

레티노인산에 의한  
각질형성세포에서의  
IL-8 발현의 기전

연세대학교 대학원

의 학 과

정 예 리

레티노인산에 의한  
각질형성세포에서의  
IL-8 발현의 기전

지도 김 수 찬 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 예 리

# 정예리의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

## 감사의 글

학위의 과정과 더불어 삶의 모든 과정에 함께 하여 주신 하나님께 감사드립니다. 피부과 의사로서, 의학을 연구하는 학자로서 모범이 되어 주시고 깊은 배려와 따뜻한 지도로 이끌어 주신 김수찬 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한, 바쁘신 와중에도 연구계획 단계에서 마무리 단계까지 많은 조언을 해주신 이민걸 교수님, 이수곤 교수님, 유욱 교수님, 신명현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 박사 실험 과정에서 처음부터 끝까지 함께 해주었던 정승용, 오성민 대학원생에게도 감사를 드립니다. 전공의 시절과 전임의 과정을 거치면서 늘 많은 격려와 애정 어린 가르침으로 이끌어 주신 피부과학 교실원 여러분에게도 감사의 마음을 전합니다.

항상 부족하고 미숙한 저를 사랑으로 이해하시고 보살피 주시는 양가 부모님과 논문완성의 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 마지막으로 늘 곁에서 후원을 아끼지 않은 사랑하는 남편과 저의 분신이자 삶의 전부인 딸 신혜와 태중의 아기에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

<차례>

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 실험재료 .....	6
2. 실험방법 .....	6
가. HaCaT세포 배양 .....	6
나. 레티노인산의 처리 .....	6
다. 실시간 정량 PCR을 이용한 사이토카인의 mRNA 정량 .....	7
라. EMSA를 이용한 NF- $\kappa$ B의 활성화도 측정 .....	9
마. NF- $\kappa$ B 억제제 처리 후 IL-8 mRNA의 발현 .....	10
바. I $\kappa$ B $\delta$ N DNA를 transfection 시킨 후 IL-8 mRNA의 발현 .....	11
사. IL-1ra 처리 후 IL-8 mRNA의 발현 .....	11
아. Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ 항체를 이용한 western blot .....	12
III. 결과 .....	
1. 레티노인산 투여 후 HaCaT세포에서의 사이토카인 발현량 측정을 위한 실시간 정량 PCR실험 .....	16
2. NF- $\kappa$ B 억제제를 사용했을 때와 I $\kappa$ B에 대한 dominant negative mutant를 HaCaT세포에 transient transfection시켰을 때의 IL-8 mRNA 실시간 정량 PCR의 결과 .....	18
3. NF- $\kappa$ B 억제제 투여 전후의 레티노인산 처리 후 HaCaT세포에서의 NF- $\kappa$ B결합 활성화도 측정을 위한 EMSA .....	20
4. IL-1ra가 레티노인산에 의한 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향 .....	22
5. Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ 항체를 이용한 western blot .....	23
IV. 고찰 .....	24
V. 결론 .....	28
참고문헌 .....	29
영문요약 .....	34

표차례

표1. 실시간 정량 PCR을 위한 사이토카인 primer 및 hybridization probe 염기 서열 .....14

그림 차례

그림 1.  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$  및  $10^{-8}M$  레티노인산 투여 후 1, 6, 12, 24시간 후 HaCaT세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과 .....16

그림 2. NF- $\kappa$ B 억제제를 투여 한 후  $10^{-6}M$  및  $10^{-7}M$  레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과 .....18

그림 3. I $\kappa$ B $\delta$ N mutant를 HaCaT세포에 transient transfection 시킨 후  $10^{-6}M$  및  $10^{-7}M$  레티노인산 처리 12시간 후의 IL-8 mRNA의 실시간 정량 PCR .....19

그림 4. NF- $\kappa$ B에 대한 억제제 투여 전과 후에  $10^{-6}M$  및  $10^{-7}M$  레티노인산 처리 12시간 후 HaCaT세포에서 발현된 NF- $\kappa$ B 결합 활성도 .....20

그림 5. NF- $\kappa$ B 억제제 투여 전 후의  $10^{-6}M$  및  $10^{-7}M$  레티노인산 처리 24시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 NF- $\kappa$ B 결합 활성도 .....21

그림 6. IL-1ra가 레티노인산에 의한 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향 .....22

그림 7. Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  항체를 이용한 western blot .....23

## 국문요약

### 레티노인산에 의한 각질형성세포에서의 IL-8 유전자 발현의 기전

IL-8은 C-X-C 케모카인에 속하는 대표적인 호중구의 화학 주성 인자로 여러 가지 염증반응에서 중요한 역할을 하며 각질형성세포를 포함한 여러 세포에서 만들어진다. IL-8은 정상시에는 분비가 이루어지지 않다가 TNF- $\alpha$ , IL-1, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), lectins, 바이러스 등에 의해 유도되어 분비된다. IL-8의 프로모터 중심부에는 nuclear factor(NF)- $\kappa$ B element를 포함한 activating protein(AP)-1, AP-2, AP-3, 부신피질호르몬 수용체, NF-IL-6와 octamer factors가 있어 여러 가지 세포에서 IL-8의 분비를 조절하고 있다. 이 중에서 NF- $\kappa$ B는 IL-8 유전자 발현에 핵심적인 역할을 한다.

레티노인산은 비타민 A의 유도체로서 면역학적 반응과 염증반응을 조절한다. 이 중에서 all-trans retinoic acid(ATRA)는 레티노이드의 자연산화물로서 건선이나 여드름, 광노화 피부 등의 피부질환 치료제로서 널리 사용되고 있다. 하지만 이러한 임상적인 유용성에 비해 레티노인산은 국소적 외용제로 사용할 때 접촉성 피부염을 흔히 일으킬 수 있기 때문에 그 사용에 제한이 있다. 레티노인산은 각질형성세포에서 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8 mRNA 발현을 증대시키며 각질형성세포와 진피 섬유모세포에서 이들 사이토카인을 분비시킨다. 이들 사이토카인이 레티노인산에 의한 접촉성 피부염 발생에 중요한 역할을 하리라 믿어진다. 본 연구에서는 레티노인산에 의해 각질형성세포주인 HaCaT세포에서 IL-1과 IL-8 mRNA의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 그리고 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)를 이용하여 IL-8 유전자 발현에 NF- $\kappa$ B가 관여함을 관찰하였다. 이는 NF- $\kappa$ B 억제제를 사용했을 때와 I- $\kappa$ B에 대한



dominant negative mutant의 cDNA를 HaCaT세포에 도입한 후 발현시켜 NF- $\kappa$ B 활성을 방해하였을 때 IL-8 mRNA 발현이 저하됨을 관찰함으로써 확인할 수 있었다. 또한 레티노인산을 투여 후 세포질 내에 I $\kappa$ B의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다.

결론적으로 저자는 레티노인산이 각질형성세포에서 NF- $\kappa$ B를 통하여 IL-8 유전자 발현에 영향을 증가시킨다는 것을 알 수 있었지만 IL-8유전자에는 전형적인 레티노인산의 반응단위가 없으므로 직접적인 자극보다는 다른 경로가 있을 것으로 추정하였다. 중간 자극제로서 가능성이 있는 IL-1의 영향으로 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 IL-8 유전자가 발현되는지를 알기 위하여 IL-1 receptor antagonist(ra)를 사용하였으나 IL-1ra가 레티노인산에 의한 IL-8 유전자 발현에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 레티노인산이 I $\kappa$ B kinase를 통해 각질형성세포에서 I $\kappa$ B의 인산화를 촉진시켜 NF- $\kappa$ B로의 해리를 유도시켜 IL-8의 발현을 촉진시켰다고 추정해 볼 수 있었다.

