creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

피부 노화에서 바이글리칸 (biglycan)과 데코린 (decorin)의 발현 변화 및 그 조절 기전 규명

2021년 8월

서울대학교 대학원

의과학과

이 한 온

피부 노화에서 바이글리칸 (biglycan)과 데코린 (decorin)의 발현 변화 및 그 조절 기전 규명

지도교수 정 진 호

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2021년 4월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학 전공
이 한 온

이한온의 박사 학위논문을 인준함
2021년 7월

위 원 장 _____

부위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

위 원 _____

초 록

피부 노화는 내인성 노화와 광노화로 나눌 수 있으며, 주요한 특징은 주름이 생기고 피부가 늘어지는 것이다. 분자적인 기전으로는 진피를 구성하는 대표적인 물질인 콜라겐의 감소와 매트릭스 메탈로프로테이네이즈-1 (Matrix metalloproteinase, MMP-1)의 증가가 잘 알려져 있다.

한편, 프로테오글리칸 (Proteoglycan, PG)은 단백질에 글리코사미노글리칸 (Glycosaminoglycan, GAG)이라고 불리는 당사슬이 하나 이상 연결된 당질화단백질들을 지칭하며, 이들은 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 등과 결합하여 피부를 구성하고 있는 주요 단백질들이다. 피부에 가장 많은 PG인 바이글리칸과 데코린은 콜라겐 섬유를 안정화 시키고 MMP-1으로부터 보호하여 진피 조직을 유지하는데 기여한다. 하지만, 피부 노화에 있어서의 변화나 조절 기전에 대해서는 아직 명쾌하게 알려져 있지 않다.

또한 노화에서 성장 인자들의 발현이 감소하는 것은 중요하게 여겨지며, 인슐린-유사 성장 인자 1 (Insulin-like growth factor, IGF-1)은 혈중 농도나 노화된 피부에서의 작용이 저하되어 있는 것으로 알려져 있지만, 피부노화에서의 역할과 PG에 미치는 영향에 대해서는 연구가 잘 되어 있지 않다.

이에 본 연구에서는 피부의 내인성 노화와 광노화에서 바이글리칸과

데코린의 발현 변화와 조절 기전 및 IGF-1과의 상관관계, 그리고 그 변화가 가져올 영향에 대해 밝히고자 했다.

실제 피부에서의 바이글리칸과 데코린의 변화를 확인하고자, 청년과 노인의 햇볕에 노출되지 않은 엉덩이와 햇볕에 노출된 하완 피부를 조직 생검하여 진피를 분리하고 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯 (Western blot)으로 분석했다. 먼저, 내인성 노화에서의 변화를 알아보기 위해 청년과 노인의 엉덩이 진피를 비교했을 때, 바이글리칸은 양이 유의하게 감소하였고, 크기는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있었다. 데코린의 경우. 통계적으로 유의하지 않지만 양은 감소하는 경향이 있었고, 크기는 유의하게 감소했다. 그 다음으로 광노화에서의 변화를 확인하기 위해 동일한 노인 피험자의 엉덩이와 하완을 비교하였을 때, 바이글리칸의 양은 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있는 반면 크기는 증가했고, 데코린은 양이 유의하게 감소하는 반면 크기가 유의하게 증가하였다. 즉, 내인성 노화에서는 두가지 모두 양과 크기가 모두 감소하는 경향을 보였으며, 광노화에서는 양은 감소하는 경향을 보이지만, 크기는 유의하게 증가해 차이를 보였다.

먼저 양적 변화를 설명하기 위해 정량적 실시간 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)로 분석하였을 때, 바이글리칸과 데코린의 mRNA는 내인성 노화와 광노화 조직에서 모두 감소하지 않았다. 이에 전사를 통한 합성 감소는 아니라고 생각하여, ADAMTS5와 같은 바이글리칸과 데코린 분해효소가 증가할 것이라고 생각하였다. 정상 사람 진피섬유아세포 (Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDFs)에

