

HaCaT 세포에서 화학물질에 의해
생성된 활성산소종의 역할

연세대학교 대학원

의 학 과

김 동 현

HaCaT 세포에서 화학물질에 의해
생성된 활성산소종의 역할

지도교수 이 민 결

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

김 동 현

김동현 의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008 년 12 월

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 모든 방면에 끊임없는
격려와 세심한 배려로 지도해 주시고 학문의 길로
첫걸음을 인도해주신 은사 이민걸 교수님께 마음 깊이
감사를 드립니다. 또한 많은 관심과 따뜻한 조언으로
격려해주신 홍천수 교수님과 최인홍 교수님께
진심으로 감사를 드립니다. 바쁜 일정 속에서도 연구
진행에 많은 도움을 준 제정환 선생님, Dashlkhumbe
byamba 선생님께도 깊은 감사를 드립니다.

사랑과 관심으로 곁에서 지켜봐 주시고 물심양면 늘
세심하게 배려해 주신 부모님과 사랑하는 아내와 아들
성준이와 민준이에게 감사를 드립니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 세포주 및 세포배양	8
2. 시약	8
가. 화학물질	8
나. 항산화제	9
3. HaCaT 세포에 화학물질 처리 후 활성산소종의 생성 관찰	9
4. HaCaT 세포에 화학물질 처리 후 표면 항원 발현 관찰	11
5. HaCaT 세포에 화학물질 처리 후 사이토카인 생성 측정	11
6. 항산화제 전처리 후 화학물질에 의한 HaCaT 세포의 활성산소종 생성, 표면 항원 발현, 사이토카인 생성의 변화 관찰	12
III. 결과	13
1. HaCaT 세포에서 다양한 화학물질에 의한 활성산소종 생성 ·	13
2. HaCaT 세포에서 DNCB와 BKC에 의한 농도별 활성산소종	

생성	14
3. 항산화제 전처리 후 DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 활성산소종 생성 변화	16
4. DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 표면 항원 발현과 항산화제를 전처리하였을 때의 표면 항원 발현의 변화	18
5. DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 사이토카인 생성과 항산화제를 전처리하였을 때의 사이토카인 생성의 변화	21
IV. 고찰	23
V. 결론	28
참고문헌	30
영문요약	35

그림 차례

그림 1. ATP synthase inhibitor as the positive control for the detection of ROS	10
그림 2. The generation of ROS in HaCaT cells with chemicals	13
그림 3A. The generation of ROS in HaCaT cells treated with DNCB	15
그림 3B. The generation of ROS in HaCaT cells treated with BKC	16
그림 4A. The effect of antioxidants on the ROS production in HaCaT cells treated with DNCB	17
그림 4B. The effect of antioxidants on the ROS production in HaCaT cells treated with BKC	18
그림 5A. ICAM-1 expression of HaCaT cells treated with DNCB and BKC	19
그림 5B. E-cadherin expression of HaCaT cells treated with DNCB and BKC	20
그림 5C. HLA-DR expression of HaCaT cells treated with DNCB and BKC	21

그림 6. IL-1 α secretion of HaCaT cells treated with
DNCB and BKC 22

표 차례

표 1. The concentration of chemicals for the ROS
generation 9

표 2. The concentration of antioxidants for the ROS
generation 12

<국문요약>

HaCaT 세포에서 화학물질에 의해 생성된 활성산소종의 역할

자외선이나 화학물질 등의 외부자극에 항상 노출되어 있는 피부에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스가 중요하다. 활성산소종이 과도하게 발생하여 항산화 시스템에 의해서 제거되지 못하면 광노화 (photoaging)나 피부 악성종양의 발생할 수 있다. 활성산소종은 면역반응을 유발하는 수지상세포 (dendritic cell)에서 MHC-II 를 포함한 표면 항원의 발현을 증가시키면서 수지상세포의 활성화에 관여한다. 그러나 표피의 95% 이상을 차지하고 전염증성 (proinflammatory) 사이토카인을 분비하여 면역학적 기관으로 인식되고 있는 각질형성세포 (keratinocyte)에서 화학물질에 의한 활성산소종의 생성과 역할에 대한 연구는 아직 부족하다.

각질형성세포에서 화학물질 처리 후 활성산소종의 생성 유무와 역할에 대해 연구하기 위해, 사람 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 다양한 화학물질을 처리한 후 1) 활성산소종의 생성 여부 2) 표면 항원 (IACM-1, E-cadherin, HLA-DR) 발현과 사이토카인 (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) 분비의 변화 3) 다양한 항산화제 (antioxidants)로 처리하였을 때 활성산소종에 의한 각질형성세포의 활성화를

억제하는지에 대해 연구하고 다음의 결과를 얻었다. HaCaT 세포에 다양한 화학물질을 1시간 처리하였을 때 활성산소종이 생성되었다. 알레르겐 중 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), CoCl_2 , thimerosal이 활성산소종을 생성하였고, 자극물질인 sodium dodecyl sulfate (SDS), benzalkonium chloride (BKC)가 활성산소종을 생성하였다. 여러 가지 화학물질 중 낮은 농도에서도 활성산소종을 생성한 알레르겐인 DNCB와 자극물질인 BKC를 선택하여 생성된 활성산소종의 역할에 대하여 실험하였다. HaCaT 세포에 DNCB와 BKC를 24시간 처리하였을 때 표면 항원의 발현이 모두 증가하였다. HaCaT 세포에 DNCB와 BKC를 48시간 처리하였을 때 IL-1 α 분비가 증가하였으나 IL-1 β 와 TNF- α 의 분비는 관찰되지 않았다. 항산화제인 glutathione, N-acetyl cysteine, selenium, Vit. E, catalase로 HaCaT 세포에 30분 동안 전처리를 한 후 DNCB와 BKC를 처리했을 때 HaCaT 세포의 활성산소종의 생성, 표면 항원 발현, 사이토카인 분비에 영향을 끼치지 못했다. 결론적으로 화학물질에 의한 HaCaT 세포에서의 활성산소종의 생성과 표면 항원의 발현, 그리고 IL-1 α 분비를 확인하였다. 그러나 여러 가지 항산화제가 화학물질에 의한 HaCaT 세포에서의

활성산소종의 생성을 억제하지 못하였으므로, 화학물질에 의해 HaCaT 세포에서 합성된 활성산소종이 어떤 역할을 하는지 아직 알 수 없다. 향후 화학물질에 의해 합성된 활성산소종을 억제시킬 수 있는 항산화제나 활성산소종의 생성에 관여하는 효소 억제제등을 확인하여 화학물질에 의해 HaCaT 세포 또는 일차 배양한 각질형성세포에서 생성되는 활성산소종의 역할에 대한 추가 연구가 필요하다.

