

인간 표피 각질형성세포에서 대기 미립자 물질 PM10에 의해 유도되는 반응성 산소종의 생성에서 Dual oxidase 2의 역할

석진경·최민아·하재원·부용출[†]

경북대학교 의과대학 분자의학교실,
BK21플러스 KNU의생명융복합창의인재양성사업단, 세포기질연구소
(2019년 1월 8일 접수, 2019년 2월 18일 수정, 2019년 2월 18일 채택)

Role of Dual Oxidase 2 in Reactive Oxygen Species Production Induced by Airborne Particulate Matter PM10 in Human Epidermal Keratinocytes

Jin Kyung Seok, Min A Choi, Jae Won Ha, and Yong Chool Boo[†]

Department of Molecular Medicine, BK21PLUS KNU Biomedical Convergence Program for Creative Talent, Cell and Matrix Research Institute, School of Medicine, Kyungpook National University, 680 Gukchaebosang-ro, Jung-gu, Daegu, 41944, Republic of Korea

(Received January 8, 2019; Revised February 18, 2019; Accepted February 18, 2019)

요약: 직경 10 μm 미만의 대기 미립자 물질(particulate matter, PM10)은 다양한 신체기관에서 산화 스트레스와 염증반응을 유발한다. 본 연구의 목적은 인간 표피 각질형성세포(HEK)에서 PM10에 의해 유도되는 반응성 산소종(ROS) 생성의 메커니즘을 알아보는 것이다. 배양된 HEK를 PM10에 노출시켰을 때 ROS가 증가하였으며, 이는 항산화제 apocynin에 의해 저해되었다. PM10에 의해 유도되는 ROS 생성에서 NADPH oxidase (NOX) family의 역할을 규명하기 위하여 이들의 mRNA 발현을 분석하였다. PM10은 NOX1, NOX2, dual oxidase (DUOX)1 및 DUOX2의 mRNA 발현을 증가시켰다. 다른 NOX들에 비교하여 DUOX1 및 DUOX2의 발현 수준이 높았으며, 이들 효소의 maturation factors, 즉 DUOXA1와 DUOXA2의 mRNA 발현도 PM10에 의하여 증가하였다. 칼슘 의존성 효소인 DUOX1과 DUOX2가 PM10에 의해 유도되는 ROS의 생성을 매개하는지 조사하였다. 선택적인 세포내 칼슘 킬레이터인 BAPTA-AM은 PM10 및 칼슘 ionophore A23187에 유도된 ROS 생성을 감소시켰다. 작은 간섭 RNA (siRNA)에 의한 DUOX2의 하향 조절은 PM10에 의해 유도된 ROS의 생성을 감소시켰고 DUOX1 siRNA는 영향이 없었다. PM10은 interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 및 interferon (IFN)- γ 등 사이토카인의 발현을 증가시켰다. siRNA에 의한 DUOX2의 하향 조절은 IFN- γ 의 발현을 저해하였지만 다른 사이토카인의 발현은 저해하지 않았다. 본 연구는 PM10에 노출된 HEK의 ROS 생성 및 염증 반응에서 DUOX2가 중요한 역할을 함을 시사한다.

Abstract: Particulate matters with a diameter of $< 10 \mu\text{m}$ (PM10) exert oxidative stress and inflammatory events in various organs. The purpose of this study was to examine the molecular mechanism of reactive oxygen species (ROS) production induced by PM10 in the human epidermal keratinocytes (HEKs). When cultured HEKs were exposed to PM10, ROS production was induced and it was inhibited by apocynin, an antioxidant. The mRNA expression of NADPH oxidase (NOX) family was analyzed in order to examine their role in PM10-induced ROS production. PM10 increased

[†] 주 저자 (e-mail: ycboo@knu.ac.kr
call: 053)420-4946

the mRNA expression of NOX1, NOX2, dual oxidase (DUOX) 1 and DUOX2. HEKs expressed DUOX1 and DUOX2 at higher levels compared to other NOXs. The mRNA expression of dual oxidase maturation factors, DUOXA1 and DUOXA2, was also increased by PM10. We examined whether these calcium-dependent enzymes, DUOX1 and DUOX2, mediate the PM10-induced ROS production. A selective intracellular calcium chelator, BAPTA-AM, attenuated ROS production induced by PM10 or calcium ionophore A23187. The small interference RNA (siRNA)-mediated down-regulation of DUOX2, but not DUOX1, attenuated the ROS production induced by PM10. PM10 increased the expression of inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 and interferon (IFN)- γ . SiRNA-mediated down-regulation of DUOX2 suppressed the PM10-induced expression of IFN- γ but not other cytokines. This study suggests that DUOX2 plays a crucial role in ROS production and inflammatory response in PM10-exposed keratinocytes.

Keywords: airborne particulate matters, dual oxidase 2, reactive oxygen species, calcium ion, keratinocytes

1. 서론

대기 미립자 물질(airborne particulate matter, PM)은 심각한 건강 문제를 일으킨다[1]. PM은 탄소 중심의 연소 입자들, 2차 무기물 및 지각의 파생 입자를 포함한 여러 가지 화합물의 혼합물을 포함한다. 미세먼지는 입자의 크기에 따라 10 μm 이하를 미세먼지(particulate matter, PM10), 2.5 μm 이하를 초미세먼지(fine particulate matter, PM2.5), 0.1 μm 이하를 극미세먼지(ultrafine particulate matter, PM0.1)로 정의하고 있다[2]. PM에 지속적으로 노출될 경우 심장질환[3,4], 호흡기질환[5,6] 및 심혈관질환[7]의 환자 수가 늘며 사망률도 높아진다.