ADAMTS5의 siRNA를 처리하였을 때, 바이글리칸과 데코린의 단백질 양이 증가 하였으므로, ADAMTS5가 실제로 바이글리칸과 데코린의 분해에 기여하고 있음을 확인하였다. 이에, 실제로 노화에서도 ADAMTS5가 증가되어 바이글리칸과 데코린의 단백질 양 감소에 기여하는지 확인하고자 하였고, 사람 조직에서 ADAMTS5의 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 확인했을 때, 내인성 노화에서 유의하게 증가하고 광노화에서는 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다,

그 다음으로, 바이글리칸과 데코린의 크기 변화는 곧 붙어 있는 GAG 사슬 길이의 변화를 의미하므로, GAG-합성 효소를 확인하고자 하였다. 바이글리칸과 데코린의 GAG는 콘트로이틴 설페이트 / 더마탄 설페이트 (Chondroitin sulfate / Dermatan sulfate, CS/DS)로 분류되며, 피부에서는 대부분 DS로 구성되어 있다. CS/DS의 GAG 사슬 연장 효소로는 6 종류가 알려져 있다. NHDF에 6 종류의 CS/DS-합성효소의 발현을 siRNA를 통한 RNA간섭으로 억제했을 때, 바이글리칸과 데코린 크기를 가장 크게 감소시켰던 효소는 콘드로이틴 설페이트 합성효소 1 (Chondroitin sulfate synthase 1, CHSY1)이었고, 그 다음으로 콘드로이틴 중합 인자 (Chondroitin polymerizing factor, CHPF)가 감소시키는 것으로 나타났다. 이에 사람 피부 조직에서의 두 효소들의 실제 발현을 확인하고자 하였다. 웨스턴 블롯에서는 잘 검출되지 않아 확인하기 어려워, CHSY1는 효소결합면역흡착검사 (엘라이자, ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CHPF는 면역형광염색법 (Immunofluorescence Staining)을 통해 분석했다. 내인성 노화에서는

바이글리칸의 크기는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있었고 데코린은 크기가 유의하게 감소했는데, CHSY1는 통계적으로 유의하지 않지만 오히려 증가하는 경향이 있었고 CHPF는 감소하는 경향을 보여주었지만 유의하지는 않았다. 광노화에서는 바이글리칸과 데코린의 크기가 유의하게 증가했지만, CHSY1은 유의한 변화가 없었고 CHPF는 감소하는 경향을 보여주었다. 따라서, 바이글리칸과 데코린의 크기 변화는 CS/DS-합성효소의 증가로 인해 CS/DS 합성이 증가하여 생기는 현상은 아닌 것으로 결론내릴 수 있었다.

한편, IGF-1 은 노화된 피부에서 그 작용이 감소되어 있다고 알려져 있다. 따라서, IGF-1의 바이글리칸과 데코린에 대한 발현 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 NHDF에 IGF-1을 처리하였을 때, 바이글리칸과 데코린의 단백질 양이 증가되는 것을 발견하였다. 이 때, mRNA는 증가하지 않았으며, 억제제 실험을 통해 IGF-1이 바이글리칸과 데코린의 전사를 증가시키는 것이 아닌, 전사 후 번역 (Post-transcriptional translation) 강화를 통해 작용하는 것을 확인하였다. 다른 한편으로는, IGF-1이 바이글리칸과 데코린을 분해하는 ADAMTS5의 발현도 억제시키는 것을 발견하였다. 이를 통해 IGF-1이 바이글리칸과 데코린을 증가시키는데, 직접적으로는 합성을 증가시키고, 간접적으로는 분해효소의 작용을 억제시키는 데서 기인한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 내인성 노화된 피부에서 IGF-1이 감소하게 되면, 두 PG의 합성이 감소하고, 억제 약화로 증가된 ADAMTS5를 통해 PG의 분해가 증가하게 되는 것으로 생각된다.