핵심되는 말 : 각질형성세포, 화학물질, 활성산소종, 접촉피부염

HaCaT 세포에서 화학물질에 의해 생성된 활성산소종의 역할

<지도교수 이민걸>

연세대학교 대학원 의학과

김 동 현

I. 서론

접촉피부염은 피부의 가장 대표적인 습진성 질환으로 일정한 농도와 충분한 자극을 주면 누구에게나 비면역적 과정으로 염증 반응이 발생하는 자극접촉피부염(irritant contact dermatitis)과 민감한 사람에게 지연형 과민반응으로 나타나는 알레르기접촉피부염(allergic contact dermatitis)으로 나눌 수 있다.¹ 두 질환은 임상적으로나 조직학적으로 정확히 구별이 어려울 때가 많다. 최근에 마우스를 이용한 접촉피부염 모델에서 피부에 상주하는 각질형성세포(keratinocyte), 수지상세포(dendritic cell) 및 비만세포(mast cell)와 염증 반응 후 피부로 침윤하는 T세포, 자연세포독성세포(natural killer cell) 등이 서로 밀접하게 상호 작용하여 임상 증상을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다.^{2,3} 최근 많이

연구되는 regulatory T세포가 접촉피부염을 예방하거나 염증 반응을 조기에 종결시키는데 기여함이 알려져 있다.⁴ T세포 매개성 지연성 과민반응 뿐만 아니라 체액성 면역반응 또는 선천성 면역반응이 접촉피부염의 발생에 관여한다는 보고도 있다.⁵

피부는 산화적 스트레스를 줄이는 비효소 또는 효소 물질들에 의해 항상성을 유지하려는 능력이 있으나 자외선 조사 같은 물리적 자극이나 화학물질에 피부가 노출된 후 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 지나치게 많이 만들어질 경우 세포자멸사(apoptosis) 경로를 억제하고 증식성 또는 세포 생존 신호를 활성화하여 광과민성 질환이나 피부 악성 종양을 포함한 여러 피부질환들을 유발하게 된다.^{6,7}

접촉피부염의 발생 기전에서도 활성산소종이 관여할 것으로 생각되는 여러 가지 보고가 있다. 항원을 전달받은 기억 T세포는 사이토카인을 분비하는 effector 세포로 분화하게 되는데, 분비하는 사이토카인에 따라 interleukin(IL)-12나 IFN- γ 를 분비하는 Th1세포와 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 분비하는 Th2세포, 그리고 IL-17과 IL-21을 분비하는 Th17세포로 나누게 된다.^{8,9} 항원전달세포(antigen presenting cell)에서 Th1/Th2 반응이 glutathione에 의해 조절되는 것이 보고되었고,¹⁰ 니켈(nickel)에

양성반응을 보이는 알레르기접촉피부염 환자에서 피부의 산화적 스트레스 반응을 나타내는 조직 내 철(iron)이 증가하고 산화/환원 glutathione 비율이 증가하는 것이 보고되었다.¹¹ Polyaromatic hydrocarbon이나 paraphenylenediamine은 cytochrome P450-의존성 산화물에 의해 알레르기접촉피부염이 나타나는 것으로 보고되었다.^{12,13} 활성산소종에 의해 수지상세포에서 MHC-II를 포함한 세포표면항원이 증가하는 것이 보고되면서 redox 조절 기전을 조정함으로써 수지상세포에 의한 T세포로의 특이 항원 전달을 차단할 수 있을 것으로 보고되었다.^{14,15} 마우스 수지상세포에 강력한 화학물질인 DNFB를 처리했을 때 단백질 산화를 증가하고 p38 MAPK와 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2의 인산화를 유도하고, 이는 glutathione에 의해 차단되는 것이 보고되었다. 이와 같이 접촉피부염의 발생에 중요한 역할을 하는 수지상세포가 활성화되는데 활성산소종이 관여할 것으로 생각되는 여러 보고들이 있다.¹⁶

각질형성세포는 표피의 95% 이상을 차지하는 가장 중요한 세포로 세포외 기질(extracellular matrix)의 구성, 성장, 분화, 항균 방어(antimicrobial defense), 염증 및 창상치유 등과 같은 피부의 기능에 중요한 역할을 한다. 각질형성세포는 물리적 외상, 화학물질,

미생물과 같은 스트레스 유발인자의 자극 후에 IL-1과 tumor necrosis factor(TNF)- α 같은 전염증성 물질을 분비하고 표면 항원의 발현을 증가시킴으로써 다른 면역세포와의 상호 작용을 통해 피부 면역계(skin-associated lymphoid tissue, SALT)를 형성하게 된다.¹⁷ 접촉피부염에서도 표피의 대부분을 차지하는 각질형성세포의 역할이 중요하리라 생각한다. 최근 수지상세포에서 생성되는 활성산소종이 접촉피부염의 발생기전에 중요하리라는 보고들이 있지만, 아직 화학물질에 의해 각질형성세포에서 활성산소종이 생성되는지, 생성된다면 그 역할이 무엇인지에 대한 연구는 아직 부족하다. 따라서 본 연구에서는 각질형성세포에서 화학물질에 의한 활성산소종 생성 여부와 이에 따른 각질형성세포의 변화를 표면 항원 발현과 사이토카인 분비를 중심으로 살펴보고 항산화제로 전처리했을 때의 효과를 관찰하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

각질형성세포주인 HaCaT 세포를 10% fetal bovine serum과 10 μ l/ml penicillin/streptomycin (Sigma, MO, USA)을 첨가한 RPMI 1640 (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 세포배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

2. 시약

가. 화학물질

알레르겐으로 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), NiSO₄, CoCl₂, thimerosal, hydroquinone을 사용하였고, 이와 비교하기 위한 자극물질로는 sodium dodecyl sulfate (SDS), benzalkonium chloride (BKC)를 사용하였다. 모든 화학물질은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. DNCB와 DNFB는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였고, 나머지 화학물질은 증류수에 녹여 사용하였다.

나. 항산화제

항산화제로 glutathione, N-acetyl cysteine (NAC), selenium, vitamin E (Vit. E), catalase를 사용하였으며, 모두 Sigma에서 구입하였다. 항산화제 중 Vit. E는 에탄올에 녹여 사용하였고, 나머지는 증류수에 녹여 사용하였다.

3. HaCaT 세포에 화학물질 처리 후 활성산소종의 생성 관찰

HaCaT 세포에 다양한 화학물질을 1시간 처리하였을 때 propidium iodide(PI)-음성/Annexin V-음성인 세포가 95% 이상인 각각의 화학물질 농도를 먼저 측정한 후 사용하였다(표 1).