---

핵심되는 말 : 레티노인산, IL-8, NF- $\kappa$ B, HaCaT세포

# 레티노인산에 의한 각질형성세포에서의 IL-8 발현의 기전

<지도교수 김 수찬 교수>

연세대학교 대학원 의학과

## 정 예 리

### I. 서 론

레티노이드는 합성과 자연 상태의 비타민 A로 여러 가지 세포들의 분화와 성장에 영향을 준다. 그리고 여러 면역세포들의 활성화 및 성숙과 분화에 관여하는 사이토카인 유전자의 발현을 조절할 수 있다<sup>1-3</sup>. 레티노이드는 생체 내에서 레티노인산(retinoic acid: RA)으로 변형되어 기능을 한다. 세포내 활성상태인 레티노인산은 각질형성세포의 증식과 분화를 조절할 뿐 아니라 피지선을 억제하여 건선이나 여드름 치료제로 사용된다. 그리고 진피의 콜라겐 분해효소를 억제하여 피부주름의 개선제로 활발히 이용된다<sup>1-3</sup>. 그러나 레티노인산의 국소도포는 홍반과 인설을 동반한 자극성 피부염을 유발하므로 그 사용에 제한이 있다<sup>4-6</sup>. 이러한 자극성 피부염 같은 염증반응의 원인으로 사이토카인이 관여되리라 생각되며, 레티노인산을 국소 도포한 마우스 피부에서와 레티노인산 투여 후 배양 각질형성세포에서 IL-1과 IL-8 유전자 발현이 증가됨이 보고 된 바 있다<sup>7, 8</sup>.

레티노인산은 핵내에서 레티노인산 수용체(retinoic acid receptor; RAR)와 결합하여 ‘레티노인산과 레티노인산 수용체의 복

합체'를 형성한다. 이 복합체가 전사인자로 작용하여 표적 유전자의 전사 개시를 위한 표적 유전자 프로모터(target gene promotor)의 레티노인산 반응 영역(retinoic acid response elements;RARE)에 결합하여 표적 유전자의 발현을 유도하여 여러 가지 기능을 나타낸다<sup>9-11</sup>. 그러나 레티노인산에 의한 각질형성세포의 사이토카인 발현이 어떤 기전에 의한 것인지 아직 밝혀져 있지 않다<sup>13, 14</sup>.

IL-8은 호중구나 T세포의 화학주성에 관계하거나 세포사이의 결합이나 호중구의 활성화 또는 histamine의 분비를 조절하는 등 여러 가지 역할을 하는 사이토카인으로 여러 세포에서 자극 특이적인 방법으로 전사수준이나 전사 후 수준에서 조절되어 분비된다. 인간의 IL-8 promoter의 5' flanking region에는 AP-1, AP-2, AP-3, glucocorticoid receptor, NF- $\kappa$ B, NF-IL-6등의 전사인자가 결합할 수 있는 여러 가지 모티브(motif)가 있어 IL-8의 분비를 조절한다. 이 중에서 NF- $\kappa$ B는 IL-8 유전자 발현에 핵심적인 역할을 한다<sup>15</sup>.

NF- $\kappa$ B는 면역반응과 염증반응을 매개하는 중요한 전사인자로서 사이토카인 발현에 중요한 역할을 한다. NF- $\kappa$ B 경로는 여러 가지 다양한 신호에 의하여 자극되는데 이러한 신호에 의하여 NF- $\kappa$ B에 붙어 있는 I $\kappa$ B가 I $\kappa$ B kinase(IKK)에 의해 인산화 되면서 분리되면 NF- $\kappa$ B가 세포질에서 핵 내로 이동하게 되고 마침내 여러 가지 유전자들의 발현을 활성화시키게 된다. 그 중에서도 IL-1 및 IL-8, TNF- $\alpha$ 는 NF- $\kappa$ B에 의해서 활성화되며 다시 NF- $\kappa$ B를 직접적으로 자극하여 자가 조절성 고리를 형성하여 다른 사이토카인을 생산하게 하여 염증반응을 증폭시킨다<sup>16</sup>. NF- $\kappa$ B는 사이토카인 생성 외에도 부착분자와 nitric oxide(NO) 및 cyclooxygenase(COX-2)와 같

은 효소의 생산도 유발하여 염증반응을 일으키며 세포고사를 억제하여 세포를 보호하는 역할도 함께 하고 있다<sup>17, 18</sup>.

이에 본 연구는 각질형성세포에 레티노인산 투여 후 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1의 mRNA 유전자 발현을 실시간 정량 PCR을 이용하여 측정하였다. 그리고 사이토카인 발현에 주로 관여하는 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 작동여부를 electrophoretic motility shift assay(EMSA)를 이용하여 확인하고, NF- $\kappa$ B에 대한 억제제와 I $\kappa$ B에 대한 dominant negative mutant를 이용하여 NF- $\kappa$ B가 작동하지 않았을 때의 IL-8의 발현여부를 확인하였다. 그리고 레티노인산이 I $\kappa$ B의 인산화를 증가시켜 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유도하는지 알아보았다. 또한 레티노인산이 NF- $\kappa$ B를 통하여 IL-8 유전자 발현에 영향을 줄 때 직접적인 자극보다는 다른 경로가 있을 것으로 추정하였다. 그래서 중간 자극제로서 가능성이 있는 IL-1의 영향으로 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 IL-8 유전자가 발현되는지를 알기 위하여 IL-1 receptor antagonist(ra)를 이용하여 IL-1의 영향을 배제한 후 레티노인산에 의한 IL-8 유전자 발현을 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 HaCaT세포는 Norbert E. Fusenig교수 (Heidelberg, Germany)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. HaCaT세포는 형질 전환된 각질형성세포로 정상 각질형성세포와 형태 및 반응 양식이 동일하면서 계대배양이 제한되지 않아 유지하기가 편한 장점이 있다.

### 2. 실험방법

#### 가. HaCaT세포 배양

HaCaT세포는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% antibiotic/antimycotic(Gibco BRL)을 첨가한 RPMI-1640(Gibco BRL)을 세포배양액으로 이용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 culture flask면적의 80%정도를 차지하면 0.05% trypsin과 53 mM EDTA를 첨가한 Hanks' balanced salt solution(HBSS with phenol red, without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>)으로 세포를 culture flask로부터 분리하였다. 그 후 20% FBS가 포함된 배양액으로 trypsin을 중화한 후 원심분리를 이용하여 여러 차례 계대배양 하였다.

#### 나. 레티노인산의 처리

10% FBS가 포함된 배양액으로 배양된 HaCaT세포가 culture

flask면적의 80%정도를 차지하면, 각 culture flask에 0.1% ethanol,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M 및  $10^{-8}$  M의 레티노인산을 2% FBS가 포함된 배양액에 각각 첨가하여 1시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 배양하였다.

실험에 사용한 레티노인산 (all-trans-retinoic acid; ATRA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)은 99.9%의 ethanol에 녹여  $10^{-3}$  M 농도의 stock solution으로 만든 다음 실험에 필요한 최적 농도로 희석하여 사용하였다

다. 실시간 정량 PCR를 이용한 사이토카인 mRNA의 정량

#### (1) RNA분리 및 정량

배양한 HaCaT세포로부터 RNA를 분리하기 위하여 TRIzol reagent(Gibco BRL) 500  $\mu$ l를 첨가하였다. 그 후 cell scraper로 flask 바닥으로부터 HaCaT세포를 분리하여 microtube에 옮겼다. 실온에 5분간 두었다가, chloroform(Sigma) 200  $\mu$ l를 첨가하여 vortex하였다. 실온에서 3분간 두고, 4°C에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액만 분리하여 새로운 microtube에 옮겼다. 분리한 상층액에 isopropyl alcohol(Sigma) 500  $\mu$ l를 첨가하여 vortex후 10분간 실온에 두었다가 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 75% ethanol 1 ml를 첨가하고 살짝 vortex한 다음 13,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 남아 있는 ethanol을 공기 중에서 완전히 건조시켜 제거한 후 microtube 바닥의 RNA pellet에 0.1% DEPC ddH<sub>2</sub>O 100  $\mu$ l를 첨가하여 다시 녹였다. 각 대조군과 실험군으로부터 분리한 RNA를 60°C water bath에서 10분간 가열시켜 single strand로 분리한 후

spectrophotometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 RNA농도 및 순수도를 측정하였다.

(2) 역전사 반응 (Reverse transcription)

각각의 대조군과 실험군으로부터 분리하여 정량, 보정한 RNA 1  $\mu\text{g}$ 에 RNA PCR Kit Ver2.1 (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 역전사반응을 실행하였다. 약술하면 10 x RNA PCR buffer, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dNTP mixture, 40 units/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor, 2.5 pmol/ $\mu\text{l}$  Oligo-dT primer, 5 units/ $\mu\text{l}$  reverse transcriptase를 각각 최종 반응농도 1 x RNA PCR buffer, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM dNTP mixture, 1 units/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor, 0.125  $\mu\text{M}$  Oligo-dT primer, 0.25 units/ $\mu\text{l}$  reverse transcriptase가 되도록 조절하여 RNase free  $\text{dH}_2\text{O}$ 를 이용해 최종 부피를 통일하였다. 45°C 45분, 95°C 1분, 4°C 5분의 thermal cycling condition으로 cDNA로 역전사 시켰다.

