

Minocycline이 각질형성세포의  
desmoglein발현에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

정 예 리

Minocycline이 각질형성세포의  
desmoglein발현에 미치는 영향

지도 김 수 찬 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

정 예 리

# 정예리의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

## 감사의 글

먼저 학위의 모든 과정에 함께 하여 주신 하나님께 감사드립니다. 피부과 의사로서, 의학을 연구하는 학자로서의 많은 점을 가르쳐 주시고, 본 논문을 완성하기까지 모든 방면에 끊임 없는 격려와 세심한 배려로 지도해 주신 김수찬 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한 많은 관심과 조언을 아끼지 않으신 김동건 부교수님, 유 욱 조교수님께 진심으로 감사드립니다. 더불어 연구 진행에 많은 도움을 주신 피부과학교실원 여러분에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 지금까지 저를 키워주시고 항상 사랑과 격려로 이끌어 주시는 부모님과 남편에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

저 자 씀

# 차 례

그림 및 표 차례 .....	1,2
국문 요약 .....	3
<b>I. 서 론</b> .....	5
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	7
1. 세포배양 .....	7
가. 각질형성세포 .....	7
나. HaCaT 세포 및 A-431 세포 .....	7
2. Desmoglein 항체를 이용한 간접 면역형광검사 .....	8
3. 역전사 중합효소 연쇄반응 .....	8
가. RNA 분리 .....	8
나. 역전사 반응 .....	9
다. 반정량적 중합효소 연쇄반응 .....	9
<b>III. 결 과</b> .....	12
1. 배양한 각질형성세포에서 minocycline 투여 후 광학 현미경 소견 .....	12
2. Desmoglein 항체를 이용한 간접 면역형광검사 .....	12
가. 각질형성세포 .....	12
나. HaCaT 세포 .....	13
다. A-431 세포 .....	13
3. 역전사 중합효소 연쇄반응 .....	13

가. 각질형성세포 .....	13
나. HaCaT 세포 .....	14
다. A-431 세포 .....	14
<b>IV. 고찰</b> .....	21
<b>V. 결론</b> .....	24
참고 문헌 .....	25
영문 요약 .....	28

## 그림 차례

그림 1. 배양 각질형성세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 H&E 염색소견

그림 2. 저칼슘 배지에 배양한 각질형성세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg단백 발현

그림 3. 고칼슘 배지에 배양한 각질형성세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg단백 발현

그림 4. HaCaT 세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg단백 발현

그림 5. A-431 세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg단백 발현

그림 6. 배양된 각질형성세포, HaCaT 세포 A-431 세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg mRNA의 발현

## 표 차 례

표 1. 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용된 primer의 염기 서열



## 국문요약

### Minocycline이 각질형성세포의 desmoglein발현에 미치는 영향

Minocycline은 세균감염외에도 여드름, 주사, 괴저성 농피증, 급성 두창상 태선양 비강진, 지속성 수장족저 농피증, 유천포창등의 질환에 사용되고 있으며, 이런 질환에서 minocycline의 치료효과는 minocycline의 항균작용 외에 항염증작용과 면역억제작용으로 설명할 수 있다. 특히 여드름에 대한 minocycline의 치료효과는 항균작용, *corynebacterium acne*로부터의 lipase와 collagenase억제 외에 면포형성억제작용 등으로 설명하고 있으나, 아직 그 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 연구자는 minocycline이 여드름 병변에서 각질형성세포의 세포간 부착에 영향을 주어 면포형성억제 작용이 있다는 가정하에 이를 증명하기 위하여 각질형성세포 부착에 가장 중요한 역할을 하는 desmoglein(Dsg)에 대한 minocycline의 영향을 연구하였다.

본 연구에서는 사람 각질형성세포와 HaCaT세포, A-431세포를 배양한 후 minocycline을 투여하여 형태학적인 변화를 살펴보고 간접면역형광검사를 시행하여 Dsg의 단백 발현과 역전사 증합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하여 Dsg mRNA의 발현에 대해서 살펴보았다. 실험결과 저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포와 HaCaT세포 및 A-431세포는 minocycline을 40 $\mu$ g/ml투여하였을 때 각질형성 세포간 부착이 억제되는 현상을 관찰하였다. 면역형광검사를 시행하여 Dsg의 단백 발현을 조사한 결과 각질형성세포와 HaCaT세포, A-431세포에서 minocycline을 40 $\mu$ g/ml 투여하여도 Dsg단백발현은 변함이 없었다. 역전사 증합효소 연쇄반응검사를 시행하여 Dsg mRNA 발현을 본 결과 각질형성세포와, HaCaT세포, A-431세포에서 minocycline의 혈장내 치료농도의 약 10배인 50 $\mu$ g/ml 농도까지 투여하여도 Dsg mRNA 발현에는 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아 minocycline이 각질형성세포 세포간 부착을 저해하지만 그 기전은 Dsg mRNA나 단백 발현에 영향을 주어서가 아니라 다른 기전에 의한 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말: minocycline, 각질 형성세포, 부착, desmoglein, 역전사 중합효소 연쇄  
반응, 면역형광검사

# Minocycline이 각질형성세포의 desmoglein 발현에 미치는 영향

<지도 김수찬 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

## 정 예 리

### I. 서 론

세포와 세포간 부착은 다세포 생물체에서 발생 및 조직의 구조와 기능 유지뿐만 아니라 세포의 이동과 증식에 매우 중요한 역할을 한다. 상피세포의 세포막에는 세포와 세포를 부착시키는 두 가지 중요한 부착구조가 존재하는데 교소체(desmosome)와 adherens junction이다. 이 중 교소체는 여러 단백질로 이루어져 있는데 세포와 세포를 결합하는 막통과 단백질로 desmoglein(Dsg)과 desmocollin(Dsc)이 있으며 이들은 동종결합을 하고 있다. Dsg과 Dsc은 cadherin가족에 속하는 단백질로 각각 3개의 동질형이 존재한다. 특히 Dsg3는 심상성 천포창 환자의 항체가 결합하는 항원 단백질이며 Dsg1은 낙엽상 천포창 환자의 항체가 결합하는 항원 단백질로서 천포창 발생 이전에 가장 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 또한 Dsg3 knock out 마우스는 심상성 천포창과 마찬가지로 임상양상 및 조직학적 소견을 보여 Dsg이 각질형성 세포 결합에 매우 중요한 역할을 하는 단백임을 알 수 있다.<sup>1</sup> Dsg과 Dsc의 동질형은 조직에 따라 분포가 다르다. 즉, 단순상피에는 Dsg2와 Dsc2만이 존재하며 중층 편평상피에는 모든 동질형이 존재하는데 중층상피의 층에 따라 그 발현이 달라지게 된다. Dsg2는 기저세포층에서만 나타나며 Dsg3는 기저세포와 그 바로 위층의 세포에서 발현되며 Dsg1은 기저세포 위층에서부터 발현된다.<sup>2</sup>

각질형성세포의 세포간 부착에 영향을 미치는 약제 중에 대표적인 것은 Vitamin A의 합성유도체인 retinoic acid로서 배양 각질형성세포의 분화를 억제시키는 동시에