표 1. The concentration of chemicals for the ROS generation

Chemicals	Concentration
DNCB	20 μ M
DNFB	32 μ M
TNBS	400 μ M
CoCl ₂	300 μ M
NiSO ₄	600 μ M
Thimerosal	40 μ M
Hydroquinone	200 μ M
BKC	20 μ M
SDS	400 μ M

여러 가지 화학물질을 HaCaT 세포에 처리한 후 세포막 투과성 염색제인 5-(and 6-)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA, 이하 DCFDA)를 30 μ M 농도로 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 세척 후 FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 PI-음성 세포군에서 발색 신호를 측정하였다. 이전의 연구에서 ATP synthase inhibitor가 수지상세포에서 활성산소종을 생성하였고¹⁸, HaCaT 세포에서도 활성산소종을 생성하는 것을 확인하였다(그림 1).

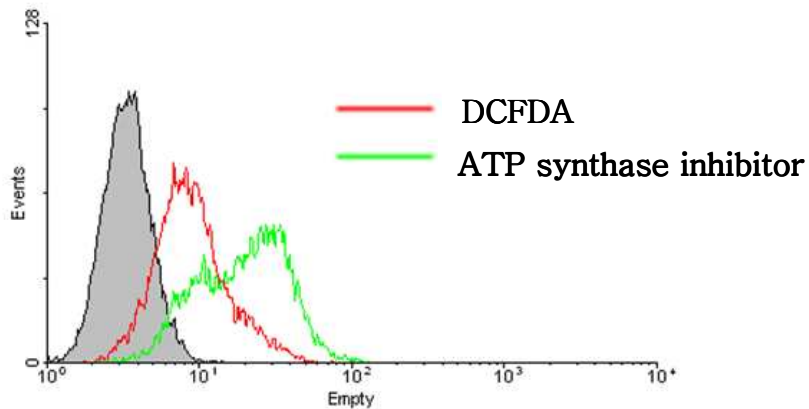


그림 1. ATP synthase inhibitor as the positive control for the detection of ROS. The production of ROS was induced in HaCaT cells with the treatment of 20 μ M ATP synthase inhibitor(DCCD, N,N0-dicyclohexylcarbodiimide) during 1 hour.

그러므로 본 연구에서는 활성산소종 생성 확인을 위한 양성대조군으로 HaCaT 세포에 ATP synthase inhibitor (DCCD, N,N0-dicyclohexylcarbodiimide, Sigma)를 20 μ M로 1시간 처리한 후, DCFDA를 30 μ M 로 20분간 처리하여 활성산소종 생성을 확인하였다.

4. HaCaT 세포에 화학물질 처리 후 표면 항원 발현 관찰

HaCaT 세포에 5 μ M DNCB와 5 μ M BKC를 24시간 동안 처리한 후 ICAM-1 (mouse mIgG₁, Santa Cruz Biotech), E-cadherin (from HE-CD1 cell line soup), HLA-DR (FITC-labeled anti-human HLA-DR, BD)이 발현되는지에 대해 FACS Calibur (Becton Dickinson)를 이용하여 발색 신호를 측정하였다.

5. HaCaT 세포에 화학물질 처리 후 사이토카인 생성 측정

HaCaT 세포에 5 μ M DNCB 와 5 μ M BKC 를 48 시간 처리 후 HaCaT 세포에서 분비되는 사이토카인인 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 에 대한 ELISA kit (R&D systems, MN, USA)를 이용하여 시행하였다.

6. **항산화제 전처리 후 화학물질에 의한 HaCaT 세포의
활성산소종 생성, 표면 항원 발현, 사이토카인 생성의 변화
관찰**

HaCaT 세포에 항산화제인 glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase를 40분 동안 전처리 후 DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 활성산소종 생성, 표면 항원 발현, 그리고 사이토카인 생성을 억제시킬 수 있는지 관찰하였다(표 2).

표 2. The concentration of antioxidants for experiment

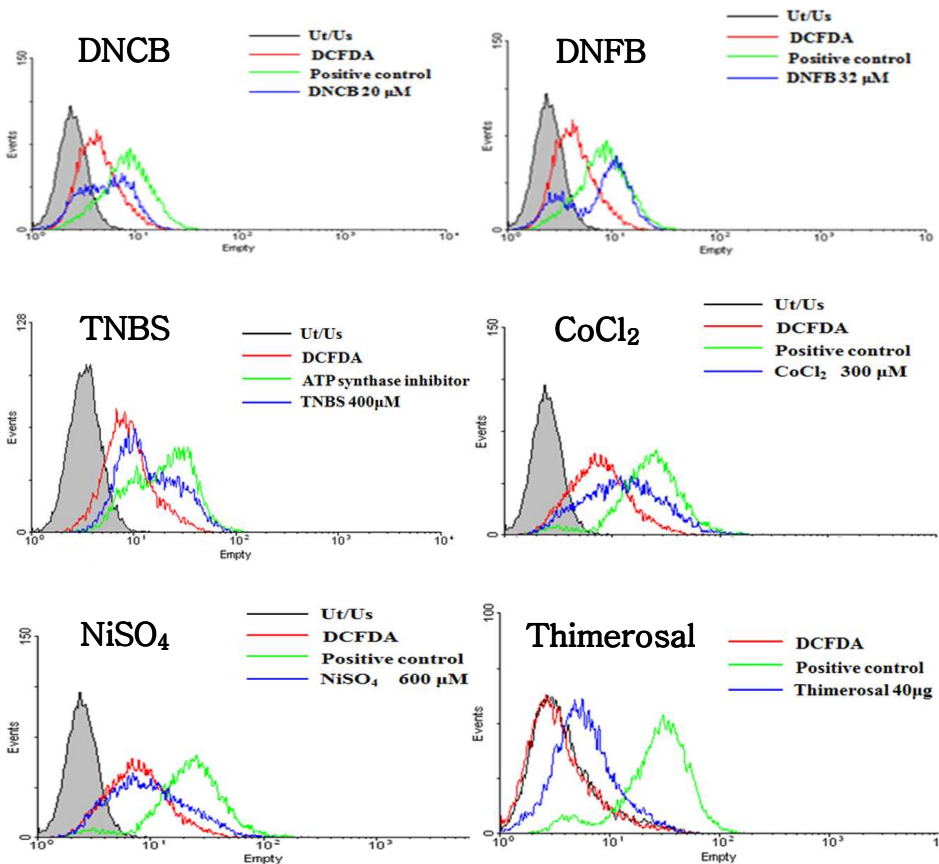
Antioxidants	Concentration
Glutathione	3mM
NAC	5mM
Selenium	0.1 μ M
Vit. E	5mM
Catalase	500U

III. 결과

1. HaCaT 세포에서 다양한 화학물질에 의한 활성산소종 생성

다양한 화학물질이 HaCaT 세포에서 활성산소종을 생성하였다(그림

2). 알레르겐 중 DNCB, DNFB, TNBS, CoCl_2 , thimerosal, 자극물질 중 SDS, BKC가 활성산소종을 생성하였다.