피부는 신체를 보호하는 장벽으로서 환경오염물질에 직접적으로 노출되는 기관이다. 피부에는 PM보다 더 큰 모공이 있으며 PM이 직접적으로 침투할 수 있다[8]. 따라서 피부 장벽이 손상된 어린이와 환자의 경우 경피 흡수 증가로 인해 PM에 의해 쉽게 영향을 받는다[9]. PM은 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 및 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)- α , 인터루킨(interleukin, IL)-1 β , IL-6 및 IL-8과 같은 염증성 사이토카인의 분비를 통해 산화 스트레스를 유도한다[10-12]. 또한 PM의 노출에 의한 슈퍼옥사이드 이온 (superoxide anion, O $_2^{\cdot-}$), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H $_2$ O $_2$), 그리고 하이드록시 라디칼 (hydroxyl radical, OH)과 같은 ROS의 증가는 matrix metalloproteinases (MMPs), 즉 MMP-1, MMP-2 및 MMP-9 등을 증가시켜 콜라겐의 분해를 초래한다[13]. PM은 다양한 메커니즘으로 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 여드름(acne), 건선(psoriasis)등 염증성 피부질환에 영향을 미친다[10-12,14]. 그러나 PM에 유도되는 ROS의 생성에 대한 메커니즘은 거의 밝혀지지 않았다.

NADPH oxidase (NOX) family는 세포 내 ROS의 공급원으로 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, dual oxidase (DUOX) 1과 DUOX2로 7개의 NOX 동족체로 분류된다. 각 효소의 서브 유닛의 조성을 다르지만 이들은 NADPH로부터 산소 전자를 전달하여 ROS를 생성하는 활성을 공유한다[15]. 이러한 NOX 효소는 숙주 방어 및 세포 신호 전달과 같은 생리와 면역 억제, 갑상선 기능 저하증 등의 병리에도 기여한다[16]. 여러 NOX family 중 DUOX1과 DUOX2는 maturation factor인 DUOXA1과 DUOXA2를 필요로 한다[17,18]. DUOX1과 DUOX2는 칼슘 이온 결합 EF-hands 모티프를 가지고 있으며, 세포 내 칼슘 이온의 증가에 의해 활성화되어 H $_2$ O $_2$ 를 생성한다[19]. 분진 입자에 의해 노출된 폐 섬유아세포에서 세포내 칼슘 이온 의존성 신호전달과 ROS가 유도된다[20]. DUOX2/DUOXA2의 변이는 선천성 갑상선 기능 저하증 및 크론병과 연관이 있다고 보고되었다[21,22].

본 연구의 목적은 인체 표피 각질형성세포에서 PM10에 의해 유도되는 ROS 생성에서 NOX family, 특히 DUOX2의 역할에 대해 알아보는 것이다.

2. 재료 및 실험

2.1. 시약

대기 미립자 물질(PM10, 유럽 표준물질 ERM-CZ120), 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM), A23187와 2'7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (H $_2$ DCFDA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) 에서 구매하였다.

Table 1. Sequences of primers used for PCR amplification of gene transcripts

Gene symbol	GenBank Accession No.	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')
NOX1	NM_007052	AAT GCT GTC ACC GAT ATT CCA	AGA TTA CCG TCC TTA TTC CTA TAA CTC
NOX2	NM_00397.3	TGT TAG TGG GAG CAG GGA TTG	TCA GAT TGG TGG CGT TAT TGC
NOX3	NM_015718	CAC TGA AGC TGA GCA AGG TGT A	CGT GTT TCC AGG GAG AGTA AGA GA
NOX4	NM_001143836.1 NM_001143837.1	GCA TGT GGC TGC CCA TCT	GCC AGG AAC AGT TGT GAA GAG A
NOX5	NM_001184780 NM_024505	TGG ATC GAA GGT GTC CAA GA	CAG CAG GCT CAC AAA CCA CT
DUOX1	NM_017434 NM_175940	CTT GAA CAA TTT GTG CGG CT	GCA GGG TGG TAT TTC GGA TT
DUOX2	NM_014080	GGG TTT TCA AAG CTC CCA AG	TGT TGT CCT CCA ACT CCG AA
DUOXA1	NM_144565.3 NM_001276267.1	CAT TCC TCT GCT GGC TAC TG	AGC ATG TGG CCA CCA TAA AC
DUOXA2	NM_207581.3	CAG TGC AGA ATG GTT CGT GG	TGG GGT CCC TGT GAG TGT AA
IFN-γ	NM_000619	ACT GTC GCC AGC AGC TAA AA	TAT TGC AGG CAG GAC AAC CA
IL-1β	NM_000576.2	CCT GTC CTG CGT GTT GAA AGA	GGG AAC TGG GCA GAC TCA AA
IL-6	NM_001318095.1 NM_000600.4	AAG CCA GAG CTG TGC AGA TGA GTA	TGT CCT GCA GCC ACT GGT TC
IL-8	NM_000584.3	CTG CGC CAA CAC AGA AAT TA	ACT TCT CCA CAA CCC TCT GC
GAPDH	NM_001289746.1	ATG GGG AAG GTG AAG GTC G	GGG GTC ATT GAT GGC AAC AA

2.2. 인간 표피 HEK의 배양

성인의 표피 HEK(Invitrogen, USA)는 10% EpiLife Defined Growth supplement과 항생제(100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.25 µg/mL 암포테리신 B)을 포함하는 EpiLife 배지(Gibco BRL, Grand Island, USA)에서 배양하였다. 세포는 5% CO₂ 와 공기 95% 의 37 °C 에서 배양하였다.

2.3. Small interference RNA (siRNA) 처리

인간 DUOX1 (Gene ID; 53905) 및 DUOX2 (Gene ID; 50506)에 대한 siRNA와 음성 대조 올리고는 (췌바이오니아 (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 siRNA 서열은 siDUOX1 #1, (sense) 5 '-CAG GAU ACC GGC CAU UUC U-3'과 (antisense) 5 '-AGA AAU GGC CGG UAU CCU G-3'; siDUOX1 #2, (sense) 5 '-CAC AAC UAA UUU CAC CCA A-3'과 (antisense) 5 '-UUG GGU GAA AUU AGU UGU G-3'; siDUOX2 #1, (sense) 5 '-GUG AUC

UCA ACC CUA AUG U-3'과 (antisense) 5 '-ACA UUA GGG UUG AGA UCA C-3'; siDUOX2, #2, (sense) 5 '-CAG UCA AUG UCU ACA UCU U-3'과 (antisense) 5 '-AAG AUG UAG ACA UUG ACU G-3'이다. HEK에 100 nM siRNA와 1.25 µL/mL Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, USA)이 포함된 Opti-MEM 혼합물을 4 h 동안 처리하여 transfection 한 뒤, 성장 배지에서 배양하였다.

