

알레르기성 접촉피부염과 자극성
접촉피부염에서 발현되는
표피내 사이토카인

연세대학교 대학원

의 학 과

이 일 주

알레르기성 접촉피부염과 자극성
접촉피부염에서 발현되는
표피내 사이토카인

지도 김 수 찬 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 일 주

이일주의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

본 논문이 완성될 수 있도록 따뜻한 격려와 세심한 배려로 모든 방면에 지도와 도움을 주신 은사 김수찬 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 연구 진행 과정에 자문을 아끼지 않으시어 논문의 완성에 많은 도움을 주신 이봉기 교수님, 이민걸 교수님, 정기양 교수님, 조남훈 교수님께 감사를 드립니다. 많은 충고와 조언을 주신 이승헌 교수님, 유욱 교수님께 감사를 드립니다. 제가 아름다운오늘 강한피부과에 근무하는 중에 바쁜 외래시간을 할애해 주셔서 논문을 완성할 수 있도록 배려해주신 강진수 원장님, 한충섭 원장님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 연구 진행 과정 중에 많은 도움을 주신 연세대학교 피부과학교실원, 연구원 여러분, 비서 박정선씨께도 감사를 드립니다.

그리고 시종일관 사랑으로 보살펴 주시고 지원해주신 장모님과 항상 사랑과 격려로 힘이 되어준 아내와 나의 온전한 사랑과 희망이 된 딸 서주에게 이 작은 영광을 드립니다.

저자 씀

목 차

국문 요약	1
I. 서 론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 접촉피부염 유발	8
2. 역전사효소 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)	8
3. RNA 분해효소 보호분석법 (RPA)	11
4. 면역조직화학염색	11
III. 결 과	13
1. 접촉피부염 유발	13
가. 귀부종 측정결과	13
나. 귀조직 검사	14
2. 역전사효소 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)	15
3. RNA 분해효소 보호분석법 (RPA)	21
4. ACD와 ICD에서의 사이토카인 면역조직화학염색 소견	22
IV. 고 찰	25
V. 결 론	34
참고문헌	35
영문요약	39

표 목 차

표1. 사이토카인 및 케모카인 primer 염기서열	10
표2. ACD 유발에서의 귀부종 측정결과	13
표3. ICD 유발에서의 귀부종 측정결과	13
표4. ACD와 ICD에서 표피내 사이토카인의 발현변화	20
표5. ACD와 ICD에서 발현되는 표피내 케모카인	20

그림목차

그림1. 정상 및 접촉피부염이 유발된 마우스 귀의 조직검사 소견 (H&E 염색)	14
그림2. 정상 및 접촉피부염을 일으킨 마우스 표피에서의 사이토카인 mRNA 발현	16
그림3. Densitometer로 측정한 각 사이토카인 mRNA 정량치	17
그림4. 정상 및 접촉피부염을 일으킨 마우스 표피의 케모카인 mRNA를 RPA로 측정한 결과	21
그림5. ACD와 ICD가 유발된 마우스 귀조직에서의 사이토카인 발현	23
그림6. ACD와 ICD가 유발된 마우스 귀조직에서의 케모카인 발현	24
그림7. 알레르기성 접촉피부염 유발기에서의 표피내 사이토카인 생성과 염증세포 침윤	32
그림8. 자극성 접촉피부염에서의 표피내 사이토카인 생성과 염증세포 침윤	33

국문 요약

알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 발현되는 표피내 사이토카인

접촉피부염은 피부에 접촉하는 물질에 의해 일어나는 염증성 질환으로 접촉하는 물질 및 그 병인에 따라 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염으로 나눈다. 이들은 병인의 측면에서 서로 다른 질환이나, 임상적으로 습진성 질환의 특징인 홍반, 부종, 수포 등의 증상을 나타내며, 병리조직학적으로도 유사한 소견을 보이므로 감별이 어렵다.

알레르기성 접촉피부염은 항원 특이적 T 림프구에 의해 매개되는 피부의 염증 반응으로, 이 과정에는 여러 세포들과 사이토카인을 포함한 염증 매개체들이 관여한다. 알레르기성 접촉피부염은 면역학적 병인에 따른 과정을 감작기(afferent phase, induction phase, sensitization)와 유발기(efferent phase, elicitation phase, challenge)로 나눈다. 감작기에는 표피의 랑게르한스세포와 진피의 수지상세포 (dermal dendritic cell)가 항원과 반응 후 국소 림프절로 이동하고 그곳에서 항원 특이적 T세포에 항원을 제시한다. 랑게르한스세포의 성숙과 이동은 IL-1 β , TNF- α 및 GM-CSF와 같은 사이토카인에 의해 조절되며 이것들은 각질형성세포와 랑게르한스세포에서 생산된다. 유발기에는 항원 특이적 기억 T세포가 자극받고 증식하며 사이토카인을 생성하여 염증반응을 일으킨다. 한편 자극성 접촉피부염은 알레르기 반응과 다른 기전으로 생긴다. 즉 어떤 물리적, 화학적 자극에 의해 표피의 세포손상이 일어나고 염증반응이 생기며 랑게르한스세포가 관여하는 감작의 과정은 필요로 하지 않는다. 그러나 자극 받은 각질형성세

포에서 생성되는 사이토카인이 염증을 일으킨다.

그러므로 사이토카인은 알레르기성 접촉피부염 뿐 아니라 자극성 접촉피부염의 발생에 중추적 역할을 한다. 표피의 사이토카인은 각질형성세포, 랑게르한스세포, T세포에서 생성된다. 염증반응에서 사이토카인의 중요성을 고려하면 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서의 사이토카인 발현 양상의 차이는 매우 흥미로운 주제이며 두 질환을 감별할 수 있는 표지자로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 마우스에 유발시킨 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 발현되는 사이토카인과 케모카인의 mRNA 생성을 비교하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 RNA 분해효소 보호분석법 (RPA)을 시행하고 단백 발현 양상의 차이를 비교하기 위하여 면역조직화학염색을 시행한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 발현되는 표피내 사이토카인은 발현양상이 서로 달랐다. 이것은 두 질환의 염증반응이 서로 다른 기전으로 발생함을 시사한다.

2. 알레르기성 접촉피부염에서는 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10 등의 사이토카인과 eotaxin, TARC, RANTES 및 JE 등의 CC 케모카인의 발현이 증가되었다. 이러한 사이토카인들은 두 접촉피부염을 구별할 수 있는 표지자로 인정된다.

3. 케모카인중 eotaxin, TARC, RANTES, JE 등의 CC 케모카인이 알레르기성 접촉피부염에서 발현이 증가되었다. 이 결과는 조직학적으로 알레르기성 접촉피부염에서 호산구 침윤을 보이는데 대한 설명이 가능하게 한다.

이상의 결과로 알레르기성 접촉피부염에서는 IL-1 β , IL-2, IL-4 및 IL-10 사이토카인과 eotaxin, TARC, RANTES 및 JE 등의 CC 케모카인의 발현이 뚜렷이 증가하였으나 자극성 접촉피부염에서는 발현이 되지 않았다. 이는 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염이 서로 다른 기전에 의해 일어남을 시사하고 있다. 따라서 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 서로 다르게 발현되는 표피내 사이토카인과 케모카인은 두 질환의 병인의 차이를 이해하고 감별하는데 도움을 주는 표지자로 인정된다고 하겠다.

핵심 되는 말: 사이토카인, 케모카인, 알레르기성 접촉피부염, 자극성 접촉
피부염

알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 발현되는 표피내 사이토카인

<지도 김수찬 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 일 주

I. 서 론

피부는 외부환경에 노출되어 있으므로 여러 가지 화학물질이나 물리적 자극에 의해 염증반응이 일어나기 쉽다. 접촉피부염은 피부에 접촉하는 물질에 의해 일어나는 염증성 질환으로 모든 직업성질환의 약 30%를 차지할 정도로 흔히 발생할 수 있는 중요한 질환이며 산업화가 진행될수록 그 발생빈도가 점점 늘어나고 있다¹. 접촉피부염은 접촉하는 물질 및 그 병인에 따라 알레르기성 접촉피부염(ACD)과 자극성 접촉피부염(ICD)으로 나눈다.

ACD는 랑게르한스세포와 진피의 수지상세포 (dermal dendritic cell), 항원 특이적 T 림프구에 의해 매개되는 피부의 염증 반응으로, 면역학적 병인에 따라 감작기 (afferent phase, induction phase, sensitization)와 유발기 (efferent phase, elicitation phase, challenge)로 나눈다. 감작기에는 표피의 랑게르한스세포와 진피의 수지상세포가 항원과 반응 후 국소 림프절로 이동하고 그곳에서 항원 특이적 T세포에 항원을 제시한다. 이때 T세포

에서 IL-2가 분비됨으로써 많은 항원특이적 T세포가 증식되어 전신순환계로 들어간다. 랑게르한스세포의 성숙과 이동에는 IL-1 β , TNF- α , GM-CSF와 같은 각질형성세포와 랑게르한스세포에서 생산되는 사이토카인이 영향을 미친다. 특정항원에 감작된 후 재차 동일항원과 접촉하면 접촉피부염이 발생하는데 이를 유발기라 한다. 유발기에는 이미 많이 증식된 항원 특이적 기억 T세포가 랑게르한스세포에 의해 국소림프절 뿐 아니라 피부에서도 항원을 제시받아 증식하며 사이토카인이 유리되어 염증반응을 일으킨다^{2,3}. 반면에 ICD는 알레르기 반응과 다른 기전으로 생긴다. 즉 어떤 물리적, 화학적 자극에 의해 표피의 세포손상이 일어나고 자극 받은 각질형성세포에서 사이토카인을 분비하여 염증을 일으킨다^{4,5}. 그러나 랑게르한스세포가 관여하는 감작의 과정은 필요로 하지 않는다^{6,7}.