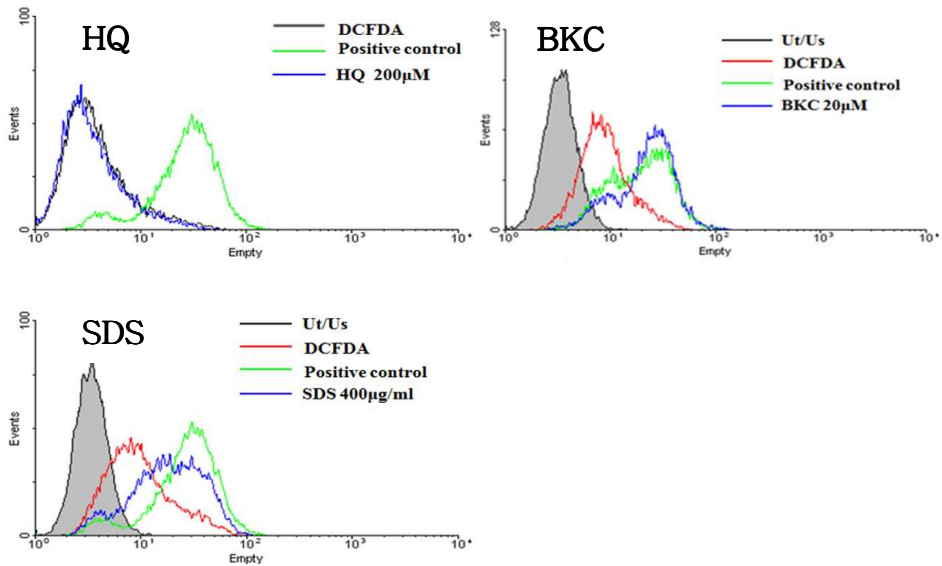


그림 2. The generation of ROS in HaCaT cells treated with chemicals. The production of ROS in HaCaT cells was induced by various allergens, including DNCB, DNFB, TNBS, CoCl_2 , thimerosal and irritants like SDS, BKC. (Ut/Us: isotype control, DCFDA: CM-H2DCFDA, Positive control: ATP synthase inhibitor)

2. HaCaT 세포에서 DNCB와 BKC에 의한 농도별 활성산소종 생성

활성산소종을 생성하는 화학물질 중 낮은 농도에서도 많은 양의 활성산소종을 생성한 화학물질로 알레르겐인 DNCB와 자극물질인 BKC를 선택하여 추가실험을 하였다. DNCB와 BKC를 $5\mu\text{M}$ 에서

20 μ M까지 24시간 동안 처리하여 활성산소종 생성을 각각 측정하여 다음의 결과를 얻었다. DNCB는 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M 농도에서 음성 대조군에 비해 활성산소종 생성이 증가하였다(그림 3A). BKC도 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M 농도에서 음성 대조군에 비해 활성산소종 생성이 증가하였다(그림 3B).

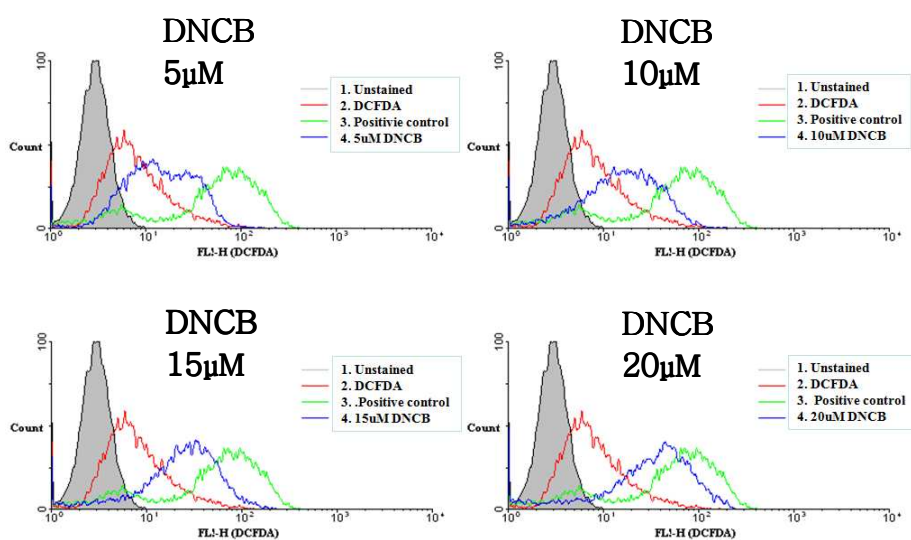


그림 3A. The generation of ROS in HaCaT cells treated with DNCB. The production of ROS was induced in HaCaT cells, which were treated with DNCB at 5–20 μ M concentration for 24 hours. (Unstained: isotype control, DCFDA: CM-H2DCFDA, Positive control: ATP synthase inhibitor)

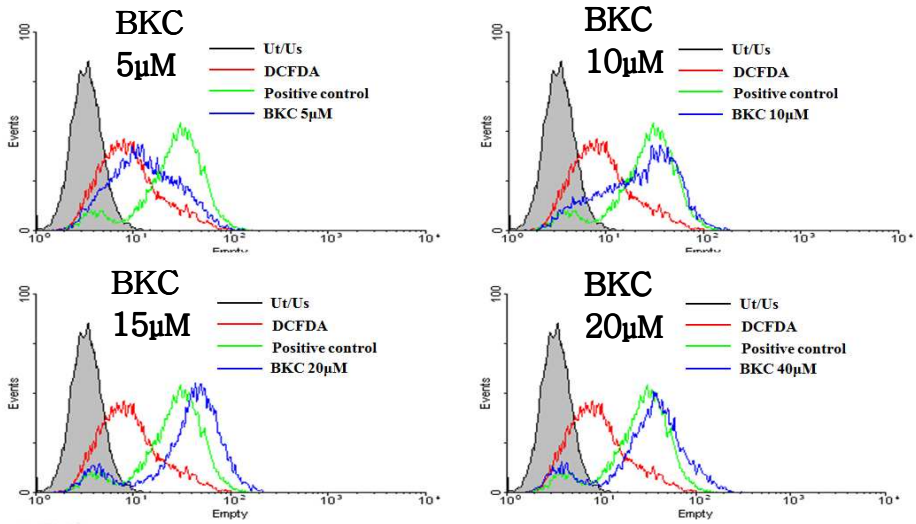


그림 3B. The generation of ROS in HaCaT cells treated with BKC. The production of ROS was induced in HaCaT cells, which were treated with BKC at 5–20 μ M concentration for 24 hours. (Ut/Us: isotype control, DCFDA: CM-H2DCFDA, Positive control: ATP synthase inhibitor)

3. 항산화제 전처리 후 DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 활성산소종 생성 변화

HaCaT 세포에 항산화제인 glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase를 40분 동안 전처리 후 HaCaT 세포에 DNCB와 BKC를 처리하였을 때 활성산소종의 생성을 억제하지 못했다(그림 4A, 4B).