2.4. PM10의 처리방법

12-well plate 에 well 당 4 x 10⁵ 개의 세포를 넣어 성장 배지에서 24 h 배양하였다. PM10을 10 mg/mL 농도로 PBS 에 희석하여 제조한 stock 용액을 성장 배지에 첨가하여 표시된 최종 농도가 되도록 하였다.

2.5. ROS 생성의 측정

12-well plate에 well당 4 x 10⁵ 개의 세포를 넣어 성장 배지에서 24 h 배양하였다. 세포를 형광 표지인자인

H₂DCFDA(10 μM)로 30 min 처리한 후 PM10(3-100 μg/mL) 또는 A23184(0.1-3 μM)에 30 min 노출 하였다. Apocynin (500 μM) 또는 BAPTA-AM (5 - 10 μM)은 H₂DCFDA 처리 30 min 이전에 전처리하였다. 세포를 1% SDS를 함유 완충액 (20 mM의 Tris-Cl, 2.5 mM의 EDTA, pH 7.5) 150 μL로 용해한 후, 13,000 rpm 에서 30 min 원심분리하여 상등액을 얻어 Gemini EM fluorescence 형광 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 형광 강도를 측정하였다 (흡수파장 485 nm, 방출파장 538 nm).

2.6. 정량적 역전사 중합 효소 연쇄 반응 분석

(Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction, qRT-PCR)

세포의 mRNA 는 RNeasy 키트(Qiagen, USA)로 추출하였고 cDNA 합성은 cDNA 키트(Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. PCR 증폭은 StepOne Plus Real-Time PCR system으로 수행하였다. 반응 혼합물은 SYBR Green PCR Master Mix, 60 ng cDNA 와 2 pmol 유전자 특이적 프라이머 세트(Macrogen, Seoul, Korea)로 구성된다. 반응은 50 °C 에서 2 min, 95 °C에서 10 min, 40 회 증폭 (95 °C에서 15 sec, 60 °C에서 1 min)의 조건으로 해리 단계를 거쳤다. 용융 곡선 분석은 단일 피크를 나타내었으며, 이는 증폭산물의 균질성을 뒷받침했다. 각 유전자의 mRNA 수준은 내부 대조군 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 와 비교한 상대적 역치 주기방법을 이용하여 나타내었다. 본 연구에 사용된 프라이머 서열은 표 1 과 같다.

2.7. 통계 처리

모든 데이터의 결과는 3 회 이상의 독립적인 실험의 평균과 표준오차로 나타내었다. 실험군 간의 통계 처리는 SigmaStat v.3.11 software (Systat Software Inc, San Jose, USA)를 사용하여 일원배치분산 분석(one-way ANOVA)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 결정하였다.

3. 결 과

3.1. HEK에서 PM10에 의한 ROS 생성 유도

PM10이 ROS를 생성하는지 알아보려고 항산화제인 apocynin 처리 유무 조건에서 HEK를 PM10에 노출시켰다. 세포 내 발생하는 ROS는 형광현미경을 통해 확인하였다.

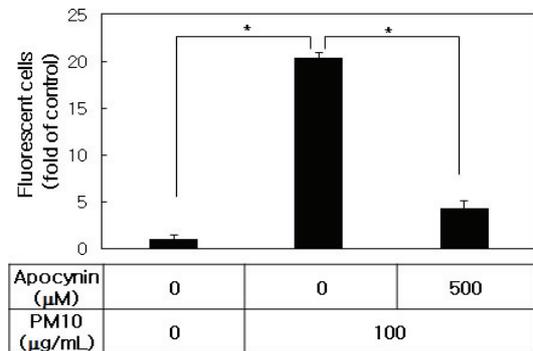
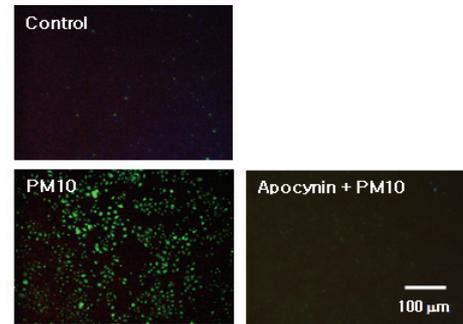


Figure 1. PM10 stimulates ROS production in HEKs. HEKs were pretreated with apocynin (500 μM) or vehicle. And then the cells were loaded with H₂DCFDA (10μM) and stimulated with PM10 (100 μg/mL). DCF fluorescence was visualized after 30 min. Representative images of 3 separate analyses are shown. The graph shows the quantification of fluorescent cells. Data are expressed as folds compared to control values. Means ± SEM, n = 3. * $p < 0.05$.

그 결과 PM10에 의해 세포 내 형광이 증가되었고 이는 apocynin에 의해 억제되었다(Figure 1).

3.2. PM10에 노출된 HEK에서의 NOX family의 발현 변화

HEK에서 PM10 농도에 따른 NOX family의 mRNA 발현 변화를 알아보았다. 각각의 PM10를 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 NOX1, NOX2, DUOX1, DUOX2의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였다(Figure 2). 상대적인 mRNA 발현 값은 DUOX1과 DUOX2가 높았다(Figure 2).