이와 같이 ACD와 ICD는 병인의 측면에서 서로 다른 질환이나 임상적으로 습진성 질환의 특징인 홍반, 부종, 수포 등의 증상을 나타내며, 병리조직학적으로도 유사한 소견을 보이므로 두 질환의 감별이 어렵다^{6,8}. 그러므로 여러 가지 실험을 통하여 ACD와 ICD를 구별하려는 노력이 있어왔다. 조직학적으로 매우 유사하지만 ICD에서 ACD에 비해 호중구 침윤이 심하다는 보고가 있었다⁹. 면역조직화학 연구에서 랑게르한스세포 수가 ACD에서는 초기에 감소하였다가 회복된다고 하며 ICD에서는 자극물질에 따라 결과가 다르다고 한다. 부속분자(accessory molecule)인 HLA-DR, ICAM-1, B7-1은 ACD에서 모두 표현이 증가하며 ICD에서는 ICAM-1, B7-1은 증가하는데 HLA-DR의 경우 증가한다는 보고도 있고 변화가 없다는 보고도 있다^{10,11}.

사이토카인은 ACD 뿐 아니라 ICD의 발생에 중추적 역할을 한다. 표피의 사이토카인은 각질형성세포, 랑게르한스세포, T세포에서 생성된다³. 케

모카인은 염증부위로 백혈구를 이동시키는 기능을 가진 구조적으로 유사한 사이토카인 그룹이다. 케모카인은 cystein residue의 위치와 거리에 따라 CXC, CC, C, CX3C 등 4개의 subfamily로 나누는데 현재까지 약 50개의 케모카인이 분리되었다. CXC 케모카인은 호중구와 림프구에 대한 주화성을 갖는다. 반면 CC 케모카인은 단구, 호산구, 호염구, 림프구, 수지상 세포, NK 세포 등 다양한 백혈구에 대한 주화성을 가지며 호중구에 대한 주화성은 없다. CC 케모카인중 eotaxin은 호산구와 호염구에 대한 주화성만을 갖고 있는 점이 특징이다. Eotaxin 이외의 CC 케모카인은 T 림프구의 증식과 사이토카인 생산을 촉진시키고 부착분자의 표현을 증진시킨다. CC 케모카인은 특히 알레르기성 염증반응에서 호산구, 호염구, 림프구를 끌어들이는 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. IL-1 α , IL-1 β , GM-CSF 및 TNF- α 등 염증 유발성 사이토카인이 케모카인 생성을 유발하며 Th2 림프구에 의한 생산된 IL-4는 IL-1과 TNF- α 에 의한 케모카인 분비를 촉진시킨다.

염증반응에서 사이토카인의 중요성을 고려하면 ACD와 ICD에서의 사이토카인 발현 양상의 차이는 매우 흥미로운 주제이며 발현의 차이를 보이는 사이토카인은 두 질환을 감별할 수 있는 표지자로 이용될 수 있다. Hoefakker 등¹² 및 Ulfgren 등¹³은 면역조직화학적 방법으로 ACD 및 ICD에서의 사이토카인 발현을 분석하였으나 큰 차이를 발견할 수 없었다. Ryan 등³은 RT-PCR을 이용하여 사이토카인의 mRNA 발현을 분석한 바 ACD에서 IL-2, IL-4, IL-10의 발현이 상대적으로 높다고 하였다. Morhenn 등⁸은 소량의 RNA 정량이 가능한 RNA 분해효소 보호분석법(RPA)을 이용하여 접촉피부염에서의 사이토카인 발현을 분석하고 IL-4가 ACD에서 많이 발현함을 보고하였다. Lisby 등¹⁴에 의하면 ACD와 ICD에

서 모두 증가하는 사이토카인은 IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF 등 이라고 하였다.

ACD와 ICD를 구분할 수 있는 사이토카인을 찾는 연구는 두 질환의 병인을 이해하는 데 도움이 되고 접촉피부염을 일으키는 어떤 물질이 ACD와 ICD 중 어느 접촉피부염을 일으키는지 보다 정확히 알 수 있고 접촉피부염의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있기 때문에 중요하다. 그러나 현재까지의 연구는 한정된 사이토카인을 대상으로한 단편적인 연구가 대부분이며 그 결과도 일정치 않아서 많은 종류의 사이토카인을 대상으로한 실험이 필요한 실정이다. 특히 케모카인에 대한 분석은 CXC 케모카인인 IP-10, MIP-2 및 IL-8 이외에는 없었다. 또한 대부분의 연구가 표피와 진피를 구분하지 않고 시행되었기 때문에 어떤 세포에서 생성된 사이토카인이 영향을 미치는지 잘 알 수 없었다. 본 연구에서는 ACD와 ICD에서 표피세포에서 발현되는 사이토카인과 케모카인의 mRNA 및 단백 발현 양상의 차이를 비교함으로써 두 접촉피부염을 구별할 수 있는 표지자를 찾아보고 그 발생 기전을 이해해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 접촉피부염 유발

ACD의 유발은 Balb/c 마우스의 털을 제거한 복부에 acetone과 olive oil을 4:1로 섞은 용액에 녹인 0.5% 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 $50\mu\text{l}$ 씩 도포하여 감작(sensitization)시키고 감작 5일째 마우스의 양쪽 귀에 0.2% DNFB를 $30\mu\text{l}$ 씩 도포하여 알레르기성 접촉피부염을 유발(challenge)시키고 24시간, 48시간 후에 귀를 분리하여 각각 표본을 얻었다. 한편 ICD는 acetone에 녹인 5% benzalkonium chloroide (BKC) (Sigma)를 마우스의 양쪽 귀에 $30\mu\text{l}$ 씩 이틀간 연속 두 차례 도포하고 24시간, 48시간 후에 각각 표본을 얻었다. 정상마우스의 귀와 접촉피부염이 유발된 마우스 귀의 두께를 engineer's micrometer (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이상과 같이 얻은 마우스 귀를 연골을 중심으로 반으로 가른 후 20mM EDTA/PBS에 37°C에서 1시간 저장하여 표피와 진피를 forcep을 이용하여 분리하고 표피를 RNA later 용액 (Ambion, Austin, TX, USA)에 넣고 -20°C에 보관하였다.

2. 역전사효소 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

표피 조직에서 Acid-guanidium thiocyanate-phenol chloroform(AGPC)를 응용한 Trizol reagent(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하

여 RNA를 추출하였다. 분리한 RNA를 formaldehyde denaturing gel에 전기 영동하여 28s, 18s band를 확인하고 GeneQuant RNA/DNA calculator(Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용해 정량하여 최종 농도를 표본마다 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 일정하게 임의 조정하였다. RT-PCR kit (TaKaRa, Otsu, Japan)를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. cDNA 증폭조건을 간단히 기술하면 94°C 에서 30초간 denature하고 60°C 에서 30초간 annealing한 다음 72°C 에서 1분 30초간 extension 하였으며 이를 35주기 반복하였다. PCR 산물을 4% Nusieve 3:1 agarose gel(FMC, Rockland, ME, USA)로 전기영동한 후 digital camera(Kodak, Rochester, NY, USA)로 촬영하였으며 이를 image analysis software인 BIO-CAPT(Vilber Lourmat, France)를 이용해서 발현양을 비교 분석하였다. 이때 모든 조직에서 발현되는 house keeping gene인 GAPDH를 control로 사용하였다. RT-PCR을 시행한 사이토카인 종류 및 primer는 표1과 같다.

표 1. 사이토카인 및 케모카인 primer 염기서열

cytokine	primer sequence(5' to 3')	chemokine	primer sequence(5' to 3')
IL-1 α	5'primer CTCTAGAGCACCATGCTA CAGAC 3'primer TGGAAATCCAGGGGAAAC ACTG	IP-10	5'primer CCTATCCTGCCCACGTG TTGAG 3'primer CATCCTGCAGGAGGAGT AGCAG
IL-1 β	5'primer TGAAGGGCTGCTTCCAAA CCTTTGAC 3'primer TGTCCATTGAGGTGGAGA GCTTTCAGC	KC	5'primer ATAACGCGTATGCAGC GCCTATCGCCAATGAG CTG 3'primer CCAGATCTTACTTGGGG ACACCTTT
IL-2	5'primer TGATGGACCTACAGGAGC TCCTGAG 3'primer GAGTCAAATCCAGAACAT GCGGCAG	RANTES	5'primer ATAACGCGTATGCATCA CCATATGGCTCGGAC 3'primer CCAGATCTAGCTCATCT CCAAATAG
TNF- α	5'primer GGCAGGTCTACTTTAGAG TCATTGC 3'primer ACATTCGAGGCTCCAGTG AATTCGG	MIP-2	5'primer GAAGTCATAGCCACTCT CAAGGGC 3'primer CAACTCACCTCTCCCC AGAAAC
IFN- γ	5'primer AGCGGCTGACTGAACTCA GATTGTAGCTTGTACCTT TACTTCACTG 3'primer GTCACAGTTTTCAGCTGT ATAGGG	Eotaxin	5'primer AGAGCTCACAGCGCTTC TATT 3'primer GGTGCATCTGTTGTTGG TGATT
IL-4	5'primer CCAGCTAGTTGTCATCCT GCTCTTCTTTCTCG 3'primer CAGTGATGTGGACTTGGA CTCATTTCATGGTGC	TARC	5'primer CAGGAAGTTGGTGAGCT GGTATA 3'primer TTGTGTTTCGCTGTAGT GCATA
IL-5	5'primer ATGACTGTGCCTCTGTGC CTGGAGC 3'primer CTGTTTTTTCCTGGAGTAA ACTGGGG	JE	5'primer ATAACGCGTATGCACAG CCAGATGCAGTTAACGC C 3'primer CCAGATCTCTAGTTTAC TGTCACACT
IL-6	5'primer TGGAGTCACAGAAGGAGT GGCTAAG 3'primer TGTGACCACAGTGAGGAA TGTCCAC	GAPDH	5'primer CATCTTCCAGGAGCGAG ACC 3'primer GTGGATGCAGGGATGAT GTT
IL-10	5'primer AGACTTTCTTTCAAACA AAGGACCAGCTGGA 3'primer CCTGGAGTCCAGCAGACT CAATACACACTGC		
IL-12p40	5'primer GAATCATAATGGCGAGAC TCTG 3'primer GTATAGTGAATATGAGA GAAG		
IL-18	5'primer ACTGTACAACCGCAGTAA TACGG 3'primer AGTGAACATTACAGATT TATCCC		
TGF- β 1	5'primer TGGACCGCAACAACGCCA TCTATGAGAAAACC 3'primer TGGAGCTGAAGCAATAG TTGGTATCCAGGGCT		

3. RNA 분해효소 보호분석법 (RPA)

RPA는 RiboQuant kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 사용하여 시행하였다. 약술하면 multi-probe template set mCK-5을 사용하여 GACU pool 1 μ l, DTT 2 μ l, 5 $\times$ transcription buffer 4 μ l, RNasin 1 μ l, T7 polymerase 1 μ l, [α -32P] UTP 10 μ l를 넣어 in vitro transcription으로 α -32P label된 RNA probe를 제작하였다. 만들어진 probe와 표피에서 추출한 RNA를 56 $^{\circ}$ C에서 12~16시간 hybridization 시킨 후 RNase로 처리하여 hybridization이 되지 않은 RNA를 제거시켰다. Proteinase K cocktail을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 phenol, chloroform을 가하여 잘 섞고 원심분리하여 상등액만 취하여 새 tube로 옮겼다. 4 M ammonium acetate와 100% ethanol을 넣어 원심분리하고 얻어진 pellet을 완전히 말린 후 1 $\times$ loading buffer에 녹여서 5% denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하고 그 패턴은 autoradiography로 확인하였다.