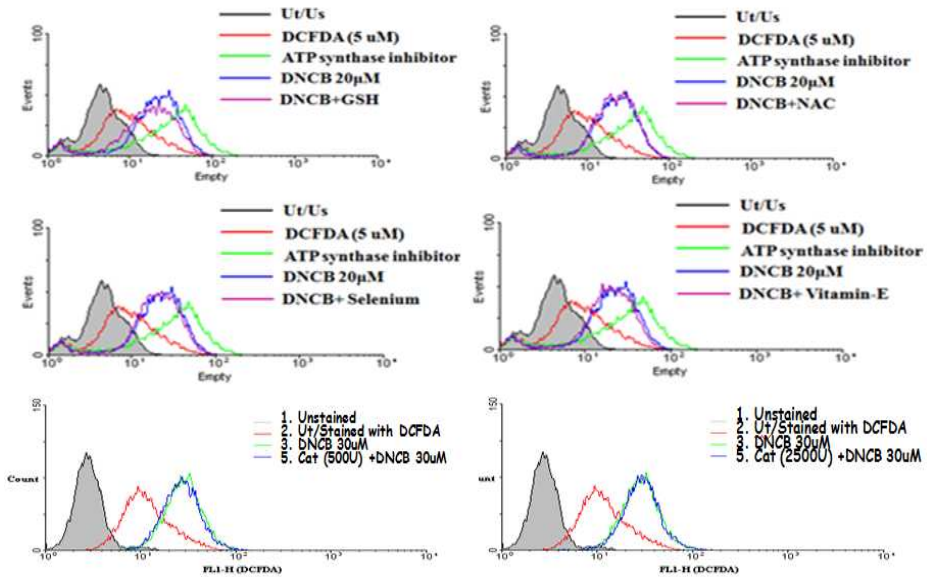


그림 4A. The effect of antioxidants on the ROS production in HaCaT cells treated with DNCB. The production of ROS was not inhibited by the pretreatment of antioxidants (glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase) 40 minutes prior to the treatment of DNCB. (Unstained: isotype control, DCFDA: CM-H₂DCFDA, GSH: glutathione, NAC: N-acetyl cysteine, Cat: Catalase)

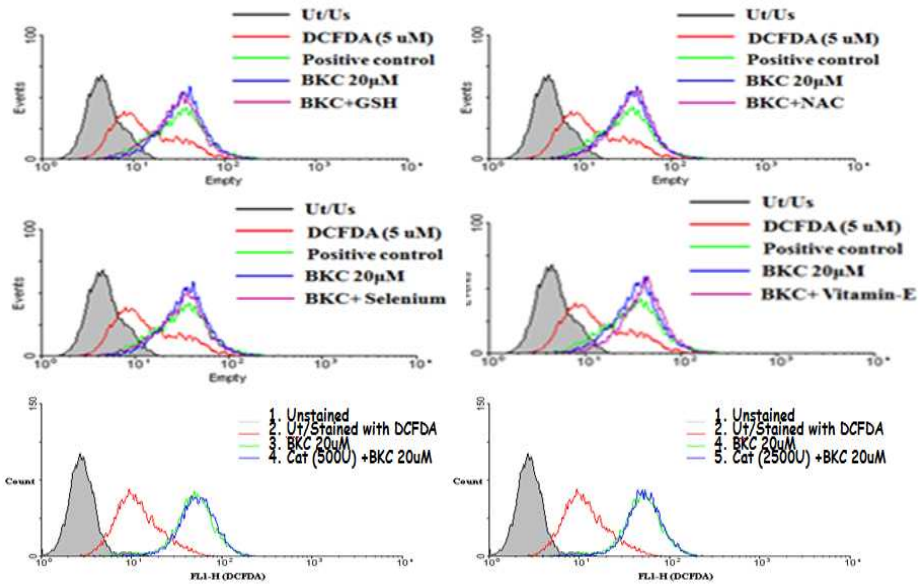


그림 4B. The effect of antioxidants on the ROS production in HaCaT cells treated with BKC. The production of ROS was not inhibited by the pretreatment of antioxidants(glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase) 40 minutes prior to the treatment of DNCB. (Unstained: isotype control, DCFDA: CM-H₂DCFDA, GSH: glutathione, NAC: N-acetyl cysteine, Cat: Catalase)

4. DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 표면 항원 발현과 항산화제를 전처리하였을 때의 표면 항원 발현의 변화

5µM DNCB와 5µM의 BKC를 HaCaT 세포에 24시간 처리한 후 ICAM-1, E-cadherin, HLA-DR의 발현이 control에 비해 모두

증가하였다. 이 때 항산화제인 glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase로 전처리 후 DNCB와 BKC를 HaCaT 세포에 처리하였을 때 표면 항원 발현의 변화는 관찰되지 않았다(그림 5A, 5B, 5C).

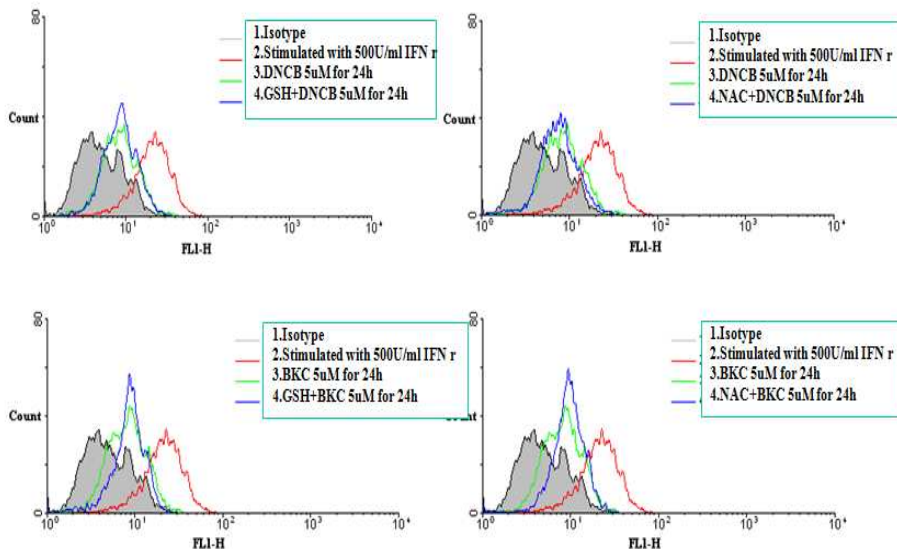


그림 5A. ICAM-1 expression of HaCaT cells treated with DNCB and BKC. Glutathione (GSH) and NAC did not affect ICAM-1 expression of DNCB/BKC-treated HaCaT cells. (GSH: glutathione, NAC: N-acetyl cysteine)