(3) 실시간 정량 PCR (Real time quantitative polymerase chain reaction)

cDNA와 표적 사이토카인 유전자의 primers로 디자인한 Light Cycler probes 그리고 Light Cycler reaction protocol에 따라 만든 mixture를 섞어 만든 각각의 반응 혼합액을 capillary에, 한 실험 개체당 20  $\mu\text{l}$ 씩 채운 다음, 95°C 1분(1회), 95°C 10초(1회), [60°C 15초, 72°C 8초](40회)의 thermal cycling condition에서 Light Cycler (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 실시간 정량 PCR을 진행시켰다. 실시간 정량 PCR에 사용된 각 사이토카인의

primers 및 Light Cycler probes는 표 1과 같다.

Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (h-G6PDH) housekeeping gene을 human endogenous control gene으로 이용하였다. 최종 PCR 증폭 산물의 양은 h-G6PDH standard를  $5 \times 10^6$ 에서  $5 \times 10^2$ 까지 10배 단위로 단계적으로 희석하여 각각의 cycle에 해당하는 실험군의 양으로 나누어 비교 정량하였다.

라. EMSA를 이용한 NF- $\kappa$ B 활성화 측정

(1) HaCaT세포로 부터 nuclear extract제작

T75 플라스크에 키운 HaCaT세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS 1 ml를 넣은 후 scraper로 세포를 긁어 1.5 ml eppendorf tube에 옮겼다. 1,200 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 pH 7.9의 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>와 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF로 구성된 buffer액 400  $\mu$ l를 넣고 다시 녹인 후 얼음 위에 10분간 두었다. 그 후 4°C에서 3분간 12,000 rpm으로 원심 분리한 후 다시 상층액을 제거하였다. pH7.9의 20 mM HEPES, 20% (V/V) glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT와 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)로 구성된 buffer액 100  $\mu$ l를 넣고 vortex한 후 20분간 얼음 위에 두었다. 4°C에서 3분간 12,000 rpm으로 원심 분리한 후 상층액(nuclear extract)을 단백질농도 2  $\mu$ g/ $\mu$ l로 맞춘 후 -70°C에 보관하였다.

(2) Gel-shift assay

Nuclear extract 10  $\mu$ g과 5 X incubation buffer 5  $\mu$ l, 증류수



25  $\mu$ l을 섞은 후 4°C에서 15분간 방치하고 P<sup>32</sup> label된 NF- $\kappa$ B oligonucleotide(Promega, Madison, WI, USA) probe 2  $\mu$ l를 넣고 실온에서 20분간 방치하였다. NF- $\kappa$ B의 probe은 NF- $\kappa$ B oligo (1.75 pmol/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l와 T4 polynucleotide kinase 10 x buffer 1  $\mu$ l, r<sup>32</sup>P-ATP 1  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ l와 T4 polynucleotide kinase 1  $\mu$ l를 섞어 총 용량 10  $\mu$ l을 37°C 에서 10분간 둔 후 0.5 M EDTA 1 $\mu$ l으로 stop reaction을 일으켰다. 89  $\mu$ l의 TE buffer를 첨가한 후 unincorporated nucleotide를 제거하기 위하여 G-25 spin column통과시켜 1300 rpm 으로 5분간 원심분리 후 하층액만 취하여 만들었다.

NF- $\kappa$ B의 염기서열은 다음과 같다. NF- $\kappa$ B: 5 '-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'. Probe를 첨가 후 상온에서 20분간 보관한 후 0.1% bromphenol blue(BPB) dye를 각 샘플마다 2  $\mu$ l씩 넣고 6% non denaturing polyacrylamide gel에 150V, 10 mA에서 2시간 전기영동 시켰다. Gel 조성(6%)은 다음과 같다. polyacrylamide: bis (29:1) 9 ml, 증류수 33 ml, 5 x TBE 2.25 ml, 10% ammonium persulfate(APS) 450  $\mu$ l, TEMED 22.5  $\mu$ l. 전기영동이 끝나면 vacuum gel dry와(Bio-Rad) 건조시킨 후 X-ray film에 노출하여 감광시켰다.

마. NF- $\kappa$ B 억제제 처리 후 IL-8 mRNA의 발현

NF- $\kappa$ B의 억제제로는 Bay 11-7082(Biomol, Plymouth, PA, USA)을 사용하였다. 10  $\mu$ M의 Bay 11-7082를 레티노인산 투여 1시간 전에 HaCaT세포에 주고 실시간 정량 PCR을 시행하여 IL-8 mRNA의 발현여부를 확인하였다.

바. I- $\kappa$ B dominant negative(dN)DNA를 transfection 후 IL-8 mRNA의 발현

I- $\kappa$ BdN은 I $\kappa$ B molecule에서 해리되는데 필수선행과정인 인산화 가 일어나는 32번과 36번 serine residue를 포함하는 N-terminal 부위를 절단시킨 mutant로 NF- $\kappa$ B활성을 방해하는 역할을 수행한다<sup>19</sup>. Transfection 시키기 하루 전 24 well-plate(2-6 x 10<sup>4</sup>)에 HaCaT세포를 plating하여 24 시간 후 50-80%정도 차지할 수 있게 한 후 세포들을 serum free media로 세척하여 FBS를 제거하였다. 0.2-0.4  $\mu$ g I- $\kappa$ BdN DNA와 25  $\mu$ l serum free media, 4  $\mu$ l Plus<sup>TM</sup> reagent(Gibco)넣고 상온에서 15분간 두었다. 0.5- 5  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> reagent(Gibco)을 25  $\mu$ l serum free media를 이용하여 희석한 후 전술한 I- $\kappa$ BdN DNA mixture에 섞어 상온에서 45 분 둔 후 0.2 ml의 transfection medium (without serum)로 media를 대체하였다. 150  $\mu$ l media를 추가로 섞은 후 세척된 HaCaT세포들 위로 도포한 후 37 $^{\circ}$ C에서 5시간 정도 incubation 후 0.4 ml의 serum이 정상보다 두 배 함유한 growth media를 첨가한 후 24시간 후 media를 갈아주었다. Transfection efficiency는 480 nm파장의 빛 하에서 전체 세포 중 녹색 형광을 내는 세포의 비율로 정하였는데, 대략 약 50%의 transfection efficiency를 얻었다. Transfection시킨 후 12시간, 24시간 후에 레티노인산을 투여 후에 IL-8 mRNA 측정을 위해 실시간 정량 PCR를 시행하였다.

사. IL-1ra처리 후 IL-8 mRNA 발현

IL-1 수용체를 억제하기 위해 IL-1ra(R&D systems, Minneapolis,

MN, USA) 50 ng/ml을 레티노인산 처리 24시간 전에 배양한 HaCaT세포에 미리 투여하였다. IL-1ra처리 24 시간 후에 레티노인산  $10^{-6}$  M 및  $10^{-7}$  M을 투여한 후 전술한 방법에 의해 IL-8 mRNA 발현을 실시간 정량 PCR을 이용하여 정량하였다.

아. Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  항체를 이용한 western blot

레티노인산을 처리하여 12시간, 24시간 배양한 HaCaT세포에 배양액을 제거한 후 PBS buffer를 이용하여 세포를 세척한 후 PBS buffer를 제거하였다. 100  $\mu$ l의 SDS sample buffer를 이용하여 세포를 해리시킨 후 즉시 scraper를 이용하여 세포를 바닥에서 떼어 낸 후 micro tube로 옮겨서 10-15초간 초음파로 분해한 후 95-100 $^{\circ}$ C 정도로 5분간 가열 후 얼음에 보관하였다. 이 후에 5분간 microcentrifuge하고 SDS-PAGE gel에 세포추출액을 20  $\mu$ l씩 넣어 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. SDS sample buffer의 조성은 62.5 mM Tris-HCl, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% w/v bromophenol blue이다.