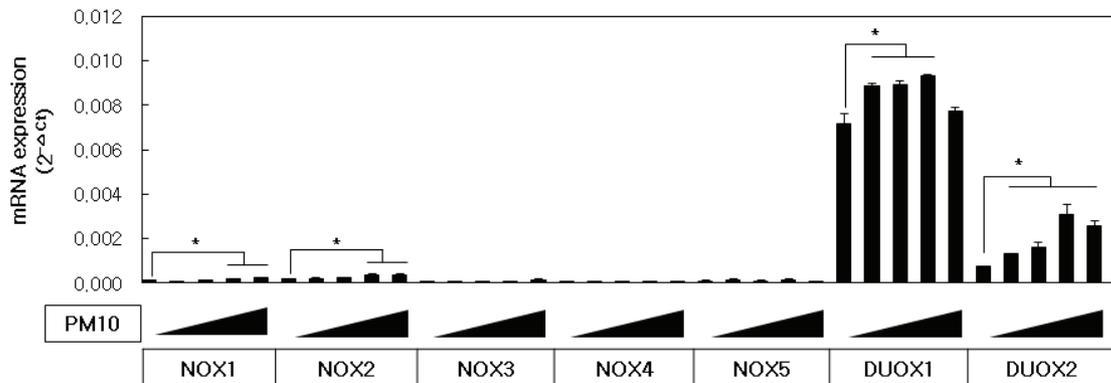


Figure 2. Effects of PM10 on the mRNA expressions of NOX family in HEKs. Cells were exposed to PM10 at increasing concentrations (0, 3, 10, 30, 100 μg/mL) for 24 h. The mRNA expressions of NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 and DUOX2 were determined by qRT-PCR and normalized to that of GAPDH. Data are expressed as folds compared to control values. Means ± SEM, n = 3. * p < 0.05.

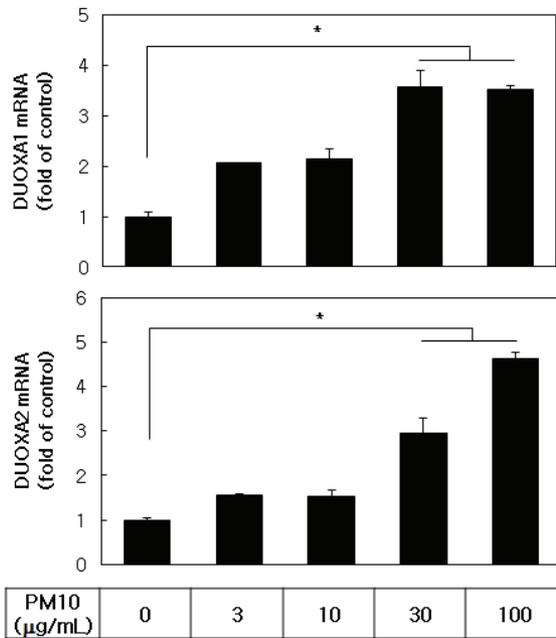


Figure 3. Effects of PM10 on the mRNA expressions of DUOXs maturation factors in HEKs. Cells were exposed to PM10 at the indicated concentrations for 24 h. The mRNA expressions of DUOX1 and DUOX2 were determined by qRT-PCR and normalized to that of GAPDH. Data are expressed as folds compared to control values. Means ± SEM, n = 3. * p < 0.05.

3.3. PM10에 노출된 HEK에서 dual oxidase maturation factors 의 발현 변화

DUOX1과 DUOX2의 활성을 나타내기 위한 필수 요소인 maturation factors의 발현도 측정하였다. HEK에서 DUOX1의 maturation factor인 DUOX1A1과 DUOX2의 maturation factor인 DUOX2A2의 발현도 PM10의 농도에 의존적으로 증가되었다(Figure 3).

3.4. PM10에 의한 HEK 내 ROS 생성의 칼슘-의존성

HEK에 선택적 칼슘이온의 킬레이터인 BAPTA-AM을 처리한 후 PM10과 A23187에 의한 ROS 생성 변화를 측정하였다. 먼저 PM10의 농도를 달리하여 HEK에 처리한 결과 3 μg/mL 이상의 농도에서 ROS 생성이 증가되었다. 또한 PM10에 의한 ROS 생성이 BAPTA-AM의 농도에 의존적으로 감소되었다. 다음으로 칼슘의 농도를 높여 주기 위해 A23187의 농도를 달리하여 처리한 결과 0.1 μM 이상의 농도에서 ROS 생성이 증가되었다. 또한 A23187에 의한 ROS 생성은 BAPTA-AM의 농도에 의존적으로 감소되었다(Figure 4).

3.5. PM10에 의한 HEK 내 ROS 생성에서 DUOX2의 필수적 역할

PM10에 의한 ROS 생성에 있어 DUOX1과 DUOX2의 역할을 알아보고자 각각에 대한 siRNA를 2 종류씩 사용하여 HEK에 transfection 하고 mRNA 발현과 ROS 생성을 측정하였다. DUOX1의 mRNA 발현이 2종류의 siDUOX1에 의해 저해되었으나, 2종류의 siDUOX2와 음성 대조에 의해서