교소체의 발현을 억제 시키는 것으로 알려져 있다.<sup>3,4</sup>

Minocycline은 tetracycline의 합성 유도체로서 감염성 질환이외에도 많은 피부 질환에서 유용하게 쓰이는 항생제이다.<sup>5</sup> 이러한 minocycline은 경구투여량의 약 90-100%정도가 흡수될 정도로 장내 흡수율이 높으며, 투여 1-4시간 안에 혈장내 최고농도인 2-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 도달하는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> 임상에서 minocycline이 사용되는 피부질환으로서 여드름<sup>7</sup>, 주사<sup>8</sup>, 피저성 농피증<sup>9</sup>, 급성 두창상 태선양 비강진<sup>10</sup>, 지속성 수장 족저 농피증<sup>11</sup>, 유천포창<sup>12</sup>, 이영양성 수포성 표피 박리증<sup>13</sup> 등이 있다. 이러한 질환에서 minocycline의 효능은 항균작용 외에 백혈구 탐식기능의 저하<sup>14</sup>, 림프구 기능의 저하<sup>15</sup>, 보체계 억제<sup>16</sup> 등의 면역작용으로 설명하고 있다. 또한, 본 교실에서 최근 시행한 연구에 의하면 minocycline이 각질형성 세포의 증식과 분화를 억제하였으며, 이런 작용이 융합성 망상 유두종증(confluent and reticulated papillomatosis)에 대한 치료효과와 관계가 있으리라고 추측하였다.<sup>17</sup>

여드름은 모피지 기관을 침범하는 질환으로 피지선이 많은 얼굴, 가슴, 등에 주로 발생한다. 여드름은 모낭상부의 과각화, 모낭내 *Cornebacterium acne*의 증식, 피지선의 증식으로 인한 피지의 과분비, 염증 등의 복합적인 원인에 의하여 발생한다.<sup>18</sup> Minocycline은 가장 흔히 사용되는 여드름 치료제 중 하나이며, 여드름에 있어서 minocycline의 효과는 항균작용, *Corynebacterium acne*로 부터의 lipase분비 억제<sup>19</sup>, collagenase의 억제<sup>20</sup> 작용 외에 면포 형성 억제 작용 등으로 설명하고 있으나, 아직 그 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.<sup>21</sup>

연구자는 저칼슘 배지 상태에서 minocycline이 각질형성 세포간 부착의 소실을 일으키는 것을 관찰하고 이런 현상이 minocycline이 Dsg형성을 저하시킴으로써 일어날 수 있다는 가설을 세웠고 이 가설을 입증하기 위하여 사람의 각질형성세포와 HaCaT 세포, A431 세포에 minocycline을 투여한 후 형태학적인 변화를 관찰하였고, 면역형광검사를 함으로써 minocycline이 Dsg단백 발현에 미치는 영향을 관찰하였으며, 또한 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하여 Dsg mRNA의 발현정도를 측정하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포배양

#### 가. 각질형성세포

정상신생아의 포피(foreskin)에서 얻은 피부를 이용하여 각질형성세포를 배양하였다. 약술하면 포피를 1.2unit/ml dispase(Behringer Mannheim, Mannheim, Germany) 용액에 4°C에서 밤새 담근 후 진피로부터 표피를 분리하고 표피를 0.05% trypsin-EDTA용액에 넣고 부유액을 만든 후 10% fetal bovine serum(FBS: Gibco BRL, Grand island, NY, USA)이 포함된 Hank's balanced salt solution(Gibco BRL)에 넣고 1회 세척하여 trypsin의 작용을 중화시켰다. 세포배지는 epidermal growth factor(100ng/ml), bovine pituitary extract(70µg/ml), hydrocortisone(0.5µg/ml), insulin(5µg/ml)등을 함유한 keratinocyte growth media(KGM; Clonetics, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. KGM의 칼슘 농도는 0.06mM로 조정하였다. 배양은 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 25cm<sup>2</sup> 플라스크 또는 Lab-Tek chamber slide(Nalge Nunc, Naperville, IL, USA)에 배양하였다.

저칼슘 배양을 위해서는 칼슘농도 0.06mM의 KGM을 그대로 사용하였으며, 고칼슘 배양을 위해서는 KGM에 칼슘을 첨가하여 칼슘농도가 1.8mM이 되도록 하였다. 칼슘농도의 조절을 위해서는 0.3M 칼슘용액을 적당량 첨가하였다.

배양한 각질형성세포가 증식하여 배양 플라스크 바닥에 약 70%정도 차지했을 때 배지에 각각 minocycline을 농도별로 0µg/ml, 40µg/ml, 50µg/ml 첨가하고 배양 7일 까지 일정한 농도를 유지하게 하였다. 예비실험 결과 minocycline 20-30µg/ml부터 세포 증식을 억제하였으나 50µg/ml까지 세포 독성을 나타내지는 않았다.

#### 나. HaCaT 세포 및 A-431 세포

HaCaT 세포와 A-431 세포의 배양에는 10% FBS가 포함된 Dulbecco's

modified eagle's medium(Gibco BRL)을 사용하였으며 배지는 1주일에 3회씩 바뀌 주며 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 2. Dsg 항체를 이용한 간접 면역형광검사

Chamber slide에 배양한 각질형성세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척한 후 0.2% sodium azide를 함유한 PBS에 실온에서 5분간 배양한 후 다시 PBS로 세척하였다. 일차항체로서 Dsg1에 대한 항체는 면역블롯팅에서 160kD의 Dsg1과 반응하는 낙엽상 천포창 환자의 혈청을 이용하였고, Dsg3에 대한 항체는 면역블롯팅에서 130kD의 Dsg3와 반응하는 점막우세형 심상성 천포창 환자의 혈청을 이용하였으며, Dsg2는 단일클론 항체(Research diagnostics INC, Flanders, NJ, USA)를 이용하였다. 일차항체를 4°C에서 16-18시간 또는 37°C에서 2시간 반응시키고 PBS로 세척한 후 -20°C의 acetone와 methanol이 1:1로 섞인 고정액에 상온에서 5분간 고정시킨 후 이차항체인 FITC-mouse anti-human IgG(DAKO, Glostrup, Denmark)와 실온에서 2시간 반응시켰다. PBS로 세척한 후 FITC mounting medium(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 슬라이드에 마운트하여 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

## 3. 역전사 중합효소 연쇄반응

### 가. RNA 분리

RNA분리는 Trizol reagent(Gibco BRL)를 이용한 acid-guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction방법으로 시행하였다. 약술하면 25cm<sup>2</sup> 플라스크에 배양한 세포를 PBS로 세척 후 Trizol reagent 500 $\mu$ l를 첨가한 후 cell scraper(Costar, Cambridge, MA, USA)로 긁어 낸 후 추출액을 1.5ml microtube에 옮긴 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리시켰다. 상층액을 분리하여 실온에서 5분간 둔 후 chloroform 100 $\mu$ l와 혼합하여 다시 상온에서 5분간 두었다. 12,000rpm으로 15분간

원심분리 후 상층액만 분리하여 500 $\mu$ l isopropylalcohol을 첨가하고 실온에서 5-10분간 놓아둔 후 12,000rpm 에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 75% ethanol을 1ml 첨가하여 혼합 후 12,000rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 실온에서 10분간 건조시키고 diethylpyrocarbonate(DEPC) treated water를 100 $\mu$ l 첨가하여 RNA를 분리시켰다. 55-60 $^{\circ}$ C water bath에 넣어서 10분간 배양하고 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양했다. 분리가 완성된 RNA는 spectrophotometry를 이용하여 정량하고 1% agarose gel에서 18S, 28S band를 확인하였다.

#### 나. 역전사 반응

역전사 반응은 흡광도에 근거하여 1 $\mu$ g의 total RNA를 준비하여 oligo dT-adaptor primer(0.125 $\mu$ M)을 1 $\mu$ l 조정 한 후 여기에 1x RNA PCR buffer, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP mixture, 1unit RNase inhibitor, 0.25unit의 AMV reverse transcriptase(TaKaRa, Tokyo, Japan)를 첨가한 후 증류수로 total 20 $\mu$ l을 만들었다. 42 $^{\circ}$ C에서 45분간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 냉각시킨 후 반응을 종료시켰다. 여기에서 생성된 single strand cDNA 1 $\mu$ l를 반정량적 증합효소 연쇄반응에 이용하였다.