마지막으로 NHDF에서 바이글리칸과 데코린의 발현을 siRNA를 이용하여 RNA간섭을 통해 억제하였을 때, 진피의 중요한 성분인 I형 콜라겐의 발현이 감소하였고, 동시에 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

본 논문의 골자는 바이글리칸과 데코린의 내인성 노화 및 광노화에서의 변화 및 그 기전, 중요성을 관찰한 것이다. 주요 변화로는 노화에서 바이글리칸과 데코린의 양이 감소하는 것과, 이들의 분해효소인 ADAMTS5가 증가하는 것, 그리고, 바이글리칸과 데코린의 크기가 내인성 노화에서는 감소하고 광노화에서는 증가한다는 것이 있다. 본 연구의 결과에 따르면, 내인성 노화에서의 바이글리칸과 데코린의 양적 감소는 IGF-1의 작용 감소로 인한 직접적인 단백질 합성 감소에 기인할 수 있을 것으로 생각되며, 이와 더불어 증가된 ADAMTS5의 작용에 의한 분해 증가를 통해서도 야기될 수 있을 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 이러한 바이글리칸의 양적 감소는 피부노화의 특징인 콜라겐의 감소와 MMP-1의 증가로 이어진다는 것을 확인하였다. 그러나 본 연구에서는, 데코린의 내인성 노화에서 크기 감소와 광노화에서 크기 증가는 CS/DS-합성효소들의 직접적인 발현 조절을 통해서는 일어나지 않는 것으로 나타났다. 종합하면, 피부노화 과정에서 IGF-1의 작용 감소에 의해 바이글리칸과 데코린의 발현발현이 감소하며, 또한 IGF-1의 감소에 따른 ADAMTS5의 증가에 의해 더욱 악화되고, 이는 직간접적으로 콜라겐의 감소로 이어진다. 때문에 IGF-1, 바이글리칸, 데코린을 증가시키거나 ADAMTS5를 감소 혹은

억제시키는 것은 피부 노화를 개선하기 위한 새로운 전략이 될 수 있다.

주요어: 프로테오글리칸 (PG), 바이글리칸, 데코린, 피부노화, ADAMTS5, 인슐린 유사성장인자-1 (IGF-1)

학 번: 2014-22025

목 차

서 론 1

연구 재료 및 방법 14

연구 결과 23

고 찰 65

참고문헌 83

Abstract 97

표 목차

[표 1] 사용된 프라이머 시퀀스 (Primer Sequence) 목록 20

[표 2] 사용된 1차 항체 목록 22

그림 목차

[그림 1] 바이글리칸 (Biglycan)과 데코린 (Decorin)의 모식도 및 콘드로이틴 설페이트 / 더마탄설페이트 (Chondroitin sulfate / Dermatan sulfate, CS/DS) 합성 과정 모식도 6

[그림 2] 내인성 노화된 사람 진피에서의 바이글리칸의 변화. 25

[그림 3] 내인성 노화된 사람 진피에서의 데코린의 변화..... 27

[그림 4] 광노화된 사람 진피에서의 바이글리칸의 변화 29

[그림 5] 광노화된 사람 진피에서의 데코린의 변화..... 31

[그림 6] 내인성 노화와 광노화 진피에서의 바이글리칸과 데코린의 mRNA 발현..... 33

[그림 7] Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs)에서 A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) 5의 녹다운 (Knockdown)에 따른 바이글리칸과 데코린의 발현 증가..... 36

[그림 8] 내인성 노화 및 광노화된 진피에서의 ADAMTS5 발현 39

[그림 9] NHDF에서 Chondroitin Sulfate Synthase 1 (CHSY1) 또는 Chondroitin Polymerizing Factor (CHPF)의 녹다운에 의한 바이글리칸과 데코린의 크기 감소 41

[그림 10] 내인성 노화와 광노화 진피 조직에서의 6 가지 CS/DS-합성효소들의 mRNA 발현 46
[그림 11] 내인성 노화 및 광노화된 조직에서의 CHSY1과 CHPF 단백질 발현 48
[그림 12] NHDF에서 인슐린 유사 성장 인자-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1)에 의한 바이글리칸과 데코린 단백질 발현 증가 53
[그림 13] NHDF에서 IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 mRNA 발현 변화 55
[그림 14] NHDF에서 IGF-1의 번역 강화를 통한 바이글리칸과 데코린 단백질 발현의 증가 57
[그림 15] NHDF에서 IGF-1의 ADAMTS5에 대한 하향 조절 59
[그림 16] NHDF에서 바이글리칸과 데코린의 녹다운이 기질 관련 단백질에 미치는 영향 62
[그림 17] 피부의 내인성 노화 및 광노화에서 바이글리칸과 데코린에 미치는 영향과 기전에 대한 모식도 64