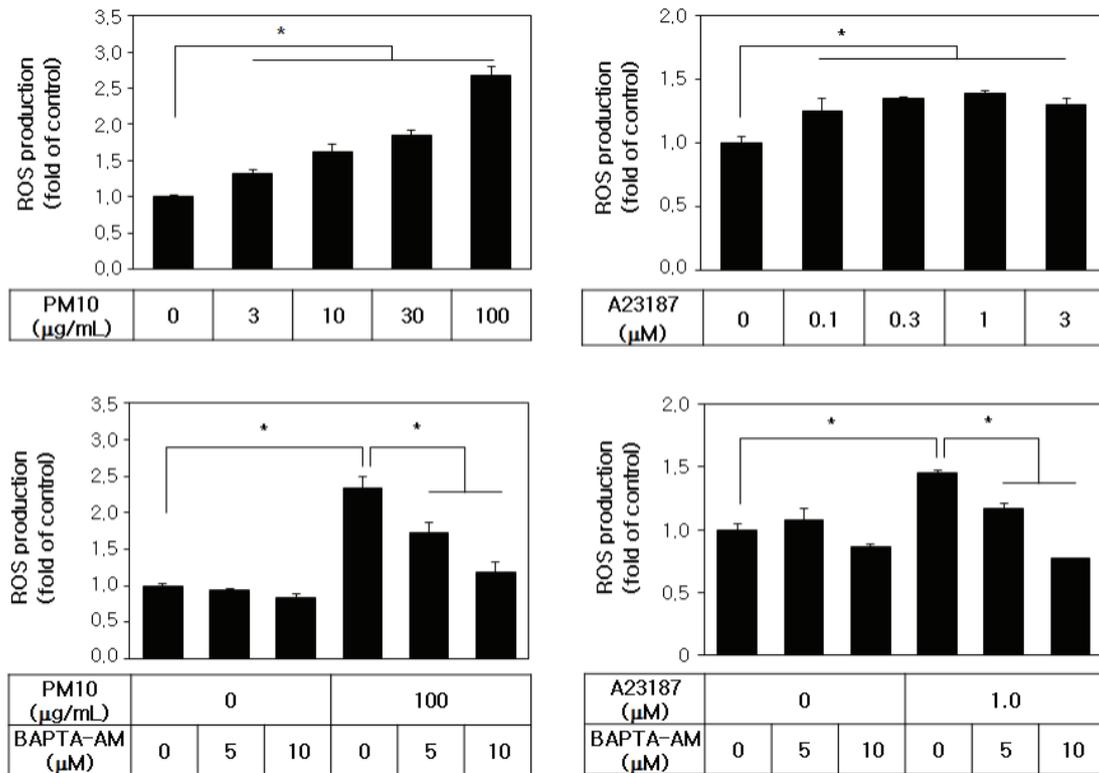


Figure 4. PM10 stimulates ROS production by a calcium-dependent mechanism in HEKs. Where indicated, cells were pretreated with BAPTA-AM for 30 min at the specified concentrations. Cells were loaded with H₂DCFDA (10 µM) for 30 min and stimulated with PM10 or A23187 at the indicated concentrations for 30 min. The fluorescent dye was extracted from the cells and quantified by measuring fluorescence intensity. Data are expressed as folds compared to control values. Means ± SEM, n = 3. * p < 0.05.

는 영향을 받지 않았다. DUOX2의 mRNA 발현이 2종류의 siDUOX2에 의해 저해되었으나, 2종류의 siDUOX1와 음성 대조에 의해서는 감소되지 않았다. PM10에 의해 유도된 ROS 생성이 DUOX1의 발현 억제에 의해서는 영향을 받지 않았지만 DUOX2의 발현이 억제에 의해서는 현저히 감소되었다(Figure 5).

3.6. PM10에 노출된 HEK에서 DUOX2 발현 억제가 사이토카인에 미치는 영향

DUOX2의 발현과 염증성 사이토카인의 발현간의 관련성을 알아보기 위하여 siDUOX2를 transfection한 HEK에 PM10을 처리하여 DUOX2 및 사이토카인들의 mRNA 발현을 분석하였다. PM10에 의해 유도된 DUOX2의 mRNA 발현은 10 nM 이상의 siDUOX2에 의해 유의하게 억제되었고, PM10에 의해 유도된 인터페론 (interferon, IFN)- γ 의 mRNA 발현도 100 nM siDUOX2에 의해 억제되었다. 그러나 PM10

에 의해 유도된 IL-1 β 의 mRNA 발현에는 siDUOX2가 영향을 미치지 않았으며, IL-6 와 IL-8의 mRNA 발현은 100 nM siDUOX2에 의해 더 증가되었다(Figure 5).

4. 고 찰

인간의 피부에서 표피 각질형성세포는 외부 독성 물질에 대한 방어성 피부 장벽의 형성에 중요한 역할을 한다. 연료 및 미세 물질에 노출된 세포에서 랑게르한스 세포 수 증가 및 지질 이중층의 특정 형태학적 변화가 초래된다 [23]. 인간 표피 각질형성세포는 표피 투과성 장벽에 영향을 줄 수 있는 염증성 사이토카인 및 오타코이드를 분비하여 독성 화학 물질 또는 유기 물질에 반응한다. 이러한 PM의 부작용과 관련된 메커니즘 중 하나는 산화 스트레스의 발생이다. 증가된 ROS의 생성은 병원체 진입을 막고 DNA손상을 복구하는 등의 피부 기능을 감소시켜 피부노