4. 면역조직화학염색

귀를 생검하여 6 μ m두께로 냉동 절편을 만들어 실온에서 1시간 건조시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하고 사용하였다. 조직 슬라이드는 methanol과 acetone이 1:1 섞인 용액에 -20 $^{\circ}$ C에서 5분간 고정 한 후 1:40으로 희석한 일차항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양 하였다. 면역조직화학염색에 사용한 일차항체는 IL-1 α (sc-1279), IL-4(sc-1260), IL-10(sc-1783), IL-12p40(sc-1283), IP-10(sc-1406), MIP-2 (sc-1388), eotaxin(sc-6183), RANTES(sc-1410)으로서 모두 마우스 사이

토카인에 대한 염소의 다클론항체이다. 이차항체염색을 LSAB plus kit (DAKO, Copenhagen, Denmark)를 이용하여 시행하고 발색은 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)로 하며 hematoxylin 염색으로 counter stain하였다. 판독은 염색정도에 따라 음성, 경도, 중등도로 판독하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 접촉피부염 유발

가. 귀부종 측정결과

각각 3마리의 Balb/c 마우스 양측귀에 ACD와 ICD를 유발시키고 6개 귀의 귀부종을 측정한 결과 평균적인 귀부종은 도표 2, 3과 같았다.

표2. ACD 유발에서의 귀부종 측정결과

Date	Procedure	ear thickness
D0	Sensitization	0.27mm
D1		
D2	Sample (S)	0.34mm
D3		
D4		
D5	Challenge	
D6	Sample (A ₁)	0.55mm
D7	Sample (A ₂)	0.55mm

표3. ICD 유발에서의 귀부종 측정결과

Date	Procedure	ear thickness
D0	5% BKC	0.27mm
D1	5% BKC	
D2	Sample (I ₁)	0.45mm
D3	Sample (I ₂)	0.50mm

나. 귀조직 검사

ACD와 ICD를 유발시킨 후 조직검사를 시행한 결과 정상에 비해 진피에 심한 부종이 관찰되었고 표피 및 진피에 많은 림프구 및 호중구의 침윤이 있었다. ICD에서 ACD에 비해 보다 많은 호중구가 침윤된 것을 관찰할 수 있었으며 ACD에서 호산구의 침윤도 관찰되었다(그림1).

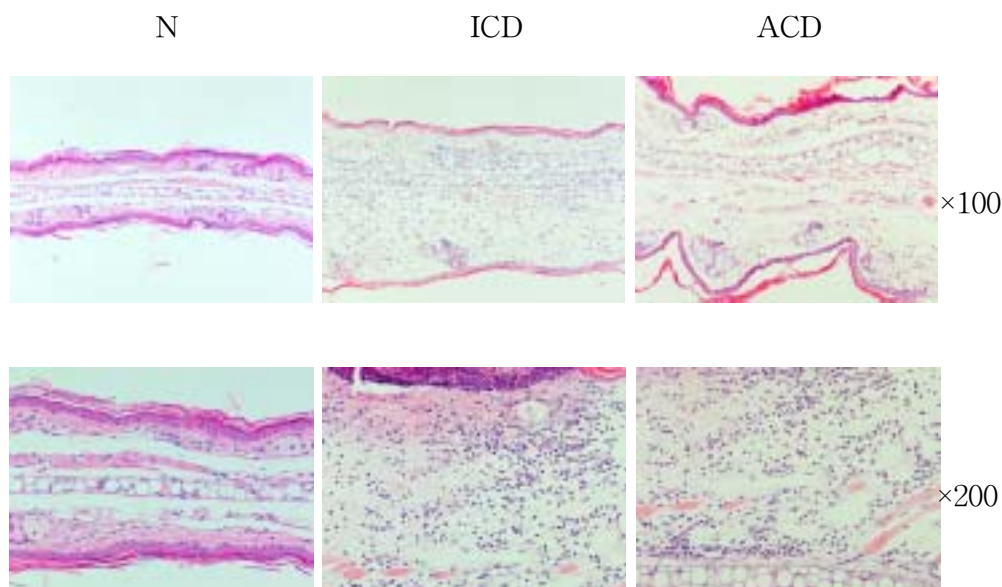


그림1. 정상 및 접촉피부염이 유발된 마우스 귀의 조직검사 소견 (H&E 염색). 정상 마우스 귀에 비해 ICD와 ACD가 유발된 마우스 귀는 매우 부종이 심하였고 많은 염증세포 침윤이 관찰되었다. ACD에 비해 ICD에서 많은 호중구의 침윤이 관찰되었으며 ACD에서 호산구의 침윤도 관찰할 수 있었다.

2. 역전사효소 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

ACD 및 ICD를 유발시킨 마우스 귀의 표피에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행한 결과는 그림2 및 표4, 5와 같다. 사이토카인중 IL-1 α 와 TGF- β 1은 정상표피를 포함한 모든 샘플에서 검출되어 각질형성세포에서 내재적으로 생성되는 사이토카인임을 알 수 있었다. 그러나 IL-1 α 는 ACD의 경우 약간 발현이 증가되었다. IL-5와 IL-6은 정상을 포함한 ACD와 ICD에서 모두 발현되었으며 각 실험군간 별다른 차이가 없었다. ACD와 ICD 모두에서 발현이 증가되는 사이토카인은 TNF- α , IL-12p40, IL-18이었고 ACD에서만 증가되는 사이토카인은 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10이었다. 케모카인중 CXC 케모카인인 IP-10, KC, MIP-2는 ACD와 ICD에서 모두 발현이 증가되었다. CC 케모카인인 eotaxin, TARC, RANTES, JE는 모두 ACD에서만 발현이 증가되었다. 이 결과는 ACD에서 호산구 침윤을 보이는 조직학적 소견을 설명해 줄 수 있는 단서라고 생각된다. 각 mRNA양을 정량하기 위하여 band의 강도를 densitometer로 측정하고 각 band의 강도는 house keeping gene인 GAPDH에 대한 mRNA band의 측정값에 대한 상대값으로 환산하여 서로 비교하였다(그림3).