#### 다. 반정량적 증합효소 연쇄반응(Semi-quantitative PCR)

증합효소 연쇄반응은 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1x RNA PCR buffer, 0.2 $\mu$ M upstream primer, 0.2 $\mu$ M down stream primer, 2.5units Taq polymerase(TaKaRa)를 이용하여 1st strand cDNA를 각 20 $\mu$ l씩 취하여 전체부피가 100 $\mu$ l가 되도록 반응액을 조성한 후 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 1회 변성을 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 33회 반응시켰다. Internal control로서는 GAPDH 유전자를 33회 증폭시켰다. 사용한 primer들의 염기서열은 Table 1과 같다. 증폭된 cDNA는 4% Nusieve 3:1 agarose gel에서 전기영동하여 분리시킨 후 ethidium bromide 염색하여 band를 확인하였으며 band의 명암도를 Science Lab 97 image gauge, version 2.54(Fuji film,

Tokyo, Japan)을 이용하여 비교분석하였다.



표1. 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용된 primer의 염기서열

Primer	Sequences (5' to 3')
Dsg1	
sense	TCAAGTTCGCAGCAGCCTGT
antisense	TGTTTCGGTTCATCTGCGCTCA
Dsg2	
sense	CAGTAGCTTCCCAGTTCC
antisense	CTGTAAGCTTCATGAAAAATC
Dsg3	
sense	ACCGAATCTCTGGAGTGGGAA
antisense	GCACCACTCACAACCAGACGAT
GAPDH	
sense	CATCTTCCAGGAGCGAGACC
antisense	GTGGATGCAGGGATGATGTT

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 배양한 각질형성세포에서 minocycline투여 후 광학현미경 소견

저칼슘 배지(0.06mM)에서 각질형성세포는 빠른 증식을 보였으며, 전형적인 조약돌(cobble stone)모양을 보였다(그림 1A). minocycline을 30-50 $\mu$ g/ml 투여시에 minocycline의 투여량이 증가될수록 각질형성세포의 세포간 부착이 소실되는 것을 확인할 수 있었다(그림 1B). 저칼슘 배지에서 각질형성세포가 70%이상 플라스크 바닥에 자란 다음 고칼슘 배지(1.8mM)로 교환시키면 각질형성세포는 6시간 이내에 증식을 멈추고 완전히 분화된 형태를 보인다(그림1C). 고칼슘 배지에서는 저칼슘 배지와는 달리 minocycline 투여 후 세포간 부착의 소실이 확연히 보이지는 않았다(그림 1D). HaCaT세포와 A-431세포도 minocycline 투여시 세포간 부착이 소실되는 경향을 보였으나, 그 정도는 저칼슘 배지에서 minocycline을 투여한 각질형성세포보다는 훨씬 덜하였다.

#### 2. Dsg 항체를 이용한 간접면역형광검사

사람의 각질형성세포, A-431 세포, HaCaT 세포를 기질로 하여 심상성 천포창 환자와 낙엽상 천포창 환자의 혈청과 Dsg2 단일클론 항체를 이용하여 간접면역형광검사를 시행한 결과 minocycline을 투여한 세포와 투여하지 않은 세포의 변화는 다음과 같았다.

##### 가. 각질형성세포

저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포를 기질로 하여 항 Dsg항체를 이용하여 간접면역형광 검사를 시행한 결과 Dsg2와 Dsg3는 발현되지 않았고, Dsg1만이 약간의 분화된 세포표면에서만 발현되었으며, minocycline을 투여한 각질형성세포와 투여하지 않은 각질형성세포의 Dsg의 발현정도는 육안적으로 큰 차이는 없었으나 minocycline을 투여한 세포가 투여하지 않은 세포에 비해 세포간의 사이가 벌어져

세포부착이 약해진 모양을 보였다(그림 2). 고칼슘 배지의 각질형성세포를 기질로 한 간접면역형광검사에서는 Dsg1과 Dsg3가 세포표면에 잘 발현되었으나, Dsg2는 발현되지 않았다. 또한, minocycline을 투여한 각질형성세포와 투여하지 않은 각질형성세포의 Dsg1,2,3 발현정도 역시 큰 차이가 없었다(그림 3).

#### 나. HaCaT 세포

HaCaT 세포배양에서는 Dsg1,2,3가 모두 세포표면에서 잘 발현되었으며 minocycline을 투여한 HaCaT 세포와 투여하지 않은 HaCaT 세포의 Dsg1,2,3의 발현에는 큰 차이가 없었으나, minocycline 투여 후 세포부착이 약해지는 모습이 관찰되었다(그림 4).

#### 다. A-431 세포

A-431 세포배양에서 Dsg1,2,3가 모두 세포표면에서 잘 발현되었으며 minocycline을 투여한 A-431 세포와 투여하지 않은 A-431 세포의 Dsg1,2,3의 발현에는 큰 차이가 없었으나, minocycline 투여 후 세포부착이 약해지는 모습이 관찰되었다(그림 5).

### 3. 역전사 중합효소 연쇄반응

#### 가. 각질형성세포

저칼슘 배지와 고칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포에 각각 minocycline을 투여한 세포와 minocycline을 투여하지 않은 세포로 나누어 배양한 후 RNA를 추출하여 Dsg1,2,3에 대한 RT-PCR을 시행한 결과 Dsg2는 모든 조건의 세포에서 발현되지 않았고, Dsg1,3는 모든 조건의 세포에서 동일한 정도의 DNA밴드를 보여 minocycline을 투여한 각질형성세포와 투여하지 않은 각질형성세포 사이에서 Dsg mRNA 발현 정도의 차이를 관찰할 수 없었다(그림 6A).

#### 나. HaCaT 세포

HaCaT 세포에서 minocycline을 투여한 HaCaT 세포와 투여하지 않은 HaCaT 세포에 대해 Dsg1,2,3에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 Dsg1는 minocycline투여 여부와 관계없이 발현되지 않았고, Dsg2,3는 minocycline투여 여부와 관계없이 동일한 크기의 DNA분절을 보여 minocycline을 투여한 HaCaT 세포와 투여하지 않은 HaCaT세포 사이에서 Dsg mRNA발현 정도의 차이를 관찰할 수 없었다(그림 6B).

#### 다. A-431세포

A-431 세포에서 minocycline을 투여한 A-431 세포와 투여하지 않은 A-431 세포에 대해 Dsg1,2,3에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 Dsg1는 minocycline투여 여부와 관계없이 발현되지 않았고, Dsg2,3는 minocycline투여 여부와 관계없이 동일한 크기의 DNA분절을 보였으며 minocycline을 투여한 A-431 세포와 투여하지 않은 A-431 세포 사이에서 Dsg발현의 차이를 관찰할 수 없었다(그림 6C).