Transfer 후에 nitrocellulose membrane을 25 ml TBS로 5분간 상온에서 보관 후 25 ml의 blocking buffer를 이용하여 상온에서 3시간 둔 후 Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 10 ml primary antibody dilution buffer를 첨가 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 약간씩 흔들어 주며 하룻밤 두었다. 다음에 TBS-Tween을 이용하여 5분간 3차례 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody(1:2000)와 HRP-conjugated anti-biotin antibody(1:1000)와 blocking buffer를 이용하여 1시간 상온에서 진동을 주며 보관 후 TBS-Tween을 이용하여 3차례 세척하였다.

Blocking buffer의 조성은 1 x TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v nonfat dry milk 를 150 ml 되게 만든 다음, 15 ml 10 x TBS와 135 ml water를 넣어 섞는다. 그 후 7.5 g의 nonfat dry milk를 더 넣고 잘 섞은 다음 0.15 ml Tween-20 (100%)을 섞었다.

Primary antibody dilution buffer의 조성은 1 x TBS, 0.1% Tween-20 with 5% BSA를 20 ml되게 만든 다음 2 ml 10 x TBS와 18 ml water를 섞은 후 1.0 g의 BSA를 넣고 섞을 때 20  $\mu$ l Tween-20 (100%)을 넣었다.

세척한 membrane을 10 ml LumiGLO(0.5 ml 20 x LumiGLO, 0.5 ml 20 x Peroxide and 9.0 ml Milli-Q water)을 첨가 후 1분간 상온에서 약간 흔들여 주면서 관찰 후 membrane이 마르지 않는 한도 내에서 과도한 용액은 제거 후 비닐 랩(saran wrap)으로 싸 후 10초간 X-ray film에 현상시켰다.

표1. 실시간 정량 PCR을 위한 사이토카인 primer 및 hybridization probe 염기 서열

IL-1a

Primers	Forward	5'-GTATGTGACTGCCCAAGA-3'
	Reverse	5'-CAAGCACACCCAGTAGTCT-3'
Amplicon size	190bp	
Hybridization probe	5'-AGTGCCGTGAGTTTCCCAGAAGAAGA-3'	
	3' Label: Fluorescein	
	5'-GAGGTTGGTCTCACTACCTGTGATGGTT-3'	
	5' Label: LCRed640	3' Label: Phosphorylated
GenBank number	access	NM_000575

TNF- $\alpha$

Primers	Forward	5'-CAGCCTGTAGCCCATGTT-3'
	Reverse	5'-ATGGCAGAGAGGAGGTTGAC-3'
Amplicon size	261bp	
Hybridization probe	5'-GAGGGCCTGTACCTCTATCTACTCCCA-3'	
	3' Label: Fluorescein	
	5'-GTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTG-3'	
	5' Label: LCRed640	3' Label: Phosphorylated
GenBank number	access	NM_000594

IL-8

Primers	Forward	5'-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3'
	Reverse	5'-CTTCTCCACAACCCTCTG-3'
Amplicon size	200bp	
Hybridization probe	5'-GTCCACTCTCAATTCACTCTCAGTTCTTTGATA-3'	
	3' Label: Fluorescein	
	5'-ATTTGGGGTGGAAAGGTTTGAGTATG-3'	
	5' Label: LCRed640	3' Label: Phosphorylated
GenBank number	access	BC013615

## MCP-1

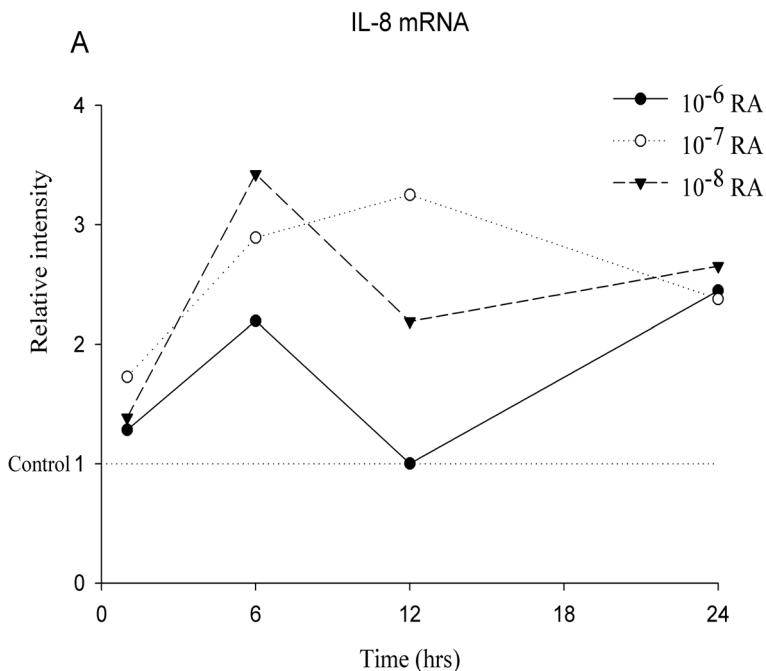
Primers	Forward Reverse	5'-CGCTAGCCAGATGCAAT-3' 5'-TTGGGTTGTGGAGTGGGT-3'
Amplicon size	255bp	
Hybridization probe	5'-CGAGCCTCTGCACTGAGATCTTCCTA-3' 3' Label: Fluorescein 5'-TGGTGAAGTTATAGCAGCAGGTGACTGGG-3' 5' Label: LCR640                      3' Label: Phosphorylated	
GenBank number	access	M28226

### III. 결 과

1. 레티노인산 투여 후 HaCaT세포에서의 사이토카인 발현량 측정을 위한 실시간 정량 PCR실험

(1)  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  및  $10^{-8}$  M 레티노인산 투여 후 1, 6, 12, 24시간 후 HaCaT세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과(그림 1)

$10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  및  $10^{-8}$  M 레티노인산 투여 1, 6, 12, 24시간 후 HaCaT세포에서 발현된 사이토카인 mRNA 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M 농도에서 IL-8(A), IL-1(B) mRNA 발현이 증가되었으나, TNF- $\alpha$ , MCP-1 mRNA는 발현되지 않았다.



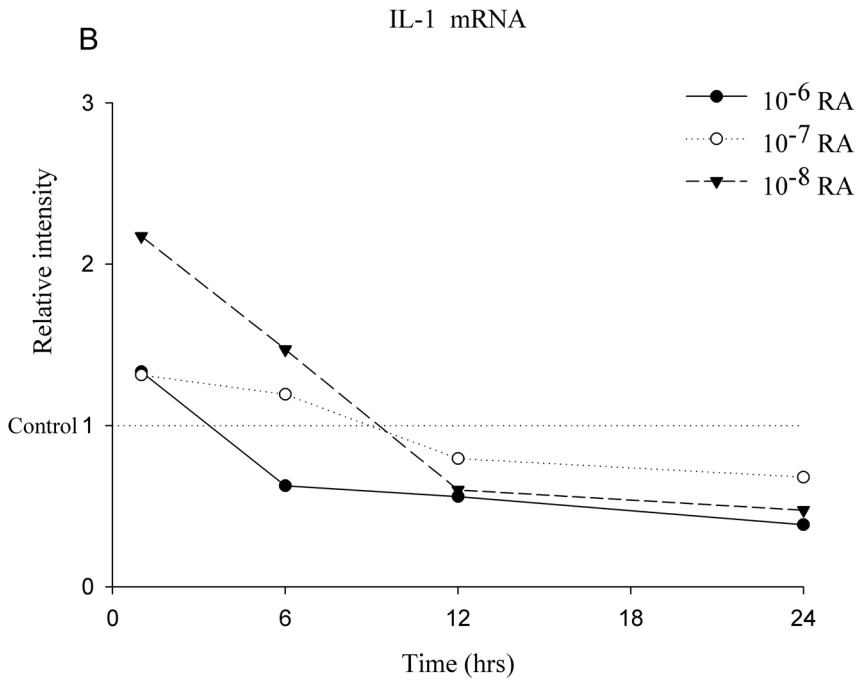


그림 1.  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M의 레티노인산을 투여 1, 6, 12, 24시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA를 측정된 결과 IL-8 mRNA의 발현은 1, 6, 12, 24 시간에 증가되었으나(A), IL-1 mRNA 발현은 1, 6 시간 초기에는 증가하다가 다시 감소하였으며, TNF- $\alpha$ , MCP-1 mRNA는 발현되지 않았다.