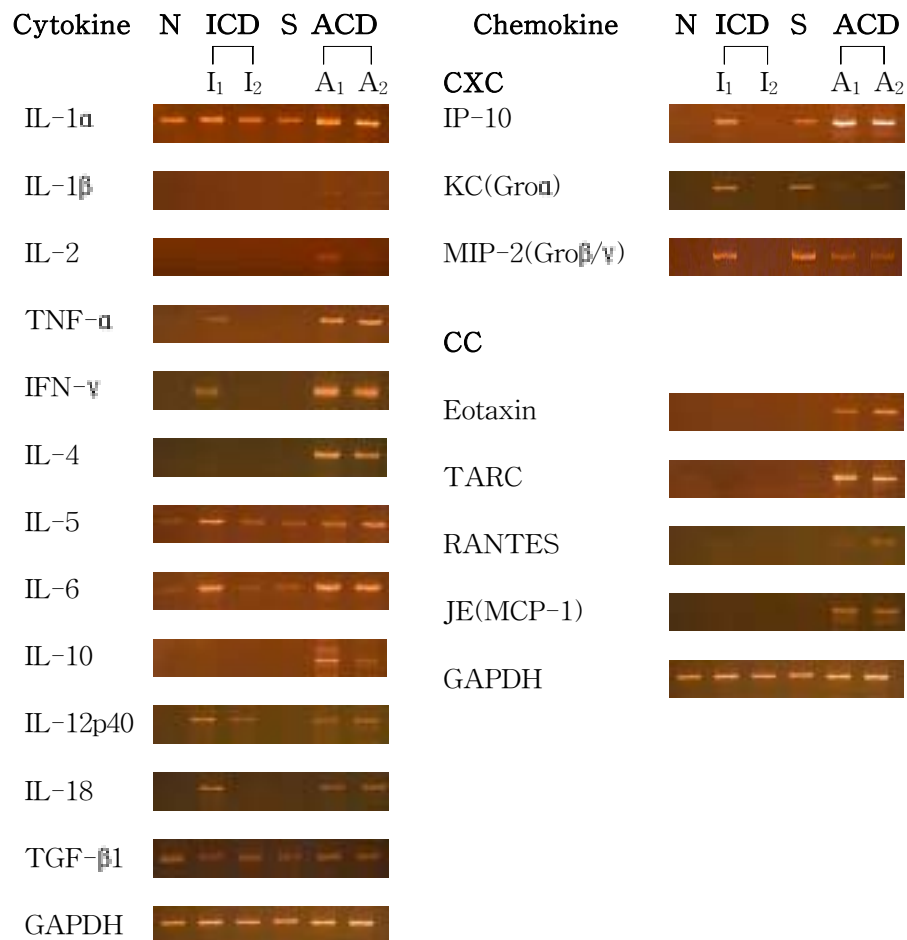
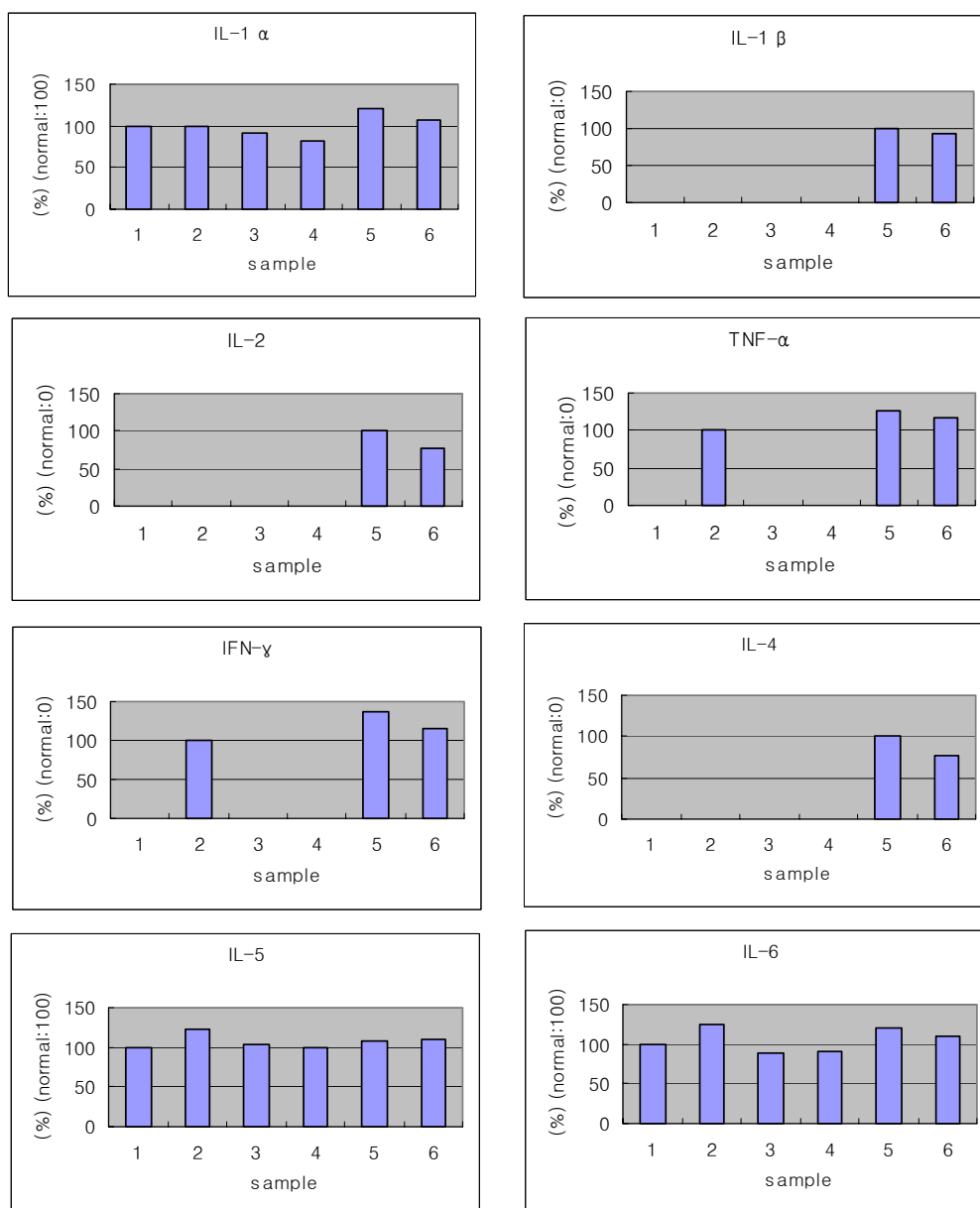
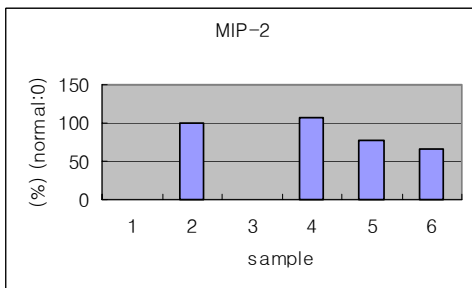
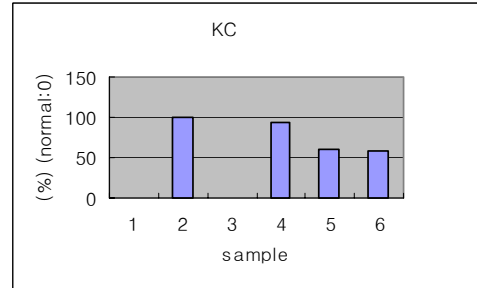
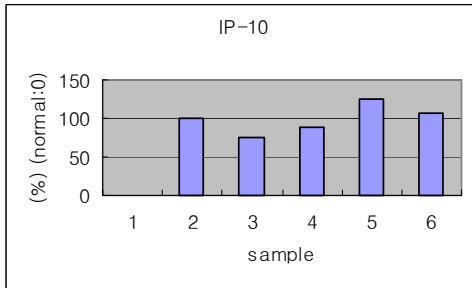
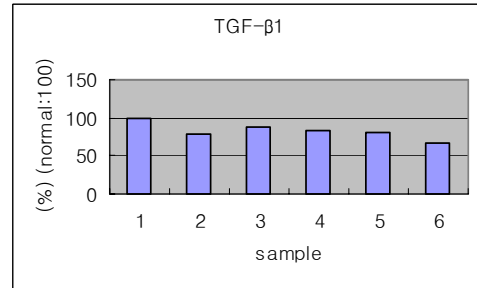
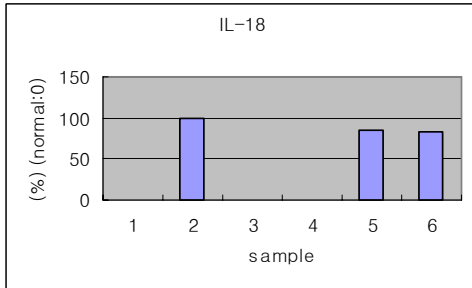
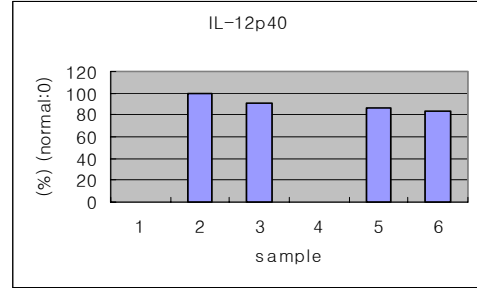
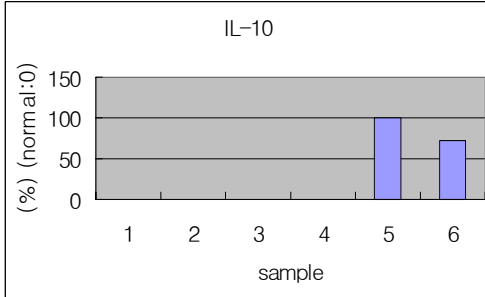


그림2. 정상(N), 자극성 접촉피부염(ICD), 감작(S), 알레르기성 접촉피부염(ACD)을 일으킨 마우스 표피에서의 사이토카인 mRNA 발현

그림 3. Densitometer로 측정한 각 사이토카인 mRNA 정량치 (1:naive, 2:ICD₁, 3:ICD₂, 4:sensitization, 5:ACD₁, 6:ACD₂)





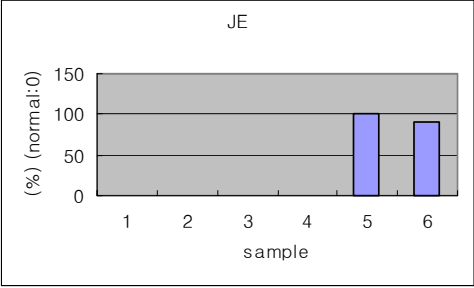
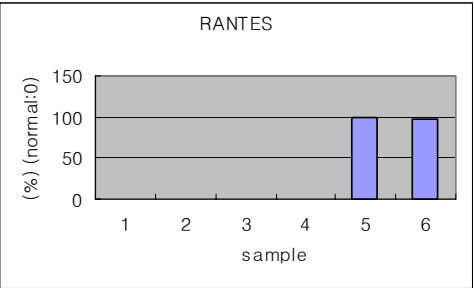
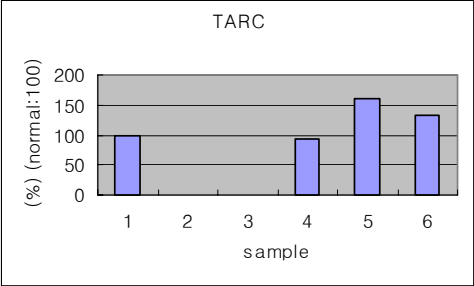
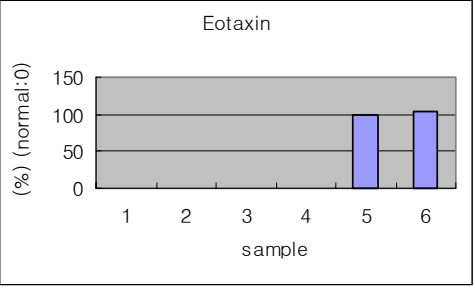


표4. ACD와 ICD에서 표피내 사이토카인의 발현변화

사이토카인	ICD	ACD
IL-1 α	→	→
IL-1 β	→	↑
IL-2	→	↑
TNF- α	↑	↑
IFN- γ	↑	↑
IL-4	→	↑
IL-5	→	→
IL-6	→	→
IL-10	→	↑
IL-12 P40	↑	↑
IL-18	↑	↑
TGF- β	→	→

표5. ACD와 ICD에서 발현되는 표피내 케모카인

케모카인	ICD	ACD
CXC		
IP-10	↑	↑
KC (Gro α)	↑	↑
MIP-2	↑	↑
CC		
Eotaxin	→	↑
TARC	→	↑
RANTES	→	↑
JE (MCP-1)	→	↑

3. RNA 분해효소 보호분석법 (RPA)

RPA를 이용하여 10가지 케모카인 mRNA를 정량분석한 결과 CXC 케모카인인 MIP-2만 ICD와 ACD에서 발현되었고 CC 케모카인인 MIP-1 α , MCP-1, MIP-1 β , TCA-3는 ACD에서만 발현되었다. RPA와 결과도 RT-PCR 결과와 비슷하게 CXC 케모카인이 ACD 뿐 아니라 ICD에서도 증가됨을 보여주었다.