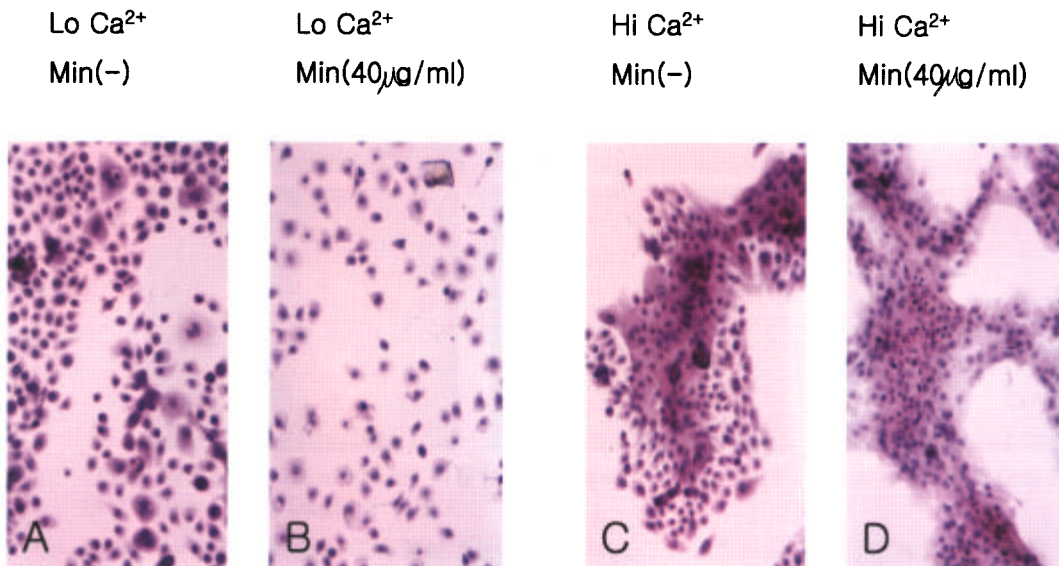


그림1. 배양 각질형성세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 H&E 염색소견

(A,B; 저칼슘 배지, C,D; 고칼슘 배지, Min(-); minocycline을 투여하지 않은 군  
Min(40μg/ml); minocycline 40μg/ml 투여한 군) (H&E X100)

저칼슘배지에서 배양한 각질형성세포에서 minocycline 을 투여하지 않은 군(A)에 비교하여 투여한 군(B)은 세포간 부착이 소실되는 경향을 보인다.

고칼슘배지에서 배양한 각질형성세포에서 minocycline 을 투여하지 않은 군(C)과 투여한 군 (D) 사이에 세포간 부착의 소실의 확연한 차이는 없다.

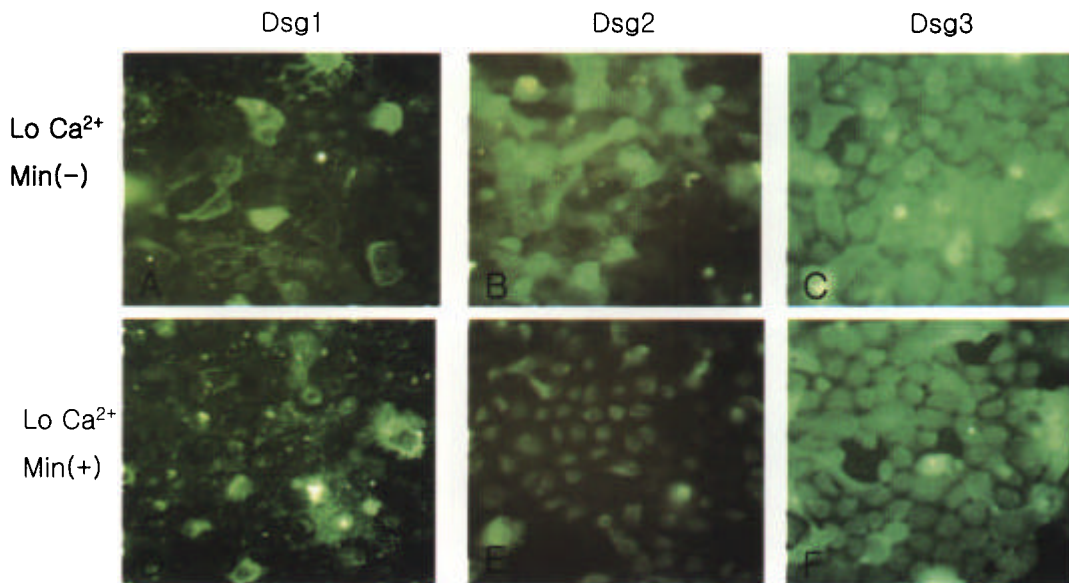


그림2. 저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포에서 minocycline투여 군(Min(+))과 투여하지 않은 군(Min(-))의 Dsg단백 발현

저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포에서는 Dsg2,3는 발현되지 않았고, Dsg1만 약간의 분화된 세포 표면에만 발현되었으며, minocycline투여하지 않은 군의 Dsg1의 발현(A), 투여한 군의 Dsg1의 발현(D)사이에는 큰 차이가 없고 minocycline을 투여한 세포에서 세포 부착이 약해진 모양을 보인다.

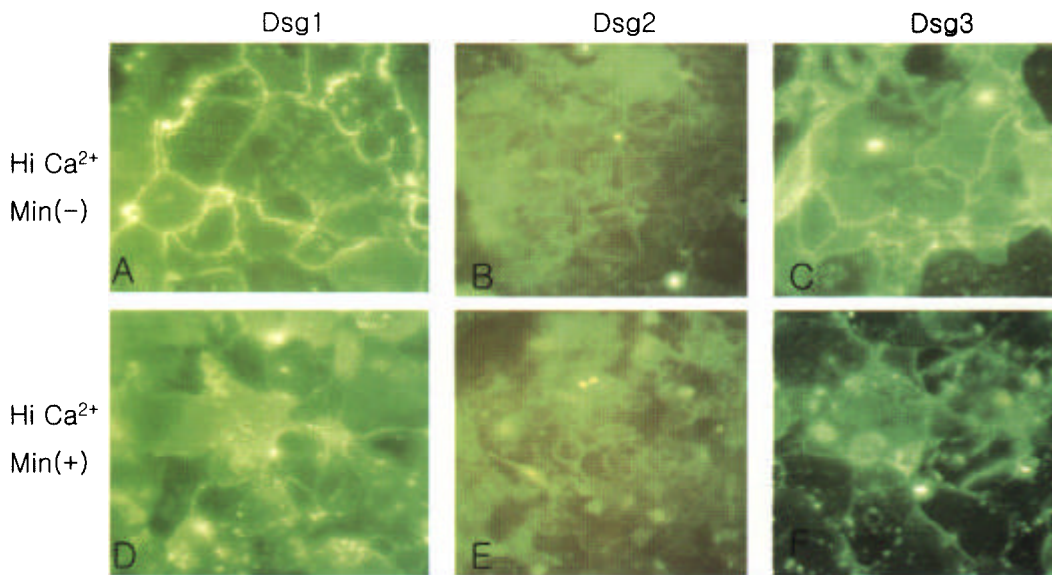


그림3. 고칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포에서 minocycline투여 군(Min(+))과 투여하지 않은 군(Min(-))의 Dsg단백 발현

고칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포에서는 Dsg1,3가 세포표면에 잘 발현되었으나, Dsg2는 발현되지 않았으며, minocycline투여하지 않은 군의 Dsg1(A)과 Dsg3(C)의 발현, 투여한 군의 Dsg1(D)과 Dsg3(F)의 발현사이에는 큰 차이가 없다.