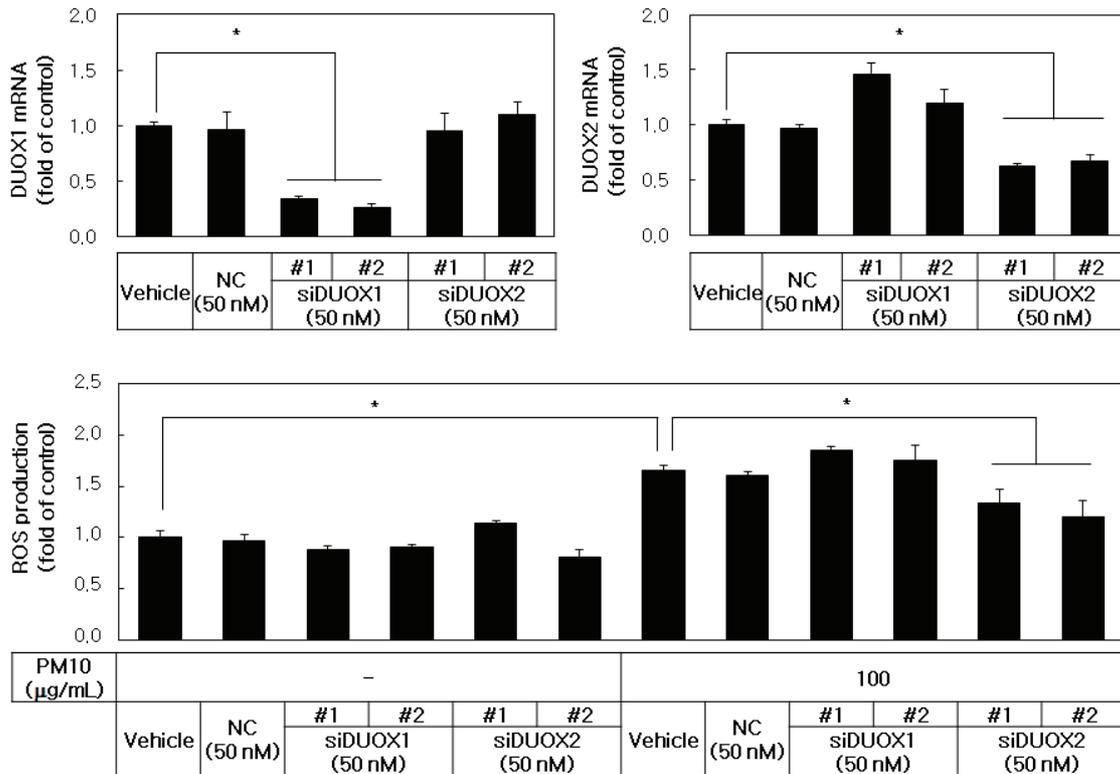


Figure 5. PM10-induced ROS production is attenuated by siRNA-mediated down-regulation of DUOX2, but not DUOX1. The cells were transfected with siRNAs for DUOX1 (siDUOX1 #1 and #2) and DUOX2 (siDUOX2 #1 and #2), or negative control (NC, oligonucleotide duplex with scrambled sequences), and incubated for 48 h. The mRNA expressions were determined by qRT-PCR and normalized to control GAPDH. For ROS measurement, the cells were loaded with H₂DCFDA (10 µM) for 30 min and stimulated with PM10 (100 µg/mL) for 30 min. The fluorescent dye was extracted from the cells and quantified by measuring fluorescence intensity. Data are expressed as folds compared to control values. Means ± SEM, n = 3. * p < 0.05.

화 과정을 촉진시킨다.

본 연구는 DUOX1과 DUOX2 및 각각의 maturation factor인 DUOXA1과 DUOXA2의 발현이 PM10에 증가됨을 보여주었다. 또한 DUOXs는 세포내 칼슘 결합-EF-hands 도메인을 통해 활성화 되어 H₂O₂를 유도하므로 칼슘이온의 유무에 따른 ROS 생성을 알아보았다. 그 결과 PM10과 A23187에 의해 유도된 ROS의 생성이 칼슘 킬레이터인 BAPTA-AM에 의해 감소됨을 확인하였다. DUOX1과 DUOX2의 siRNA를 처리하여 각각의 발현을 저해시킨 후 ROS 생성을 확인해본 결과 DUOX1이 아닌 DUOX2의 발현 억제가 PM10에 의한 ROS의 생성을 감소시킴을 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 PM10에 의해 다양한 경로로 발생하는 ROS의 생성에 있어서 특히 DUOX2 의존성 메커니즘이 중요함을 시사한다.

소포체와 같은 세포 내 소기관의 칼슘 축적은 표피의

칼슘 구배를 형성하는 주요 구성 요소이며, 칼슘 항상성이 각질형성세포의 분화, 세포 간 접합 형성, 항균 장벽 및 투과성을 조절하는데 중요하다[24-26]. 따라서 PM10에 의한 칼슘 의존적 ROS 생성은 이러한 분화 마커의 발현 증가를 야기하여 각질형성세포의 비정상적인 분화를 촉진할 것으로 예상할 수 있다. PM10에 의한 ROS 생성에 대하여 칼슘을 매개로 한 DUOX2 관련 메커니즘의 연구는 피부 장벽의 손상과 피부 노화에 있어 중요한 실마리를 제공할 것으로 사료된다.

본 연구에서 PM10에 의해 증가된 IFN-γ의 발현이 DUOX2의 하향 조절에 의해 감소되었다. 전 연구들에 따르면 DUOX2의 발현은 IFN-γ에 의해서 조절이 되며 [27,28], 반대로 IFN-γ의 발현도 DUOX2의 발현과 상관관계가 있다[29]. 건선과 같은 만성 염증성 피부 질환, 알레르기성 접촉 피부염 및 아토피성 피부염은 각질형성세포

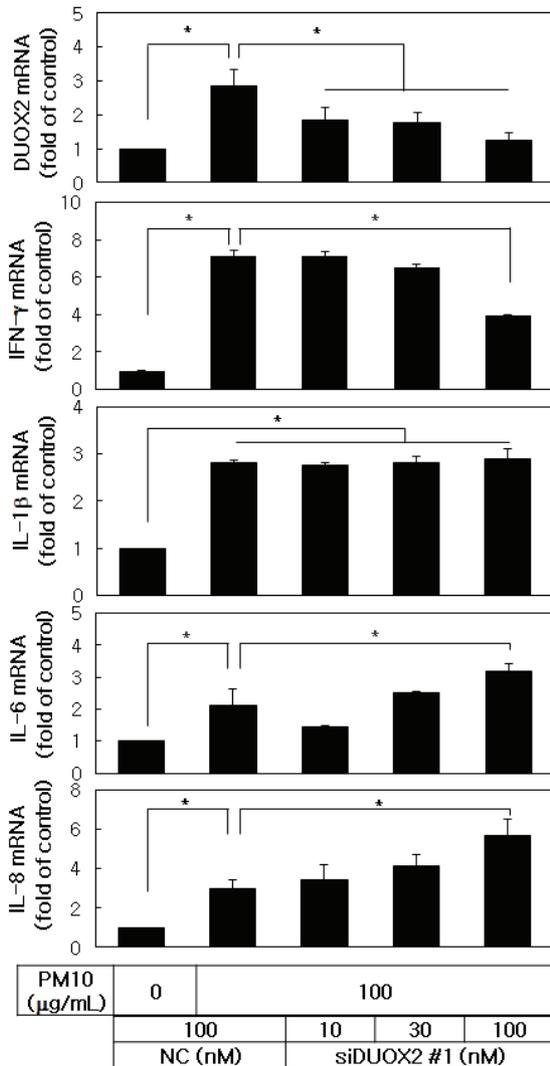


Figure 6. SiRNA-mediated down regulation of DUOX2 suppresses PM10-induced expression of IFN- γ but not other cytokines. The cells were transfected with a siRNA for DUOX2 (siDUOX2 #1) or negative control (NC, oligonucleotide duplex with scrambled sequences) for 48 h followed by exposure to PM10 (100 μ g/mL) for 24 h. The mRNA expression levels were determined by qRT-PCR and normalized to control GAPDH. Data are expressed as folds compared to control values. Means \pm SEM, n = 3. * p < 0.05.