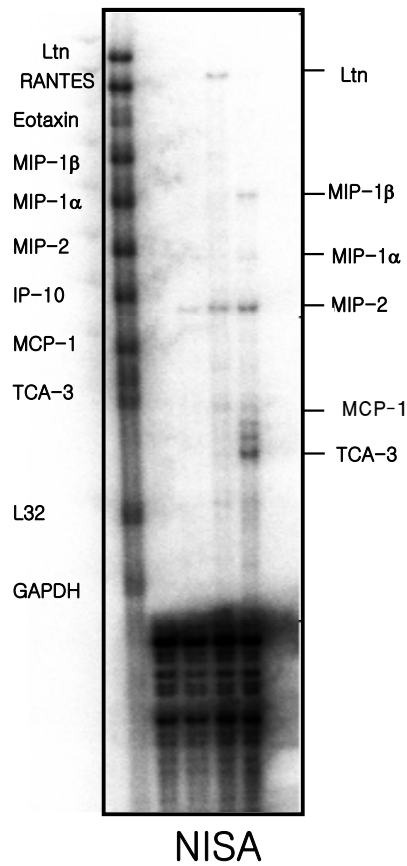


그림4. 정상(N), 자극성 접촉피부염(I), 감작(S), 알레르기성 접촉피부염(A)을 일으킨 마우스 표피의 케모카인 mRNA를 RPA로 측정된 결과

4. ACD와 ICD에서의 사이토카인 면역조직화학염색 소견

ACD와 ICD를 유발시킨 마우스 귀를 냉동절편을 만들어 사이토카인 면역조직화학염색한 결과 양성인 경우 세포표면 보다는 세포질에 염색되는 양상을 보였다. IL-1 α 는 정상과 ICD에서도 경도로 발현되었으나 ACD에서 발현이 중등도로 증가되었고 IL-4는 ACD에서 발현이 중등도로 증가되었고 IL-10과 IL-12p40는 ACD에서 중등도로 발현이 증가되었으나 ICD에서도 경도로 발현이 증가되었다(그림5). IP-10과 MIP-2는 ICD와 ACD에서 발현이 경도로 증가되었고 eotaxin과 RANTES는 ACD에서 발현이 중등도로 증가되었다(그림6).