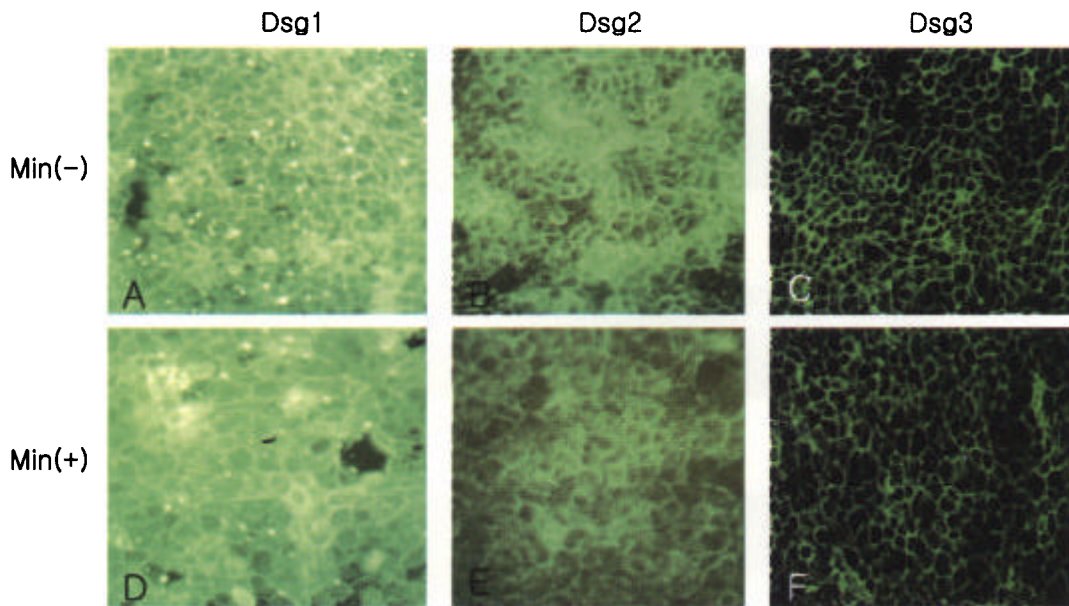


그림4. HaCaT 세포에서 minocycline 투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg단백 발현

HaCaT세포에서는 Dsg1,2,3모두 세포 표면에 잘 발현되었으며, minocycline투여하지 않은 군의 Dsg1(A), Dsg2(B),Dsg3(C)의 발현과 투여한 군의 Dsg1(D), Dsg2(E), Dsg3(F) 발현의 사이에는 큰 차이가 없으나, 세포부착이 약해진 모양이 관찰된다. .

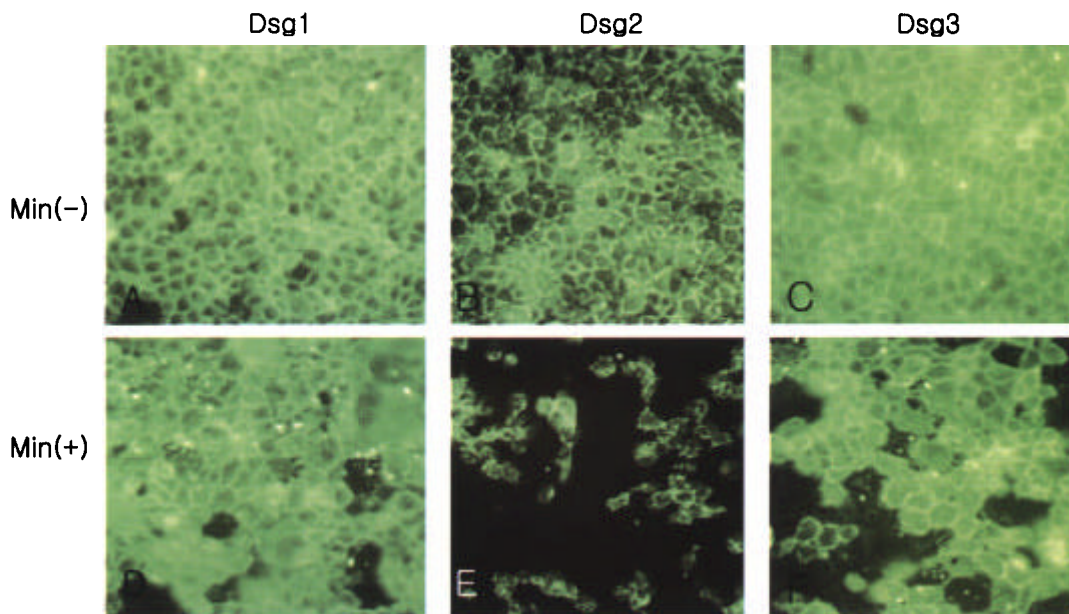


그림5. A-431 세포에서 minocycline투여 군(Min(+))과 투여하지 않은 군(Min(-))의 Dsg 단백질 발현

A-431세포에서는 Dsg1,2,3모두 세포 표면에 잘 발현되었으며, minocycline투여하지 않은 군의 Dsg1(A), Dsg2(B),Dsg3(C)의 발현과 투여한 군의 Dsg1(D), Dsg2(E), Dsg3(F) 발현의 사이에는 큰 차이가 없으나, 세포부착이 약해진 모양이 관찰된다. .

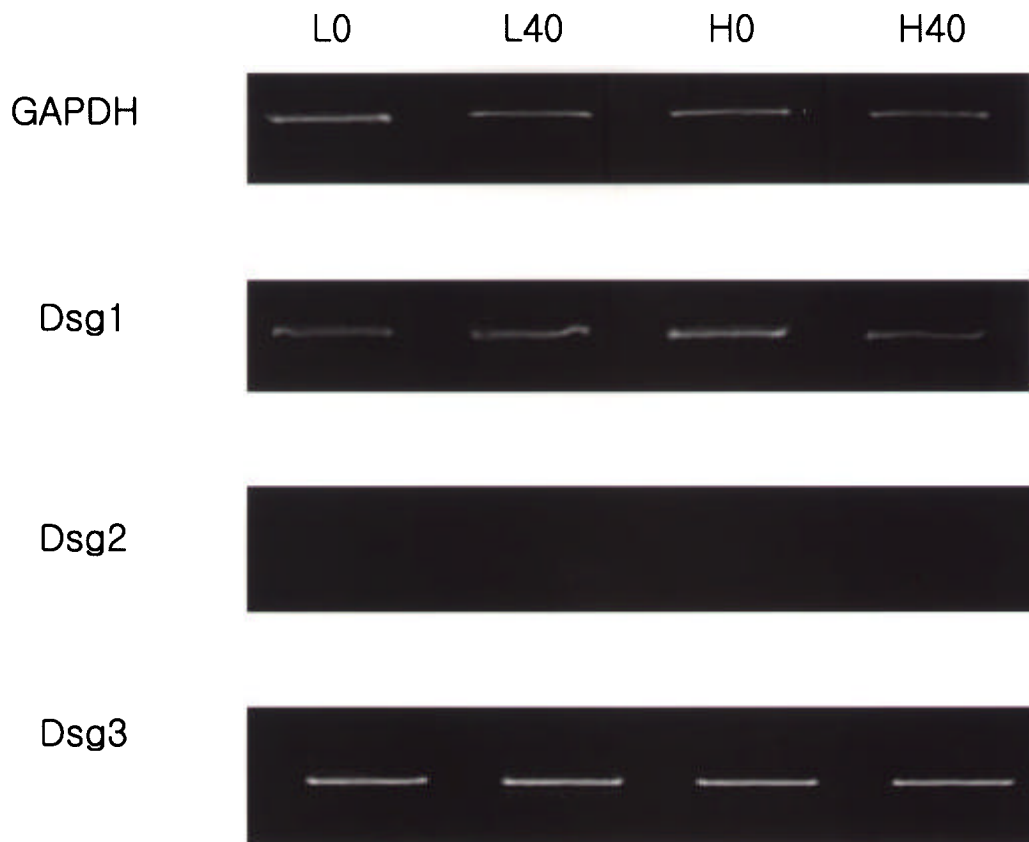


그림 6A. 배양된 각질형성세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg mRNA 발현  
 배양된 각질형성세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않은 군과의 Dsg1, 2, 3 mRNA발현  
 의 비교 (L0: Low calcium media, L40: Low calcium media, minocycline 40 $\mu$ g/ml 투여군, H0:  
 High calcium media, H40: High calcium media, minocycline 40 $\mu$ g/ml 투여군)하면 Dsg2는 모  
 든 조건의 세포에서 발현되지 않았고, minocycline을 투여한 군과 투여하지 않은 군간에는 Dsg  
 mRNA발현의 차이는 없었다.