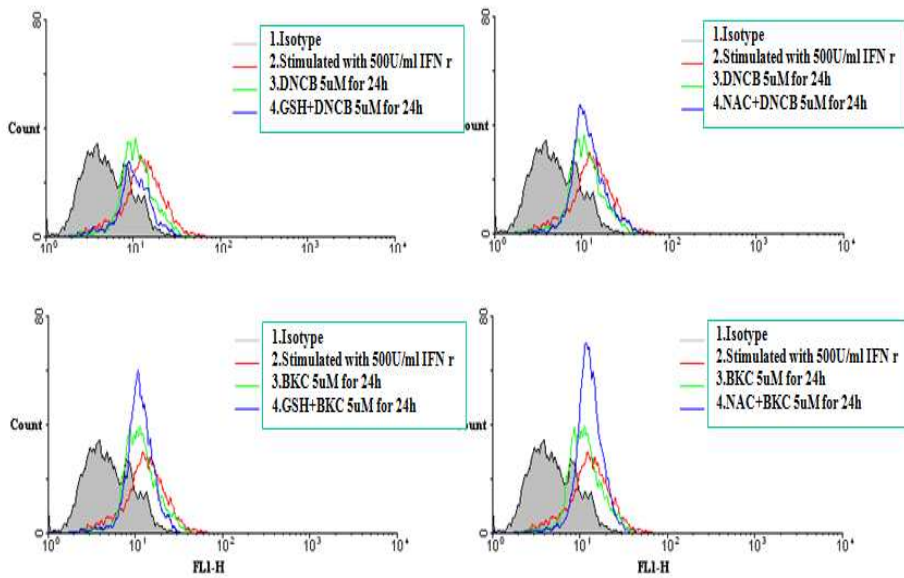


그림 5B. E-cadherin expression of HaCaT cells treated with DNCB and BKC. Glutathione (GSH) and NAC did not affect E-cadherin expression of DNCB/BKC-treated HaCaT cells. (GSH: glutathione, NAC: N-acetyl cysteine)

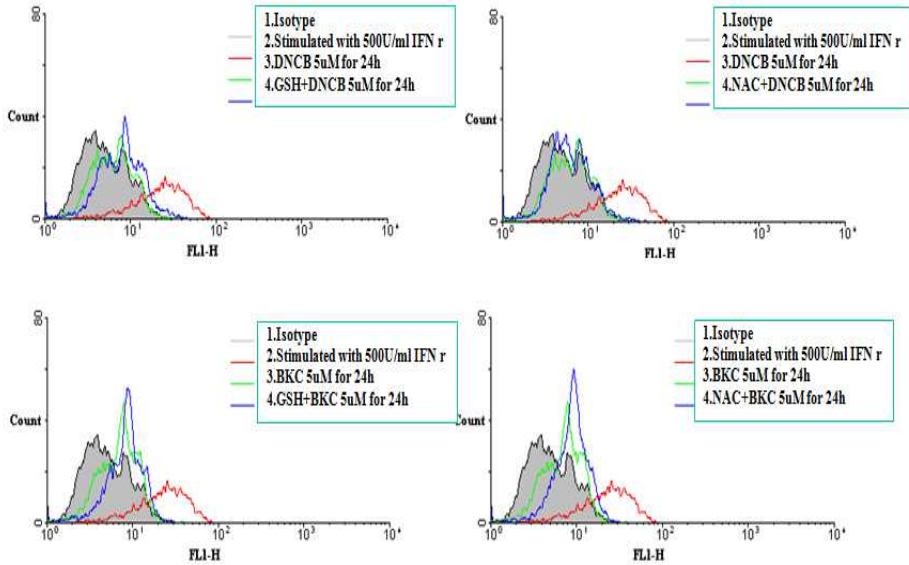


그림 5C. HLA-DR expression of HaCaT cells treated with DNCB and BKC. Glutathione (GSH) and NAC did not affect HLA-DR expression of DNCB/BKC-treated HaCaT cells. (GSH: glutathione, NAC: N-acetyl cysteine)

5. DNCB와 BKC에 의한 HaCaT 세포의 사이토카인 생성과 항산화제를 전처리하였을 때의 사이토카인 생성의 변화

5 μ M DNCB와 5 μ M의 BKC를 HaCaT 세포에 1시간, 24시간, 48시간 동안 처리하였을 때 HaCaT 세포에서 IL-1 α 가 생성되었으나(그림 6), IL-1 β 와 TNF- α 의 생성은 관찰되지 않았다(data not shown). 이 때 항산화제를 전처리 후 DNCB와

BKC를 HaCaT 세포에 처리하였을 때 IL-1 α 생성의 변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

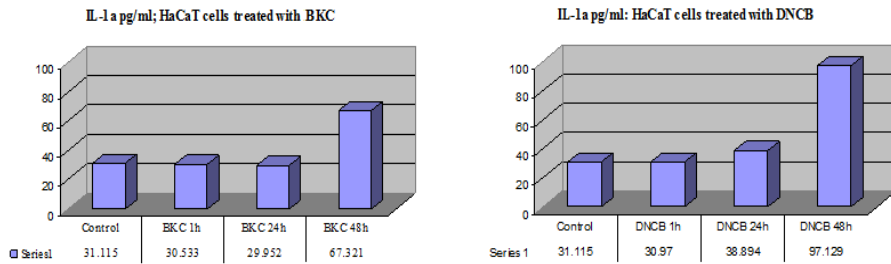


그림 6. IL-1 α secretion of HaCaT cells treated with DNCB and BKC.

After 48 hours treatment of DNCB and BKC with HaCaT cells, the secretion of IL-1 α increased, but IL-1 β 와 TNF- α did not.