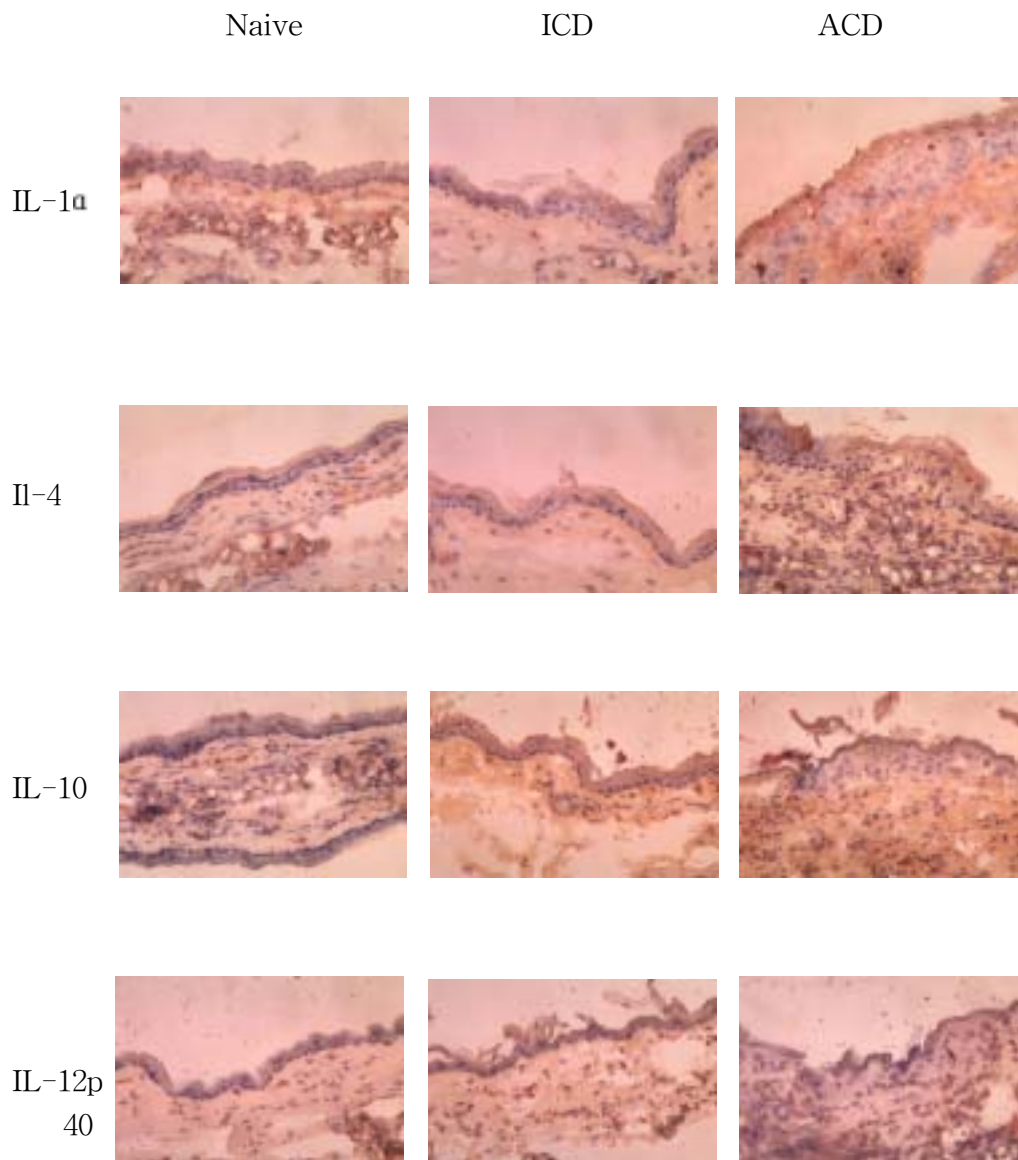


그림5. ACD와 ICD가 유발된 마우스 귀조직에서의 사이토카인 발현

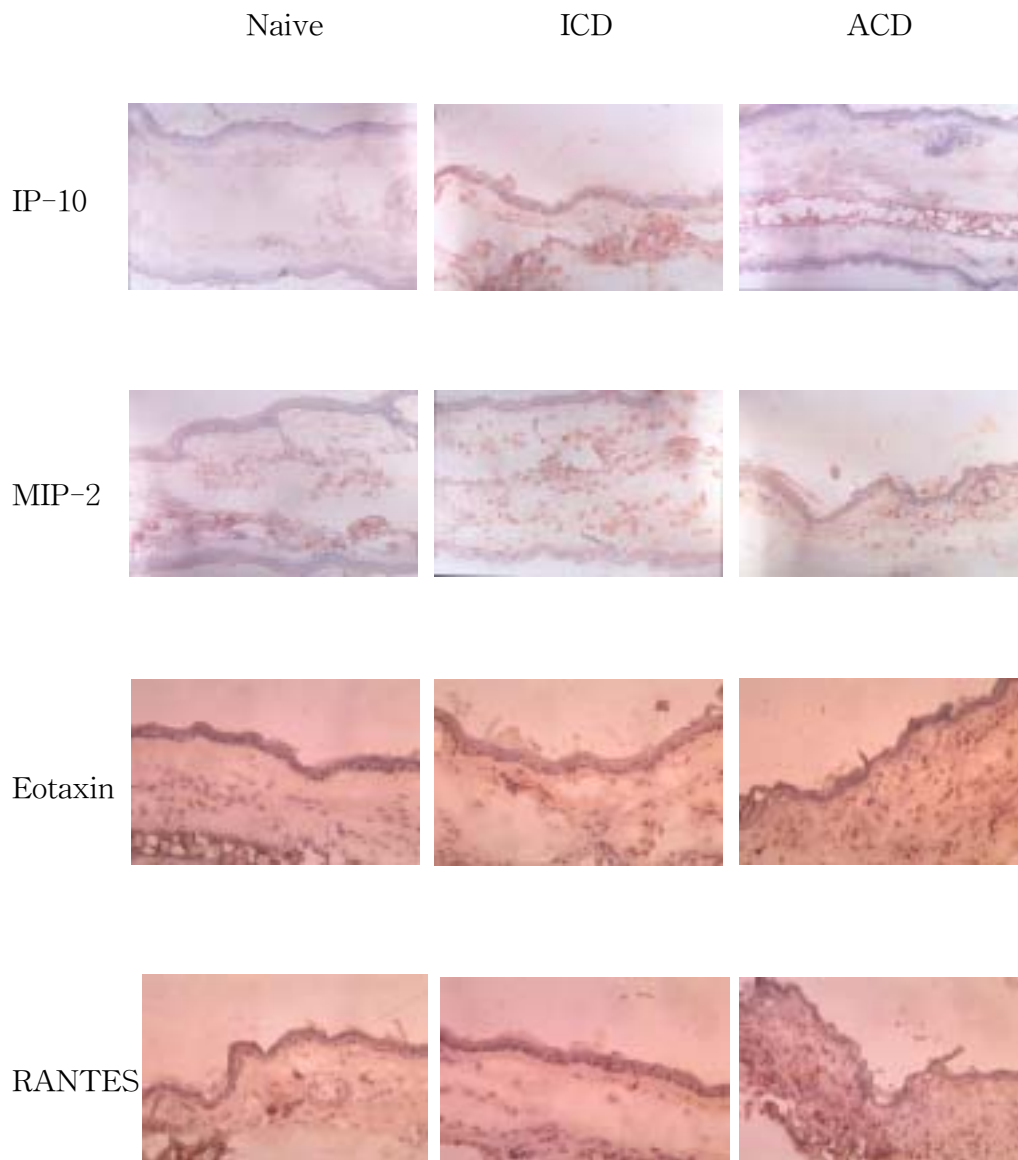


그림6. ACD와 ICD가 유발된 마우스 귀조직에서의 케모카인 발현

IV. 고 찰

ACD는 매우 작은 지용성 물질인 hapten에 의한 감각에 의해 피부에 염증을 일으키는 일종의 지연성 과민반응이다. ICD는 독성물질에 의한 급성 노출에 의해서든지 경한 자극물질에 의한 만성노출에 의해서 유발된다. ICD를 일으키는 물질은 표피단백을 응고시키는 산 (acid), 피부표면의 지질을 제거시키는 알칼리, 유기용매 또는 계면활성제, 표피상태를 변화시키는 산화제 등이 있다. 본 실험에서는 ACD를 유발하기 위하여 강한 감작능력을 지닌 hapten인 DNFB를 사용하였고 ICD를 유발하기 위하여 국소 소독제로 쓰이는 detergent인 BKC를 사용하였는데 DNFB와 BKC에 의한 염증반응 정도가 귀부종 측정결과로 관찰하여 비슷하므로 ACD와 ICD를 비교하기에 알맞은 실험물질로 판단되었다.

ACD는 특히 경한 ICD와 임상적으로 잘 구분이 안된다^{12,14}. 또한 조직학적으로 비슷하나 호중구 침윤이 ICD에서 더 현저하다는 보고가 있다⁹. 본 실험에서도 DNFB에 의한 ACD에서 보다 BKC에 의한 ICD에서 호중구 침윤이 더 많이 나타남을 확인할 수 있었으며 ACD에서 호산구의 침윤을 관찰할 수 있었다.

ACD와 ICD의 근본적인 발생기전상의 차이는 랑게르한스세포와 진피 수지상세포가 hapten 특이 Th세포에 항원을 전달하여 T세포의 증식이 일어나는 과정이 ACD에는 있으나 ICD에는 없다는 점이다. 그러나 ACD와 ICD는 임상 및 조직소견상 매우 유사하기 때문에 두 접촉피부염을 구분하려는 목적으로 사이토카인과 부착분자 및 부속분자(accessory molecule) 등의 발현양상을 비교하는 연구가 이루어져 왔다. 사이토카인 mRNA 발현을 보기 위해서는 역전사효소 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용한 연구

가 주로 이루어져 왔다. 지금까지의 연구결과를 살펴보면 TNF- α , IFN- γ , IL-2, GM-CSF는 ACD와 ICD 모두에서 증가되었고 IL-1 α 는 실험에 따라 그 결과가 일정치 않았다^{12,15-18}. IL-1 β 는 ACD에서는 증가하였으며 ICD에서는 변화가 없는 경우도 있었고 증가한 경우도 있었다^{15,19,20}. IL-4와 IL-6는 ACD에서 증가하였으나 ICD의 경우 연구결과가 없다²¹⁻²³. IL-10과 IL-12는 ACD에서 증가되었고 ICD에서 변화가 없었으며 IL-15나 IL-18은 측정된바 없다^{24,25}. 케모카인 mRNA 발현은 CXC 케모카인인 IP-10, MIP-2과 IL-8에 대한 연구만이 보고되었는데 IP-10과 MIP-2는 ACD에서 증가하였고 ICD에서는 변화가 없었다고 하였다¹⁵. IL-8은 ACD의 경우 변화가 없었고 ICD의 경우 측정된 바 없다¹⁶. 그러나 이전의 연구는 매우 한정된 사이토카인을 대상으로 한 연구가 대부분이며 그 결과 또한 일정치 않다. 그러므로 본 연구에서는 마우스 피부에 ACD와 ICD를 유발시키고 표피만을 분리하여 표피세포에서의 여러가지 사이토카인과 케모카인의 발현을 비교하였다. 표피는 대부분 각질형성세포로 구성되어 있으나 약간의 랑게르한스세포와 T세포 또한 포함되어 있기 때문에 본 실험에서 시행한 RT-PCR 결과는 대부분 각질형성세포에서 생성된 사이토카인 이지만 랑게르한스세포나 T세포에서 생성된 사이토카인 가능성도 있다.

IL-1 α 는 각질형성세포에서 생산되는데 정상적으로도 각질형성세포는 미리 형성된 IL-1 α 를 가지고 있으며 약한 자극에도 IL-1 α 가 분비된다. IL-1 α 는 화학적, 물리적 자극이나 자외선, IL-1, TNF- α 나 IL-6 등의 사이토카인에 의해서도 생산이 증가된다. IL-1 α 는 뇌하수체를 자극하여 발열을 유발시키고 NF-kB를 활성화시키기 때문에 IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF 등의 사이토카인과 케모카인의 생산을 자극하는 효과가 있다. 또는 IL-1은 각질형성세포의 증식을 자극하여 상처치유에 관여한다고 생각

된다. Enk와 Katz¹⁵는 알레르기성 접촉피부염의 감작기에 IL-1 α 발현이 증가하지만 ICD에서는 변화가 없었다고 하였고 Corsini 등¹⁷은 ICD에서도 IL-1 α 의 발현이 증가된다고 하였으나 본 연구에서는 IL-1 α 가 정상 각질형성세포에서도 상당량 발현이 되어있었으며 ICD에서는 변화없었고 ACD에서 약간 발현이 증가되어 있었으나 큰 의미는 없었다 IL-1 β 는 표피에서 주로 랑게르한스세포에서 생산되며 각질형성세포에서도 약간 생성된다. IL-1 β 와 TNF- α 는 랑게르한스세포의 이동에 역할을 하는 사이토카인이다. Enk와 Katz¹⁵는 ACD의 감작기에 IL-1 β 가 증가하고 ICD에서는 변화가 없다고 하였으며 Brand 등¹⁹과 Zepter 등²⁰은 IL-1 β 가 ACD와 ICD 모두에서 증가한다고 하였다. 본 실험에서는 ACD에서만 증가하여 IL-1 β 가 ACD와 ICD를 구분할 수 있는 표지자로서 생각되었다. IL-1 β 가 ACD에서만 증가하는 것은 이론적으로도 합당하다고 생각된다. 왜냐하면 ACD의 경우 ICD에 비해 랑게르한스세포 자극이 일어나며 자극 받은 랑게르한스세포에서 IL-1 β 가 분비된다고 생각되기 때문이다.

IL-2는 각질형성세포에서 생성되지는 않고 림프구에서 생성되는 사이토카인으로서 주로 T세포의 증식을 자극한다. Hoefakker 등¹²에 의하면 IL-2가 ACD와 ICD 모두에서 증가되었다고 하였는데 본 실험에서는 ACD에서만 증가하였다. 이 결과는 ACD의 유발기에 표피에 침윤된 활성화된 T세포가 랑게르한스세포로부터 항원을 제시받아 IL-2를 분비하는데 반해 ICD에서는 표피에 침윤된 T세포가 많지 않을 뿐 아니라 그 역할이 크지 않다고 추측된다.

TNF- α 는 각질형성세포에서 생성되며 IL-1 β 와 함께 랑게르한스세포를 이동시키는 역할을 한다. 또한 NF- κ B를 활성화하여 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF- α 등의 사이토카인 생성을 증가시킨다. 본 실험에서는

TNF- α 가 ACD와 ICD 모두에서 증가하였는데 이는 Hoefakker 등¹²의 결과와도 일치하였다.

IFN- γ 는 주로 림프구에서 생성되어 HLA-DR과 ICAM-1의 표현을 증가시키고 IP-10과 Mig 등의 케모카인 생성을 유발시키며 Fas를 표현시킴으로써 세포고사를 일으키는 등의 작용을 가진 사이토카인으로서 각질형성세포에서도 생성될 수 있음이 밝혀진바 있다¹⁶. Hoefakker 등¹²은 ACD와 ICD 모두에서 IFN- γ 가 증가한다고 하였으며 본 실험에서도 ACD와 ICD 모두에서 증가하였다.

IL-4는 T세포를 Th2 세포로 분화시키는 사이토카인이며 B 세포를 자극하여 IgG1과 IgE를 생성하도록 한다. Th2 세포뿐 아니라 각질형성세포에서도 생성된다. 또한 호산구를 끌어당기는 혈관내피세포의 부착분자 발현을 유도한다. Asada 등²¹과 Rowe와 Bunker²²는 IL-4가 ACD에서 증가된다고 하였으나 ICD에서의 연구는 없었다. 본 실험에서는 ACD에서만 발현이 증가되었다. IL-5는 호산구를 자극하는 사이토카인으로서 이 역시 각질형성세포에서 생성될 수 있다. 접촉피부염에서 IL-5 생성에 대한 연구는 아직 없다. 본 실험에서는 별 변화를 관찰할 수 없었다. IL-6는 B세포를 자극하여 IgG, IgM, IgA 생성을 증대시키며 Th2 세포로의 분화를 촉진시킨다. 본 실험에서는 ACD와 ICD 모두에서 약간 생성이 증가하였으나 큰 의미는 없는 것으로 생각된다.