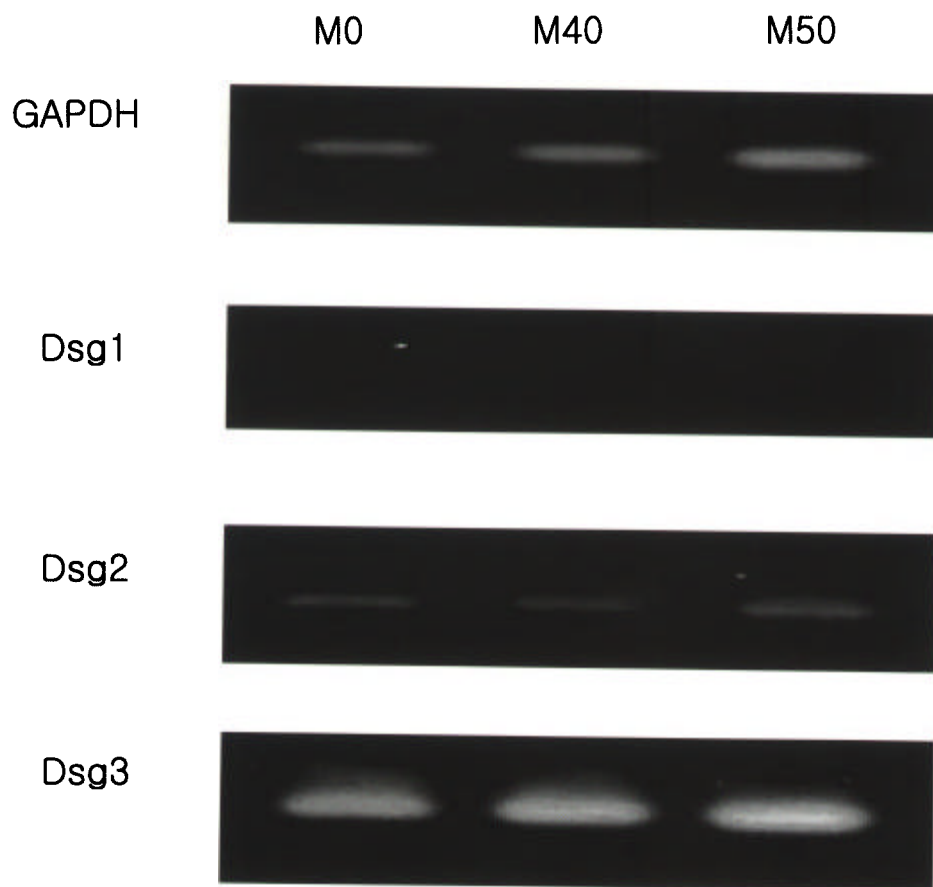


그림 6B. HaCaT 세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg mRNA 발현

HaCaT 세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않는 군과의 Dsg1, 2, 3 mRNA발현의 비교 (M0: minocycline투여전, M40: minocycline 40 $\mu$ g/ml 투여군, M50: minocycline 50 $\mu$ g/ml 투여군) 하면 Dsg1은 모든 조건의 세포에서 발현되지 않았고, minocycline을 투여한 군과 투여하지 않은 군간에는 Dsg mRNA발현의 차이는 없었다.

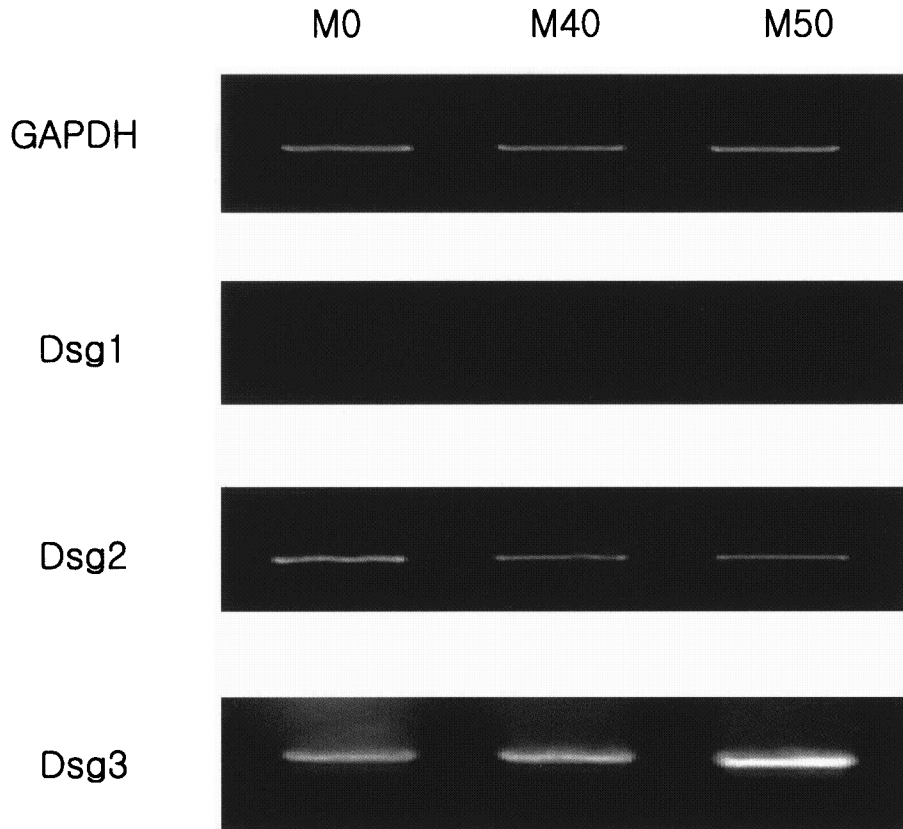


그림 6C. A-431 세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않은 군의 Dsg mRNA 발현

A-431세포에서 minocycline투여 군과 투여하지 않는 군과의 Dsg1, 2, 3 mRNA발현의 비교 (M0: minocycline투여전, M40: minocycline 40 $\mu$ g/ml 투여군, M50: minocycline 50 $\mu$ g/ml 투여군) 하면 Dsg1은 모든 조건의 세포에서 발현되지 않았고, minocycline을 투여한 군과 투여하지 않은 군간에는 Dsg mRNA발현의 차이는 없었다.