2. NF- $\kappa$ B 억제제를 사용했을 때와 I $\kappa$ B에 대한 dominant negative mutant를 HaCaT세포에 transient transfection시켰을 때의 IL-8 mRNA 실시간 정량 PCR의 결과

(1) NF- $\kappa$ B 억제제를 투여 한 후  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과(그림 2)

NF- $\kappa$ B 억제제(Bay 11-7082) 투여 후  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 두 농도에서 IL-8 mRNA 발현이 저하되었다.

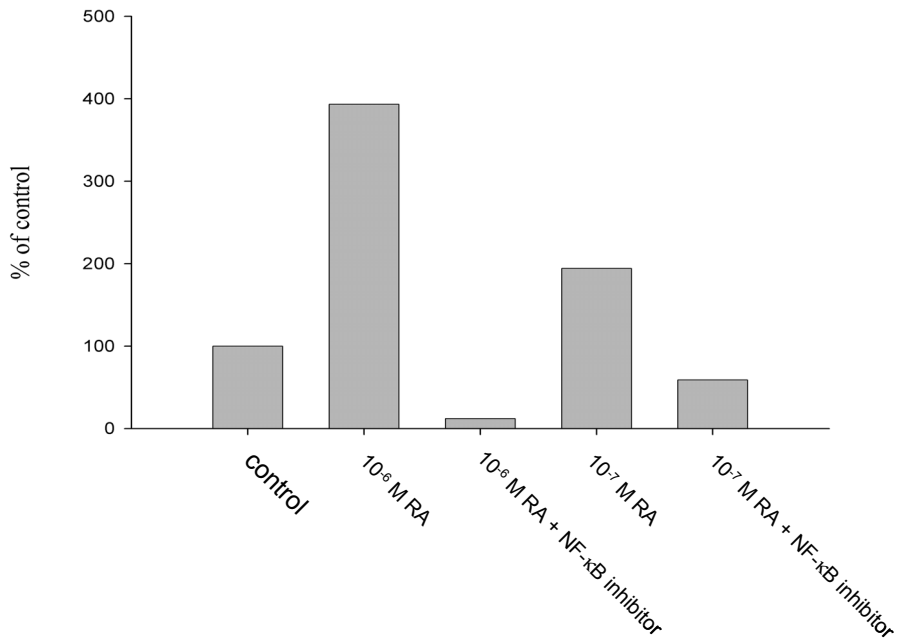


그림 2. NF- $\kappa$ B 억제제(Bay 11-7082) 투여 후  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 두 농도에서 IL-8 mRNA 발현이 현저히 저하되었다.

(2)  $I\kappa B\delta N$  mutant를 HaCaT세포에 transient transfection 시킨 후  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 처리 12시간 후의 IL-8 mRNA의 실시간 정량 PCR(그림 3)

$I\kappa B\delta N$ 을 HaCaT세포에 transient transfection 시킨 후  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 24시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 두 농도에서 IL-8 mRNA 발현이 현저히 저하되었다.

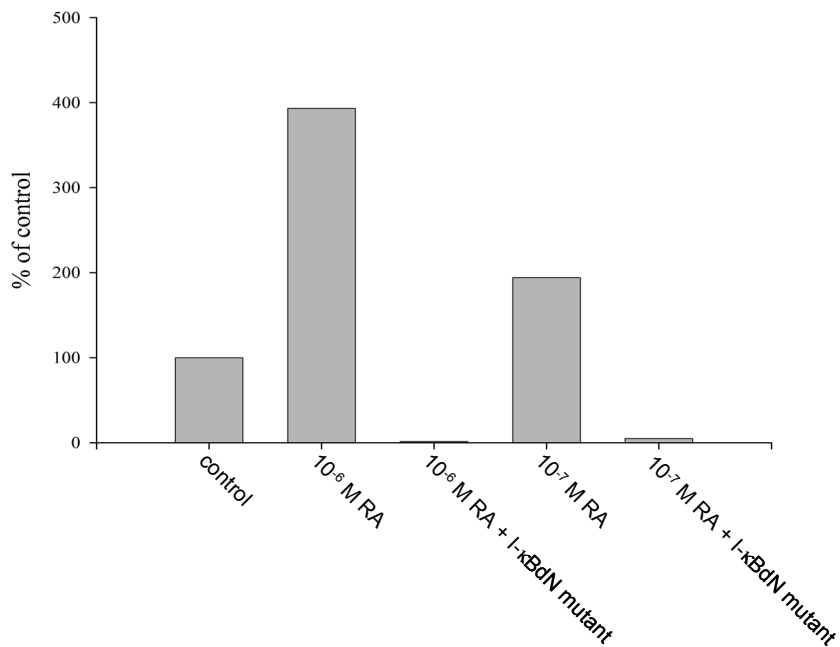


그림 3.  $I\kappa B\delta N$ 을 HaCaT 세포에 transient transfection 시킨 후  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 24시간 후 HaCaT세포에서 발현된 IL-8 mRNA 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 두 농도에서 IL-8 mRNA 발현이 현저히 저하되었다.

3. NF- $\kappa$ B 억제제 투여 전후의 레티노인산 처리 후 HaCaT세포에서 NF- $\kappa$ B결합 활성도 측정을 위한 EMSA

(1) NF- $\kappa$ B에 대한 억제제 투여 전과 후에  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 처리 12시간 후 HaCaT세포에서 발현된 NF- $\kappa$ B 결합 활성도(그림 4)

$10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 12시간 후 HaCaT세포에서 NF- $\kappa$ B결합 활성도 발현된 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 두 농도에서 농도에 비례하여 NF- $\kappa$ B결합 활성도가 증가되었다(A). 반면에 NF- $\kappa$ B에 대한 억제제를 투여했을 경우에는 NF- $\kappa$ B 결합활성도에 큰 변화가 없었다(B).

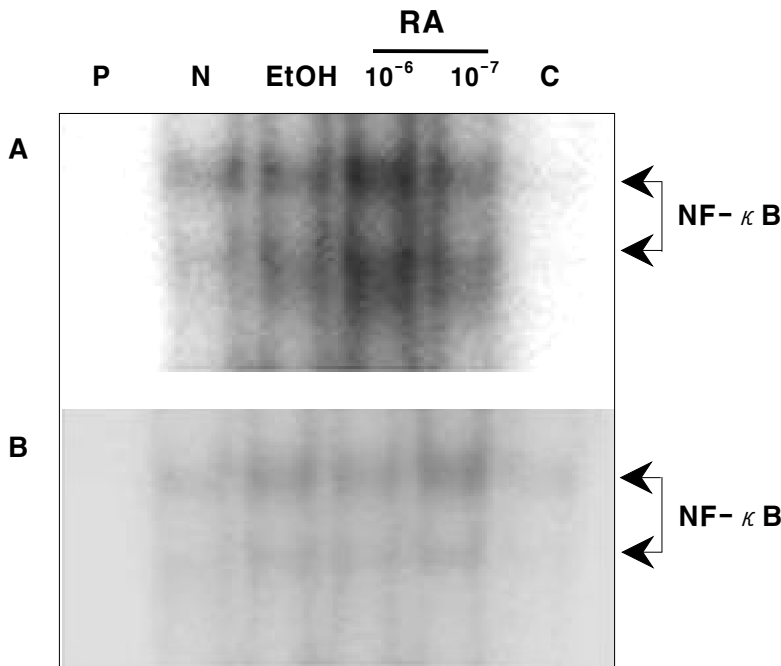


그림 4.  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M의 레티노인산 투여 12시간 후 NF- $\kappa$ B의 활성도가 증가되었으나(A) NF- $\kappa$ B 억제제 투여 후에는 NF- $\kappa$ B 활성의 증가가 없었다(B). (A: NF- $\kappa$ B 억제제 투여 전, B: NF- $\kappa$ B 억제제 투여 후) (P: probe only, N: normal, EtOH: ethanol, RA: retinoic acid, C: competitor).