IV. 고찰

알레르기접촉피부염은 항원전달세포가 화학물질 같은 항원을 T 세포에 전달하는 세포매개 면역반응으로 나타난다. 알레르기접촉피부염을 유발하는 항원인 화학물질이 피부로 침투하면 피부에 존재하는 수지상세포인 랑게르한스 세포(Langerhans cell)와 진피 수지상세포가 포획하여 MHC class I 및 II 와 항원복합체를 이루어 세포 표면에 표현한다. 한편 화학물질이 각질형성세포를 자극하여 IL-1 α , TNF- α , GM-CSF 등이 분비되고 이들 사이토카인에 의해 수지상세포가 활성화되면 IL-1 β , IL-6, IL-12 같은 사이토카인과 케모카인의 분비가 증가하고, 세포 표면 항원인 MHC-I, MHC-II, 세포부착물질(cell adhesion molecule), 보조자극물질(co-stimulatory molecule)의 발현이 증가하며, 항원의 포획과 처리하는 능력은 감소하고 항원 전달 능력은 증가하게 된다.¹⁹ 이동한 수지상세포는 림프절 내에서 항원과 접촉이 없었던 naïve T 림프구를 기억세포로 변화시키면서 항원에 특이한 기억세포를 증식시키는 민감기(sensitization phase) 과정을 거친다.²⁰ 수지상세포가 피부에서 국소림프절로 이동하는 과정에는 몇 가지 조건이 이루어져야 한다. 랑게르한스 세포와 각질형성세포를 접촉시켜주는 E-cadherin 이

감소하여야 하고, 랑게르한스 세포가 기저세포막을 통과하기 위해서는 matrix metalloproteinase(MMP)-3, MMP-9 등이 분비되어야 하며, CCR7의 표현이 증가되어 국소림프절에서 분비되는 CC chemokine ligand(CCL)19 및 CCL21에 반응하여야 한다. 또한 CD80, CD86과 같은 보조자극물질 표현이 증가되어야 한다. 이 때 각질형성세포와 진피의 세포로부터 분비되는 TNF- α 와 IL-1 β 가 랑게르한스 세포의 활성화와 이동에 중요한 역할을 한다.²¹ 피부에 CD8+ 항원 특이 T 세포가 기억세포로 존재하는 상태에서 다시 화학물질이 피부로 침입하면 유발기(elicitation phase) 과정이 일어나는데 수지상세포가 피부에 존재하는 항원 특이 T 세포에 항원을 제공하면서 이들 T 세포가 급격히 증식된다. 이들 CD8+ T 세포는 항원을 가진 각질형성세포를 공격하여 세포자멸사를 일으킨다. 또한 T 세포와 각질형성세포에서는 여러 가지 사이토카인 및 케모카인이 분비되고 단핵구, 호중구, 호산구, 비만세포 등이 모여들어 더욱 피부에 염증반응이 심해진다. CD4+ 조절 T 세포(regulatory T cell)가 IL-10을 분비하여 수지상세포의 기능을 저하시키거나 T 세포와 직접 접촉하여 T 세포 기능을 억제함으로써 염증반응이 소멸되게 된다.²²

화학물질에 의한 접촉피부염의 발생에서 수지상세포에서 활성산소종의 역할에 대해서는 여러 가지 연구결과가 발표되고 있지만, 화학물질에 의해 각질형성세포에서 활성산소종이 생성되는지에 대해서나 이에 따른 각질형성세포에서의 ICAM-1 같은 표면항원이나 IL-1 이나 TNF- α 같은 사이토카인 분비에 대한 연구 결과는 아직 부족하다. 따라서 이번 연구에서 각질형성세포에서 화학물질에 의한 활성산소종 생성 여부와 이에 따른 각질형성세포의 변화를 알아보는 것에 의미를 두었다. 본 연구에서 알레르겐인 DNCB, DNFB, TNBS, CoCl₂, thimerosal 과 자극물질인 BKC, SDS 는 DCFDA 로 측정된 결과 HaCaT 세포에서 활성산소종을 생성하였다. 알레르겐과 자극물질 중에서 DNCB 와 BKC 는 다른 화학물질에 비해 낮은 농도에서도 활성산소종을 많이 생성하였고, NiSO₄ 와 hydroquinone 은 활성산소종을 생성하지 못하였다. NiSO₄ 은 알레르기접촉피부염을 가장 흔히 일으키는 물질이지만 HaCaT 세포뿐 아니라 수지상세포를 이용한 실험에서도 활성산소종을 생성하지 못하였다. 따라서 화학물질의 종류에 따라 세포에 미치는 산화적인 스트레스적인 영향이 다르다는 것을 생각할 수 있고, 접촉피부염의 기전과 관련하여 활성산소종 의존성 기전과

활성산소종-비의존성 기전이 있을 것으로 추정할 수 있으며 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

화학물질에 의한 각질형성세포에서 생성되는 활성산소종을 억제했을 때의 효과를 관찰하기 위해 항산화제인 glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase 를 사용하였다. Glutathione 은 대표적인 항산화제로 hydroxyl radical (OH \cdot), peroxy radical (ROO \cdot), alkoxy radical (RO \cdot), hypochlorous acid (HClO) 등에 직접적으로 작용하여 활성산소종을 제거한다.²³ NAC 은 glutathione 합성의 전구체로서 세포내 glutathione 의 농도를 높인다.²⁴ Selenium 은 자외선 조사 후 각질형성세포에서 발생하는 활성산소종에 의한 세포자멸사의 유도를 억제한다.²⁵ Vit. E 는 lipid peroxidation 을 억제하여 peroxy radical (ROO \cdot)을 제거한다.²³ Catalase 는 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 제거할 수 있다.²⁴ 항산화제로 30 분 동안 전처리 하였을 때 활성산소종이 줄어들지 않은 이유는 정확하지 않다. 항산화제가 활성산소종의 생성을 억제하기에 농도와 처리시간이 부족하였을 가능성도 있다. 하지만 catalase 의 경우 농도를 50U/ml 에서 500U/ml 로 증가시켜도 같은 결과를 보였으므로 이번 연구에서 사용한 항산화제가 작용하지 못한 것으로 생각하는 것이 타당하다고 생각한다.

이번 연구에서는 사람 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 사용하여 실험을 하였기 때문에, 추가적으로 사람 각질형성세포를 일차 배양하여 실험을 하는 것이 필요하다. 연구결과에서 보여준 DNCB와 BKC의 활성산소종 생성 시스템의 차이 이외에도 산화적 스트레스의 지표로 사용되는 protein carbonylation에서도 차이를 보였는데, HaCaT 세포에서 2,4-dinitro hydrazones (DNP)을 이용한 western blot에서 DNCB는 protein carbonylation을 생성했지만 BKC는 생성하지 않아 추가실험을 진행하고 있다.

결론으로 다양한 화학물질들이 사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 활성산소종을 생성하고, 이들이 HaCaT 세포의 표면 항원의 발현과 사이토카인의 생성을 증가시키는 것으로 보아 사람 각질형성세포에서 생성된 활성산소종이 접촉피부염에서 중요한 역할을 하리라 생각되나, 화학물질 자극 후 생성되는 활성산소종을 억제시킬 수 있는 항산화제를 확인하여 화학물질에 의해 생성된 활성산소종의 역할에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결론

1. 사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 다양한 화학물질이 활성산소종을 생성하였다. 알레르겐인 DNCB, DNFB, TNBS, CoCl₂, thimerosal과 자극물질인 SDS, BKC가 활성산소종을 생성하였다. 알레르겐과 자극물질 중 낮은 농도에서도 활성산소종을 생성하는 DNCB와 BKC를 선택하여 추후 실험들을 진행하였다.
2. HaCaT 세포에 DNCB와 BKC를 24시간 처리하였을 때 HaCaT 세포의 표면항원 ICAM-1, E-cadherin, HLA-DR의 발현이 모두 증가하였다.
3. HaCaT 세포에 DNCB와 BKC를 48시간 처리하였을 때 IL-1 α 을 생성하였다.
4. 항산화제인 glutathione, NAC, selenium, Vit. E, catalase를 전처리 후 DNCB와 BKC를 HaCaT 세포와 반응시켰을 때 DNCB와 BKC에 의한 활성산소종의 생성을 억제하지 못하였고, 표면 항원 발현과 IL-1 α 생성을 억제하지 못하였다.