## IV. 고 찰

교소체는 세포내 중간 세섬유를 세포막에 연결시킴으로써 세포와 세포사이를 밀접하게 부착시켜 조직전체에 걸쳐 외부의 물리적 힘에 견딜 수 있도록 탄력성 있는 망구조를 이루게 한다. 다시 말해 교소체는 세포내에 존재하는 골격구조인 중간 세섬유를 세포간 부착구조에 고정시킴으로써 전체 조직의 보존에 필수적인 세포들간의 네트워크를 형성하는 중요한 다리역할을 한다. 이러한 교소체의 기능은 최근 교소체의 구성성분에 돌연변이를 유도한 동물모델이나 인간의 자가면역 수포성 질환들을 연구하면서 더욱 확실히 검증되었다.<sup>22</sup>

각질형성세포에서 세포간 결합의 약화 혹은 소실로 극세포 해리가 일어나는 대표적 질환으로는 유전적 질환인 Darier병과 Hailey-Hailey병이 있으며, 후천적으로 발생하는 질환으로 천포창과 포도구균성 열상피부 증후군(Staphylococcal scalded-skin syndrome, SSSS)등이 있다. 각각의 질환에서 극세포 해리가 발생하는 기전에는 차이가 있다. 유전적 질환인 Darier병과 Hailey-Hailey병에서는 극세포 해리가 발생하는 원인이  $Ca^{2+}$  pump와 연관된 유전자의 돌연변이라는 사실이 증명되었으나, 변이된 유전자에 의한  $Ca^{2+}$  pump에 의해 어떻게 극세포 해리가 발생하는지에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다.<sup>23,24</sup> Darier병에서는 *ATP2A2* 유전자의 돌연변이로 인해 내형 질세망 골지의  $Ca^{2+}$  pump에 장애를 일으켜 극세포 해리가 발생하며<sup>23</sup>, Hailey-Hailey 병에서는 각질형성세포내의  $Ca^{2+}$ 을 조절하는 *ATP2C1* 유전자의 돌연변이로 인해 극세포 해리가 발생한다.<sup>24</sup> 이 두 질환에서 밝혀졌듯이  $Ca^{2+}$ 이 표피의 분화에 영향을 미치는 작용 외에도 각질형성세포간 접촉에도 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 천포창에서는 질병을 유발시키는 자가항체가 항원인 Dsg에 결합한 후 어떤 과정으로 극세포 해리증이 일어나는 지에 대한 자세한 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만 하나의 학설로서 자가항체가 Dsg에 결합하면 각질형성세포로부터 plasminogen activator가 유리되고 plasminogen activator에 의해 plasminogen이 plasmin이 된다. Plasmin은 단백분해 효소이므로 Dsg간의 결합을 끊음으로써 극세포 해리가 일어난다

는 가설이 있다.<sup>25</sup> 다른 가설로서 자가항체가 Dsg에 결합하여 Dsg의 동종결합을 직접적으로 저해함으로써 염증이나 plasminogen의 개입없이 극세포해리가 일어나는 기전인데, 자가항체가 Dsg에 결합한 후 signal transduction에 의하여 protein kinase C가 활성화 되면서 Dsg의 인산화가 발생하여 Dsg과 plakoglobin의 결합이 해리되면서 극세포 해리가 발생한다는 가설이다.<sup>26</sup> 포도 구균성 열상 피부 증후군은 최근 포도 구균에 의해 분비되는 exfoliative toxin A가 주로 상부 표피에 분포하는 Dsg1에 작용하여 극세포해리를 일으키는 것으로 밝혀졌다.<sup>27</sup> 본 연구는 이러한 여러 질환의 극세포 해리가 발생하는 기전을 바탕으로 minocycline이 Dsg 생성 저하를 일으켜 각질형성세포간 극세포해리가 일어난다는 가정하에 실험을 실시하였다.

교소체를 이루는 구성성분 중 막통과 당단백인 Dsg과 Dsc이 있는데 이 중 Dsg에 대한 자가항체는 천포창 환자에서 극세포 해리증을 유발하는 것으로 각질형성세포의 세포간 부착에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. Dsg의 동질형은 각질형성세포의 분화에 따라 각각 다르게 표현된다. 배양된 각질형성세포에서는 단층배양시 Dsg1과 Dsg3만 표현되고 Dsg2는 표현되지 않지만 중층으로 배양되면 Dsg3는 감소하고 Dsg1은 증가한다.<sup>28</sup> HaCaT 세포는 인간 각질형성세포에서 유래된 영구히 분열하는 비암세포로 각질형성세포와 유사한 생리학적 성상때문에 각질형성세포 조절의 모델로 많이 쓰이고 있다. HaCaT 세포는 각질형성세포와는 달리 Dsg1, Dsc1은 거의 존재하지 않고, Dsg2, Dsc2, Dsg3, Dsc3만 표현된다.<sup>29</sup> A-431 세포는 사람의 유방암에서 기원한 편평상피암 세포로 HaCaT 세포와 마찬가지로 Dsg과 envoplakin등을 표현한다.<sup>26,30</sup>

배양 각질형성세포에서 minocycline이 세포간 부착에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 저칼슘 배지로 배양한 각질형성세포가 플라스크 바닥에 약 70-80%정도 자랐을 때 일부 세포는 고칼슘 배지로 전환시킨 후 저칼슘 배지와 고칼슘 배지 각각에 minocycline을 투여한 배지를 만들어 5-7일간 배양하여 minocycline을 투여한 세포와 투여하지 않은 세포간의 형태학적인 차이를 H&E 염색을 이용하여 비교하였다. 저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포의 실험에서는 minocycline을 투여하지 않은 군

은 전형적인 조약돌(cobble stone) 모양의 각질형성세포가 잘 융합되어 증식하였으나, minocycline을 투여한 군에서는  $30\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 세포간 부착이 소실되고 세포와 세포사이가 벌어져 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 고칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포는 minocycline을 투여한 세포와 투여하지 않은 세포 사이에서 육안적으로 큰 차이를 관찰하지 못했다. HaCaT 세포와 A-431 세포 역시 이러한 실험 결과를 바탕으로 저칼슘 배지의 각질형성세포가 minocycline투여 후 세포간 부착이 소실되는데 그 원인이 Dsg 발현 저하에 의한 것인지를 알아보기 위해 minocycline 투여 후 Dsg의 단백 및 mRNA 발현 정도를 측정하였다.

간접 면역형광검사상 고농도의 minocycline  $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여하였을 때 저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포와 HaCaT 세포, A-431 세포 모두에서 Dsg의 소실을 관찰할 수 없었다. 또 Dsg mRNA의 발현도 치료농도의 약 5-10배 정도인  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 투여하여도 minocycline을 투여한 세포와 투여하지 않은 세포사이에 차이가 없었다.

간접 면역형광검사서 배양 각질형성세포의 Dsg단백 발현이 배지의 칼슘농도에 영향을 받기 때문에 저칼슘배지에서의 각질형성세포에서는 Dsg1만이 일부의 분화된 세포의 표면에 발현되었고, 고칼슘 배지의 각질형성세포에서는 Dsg1과 Dsg3가 잘 발현되었다. 또한 배양 각질형성세포에서는 간접 면역형광검사와 역전사 중합효소 연쇄반응검사에서 Dsg2가 발현되지 않았는데, 이는 각질형성세포를 단층으로 배양시에 Dsg2가 표현되지 않는다는 보고와 일치한다.<sup>28</sup> 하지만 A-431, HaCaT 세포에서는 간접 면역형광검사에서 Dsg1,2,3는 세포 표면에 잘 발현되었으나, mRNA는 Dsg2,3만이 발현되어 일치하지 않은 결과를 보였는데, 이 원인에 대해서는 아직 정확히 밝혀진 바가 없다.