(2) NF- $\kappa$ B 억제제 투여 전 후의  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 처리 24시간 후 HaCaT 세포에서 발현된 NF- $\kappa$ B 결합 활성도(그림 5)

$10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M 레티노인산 투여 24시간 후 HaCaT 세포에서 NF- $\kappa$ B 결합 활성도 측정 결과,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 두 농도에서 농도에 비례하여 NF- $\kappa$ B 결합 활성도가 증가되었다(A). 반면에 NF- $\kappa$ B에 대한 억제제를 투여했을 경우에는 NF- $\kappa$ B 결합 활성도에는 큰 변화가 없었다(B).

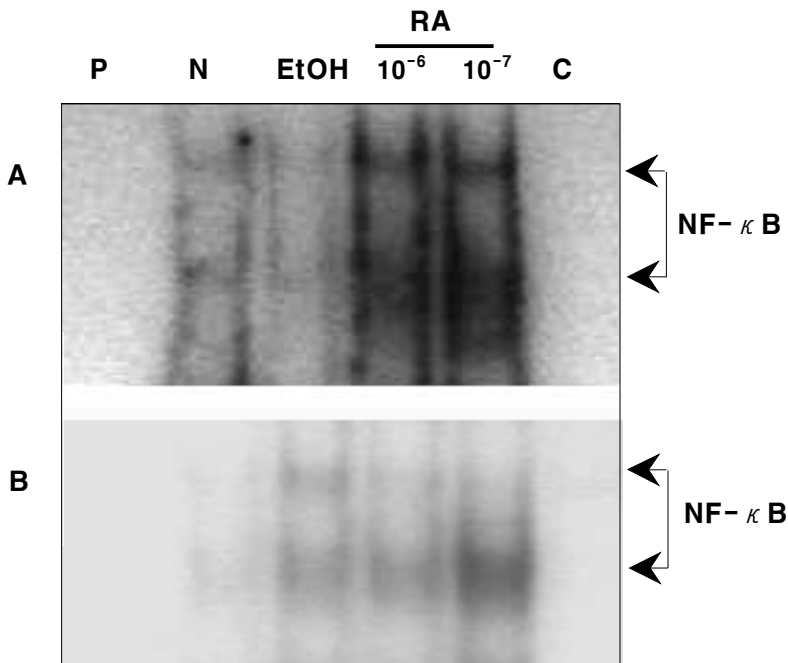


그림 5.  $10^{-6}$  및  $10^{-7}$  M의 레티노인산 투여 24시간 후 NF- $\kappa$ B의 활성도가 증가되었으나(A) NF- $\kappa$ B 억제제 투여 후에는 NF- $\kappa$ B 활성의 증가가 없었다(B). (A: NF- $\kappa$ B 억제제 투여 전, B: NF- $\kappa$ B 억제제 투여 후) (P: probe only, N: normal, EtOH: ethanol, RA: retinoic acid, C: competitor). 본 실험결과는 2회의 독립적인 실험의 결과이다.

4. IL-1ra가 레티노인산에 의한 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향 (그림 6)

IL-1ra처리 전후에 레티노인산을  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M 투여하여 IL-8 mRNA의 발현을 비교하였을 때 IL-1ra를 처리하지 않은 좌측의 그래프와 IL-1ra처리 후의 우측의 그래프에서 IL-8 mRNA 발현에 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

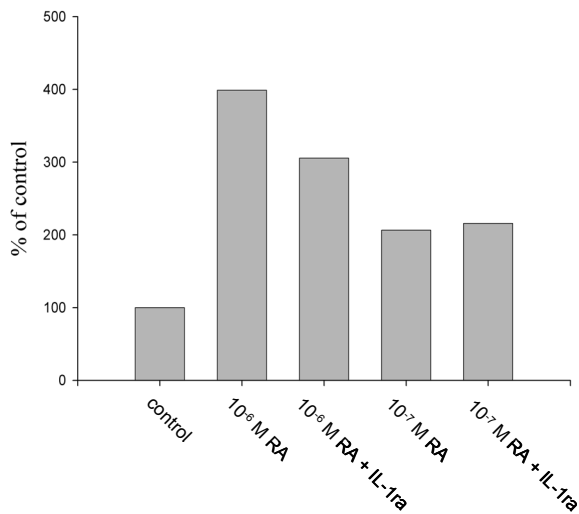


그림 6. IL-1ra의 처리 전후에 레티노인산을 투여한 후 IL-8 mRNA 발현을 본 결과 IL-1ra는 레티노인산에 의한 IL-8 mRNA 발현에 영향을 미치지 못하였다.

5. Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  항체를 이용한 western blot(그림 7)

$10^{-6}$  M 레티노인산 투여 12시간과 24시간 모두에서 세포질 내의 인산화 된 I $\kappa$ B의 농도가 증가되는 것을 확인하였다.

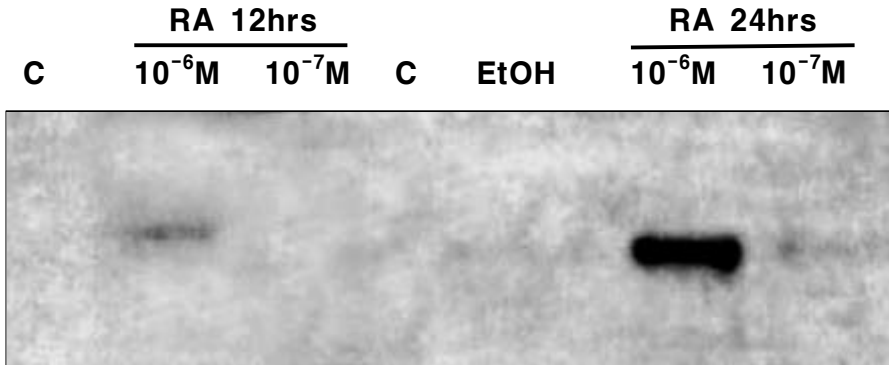


그림 7.  $10^{-6}$  M의 레티노인산 투여 후 HaCaT 세포질내에 I $\kappa$ B의 인산화가 증가되었다(C: control, EtOH: ethanol, RA: retinoic acid). 본 실험 결과는 2회의 독립적인 실험의 결과이다.

#### IV. 고 찰

각질형성세포는 표피를 구성하는 세포로 단순한 물리적 장벽의 기능뿐만 아니라 많은 종류의 사이토카인을 분비하여 면역 기능과 염증 반응에 관여한다<sup>20</sup>. 외부의 자극을 받으면 각질형성세포는 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 일차 사이토카인을 분비하여 IL-8이나 MCP-1, IP-10과 같은 케모카인의 생성을 유도함으로써 활성화된 염증세포들이 자극 부위로 모여들게 하여 염증반응을 일으킨다<sup>21-24</sup>.

레티노인산의 국소도포로 유발될 수 있는 자극성 피부염은 다른 화학물질에 의한 전형적인 자극성 피부염에 비하여 다소 지연되어 나타나며 레티노인산으로 인한 염증유발 기전에 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 등의 사이토카인이 관여하고 있음이 보고 되었으나<sup>24</sup> 이들 염증성 사이토카인이 발현되는 기전에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다<sup>25-27</sup>. 본 연구에서도 레티노인산 투여 후 IL-1, IL-8같은 사이토카인의 증가를 확인하였는데 IL-1은 자극 초기에만 증가하였으나 IL-8은 레티노인산 투여 24시간 후에도 증가하는 모습을 보였다.

레티노인산이 유전자 발현을 조절하는 방법으로 몇 가지가 알려져 있는데 첫째로 레티노인산은 핵 수용체인 레티노인산 수용체(RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )와 레티노이드 X 수용체(retinoid X receptor, RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )에 결합하고 이들 수용체에 특이한 DNA 염기서열에 결합하여 리간드에 의한 전사조절에 관여하게 된다<sup>10, 28</sup>. 즉, RAR은 대개 RXR과 서로 합하여 이형이량체(heterodimer)를 형성하는데 이 이형이량체는 특정 유전자 위쪽 프로모터에 존재하는 특이한 호르몬 반응 단위에 결합함으로써 특정 유전자의 발현을 전사적으로 활성화 시킨다<sup>10</sup>. 레티노인산 수용체에 의한 유전자 발현 조절의 또 다른 방법으로는 서로

연관되지 않는 전사인자와의 단백질-단백의 직접결합에도 의한다. 즉, 레티노인산은 AP-1에 반응하는 유전자에 대해서 억제하는 역할을 하는데 이는 RAR이 AP-1 전사인자 복합체 중 하나인 c-JUN과 결합하여 AP-1이 반응 영역(response element)에 결합하는 것을 방지하며 대표적인 예가 collagenase promoter이다<sup>29, 30</sup>. 마지막으로 RAR과 연관이 전혀 없는 여러 유전자들도 레티노인산이 다른 전사인자를 활성화 시키거나 억제시킴으로써 유전자 발현을 조절하게 된다<sup>31</sup>.

