studies of atopy and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1997;136:1-5.
10. Schaefer L, Kragballe K. Abnormalities in epidermal lipid

- metabolism in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1991;96:10–15.
11. Abeck D, Mempel M. *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br J Dermatol* 1998;139:13–16.
 12. Leung DYM, Sorter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:s1–12.
 13. Appenzeller U, Meyer C, Menz G, Blaser K, Cramer R. IgE-mediated reactions to autoantigens in allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:193–196.
 14. Valenta R, Seiberler S, Natter S, Mahler V, Mossabeb R, Ring J, et al. Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:432–437.
 15. Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:323–331.
 16. Van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, et al. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:184–193.
 17. Morren Ma, Przybilla B, Bamelis M, Heykants B, Reynaers A, Degreef H. Atopic dermatitis:triggering

- factors. *J Am Acad Dermatol* 1994;31:467–473.
18. Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, Konayashi Y, Mochkzuki H, Kato M, et al. Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1509–1514.
 19. Gollob JA, Li J, Reinherz EL, Ritz J. CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin 12. *J Exp Med* 1995;182:721–731.
 20. Janeford CK, Jenmalm MC. PHA-induced IL-12R β_2 mRNA expression in atopic and non-atopic children. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1493–1500.
 21. Leung DYM. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:860–876.
 22. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998;19:356–361.
 23. Soumelis V, Liu YJ. Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. *Springer Semin Immunopathol* 2004 ;25:325–333.
 24. Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K,

- Foxworthe D, Price V, et al. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med* 2000;192:671–680.
25. Tonozuka Y, Fujio K, Sugiyama T, Nosaka T, Hirai M, Kitamura T. Molecular cloning of a human novel type I cytokine receptor related to α /TSLPR. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:23–25.
26. Pandey A, Ozaki K, Baumann H, Levin SD, Puel A, Farr AG. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol* 2000;1:59–64.
27. Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med* 2000;192:659–670.
28. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu YJ, Travis M, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 2001;167:336–343.
29. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Liu YJ, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673–680.
30. Maeda S, Yanagihara Y. Inflammatory cytokines (IL-4,

- IL-5 and IL-13) *Nippon Rinsho* 2001;59:1894-1899.
31. Meyer O. Role of TNF- α and cytokines in the physiopathology of rheumatoid arthritis. Therapeutic perspectives. *Bull Acad Natl Med* 2003;187:935-954.
32. Baugh JA, Bucala R. Mechanisms for modulating TNF α in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001;4:635-650.
33. Wimmer I, Grehn F. Control of wound healing after glaucoma surgery. Effect and inhibition of the growth factor TGF- β . *Ophthalmologe* 2002;99:678-682.
34. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002;82:85-91.
35. Schmidt-Weber CB, Kunzmann S, Blaser K. TGF- β -mediated control of allergen-specific T-cell responses. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002 ;2:259-262.
36. Erickson M, Morkowski S, Lehar S, Gillard G, Beers C, Dooley J, et al. Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* 2002;100:3269-3278.
37. Girolimoni G, Sebastiani S, Albaeisi C, Cavani A. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol* 2001;13:733-737.
38. Carpino N, Thierfelder WE, Chang MS, Saris C, Turner SJ, Ziegler SF, et al. Absence of an essential role for thymic stromal lymphopoietin receptor in murine B-cell

- development. *Mol Cell Biol* 2004;24:2584–2592.
39. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 2004;5:426–434.
40. Vosshenrich CA, Cumano A, Muller W, Di Santo JP, Vieira P. Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. *Nat Immunol* 2003;4:773–779.
41. Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, et al. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J Dermatol* 2003;31:111–117.
42. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol (Stockh)* 1980;92:s44–47.

Abstract

Expression of TSLP in keratinocytes of atopic dermatitis patients and normal controls

Wu Wen Hao

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

(Directed by Professor Kwang Hoon Lee)

Human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is a novel IL-7-like cytokine produced by human epithelial, stromal, and mast cells. TSLP-activated human dendritic cells produce Th2-attracting chemokines such as TARC and MDC but not IL-12. TSLP-activated human dendritic cells induce the generation of CD4+ Th cells with a pro-allergic phenotype and also induce the differentiation of CD8+T cells into IL-5 and IL-13 producing cytolytic effector cells. It has been reported that TSLP is highly expressed in the lesional keratinocytes of atopic dermatitis but not in the non-lesional keratinocytes of atopic dermatitis or other types of disease with skin inflammation. Our study to verified the differential expression of TSLP in keratinocytes among lesional and, non-lesional sites of atopic dermatitis compared to a normal control group. We also observed the expression of TSLP in keratinocytes treated with various cytokines. Our study showed that TSLP is expressed in the keratinocytes of all subjects: the normal

control group, and the lesional and non-lesional sites of atopic dermatitis patients. However, TSLP was expressed more highly in the lesional keratinocytes of atopic dermatitis than in the non-lesional and normal keratinocytes using a confocal laser microscopy and immunohistochemistry methods. TSLP expressions did not differ among cultured keratinocytes treated with IL-4, TNF- α , TGF- β and KGF. The regulating factor of TSLP in atopic dermatitis remains to be found by using primary cultured human keratinocytes.

Key Words : atopic dermatitis, keratinocyte, thymic stromal lymphopoietin