이상과 같이 면역형광검사 및 역전사 중합효소 연쇄반응검사 결과 minocycline이 Dsg의 단백발현이나 mRNA 발현에 큰 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있었다. 따라서 결론적으로 minocycline이 각질형성세포의 부착을 억제하는 현상은 Dsg에 대한 영향 때문이 아니라 다른 기전으로 이루어지는 것으로 생각된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 tetracycline의 합성유도체이면서 감염성 질환뿐만 아니라 염증성 피부질환에도 광범위하게 쓰여지는 minocycline이 각질형성세포의 Dsg형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 각질형성세포, HaCaT 세포, A-431 세포를 배양하여 minocycline투여 후 Dsg에 대한 면역형광검사와 역전사 중합효소 연쇄반응검사를 시행하여 minocycline이 Dsg단백 발현과 Dsg mRNA발현에 미치는 영향을 조사하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저칼슘 배지에서 배양한 각질형성세포에서 H&E염색소견을 관찰한 결과 minocycline농도가  $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 대조군과 비교하여 각질형성세포간 부착이 소실되는 것을 관찰할 수 있었다.
2. 간접면역형광검사 결과 각질형성세포와 HaCaT 세포, A-431 세포에서 minocycline을 투여한 세포와 투여하지 않은 세포 사이에 Dsg 단백질 발현의 차이는 없었다.
3. 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 배양 각질형성세포와, HaCaT 세포, A-431 세포에서 minocycline을 투여한 세포와 투여하지 않은 세포의 Dsg mRNA 발현에는 차이가 없었다.

이상과 같이 면역형광검사 및 역전사 중합효소 연쇄반응검사 결과 minocycline이 Dsg의 발현에 큰 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있었다. 따라서 minocycline이 각질형성세포의 부착을 억제하는 현상은 Dsg에 대한 영향 때문이 아니라 다른 기전으로 이루어지는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen(desmoglein 3)gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotypy similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 1997;137:1091-1102.
2. Hoim PK, Hansen SH, Sandvig K, Deurs Bvan. Endocytosis of desmosomal plaques depends on intact actin filaments and leads to a nondegradative compartment. *Eur J Cell Biol* 1993;62:362-371.
3. 김수찬, 원진형. 칼슘과 레티노인산이 각질형성세포의 교소체 형성에 미치는 영향. *대피지* 1994;32:820-831.
4. Wanner R, Brommer S, Czarnetzki BM, Rosenbach T. The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript level is suppressed by retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:706-711.
5. Humbert P, Treffel P, Chapuis JF, Buchet S, Derancourt C, Agache P. The tetracycline in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1991;25: 691-697.
6. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-1423.
7. Cunliffa WJ, Forster RA, Greenwood ND, Hetherington C, Holland KT, Holmes RL et al. Tetracycline and acne vulgaris: a clinical and laboratory investigation. *Br Med J* 1973;4:332-335.
8. Sneddon IB. A clinical trial of tetracycline in rosacea. *Br J Dermatol* 1966;78: 649-652.
9. Lynch WS, Bergfeld WF. Pyoderma gangrenosum responsive to minocycline hydrochloride. *Cutis* 1978;21:535-537.

10. Shelly WB, Griffith RF. Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta: A report of a case controlled by a high dose of tetracycline. *Arch Dermatol* 1969;100: 596-597.
11. Thomsen K, Osterbye P. Pustulosis palmaris et plantaris. *Br J Dermatol* 1973;89:293-296.
12. Thornfeldt CR, Menkes AW. Bullous pemphigoid controlled by tetracycline. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:305-310.
13. White JE. Minocycline for dystrophic epidermolysis bullosa. *Lancet* 1989;1:966-989.
14. Forgen A, Schmeling D, Quie PG. Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. *J Infect Dis* 1974;130:412-415.
15. Thong YH, Ferrande A. Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferation responses to tetracycline analogues. *Clin Exp Immunol* 1979;35: 443-446.
16. Ingham E. The effect of tetracyclines and erythromycin on complement activation in vitro. *Acta dermatol Venereol (Stockh)* 1995;70:531-534.
17. 장성남. Minocycline이 표피각질세포의 증식 및 분화에 미치는 영향. 박사학위 논문. 1999.
18. Thiboutout DM. Overview of clinical research findings. *Dermatol Clin* 1997;15: 97-109.
19. Hassing GS. Inhibition of *Cornibacterium acne* lipase by tetracycline. *J Invest Dermatol* 1971;56:189-192.
20. Sheridam P. Tetracycline block collagenase activity. *JAMA* 1984;252:1989-1990.
21. Chosidow O, Poli E, Naline E, Advenier C, Revuz J. Comedonal diffusion of minocycline in acne. *Dermatology* 1998;196:162.



22. O'keefe EJ, Briggamem RA, Hermam B. Calcium induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J Cell Biol* 1987;107:807-817.
23. Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S et al. Mutation in *ATP2A2*, encoding a  $Ca^{2+}$  pump, cause Darier disease. *Nature genetics* 1999;21:271-277.
24. Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H et al. Mutations in *ATP2C1*, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nature genetics* 2000;24:61-65.
25. Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* 1999;29:2233-2240.
26. Kitajima Y, Aoyama Y, Sieshima M. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induce by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Sym Proc* 1999;4:137-144.
27. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scaled-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nature medicine* 2000;6:1275-1277.
28. Wanner R, Wolff B, Glowacki F, Klode G, Wittig B. The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCaT keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* 1999;291:346-353.
29. Koch PJ, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Troyanovsk R, Franke WW. Complexity and expression pattern of the desmosomal cadherins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:353-357.
30. 정태석, 김수찬. 조직과 배양세포에서 Envoplakin의 발현. 대한 피부연구학회지 200;7:101-108.

## Abstract

# The effect of minocycline on the expression of desmoglein in keratinocytes

Yae Lee Chung

*Department of Dermatology*

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo-Chan Kim)

Minocycline is one of the most widely used antibiotics in dermatology. In addition to the infectious condition, it also has been used in the treatment of various noninfectious dermatologic disease including acne, rosacea, pyoderma gangrenosum, prurigo pigmentosa, pityriasis lichenoides et varioliformis acuta, pustulosis palmaris and plantaris, bullous pemphigoid, and dystrophic epidermolysis bullosa. Pharmacologic mechanisms of minocycline in these disease can be explained by its anti-inflammatory effects, such as inhibition of neutrophilic chemotaxis and immunosuppressive properties.

Efficiency of minocycline has been demonstrated in acne vulgaris. It reduces the level of cutaneous surface lipids and is active against *propinebacterium acnes*. Furthermore an anticomedogenic effect of minocycline has recently been discovered. However, the mechanism of anticomedogenic effect of minocycline can not be just fully explained by its many properties which is already known. Thus we evaluated the effect of minocycline on the adhesion of keratinocyte to understand the anticomedogenic effect of minocycline.

Desmosomes are most important adhering junction in stratified epithelia. The desmogleins(Dsgs) are belong to the desmosomal cadherin and it was found to be the target antigen in the pemphigus

In this study, we examined the effect of minocycline on the expression of Dsg using cultured human keratinocytes, HaCaT cell line, and A-431 cell line. Morphologic analysis and indirect immunofluorescence study was performed to evaluate the expression of Dsg in keratinocytes treated with minocycline. In addition, semiquantitative RT-PCR was performed to study the effect of minocycline on Dsg mRNA expression of keratinocytes.

The results are as follows.

1. Human keratinocyte showed loss of intercellular attachments at the concentration of  $30\mu\text{g}/\text{ml}$  of minocycline when cultered in a low calcium media.

2. Indirect immunofluorescent study of Dsgs using cultured human keratinocytes, HaCaT cell line and A-431 cell line as a substrate revealed that there is no difference in the expression of Dsg between minocycline treated cells and minocycline untreated cells.

3. Semi-quantitative RT-PCR revealed that there is no difference in the expression of Dsg mRNA in culuted keratinocyte, HaCaT cell line and A-431 cell line between minocycline treated cells and minocycline untreated cells. .

As a result, minocycline has no effect on the expression of Dsg protein and Dsg mRNA. Therefore the mechanism of minocycline induced loosening of cell adhesion is not dependent on the direct effect of minocycline.

---

**Key Words** : minocycline, keratinocyte, adhesion, desmoglein, RT-PCR, indirect immunofluorescent study