NF- $\kappa$ B는 여러 가지 사이토카인과 스트레스 또는 생물리화학적 자극에 의해 활성화되어 여러 유전자의 발현에 영향을 미침으로써 염증반응과 면역반응에 핵심적인 역할을 하는 전사인자이다. NF- $\kappa$ B는 Rel 족에 속하는 여러 단백질의 이형체를 형성하는데 불활성화 상태에서는 I $\kappa$ B라는 NF- $\kappa$ B의 억제제에 의해 세포질 내에 머물러 있다가 활성화되면 I $\kappa$ B는 I $\kappa$ B kinases(IKK)에 의해 인산화되면서 분해되고 NF- $\kappa$ B는 핵 안으로 들어가 유전자와 결합한다<sup>16</sup>. 이러한 NF- $\kappa$ B 경로는 여러 다양한 자극에 의해 세포마다 특이하게 활성화되어 유전자 발현에 서로 다른 효과를 유발할 수 있다<sup>32</sup>.

IL-8은 C-X-C케모카인에 속하는 8.4 kDa의 케모카인으로써 단핵구/대식세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 활막세포, 각질형성세포, 상피세포 등 다양한 세포와 위암세포나 뇌신경종양등의 종양세포에서도 생산된다<sup>33</sup>. IL-8의 전형적인 유도인자는 염증반응의 자극으로 IL-1, TNF, bacterial lipopolysaccharides, 바이러스, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, double-stranded RNA등이 있다. IL-8 유전자의 3' flanking region에는 ATTTA 모티브가 존재하여 여러 가지 사이토카인을 불안정화시키는 역할을 하



고, IL-8의 프로모터인 5' flanking region에는 여러 가지 전사인자, 즉 AP-1, AP-2, AP-3, HSE, HNF-a, IRF-1, glucocorticoid 수용체, NF- $\kappa$ B, NF-IL-6와 octamer factor가 결합할 수 있는 유전자를 포함한다<sup>34, 35</sup>. IL-8유전자의 전사 시작부위에서 -94에서 -70 nucleotide가 NF- $\kappa$ B와 NF-IL-6에 의해 유도되거나 억제되는 부위로 추정되고 있다. 이 부위는 여러 염증성 사이토카인에 의해서 IL-8이 발현되는 부위와 일치하므로 NF- $\kappa$ B가 IL-8유전자의 전사에 핵심적인 역할을 한다고 추정할 수 있다<sup>35</sup>.

본 연구에서는 레티노인산을 HaCaT세포에 투여하였을 때 시간에 따른 차이는 있었지만 IL-1과 IL-8의 증가를 확인 할 수 있었다. 또한 레티노인산에 의해 IL-8이 증가되는 기전이 NF- $\kappa$ B의 경로에 의한 것이라는 가설 하에 EMSA를 이용하여 레티노인산 투여 후 농도와 시간에 따라 NF- $\kappa$ B 발현의 변화를 확인하였으며 NF- $\kappa$ B에 대한 억제제를 투여한 후 레티노인산을 처리하면 IL-8의 발현이 억제되는 것을 알 수 있었다. 또 이를 좀 더 명확히 확인하기 위해 I $\kappa$ B에 대한 dominant negative mutant를 이용하여 transient transfection시킨 후 NF- $\kappa$ B 경로를 폐쇄한 후에 같은 실험을 한 결과 레티노인산에 의한 IL-8의 발현은 NF- $\kappa$ B를 통해서 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 레티노인산 처리 후 세포질 내에 인산화된 I $\kappa$ B의 양이 증가되는 것을 확인하였다. 하지만 레티노인산에 의해서 여러 가지 세포나 종양세포에 의해서 IL-8이 증가하는 것은 증명되어 있으나 IL-8 유전자의 조절부위에 전형적인 레티노인산의 반응 단위가 존재하지 않으므로 레티노인산이 어떻게 IL-8의 발현을 증가시키는지에 대해서는 밝혀져 있지 않으며 다만 NF- $\kappa$ B와 연관된다고 추정하고 있다. 여기에 대해서는 레티노인산에 의한 자극,

예를 들면 IKK의 증가와 같은 자극에 의해서 NF- $\kappa$ B로부터 I $\kappa$ B의 해리를 촉진하여 NF- $\kappa$ B의 핵 내 진입을 용이하게 할 수 있다는 가설과, 레티노인산이 NF- $\kappa$ B 단위단백의 합성을 증가시키거나 I $\kappa$ B의 수준을 억제하는 등의 의견이 제시되고 있으나 아직 증명되지는 않았다<sup>34</sup>. 또한 스테로이드 수용체에 속하는 부신피질 호르몬 수용체나 에스트로젠 수용체, 프로জে스테론 수용체, 안드로젠 수용체 등이 실험실 상에서 NF- $\kappa$ B와 물리적으로 연결되어 NF- $\kappa$ B의 작용을 억제한다는 실험연구와 유사하게 NF- $\kappa$ B와 RXR이 서로 물리적으로 연결되어 사이토카인 발현을 억제한다는 가설도 존재한다<sup>13</sup>.

저자들은 이에 레티노인산 투여 후 초기에만 증가하는 IL-1 같은 일차 사이토카인이 중간 자극제 역할을 하여 IL-1이 IL-1수용체에 결합 후 IKK를 활성화 시켜 NF- $\kappa$ B가 핵 내로 진입하여 IL-8의 프로모터에 결합하여 IL-8유전자 발현을 조절할 수 있다는 가설을 세우고 IL-1수용체에 대한 길항제를 처리하여 IL-1에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제했을 때 IL-8의 발현이 증가되는 지를 확인하였다. 결과에서 보듯이 IL-1ra처리 후에 레티노인산을 처리하였을 때 발현되는 IL-8 mRNA의 양은 큰 차이가 없어 IL-1이 어떤 중간 자극제의 역할을 하여 IL-8유전자 발현에 영향을 미쳤다고 볼 수는 없었다. 결론적으로 레티노인산을 각질형성세포에 처리 후 NF- $\kappa$ B 작동에 의해 IL-8 유전자가 발현이 증가된 것은 레티노인산이 IKK에 의한 I $\kappa$ B의 해리를 증가시켜 NF- $\kappa$ B의 핵 내 진입을 용이하게 하여 IL-8 유전자 발현에 영향을 미쳤을 거라고 여겨진다. 하지만 레티노인산이 어떤 경로로 IKK를 활성화 시키는가에 대해서는 계속 연구가 진행되어야 할 것이다.

## V. 결 론

레티노인산을 각질형성세포에 투여하였을 때 증가하는 대표적 사이토카인인 IL-8의 유전자 발현에 레티노인산이 어떤 경로로 작용하는지를 알아보려고 본 연구를 시행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 레티노인산을 각질형성세포에 투여하였을 때 IL-1과 IL-8 mRNA 발현이 증가하였다.
2. 레티노인산을 각질형성세포에 투여하면 각질형성세포 내의 I $\kappa$ B의 인산화가 증대되었고 NF- $\kappa$ B가 활성화 되었다.
3. 레티노인산에 의한 IL-8 유전자의 발현에 IL-1은 중간자극제로서 관여하지 않았다.

결론적으로 레티노인산에 의한 각질형성세포의 IL-8 유전자 발현의 증가는 NF- $\kappa$ B를 통해서 이루어짐을 알 수 있었다. 그리고 NF- $\kappa$ B의 활성화는 IL-1에 의한 영향과는 관련이 없음을 확인하였으며 레티노인산에 의해 IKK활성화로 인해 I $\kappa$ B의 인산화와 해리를 촉진하여 NF- $\kappa$ B의 작동을 용이하게 했을 것으로 추정한다.