서 론

피부 노화

피부 노화는 크게 내인성 노화와 광노화로 구분된다. 내인성 노화는 얇아진 표피와 잔주름이 특징이고, 광노화는 만성적인 태양 노출에 의해 깊은 주름, 피부 늘어짐, 모세혈관확장증 및 흑자 등의 특징을 나타낸다 (Danielson et al., 1997, Zeng et al., 2014). 분자 기전의 주요 특징은 피부 탄력과 조직 강도를 유지하는 데 중요한 성숙한 콜라겐과 같은 세포외기질이 감소한다는 것이다. 이들은 합성이 감소할 뿐만 아니라 이들에 대한 분해 효소가 증가한다. 대표적인 분해 효소로는 MMP 족으로, MMP-1은 초기 콜라겐 분해효소이며 광노화 피부에서 특히 증가되는 것으로 나타난다 (Li et al., 2013b, Xia et al., 2015).

프로테오글리칸 (Proteoglycan, PG)의 정의 및 종류

프로테오글리칸 (Proteoglycan, PG)은 핵심 단백질 (코어 프로틴, core protein)과 공유결합으로 부착된 하나 이상의 글리코사미노글리칸 (Glycosaminoglycan, GAG) 사슬로 구성된다. PG는 붙어 있는 GAG유형에 따라 구분될 수 있는데, GAG는 콘드로이틴 설페이트 (Chondroitin sulfate, CS), 더마탄 설페이트 (Dermatan sulfate, DS), 케라탄 설페이트 (Keratan sulfate, KS), 헤파란 설페이트 (Heparan sulfate, HS), 헤파린 (Heparin, Hep), 히알루론산 (Hyaluronic acid,

HA)의 6 가지 유형으로 분류되며, 이 중 HA는 예외적으로 핵심 단백질이 없이 단독으로 합성된다 (Perrimon and Bernfield, 2001).

PG는 당사슬 때문에 분자량이 매우 크거나, 비교적 크기가 작더라도 일정하지 않은 당사슬 길이로 인해 광범위한 크기를 가지고 있다. 작은 PG와 큰 PG로 크기에 따라 나눌 수도 있는데, 작은 PG에는 대표적으로 CS/DS PG인 바이글리칸과 데코린, HS/CS PG인 테스티칸 (Testican), CS PG인 비쿠닌 (Bikunin), KS PG인 피브로모듈린 (Fibromodulin)과 루미칸 (Lumican)이 있다. 큰 PG에는 CS/DS PG인 베르시칸 (Versican), HS.CS PG인 퍼레칸 (Perlecan), CS PG인 뉴로칸 (Neurocan)과 아그레칸 (Aggrecan) 등이 있다. PG 중 본 논문의 표적인 바이글리칸과 데코린은 따로 아래에서 설명하도록 하겠다.

바이글리칸 (Biglycan)과 데코린 (Decorin)

바이글리칸과 데코린은 작은 류신-풍부 PG (Small leucine-rich PGs, SLRPs)의 일원으로 (Schaefer, 2014), 피부에서 가장 풍부한 PG로 알려져 있다. 바이글리칸은 표피에서도 다소 발현되지만, 이들은 주로 진피에서 관찰된다 (Li et al., 2013a).

데코린은 핵심 단백질 (45 kDa)에 하나의 DS 사슬로 구성된다 (Carrino et al., 2011). 인간 피부 또는 배양된 정상 인간 진피 섬유아세포 (Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDFs)에서, 온전한 형태의 데코린 (Intact form, 단당사슬-데코린)은 약 70-100 kDa에서 확인되며, 성인의 진피 조직에서는 분해된 PG 조각들이 관찰된다

(Carrino et al., 2003).