포함 T림프구의 강력한 침윤을 특징으로 한다. T세포-유도 사이토카인 중에서 IFN- γ 는 각질형성세포의 염증유발 기능의 가장 강력한 활성화제이다. 따라서 T림프구와 각질형성세포의 상호 활성화는 면역 매개 피부 질환 동안 피부 염증을 증폭시키는 중요한 메커니즘이다[30]. IFN- γ 가

DUOX2 발현을 다양한 신호 조절 경로를 통해 조절하므로 [31] PM10에 의해 유도된 DUOX2가 IFN- γ 의 발현을 조절하는 과정도 매우 복잡할 것이라 예상된다. DUOX2과 IFN- γ 가 상호 관련된 메커니즘에 대한 후속 연구가 필요하다.

본 연구에서 DUOX2의 siRNA가 PM10에 의한 IL-1 β 의 발현에는 영향을 미치지 않았고 IL-6과 IL-8의 발현은 증가시켰다. 각질형성세포에서 IL-1 β 는 염증 반응을 상향 조절하며[32], IL-6는 건선과 같은 특정 피부 질환에서 중추적인 역할을 하는 염증성 사이토카인 중 하나이고[33], IL-8은 혈관 신생과 상처 치유에 중요한 역할을 매개하는 케모카인이다[34]. 현재의 정보로는 DUOX2 감소에 의한 IL-6과 IL-8의 발현 증가에 대하여 설명하기 어렵지만, DUOX2에 의해 생성되는 ROS가 다양한 biological mechanism을 통해 염증 반응 및 면역 반응을 조절할 것으로 예측할 수 있다.

ROS는 세포 증식 및 분화와 같은 기본적인 생물학적 과정에도 필수적이다[35]. 따라서 ROS를 무차별적으로 억제하는 접근법은 원하는 질병 개선의 결과를 얻을 수 없다 [36,37]. 임상 연구에서 항산화 보충제를 이용한 전략이 질병 위험 또는 진행을 개선시키지 못하고 오히려 병리학적 결과를 악화시켰다[38]. 본 연구팀의 선행연구에서 여러 폴리페놀 성분 중에서 punicalagin, (-)-epigallocatechin gallate, dieckol 등은 PM10에 의해 유도된 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8과 같은 염증성 사이토카인의 발현을 전체적으로 경감하였지만[39-42], resveratrol과 resveratryl triacetate는 IL-6의 발현을 선택적으로 억제하였고, 다른 사이토카인의 발현에는 영향이 없거나 오히려 증가시켰다[43]. 따라서 대기 미세 먼지에 의한 피부 질환의 예방과 치료를 위해서는 ROS, NOX family, 염증성 사이토카인, 그리고 항산화제의 개별적 기능과 상호 관계에 대한 종합적 이해가 필요하다.

5. 결론

결론적으로 본 연구는 PM10에 노출된 HEK에서 ROS의 생성 및 염증 반응에서 DUOX2가 중요한 역할을 함을 시사한다.

Acknowledgement

이 논문은 2016년도 대한민국 교육부의 재원으로 한국 연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업이다 (No. 2016R1D1A1B03932501).

Reference

1. J. M. Samet, F. Dominici, F. C. Curriero, I. Coursac, and S. L. Zeger, Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994, *N. Engl. J. Med.*, **343**(24), 1742 (2000).
2. K. E. Kim, D. Cho, and H. J. Park, Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases, *Life Sciences*, **152**, 126 (2016).
3. C. A. Pope, 3rd, R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, K. Ito, and G. D. Thurston, Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution, *JAMA*, **287**(9), 1132 (2002).
4. A. J. Badyda, J. Grellier, and P. Dabrowiecki, Ambient PM2.5 Exposure and Mortality Due to Lung Cancer and Cardiopulmonary Diseases in Polish Cities, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **944**, 9 (2017).
5. G. Cesaroni, C. Badaloni, C. Gariazzo, M. Stafoggia, R. Sozzi, M. Davoli, and F. Forastiere, Long-term exposure to urban air pollution and mortality in a cohort of more than a million adults in Rome, *Environ. Health Perspect.*, **121**(3), 324 (2013).
6. A. Iskandar, Z. J. Andersen, K. Bonnelykke, T. Ellermann, K. K. Andersen, and H. Bisgaard, Coarse and fine particles but not ultrafine particles in urban air trigger hospital admission for asthma in children, *Thorax*, **67**(3), 252 (2012).
7. A. Zanobetti, J. Schwartz, E. Samoli, A. Gryparis, G. Touloumi, J. Peacock, R. H. Anderson, A. Le Tertre, J. Bobros, M. Celko, A. Goren, B. Forsberg, P. Michelozzi, D. Rabczenko, S. P. Hoyos, H. E. Wichmann, and K. Katsouyanni, The temporal pattern of respiratory and heart disease mortality in response to air pollution, *Environ. Health Perspect.*, **111**(9), 1188 (2003).
8. J. Lademann, H. Schaefer, N. Otberg, A. Teichmann, U. Blume-Peytavi, and W. Sterry, Penetration of microparticles into human skin, *Hautarzt*, **55**(12), 1117 (2004).
9. K. Ahn, The role of air pollutants in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **134**(5), 993 (2014).
10. S. H. Jeong, J. H. Park, J. N. Kim, Y. H. Park, S. Y. Shin, Y. H. Lee, Y. C. Kye, and S. W. Son, Up-regulation of TNF-alpha secretion by cigarette smoke is mediated by Egr-1 in HaCaT human keratinocytes, *Exp. Dermatol.*, **19**(8), e206 (2010).
11. Y. S. Yang, H. K. Lim, K. K. Hong, M. K. Shin, J. W. Lee, S. W. Lee, and N. I. Kim, Cigarette smoke-induced interleukin-1 alpha may be involved in the pathogenesis of adult acne, *Ann Dermatol*, **26**(1), 11 (2014).
12. G. Tsuji, M. Takahara, H. Uchi, S. Takeuchi, C. Mitoma, Y. Moroi, and M. Furue, An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway, *J. Dermatol. Sci.*, **62**(1), 42 (2011).
13. S. P. Yun, S. J. Lee, S. Y. Oh, Y. H. Jung, J. M. Ryu, H. N. Suh, M. O. Kim, K. B. Oh, and H. J. Han, Reactive oxygen species induce MMP12-dependent degradation of collagen 5 and fibronectin to promote the motility of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, *Br. J. Pharmacol.*, **171**(13), 3283 (2014).
14. S. Song, K. Lee, Y. M. Lee, J. H. Lee, S. I. Lee, S. D. Yu, and D. Paek, Acute health effects of urban fine and ultrafine particles on children with atopic dermatitis, *Environ. Res.*, **111**(3), 394 (2011).
15. R. P. Brandes, N. Weissmann, and K. Schroder, Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **76**, 208 (2014).
16. K. Bedard, and K. H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and