IL-10은 대표적인 항염증성 사이토카인으로서 Th2 세포와 B 세포에서 생성되지만 각질형성세포에서도 생성된다. IL-10은 Th1 면역반응을 억제시킨다. 자외선을 조사하면 각질형성세포에서 IL-10이 생성됨으로써 면역억제가 일어난다. Enk와 Katz²⁴는 IL-10이 ACD에서 증가되었으나 ICD에서는 변화가 없었다고 하였으며 본 실험에서도 IL-10은 ACD에서만 증가

하였다. 임상에서 시간이 경과함에 따라 ACD 반응의 강도가 약해지는 것을 관찰할 수 있는데 이때 IL-10이 염증을 가라앉히는데 중요한 역할을 하는 것으로 해석된다. 그러나 ICD는 ACD에서와 같은 T세포의 활성화와 증폭에 의한 반응이 크지 않기 때문에 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 생성이 관여하지 않는 것 같다.

IL-12는 35kD(p35)와 40kD(p40)의 subunit가 disulfide 본드로 연결되어 있는 사이토카인으로서 p35 subunit는 기본적으로 세포에서 생성되지만 p40 subunit는 자극이 있을 때 생성된다. IL-12는 Th세포가 Th1세포로 분화되도록 유도하며 IFN- γ 를 분비하도록 한다. Muller 등²⁵에 의하면 ACD에서 IL-12가 증가되고 ICD에서 변화가 없다고 하였다. 본 실험에서는 ACD와 ICD 모두에서 생성이 증가되었다. IL-18는 IL-12와 마찬가지로 Th1 세포나 NK 세포로부터 IFN- γ 분비를 유도한다. 아직까지 접촉피부염에서 IL-18 생성에 관한 연구는 없었다. 본 실험결과 ACD와 ICD 모두에서 IL-18의 생성이 증가되었다.

CXC 케모카인은 주로 호중구와 림프구에 대한 주화성을 갖는데 Enk와 Katz¹⁵에 의하면 ACD에서 증가하였고 ICD에서는 변화가 없다고 하였으나 본 실험결과에 의하면 ACD와 ICD 모두에서 증가하였다. Howie 등¹⁶이 사람에서 시행한 연구에 의하면 IL-8이 ACD에서 변화 없었다고 하였다. 마우스에서는 IL-8과 동일한 사이토카인은 없으나 사람의 Gro α 에 해당하는 KC가 IL-8과 유사한 사이토카인으로 인정받고 있다. 본 실험결과에 의하면 KC 역시 ACD와 ICD 모두에서 증가하였다. 일반적으로 ICD에서 많은 호중구침윤이 관찰되는데 ICD에서 많은 CXC 케모카인이 생성된다는 본 실험의 결과가 이를 뒷받침한다고 생각된다.

CC 케모카인은 단구, 호산구, 호염구, 림프구, NK 세포 등 다양한 세포

에 대한 주화성을 가지며 특히 eotaxin은 호산구와 호염구에 대한 주화성만을 가지고 있는 것이 특징이다. 아직까지 접촉피부염에서 CC 케모카인 생성에 대한 연구는 없었으며 본 실험결과 eotaxin, TARC, RANTES, JE(MCP-1) 등 모든 CC 케모카인이 ACD에서만 발현이 증가되었다. 이 결과는 ACD에서 호산구침윤이 잘 관찰될 수 있다는 조직검사 소견을 뒷받침하는 증거로 생각된다.

RT-PCR 결과 ACD와 ICD에서 CXC와 CC 케모카인의 발현차이가 있으므로 좀더 정량적인 분석법으로 이를 확인하고자 RNA 분해효소 보호분석법(RPA)으로 케모카인의 발현을 분석하였다. 그 결과 RT-PCR의 결과와 비슷하게 CXC 케모카인인 MIP-2만 ACD와 ICD에서 발현되었고 CC 케모카인인 MIP-1 α , MCP-1, MIP-1 β , TCA-3는 ACD에서만 발현되었다.

본 실험의 결과에 의하여 유발기의 ACD와 ICD에서의 사이토카인 생성양상을 도식화하여 설명하면 그림7 및 8과 같다. 즉 ACD에서는 hapten이 랑게르한스세포와 만나면 랑게르한스세포에서 IL-1 β 와 TNF- α 가 분비되면서 T세포에 항원을 제시하고 또한 hapten이 각질형성세포를 자극하여 각질형성세포에서 IL-1 α , IFN- γ 가 분비된다. T세포에서 분비된 IL-2, IFN- γ 와 각질형성세포에서 분비된 IL-1 α , IFN- γ 에 의하여 또다른 각질형성세포에서 TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, KC, IP-10, MIP-2, eotaxin, TARC, RANTES, JE 등을 분비하여 림프구, 호산구, 호중구, NK세포, 단구 등이 피부에 침윤된다. ICD에서는 자극물질이 각질형성세포를 자극하여 각질형성세포에서 TNF- α , IFN- γ 등이 분비되며 TNF- α 와 IFN- γ 가 다른 각질형성세포를 자극하여 IL-12, IL-18, IP-10, KC, MIP-2 등이 분비되며 림프구, 호중구, NK세포 등이 피부에 침윤된다.

ACD와 ICD에서 사이토카인 단백질의 발현차이를 분석하기 위한 방법으로 서면역조직화학염색을 시행하였다. 상품화되어 있는 마우스 사이토카인에 대한 항체는 제한되어 있기 때문에 사이토카인중 IL-1 α , IL-4, IL-10, IL-12와 케모카인중 IP-10, MIP-2, eotaxin, RANTES를 시행할 수 있었다. IL-4, IL-10, IL-12 등이 정상이나 ICD보다 ACD에서 발현이 증가된 양상을 보였고 IP-10과 MIP-2는 ICD와 ACD 모두에서 발현이 증가되었으며 eotaxin과 RANTES는 ACD에서 발현이 증가된 양상을 보였으나 뚜렷한 차이를 보여주지는 못했다. RT-PCR 등의 mRNA 측정법에 비해 서면역조직화학 염색에 의한 단백질 발현측정이 어려운 이유는 첫째, 항체가 서면역조직화학 염색에 적합치 못한 경우가 많고 둘째, 사이토카인은 아주 작은 분자량의 분비되는 단백질이기 때문에 구조단백에 비하여 염색에 어려움이 있을 수 있기 때문으로 생각된다.

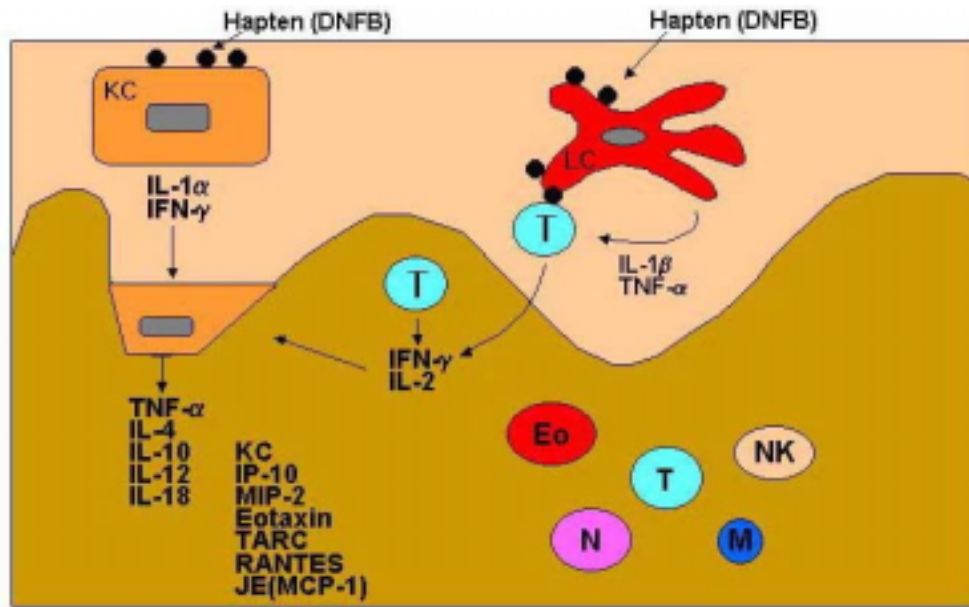


그림7. 알레르기성 접촉피부염 유발기에서의 표피내 사이토카인 생성과 염증세포 침윤.

ACD에서는 hapten이 랑게르한스세포와 만나면 랑게르한스세포에서 IL-1 β 와 TNF- α 가 분비되면서 T세포에 항원을 제시하고 또한 hapten이 각질형성세포를 자극하여 각질형성세포에서 IL-1 α , IFN- γ 가 분비된다. T세포에서 분비된 IL-2, IFN- γ 와 각질형성세포에서 분비된 IL-1 α , IFN- γ 에 의하여 또다른 각질형성세포에서 TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, KC, IP-10, MIP-2, eotaxin, TARC, RANTES, JE 등을 분비하여 림프구, 호산구, 호중구, NK세포, 단구 등이 피부에 침윤된다.