바이글리칸은 핵심 단백질 (40 kDa)에 두 개의 DS 사슬로 구성된다. 바이글리칸의 PG 형태는 두 개의 DS 사슬을 가진 온전한 형태 (Intact form) 이당사슬-바이글리칸과 하나의 DS 사슬을 가진 단당사슬-바이글리칸 (Monoglycosylated form)으로 각각 약 ~ 240 kDa와 70-100 kDa에서 검출된다 (Jin et al., 2015, Lee et al., 2016).

바이글리칸과 데코린은 콜라겐 섬유에 일정한 간격으로 결합하여 콜라겐 섬유를 안정화시키는 것으로 알려져 있다. 데코린은 또한, 콜라겐이 기질 금속단백질분해효소-1 (Matrix metalloproteinase, MMP-1)에 의해 분해되지 않도록 보호한다. 바이글리칸 또는 데코린 유전자 제거 마우스 (녹아웃 마우스, Knockout mouse) 연구에서는 두 유전자의 제거 모두 불규칙한 콜라겐 섬유를 가진 얇은 진피와 약해진 피부를 나타내었다 (Corsi et al., 2002, Danielson et al., 1997). 또한 바이글리칸과 데코린의 비-당사슬-핵심 단백질화 (Non-glycosylated, core protein) 또는 단당사슬-바이글리칸화 등 바이글리칸과 데코린의 불완전한 형태는 콜라겐 섬유의 형성이나 성숙을 돕는 능력이 약화된다 (Hwang et al., 2008, Schonherr et al., 1993, Seidler et al., 2006, Tufvesson et al., 2002, Wiberg et al., 2002).

피부 매트릭스에서 탄성 섬유 (Elastic fiber)는 피부 탄력에 기여하는 중요한 구조 구성 성분이다. 바이글리칸과 데코린은 트로포엘라스틴 (Tropoelastin, 엘라스틴 전구체), 피브릴린-1 (fibrilin-1) 또는 마이크로피브릴-관련 글리코프로틴 (Microfibril-

related glycoproteins, MAGP)과 같은 탄성 섬유 성분과 상호 작용한다 (Reinboth et al., 2002, Trask et al., 2000).

노화 측면에서 PG에 대한 보고가 여러 차례 있었지만 피부 노화와 관련된 연구는 많지 않다. 내인성 노화 피부에서 면역조직화학염색으로 바이글리칸이 감소한 것을 확인한 보고가 있었다 (Lee et al., 2016). 또한, 내인성 노화 피부 단백질을 웨스턴 블롯하여 데코린의 크기가 감소한 것을 보았으며 (Li et al., 2013a, Nomura, 2006), 노화된 진피에서 1,9-디메틸메틸렌 블루 (1,9-Dimethylmethylene blue, DMMB) 비색법을 통해 황산화 GAG를 분석했을 때, 그 양이 감소하는 것을 확인하였다 (Oh et al., 2018). 광노화에서는 더욱 보고가 많지 않았고, 자외선과 관련해서는 태양 자외선에 의한 인간 피부의 데코린 분해 (Li et al., 2013b) 또는 NHDF에서 자외선 조사에 의한 단당사슬-바이글리칸 형태 증가 (Jin et al., 2015) 등이 밝혀졌다

바이글리칸과 데코린은 다양한 신호 전달 분자와 상호 작용하는데, 변형 성장 인자 (Transforming growth factor -β, TGF-β)와는 결합 후 격리하여 TGF-β 신호를 약화시키는 기능을 한다 (Hildebrand et al., 1994, Kolb et al., 2001). 더욱이, 바이글리칸은 골형성단백질 2 (Bone morphogenetic protein, BMP2), BMP 4와 Wnt3a, 표피 성장 인자 수용체 (Epidermal growth factor receptor, EGFR)에 결합해 신호 전달을 강화시킨다 (Babelova et al., 2009, Berendsen et al., 2011, Chen et al., 2004, Iacob and Cs-Szabo, 2010, Miguez et al., 2011). 데코린은 또한 혈소판 유래 성장 인자 (Platelet-derived

growth factor, PDGF), EGFR, Met, IGF-1 및 IGF 수용체 1 (IGF-1R)에 결합해 신호 전달을 하향 조절하는 것으로 알려져 있다 (Goldoni et al., 2009, Iozzo et al., 2011, Nili et al., 2003, Santra et al., 2002). 바이글리칸과 데코린은 또한 대식세포에서 톨유사수용체 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)와 TLR4를 활성화하는 것으로 보고되었다 (Babelova et al., 2009, Oh and Chung, 2019, Schaefer, 2014).