- pathophysiology, *Physiol. Rev.*, **87**(1), 245 (2007).
17. M. Katsuyama, K. Matsuno, and C. Yabe-Nishimura, Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **50**(1), 9 (2012).
 18. C. Hoste, J. E. Dumont, F. Miot, and X. De Deken, The type of DUOX-dependent ROS production is dictated by defined sequences in DUOXA, *Exp. Cell. Res.*, **318**(18), 2353 (2012).
 19. C. Massart, C. Hoste, A. Virion, J. Ruf, J. E. Dumont, and J. Van Sande, Cell biology of H₂O₂ generation in the thyroid: investigation of the control of dual oxidases (DUOX) activity in intact *ex vivo* thyroid tissue and cell lines, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **343**(1-2), 32 (2011).
 20. D. U. Lee, M. J. Ji, J. Y. Kang, S. Y. Kyung, and J. H. Hong, Dust particles-induced intracellular Ca²⁺ signaling and reactive oxygen species in lung fibroblast cell line MRC5, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **21**(3), 327 (2017).
 21. X. De Deken, D. Wang, M. C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J. E. Dumont, and F. Miot, Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family, *J. Biol. Chem.*, **275**(30), 23227 (2000).
 22. J. E. Toublanc, Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world, *Horm. Res.*, **38**(5-6), 230 (1992).
 23. N. A. Monteiro-Riviere, A. O. Inman, and J. E. Riviere, Skin toxicity of jet fuels: ultrastructural studies and the effects of substance P, *Toxicol Appl Pharmacol.*, **195**(3), 339 (2004).
 24. G. K. Menon, and P. M. Elias, Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis, *Arch Dermatol.*, **127**(1), 57 (1991).
 25. R. B. Presland, J. A. Bassuk, J. R. Kimball, and B. A. Dale, Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin, *J. Invest. Dermatol.*, **104**(2), 218 (1995).
 26. K. Hitomi, Transglutaminases in skin epidermis, *Eur J Dermatol.*, **15**(5), 313 (2005).
 27. T. Hill, 3rd, and R. H. Rice, DUOX expression in human keratinocytes and bronchial epithelial cells: Influence of vanadate, *Toxicol In Vitro*, **46**, 257 (2018).
 28. R. W. Harper, C. Xu, J. P. Eiserich, Y. Chen, C. Y. Kao, P. Thai, H. Setiadi, and R. Wu, Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium, *FEBS Lett.*, **579**(21), 4911 (2005).
 29. H. J. Kim, C. H. Kim, J. H. Ryu, M. J. Kim, C. Y. Park, J. M. Lee, M. J. Holtzman, and J. H. Yoon, Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN-lambda regulation in human nasal epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.*, **49**(5), 855 (2013).
 30. M. Federici, M. L. Giustizieri, C. Scarponi, G. Girolomoni, and C. Albanesi, Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1, *J. Immunol.*, **169**(1), 434 (2002).
 31. T. Hill, 3rd, C. Xu, and R. W. Harper, IFN-gamma mediates DUOX2 expression via a STAT-independent signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **395**(2), 270 (2010).
 32. M. J. Bechtel, J. Reinartz, J. M. Rox, S. Inndorf, B. M. Schaefer, and M. D. Kramer, Upregulation of cell-surface-associated plasminogen activation in cultured keratinocytes by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, *Exp. Cell. Res.*, **223**(2), 395 (1996).
 33. M. Abe, Y. Yokoyama, T. Syuto, H. Ishibuchi, and O. Ishikawa, Interleukin-6 counteracts effects of cyclosporin A on extracellular matrix metabolism by human dermal fibroblasts, *Cell Tissue Res.*, **333**(2), 281 (2008).
 34. G. Michel, L. Kemeny, R. U. Peter, A. Beetz, C. Ried, P. Arenberger, and T. Ruzicka, Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells, *FEBS Lett.*, **305**(3), 241 (1992).

35. R. Mittler, ROS are good, *Trends Plant Sci.*, **22**(1), 11 (2017).
36. M. Ristow, Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits, *Nat. Med.*, **20**(7), 709 (2014).
37. H. Kawagishi, and T. Finkel, Unraveling the truth about antioxidants: ROS and disease: finding the right balance, *Nat. Med.*, **20**(7), 711 (2014).
38. P. Ghezzi, V. Jaquet, F. Marcucci, and H. Schmidt, The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects, *Br. J. Pharmacol.*, **174**(12), 1784 (2017).
39. J. K. Seok, J. W. Lee, Y. M. Kim, and Y. C. Boo, Punicalagin and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate rescue cell viability and attenuate inflammatory responses of human epidermal keratinocytes exposed to airborne particulate matter PM10, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **31**(3), 134 (2018).
40. J. W. Lee, J. K. Seok, and Y. C. Boo, *Ecklonia cava* extract and dieckol attenuate cellular lipid peroxidation in keratinocytes exposed to PM10, *Evid.-Based Complementary Altern. Med.*, **2018**, 8248323 (2018).
41. S. Park, J. K. Seok, J. Y. Kwak, H. J. Suh, Y. M. Kim, and Y. C. Boo, Anti-inflammatory effects of Pomegranate Peel extract in THP-1 cells exposed to particulate matter PM10, *Evid.-Based Complementary Altern. Med.*, **2016**, 836080 (2016).
42. A. Rauf, M. Imran, H. A. R. Suleria, B. Ahmad, D. G. Peters, and M. S. Mubarak, A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol, *Food Funct.*, **8**(12), 4284 (2017).
43. M. A. Choi, J. K. Seok, J. W. Lee, S. Y. Lee, Y. M. Kim, and Y. C. Boo, Effects of resveratrol and resveratryl triacetate on the inflammatory responses of human epidermal keratinocytes exposed to airborne particulate matter PM10, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(3), 249 (2018).