다양한 화학물질들이 사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 활성산소종을 생성하고, 이들이 HaCaT 세포의 표면 항원의 발현과 사이토카인의 생성을 증가시키는 것으로 보아 사람 각질형성세포에서 생성된 활성산소종이 접촉피부염에서 중요한 역할을 하리라 생각되나, 화학물질 자극 후 생성되는 활성산소종을 억제시킬 수 있는 항산화제를 확인하여 화학물질에 의해 생성된 활성산소종의 역할에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Mark BJ, Slavin RG. Allergic contact dermatitis. *Med Clin North Am.* 2006;90:169-85.
2. Cavani A, De Pita O, Girolomoni G. New aspects of the molecular basis of contact allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:404-8.
3. Gober MD, Fischelevich R, Zhao Y, Unutmaz D, Gaspari AA. Human natural killer T cells infiltrate into the skin at elicitation sites of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008;128:1460-9.
4. Ring S, Schäfer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol.* 2006;36:2981-92.
5. Edele F, Esser PR, Lass C, Laszczyk MN, Oswald E, Strüh CM, et al. Innate and adaptive immune responses in allergic contact dermatitis and autoimmune skin diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007;6:236-44.
6. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal.*

2002;4:665-73.

7. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol.* 2006;126:2565-75.

8. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol.* 2006;177:6852-8.

9. Brandt K, Bulfone-Paus S, Jenckel A, Foster DC, Paus R, Rückert R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1379-82.

10. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003;8:223-46.

11. Kaur S, Zilmer M, Eisen M, Kullisaar T, Rehema A, Vihalemm T. Patients with allergic and irritant contact dermatitis are characterized by striking change of iron and oxidized glutathione status in nonlesional area of the skin. *J Invest Dermatol.* 2001;116:886-90.

12. Anderson C, Hehr A, Robbins R, Hasan R, Athar M, Mukhtar H, et al. Metabolic requirements for induction of contact

- hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J Immunol.* 1995;155:3530-7.
13. Kawakubo Y, Nakamori M, Schopf E, Ohkido M. Acetylator phenotype in patients with p-phenylenediamine allergy. *Dermatology.* 1997;195:43-5.
14. Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17:663-9.
15. Tan PH, Sagoo P, Chan C, Yates JB, Campbell J, Beutelspacher SC, et al. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;174:7633-44.
16. Matos TJ, Duarte CB, Goncalo M, Lopes MC. Role of oxidative stress in ERK and p38 MAPK activation induced by the chemical sensitizer DNFB in a fetal skin dendritic cell line. *Immunol Cell Biol.* 2005;83:607-14.
17. Wittmann M, Werfel T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6:329-34.
18. JH Je, TH Lee, DH Kim, YH Cho, JH Lee, SC Kim, et al. Mitochondrial ATP synthase is a target for TNBS-induced

protein carbonylation in XS-106 dendritic cells. *Proteomics* 2008;8:2384-93.

19. Jakob T, Ring J, Udey MC. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:688-96.

20. Bennett CL, Noordegraaf M, Martina CA, Clausen BE. Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *J Immunol.* 2007;179:6830-5.

21. Nishibu A, Ward BR, Boes M, Takashima A. Roles for IL-1 and TNFalpha in dynamic behavioral responses of Langerhans cells to topical hapten application. *J Dermatol Sci.* 2007;45:23-30.

22. Cavani A. T regulatory cells in contact hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8:294-8.

23. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30:620-50.

24. Koren E, Zverev I, Ginsburg I, Kohen R. Supplementation with antioxidants fails to increase the total antioxidant capacity of several cell lines in culture. *Biomed Pharmacother.* 2008;62:179-88.

25. Rafferty TS, Beckett GJ, Walker C, Bisset YC, McKenzie RC. Selenium protects primary human keratinocytes from apoptosis induced by exposure to ultraviolet radiation. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:294-300.

Abstract

The role of ROS produced by HaCaT cells treated with chemicals

Dong Hyun Kim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Min-Geol Lee)

Reactive oxygen species (ROS) may participate in the pathogenesis of allergic contact dermatitis. Although most studies about the influence of ROS on allergic contact dermatitis focused on dendritic cells, the role of ROS on the activation of keratinocytes, which represent the majority of epidermal cells and produce proinflammatory cytokines, still remains to be elucidated. To study the role of ROS on chemicals-treated HaCaT cells, human keratinocyte cell line, we investigated 1) the production of ROS by various chemicals 2) the expression of surface molecules (ICAM-1, E-cadherin, HLA-DR) and the secretion of cytokine (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α)

and 3) the inhibition of ROS production, surface molecule expression, and cytokine secretion by antioxidants. In the present study, we have shown the production of ROS by chemicals-treated HaCaT cells. Allergen, including 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2,4-dinitrofluorobenzene, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, CoCl_2 , thimerosal, and irritants, including sodium dodecyl sulfate, benzalkonium chloride (BKC), produced ROS. Among ROS-producing chemicals, DNCB and BKC were selected to be the representative of allergen and irritant, respectively. After 24 hours treatment of DNCB and BKC with HaCaT cells, the expression of ICAM-1, E-cadherin, HLA-DR were all increased. After 48 hours treatment of DNCB and BKC with HaCaT cells, the secretion of IL-1 α increased, but IL-1 β and TNF- α did not. The production of ROS, the expression of surface molecules, and the secretion of cytokine was not inhibited by antioxidants (glutathione, N-acetyl cysteine, selenium, Vit. E, catalase).

In conclusion, we have shown the production of ROS by chemicals-treated HaCaT cells, surface molecules expression and IL-1 α secretion. However, the role of ROS produced by hatpens-treated HaCaT cells is not well understood yet, because several antioxidants did not inhibit the production of ROS by chemicals-treated HaCaT cells. In additional experiments, we need to find antioxidants or the inhibitors of ROS-generating sources to inhibit the production of ROS by chemicals-treated HaCaT cells or primary keratinocytes.

Key Words : keratinocyte, chemicals, ROS, contact dermatitis