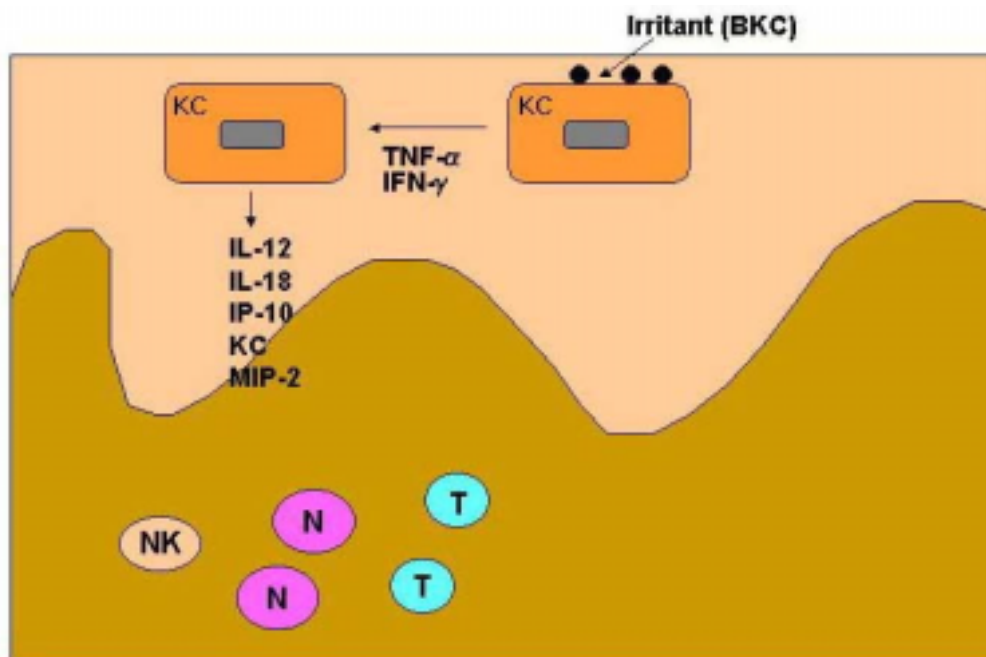


그림8. 자극성 접촉피부염에서의 표피내 사이토카인 생성과 염증세포 침윤.
ICD에서는 자극물질이 각질형성세포를 자극하여 각질형성세포에서 TNF- α , IFN- γ 등이 분비되며 TNF- α 와 IFN- γ 가 다른 각질형성 세포를 자극하여 IL-12, IL-18, IP-10, KC, MIP-2 등이 분비되며 림프구, 호중구, NK 세포 등이 피부에 침윤된다.

V. 결 론

1. 알레르기성 접촉피부염(ACD)과 자극성 접촉피부염(ICD)에서 발현되는 표피내 사이토카인은 발현양상이 서로 달랐다. 이것은 두 질환의 염증반응이 서로 다른 기전으로 발생함을 시사한다.

2. ACD에서만 발현이 뚜렷이 증가되는 사이토카인은 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10이었고, eotaxin, TARC, RANTES, JE 등의 CC 케모카인이었다. 이러한 사이토카인은 두 접촉피부염을 구별할 수 있는 표지자로서 인정된다.

3. CXC 케모카인은 ACD와 ICD에서 모두 발현이 증가되었으나, CC 케모카인은 ACD에서만 발현이 증가되었다. 이 결과는 ACD에서 호산구 침윤을 보이는 조직학적 소견의 설명이 가능하게 한다.

이상의 결과로 알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 서로 다르게 발현되는 표피내 사이토카인과 케모카인은 두 질환의 병인의 차이를 이해하고 감별하는데 도움이 된다고 하겠다.

참 고 문 헌

1. Mathias EG. Occupational dermatoses. J Am Acad Dermatol 1988;19:1107-1114.
2. Kondo S, Sauder DN. Epidermal cytokines in allergic contact dermatitis. J Am Acad Dermatol 1995;33:786-800.
3. Ryan CA, Gerberick GF. Cytokine mRNA expression in human epidermis after patch treatment with rhus and sodium lauryl sulfate. Am J Contact Dermat 1999;10:127-135.
4. Cohen ML, Skopicki DK, Harrist TJ, Clark WH Jr. Noninfectious vesicobullous and vesicopustular diseases. In : Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B, editors. Lever's histopathology of the skin. 8th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997, p.209-252.
5. Elias MP, Wood LC, Feingold KR. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. Am J Contact Dermat 1999;10:119-126.
6. Krasteva M. Contact dermatitis. Int J Dermatol 1993;32:547-560.
7. Emilson A, Lindberg M, Scheynius A. Differential epidermal expression of the invariant chain in allergic and irritant contact dermatitis. Acta Derm Venereol 1998;78:402-407.
8. Morhenn VB, Chang EY, Rheins LA. A noninvasive method for quantifying and distinguishing inflammatory skin reactions. J Am Acad Dermatol 1999;41:687-692.
9. Lever WF, Schaumberg-Lever G. Histopathology of the skin. 7th ed. Philadelphia: J B Lippincott; 1990. p.106.

10. Willis CM, Stephens CJM, Wilkinson JD. Selective expression of immune-associated surface antigens by keratinocytes in irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 1991;96:505-511.
11. Gawkrödger DJ, Carr MM, McVittie E, Guy K, Hunter JAA. Keratinocyte expression of MHC class II antigens in allergic sensitization and challenge reactions and in irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 1987;88:11-16.
12. Hoefakker S, Caubo M, van't Erve EHM, Roggeveen MJ, Boersma WJ, van Joost T, et al. In vivo cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1995;33:258-266.
13. Ulfgren AK, Klareskog L, Lindberg M. An immunohistochemical analysis of cytokine expression in allergic and irritant contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2000;80:167-170.
14. Lisby S, Muller KM, Jongeneel CV, Saurat JH, Hauser C. Nickel and skin irritants upregulate tumor necrosis factor- α mRNA in keratinocytes by different but potentially synergistic mechanisms. *Int Immunol* 1995;7:343-352.
15. Enk AH, Katz SI. Early molecular events in the induction of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:1398-1402.
16. Howie SEM, Aldridge RD, McVittie E, Forsey RJ, Sands C, Hunter JAA. Epidermal keratinocyte production of interferon- γ immunoreactive protein and mRNA is an early event in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996;106:1218-1223.
17. Corsini E, Bruccoleri A, Marinovich M, Galli CL. Endogenous

- interleukin-1 α is associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;138:268-274.
18. Pastore S, Shivji GM, Kondo T, McKenzie RC, Segal L, Somers D, et al. Effects of contact sensitizers neomycin sulfate, benzoxaine and 2,4-dinitrobenzene-1-sulfonate, sodium salt on viability, membrane integrity and IL-1 α mRNA expression of cultured normal human keratinocytes. *Food Chem Toxicol* 1995;33:57-68.
 19. Brand CU, Hunziger T, Yawalkar N, Braathen LR. IL-1 β protein in human skin lymph does not discriminate allergic from irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1996;35:152-156.
 20. Zepter C, Haffner A, Soohoo LF, De Luca D, Tang H, Fisher P, et al. Induction of biologically active IL-1b-converting enzyme and mature IL-1b in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. *J Immunol* 1997;159:6203-6208.
 21. Asada H, Linton J, Katz SI. Cytokine gene expression during the elicitation phase of contact sensitivity: regulation by endogenous IL-4. *J Invest Dermatol* 1997;108:406-411.
 22. Rowe A, Bunker CB. Interleukin-4 and the interleukin-4 receptor in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1998;38:36-39.
 23. Flint MS, Dearman RJ, Kimber I, Hotchkiss SA. Production and in situ localization of cutaneous tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) following skin sensitization. *Cytokine* 1998;10:213-219.
 24. Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-

- derived IL-10. J Immunol 1992;159:92-95.
25. Muller G, Saloga J, Germann T, Bellinghausen I, Mohamadzadeh M, Knop J, et al. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. J Clin Invest 1994;94:1799-1805.

Abstract

Epidermal cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis

Il-Joo Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo-Chan Kim)

Both allergic contact dermatitis (ACD) and irritant contact dermatitis (ICD) are very common and important conditions in clinical and occupational dermatology. There are two categories of contact dermatitis, classified by their etiologies. ICD is a nonimmunological, local inflammatory reaction characterized by erythema, edema, or corrosion following a single or repeated exposure of a chemical to an identical cutaneous site, which occurs primarily as a result of chemical toxicity to epidermal cells leading to an inflammatory response in the dermis. A second category, ACD, is a cell-mediated immune response to a particular chemical hapten. ACD begins with an initial refractory

period, followed by an inductive phase lasting from several days to several weeks during which sensitization occurs, and an efferent phase after antigenic reexposure which can precipitate rapid and even severe responses.

Comparative studies of ACD and ICD suggest that although their pathogenic definitions seem to be separate and distinct, both the histologic and clinical features of ACD and ICD are strikingly similar. Immunohistochemistry studies examining the cellular nature of the infiltrate also do not distinguish these two types of dermatitis. Although haptens consistently decrease epidermal Langerhans cell (LC) number, some irritants also decrease LC, suggesting that this is not a consistent feature that will distinguish ACD from ICD. Also immunohistochemistry studies of the expression of accessory molecules such as ICAM-1 and B7-1 show no differences between ACD and ICD.

In ACD, keratinocytes (KC) have been shown to produce a wide variety of different cytokines by direct stimulation of hapten on KC or cytokines produced by sensitized T lymphocytes. These KC-produced cytokines have the potential to initiate, amplify, and even terminate lymphocyte-mediated inflammation in the skin. While a variety of epidermal cell types, such as LC and melanocytes, can be induced to secrete soluble cytokines, KC are overwhelmingly the predominant cell type in the epidermis, and hence likely to represent a major source of epidermal cytokines.

Irritants also trigger cutaneous responses by inducing epidermal KC

to elaborate and/or to release proinflammatory cytokines at both the protein and mRNA levels. These cytokines activate dermal microvascular endothelial cells and induce accumulation of specific mononuclear cells in vivo, and they, therefore, are considered as critical signaling molecules in the cascade of events leading to in vivo skin irritation.

It is very interesting, therefore, to study cytokine gene expression in ACD and ICD to make an effort to distinguish these two contact dermatitis. In this study, we studied epidermal cytokine profiles in ACD and ICD. We induced ACD with DNFB and ICD with benzalkonium chloride in mice ear and performed RT-PCR, RNase protection assay and immunohistochemistry to study cytokine expression.

The results are follows;

1. The expression of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, and CC chemokines (eotaxin, TARC, RANTES, JE) were increased in ACD.
2. The expression of TNF- α , IFN- γ , IL-12p40, IL-18 and CXC chemokines (IP-10, KC, MIP-2) were increased in both ACD and ICD.
3. IL-1 β , IL-4, IL-10 and CC chemokines might be considered as biomarker to distinguish ACD and ICD.

In conclusion, the cytokine expression profiles between ACD and ICD are different, and some cytokines have been considered as

biomarkers to distinguish these two contact dermatitis. In addition, the difference of chemokine expression profiles in ACD and ICD support the explanation of difference of leukocyte infiltration in ACD in ICD.

Key Words: cytokine, chemokine, allergic contact dermatitis, irritant contact dermatitis