## 참고문헌

1. Erickson JM, Mawson AR. Possible role of endogenous retinoid(Vitamine A) toxicity in the pathophysiology of primary biliary cirrhosis. J Theor Biol 2000; 206: 47-54
2. Racke AE, Racke MK. Retinoic acid promotes the development of Th2 like human myelin basic protein-reactive T cells. Cell Immunol 2002; 215: 54-60
3. Ballow M, Wang W, Xiang S. Modulation of B cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. Clin Immunol Immunopathol 1996; 80 Suppl: 73-81
4. Yun JI. Retinoid. Clin Dermatol(Seoul) 1996; 2(2): 65-66
5. Kang SW. Metabolism and molecular action of retinoids in human skin. Clin Dermatology(Seoul) 1997; 3(1): 8-10
6. MacGregor JL, Maibach H. The specificity of retinoid-induced irritation and its role in clinical efficacy. Exog Dermatol 2002; 1: 68-73
7. Petkovich PM. Retinoid and metabolism. J Am Acad Dermatol 2001; 45 Suppl: 136-142
8. Harant H, Lindley I, Uthman A, Ballaun C, Krupitza G, Grunt T, et al. Regulation of interleukin-8 gene expression by all-*trans* retinoic acid. Biochem Biophys Res Com 1995; 210: 898-906
9. Harant H, de Martin R, Andrew PJ, Foglar E, Dittrich C, Lindley I. Synergistic action of interleukin-8 gene

- transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor- $\alpha$  involves the transcriptional factor NF- $\kappa$ B. *J Bio Chem* 1996; 271: 26954-26961
10. Chang M MJ, Harper R, Hyde DM, Wu R. A novel mechanism of retinoid acid-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *Am J Resp cell Mol Bio* 2000; 22: 502-510
  11. Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanism of retinoid actions in skin. *FASEB J* 1996;10:1002-1013
  12. Awad S, Yokozeki H, Miyazaki Y, Igawa K, Minatohara K, Satoh T, et al. Glucocorticoid induced the production and gene expression of IL-1 $\alpha$  through AP-1 and partially NF- $\kappa$ B activation in murine epidermal cells. *J Med Den Sci* 2002; 49: 27-35
  13. Na S-Y, Kang BY, Chung SW, Han SJ, Ma X, Trinchieri G, et al. Retinoid inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical association of retinoid X receptor and NF- $\kappa$ B. *J Bio Chem* 1999; 274: 7674-7680
  14. Bernard FX, Pedretti N, Rosoy M, Deguercey A. Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis. *Exp Dermatol* 2002; 11: 59-74

15. Roebuck KA. Regulation of Interleukin-8 gene expression. J Interferon Cytokine Res 1999;19:429-438
16. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatments of inflammation and cancer. J Clin Invest 2001; 107: 514-521
17. Pahl HL. Activators and targets genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. Oncogenes 1999; 18: 6853-6866
18. Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossman M. The regulation and roles of Rel/NF- $\kappa$ B transcriptional factors during lymphocytes activation. Curr Opin Immunol 1998; 10 : 353-359
19. Brockman JA, Scherer DC, McKinsey TA, Hall SM, Qi X, Lee WY, Ballard DW. Coupling of a signal response domain in I $\kappa$ B $\alpha$  to multiple pathways for NF- $\kappa$ B activation. Mol Cell Biol 1997; 15:2809-2818.
20. Shimada S, Katz SI. The skin as an immunologic organ. Arch Pathol Lab Med 1998; 112: 231-234
21. Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. J Invest Dermatol 1990; 94 Suppl: 101-107
22. Grone A. Keratinocytes and cytokines. Vet Immunolo Immunopathol 2002; 88: 1-12
23. Sauder DN. The role of epidermal cytokines in inflammatory skin disease. J Invest Dermatol 1990; 95

suppl: 27-28

24. 김지윤. 레티노인산이 배양 각질형성세포에서 사이토카인 발현에 미치는 영향. 연세대학교 의과학과 석사학위논문, 2003
25. Jessens S, Bols L, Vandermeeren M. Retinoic acid potentiates TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 expression in normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:64-69
26. Green GS. Retinoic acid effects on endothelial cell function: Interaction with IL-1. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72(1): 53-61
27. Gidlóf AC, Romert A, Olsson A, Tórmă H, Eriksson U, Sirsjó A. Increased retinoid signaling in vascular smooth muscle cells by proinflammatory cytokines. *Biochem Biophys res Commun* 2001; 286: 336-342
28. Yu VC, Delsert L, Anderson B, Holloway JM, Devary OV, Năăr AM, et al. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response element. *Cell* 1991; 67: 1251-1266
29. Shúle R, Rangarajan P, Yang N, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, et al. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A* 1991; 88: 6092-6096
30. de Grazia U, Felli MP, Vacca A, Farina AR, Maroder M, Cappabianca L, et al. Positive and negative regulator of

- the composite octamer of the Interleukin-2 enhancer by AP-1, Oct-2 and retinoic acid receptor. *J Exp Med* 1994; 180:1485-1497
31. Segars JH, Nagata T, Bours V, Medin JA, Franzoso G, Blanco JCG, et al. Retinoic acid induction of major histocompatibility complex class I genes in NTera-2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF-kappa B(p50-p65) and retinoic acid receptor beta-retinoid X receptor beta heterodimers. *Mol Cell Biol* 1993; 13:6157-6169
  32. Schooley K, ZHV P, Dower SK, Qwarnström EE. Regulation of nuclear translocation of nuclear factor-kappa B relA: evidence for complex dynamic at the single cell level. *Biochem J* 2003; 369: 331-339
  33. Roebuck KA. Regulation of Interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 429-438
  34. Chang MM-J, Harper R, Hyde DM, Wu R. A novel mechanism of retinoic acid-enhanced Interleukin-8 gene expression in air way epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 502-510
  35. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF. Synergistic transcriptional activation of the Interleukin-8 gene by NF-kappaB p65(RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 1994; 153: 153-164.



## Abstract

A mechanism of retinoic acid-enhanced IL-8 gene expression in keratinocytes.

Yae Lee Chung

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo-Chan Kim)

IL-8 is a member of the C-X-C chemokine family and an important chemoattractant for neutrophils and has been implicated in a variety of inflammatory diseases. It has been reported to be produced by variety of cell types, including keratinocytes. The production of IL-8 is normally not constitutive, but is induced mainly by inflammatory mediators like TNF- $\alpha$ , or IL-1 and also by PMA, lectins and viruses. The core IL-8 promoter contain a nuclear factor(NF)- $\kappa$ B element that is required for activation in all cell types studied, activating protein(AP-1), AP-2, AP-3, glucocorticoid receptor, NF-IL-6, and octamer factors, etc. Unlike other transcriptional factors, NF- $\kappa$ B site is essential for induction for gene expression.

Retinoic acid (RA), a derivative of Vitamin A, is a modulator of immunologic and inflammatory responses. All-trans retinoic acid(ATRA), one of the naturally oxidized substances of retinoids, is clinically used for treatment of psoriasis, acne, photo-aging dermatoses and other skin diseases. However,

the use of RA is restricted to the application because it induces irritant contact dermatitis. RA has been reported to induce up-regulation of IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8 mRNA and release in dermal fibroblasts and keratinocytes.

In this study, a stimulation of IL-8 gene expression by RA was demonstrated in HaCaT keratinocytes. Inhibition and transient transfection assay revealed the involvement of NF- $\kappa$ B binding site of IL-8 gene in RA-enhanced promoter activity. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) demonstrated that RA enhanced DNA-NF- $\kappa$ B complex formation, especially with the p65 subunit.

We concluded that RA is able to cause transactivation of IL-8 gene, which does not contain classical RA response elements in its regulatory region. The stimulation of RA on the expression of IL-8 mRNA was related to activation of NF- $\kappa$ B binding activity, which is essential for enhanced IL-8 gene expression. However, there is no evidence to support a direct interaction between RA-mediated transcriptional machinery and IL-8 gene transcription. We suspected the mechanism of involvement of IL-1 as an intermediate stimulus in the RA-mediated IL-8 up regulation in HaCaT cells. However, there is no evidence to support IL-1 as an intermediate stimulus between RA-mediated transcriptional machinery and IL-8 gene transcription. Therefore, our result suggested that the IL-8 gene expression by HaCaT cell after RA stimulation results from the activation of IKK and dissociation of I $\kappa$ B from NF- $\kappa$ B and the transcription of NF- $\kappa$ B to the nucleus

---

Key Words : retinoic acid, IL-8, NF- $\kappa$ B, HaCaT cell