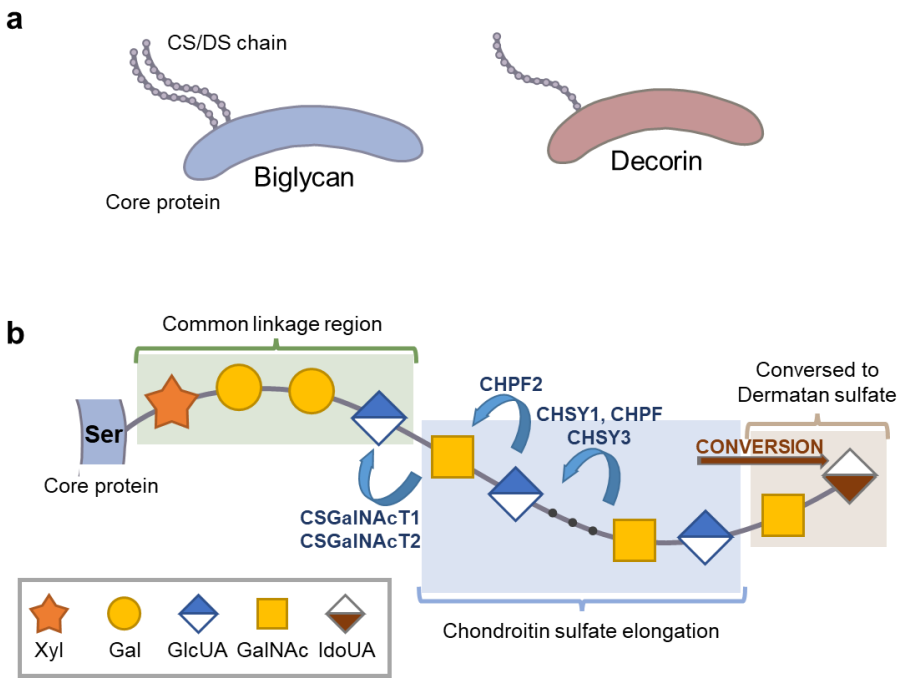


그림 1. 바이글리칸 (Biglycan)과 데코린 (Decorin)의 모식도 및 콘드로이틴 설페이트 / 더마탄설페이트 (Chondroitin sulfate / Dermatan sulfate, CS/DS) 합성 과정 모식도

프로테오글리칸 (Proteoglycan, PG)은 핵심 단백질 (Core protein)에 글리코사미노글리칸 (Glycosaminoglycan, GAG) 사슬이 붙어 있는 형태이다. (a) 바이글리칸과 데코린은 작은 류신-풍부 PG (Small leucine-rich PGs, SLRPs)의 일원으로 각각 2개와 1개의 GAG 사슬이 붙어 있다. (b) GAG 사슬 중 CS/DS의 합성 과정을 나타낸 모식도이다. 세린 (Serine) 잔기에 GlcUA β1-3Gal β1-3Gal β1-4Xyl β1-(GlcUA-Gal-Gal-Xyl-; GlcUA, Glucuronic acid; Gal, Galacorse; Xyl, Xylose)의 구조로 된 공통 연결 부위 (common linkage region)가

형성된다. CS/DS 사슬의 경우 GalNAc (N-acetylgalactosamine)와 GlcUA가 반복적으로 합성되며, CHSY1 (Chondroitin Sulfate Synthase 1), CHPF (Chondroitin Polymerizing Factor), CHSY3, CSGalNAcT1 (Chondroitin Sulfate GalNAc Transferase, CSGlcAT), CSGalNAcT2, CHPF2 (Chondroitin Sulfate GlcUA Transferase)의 여섯 가지 효소가 관여한다. CHSY1, CHPF 및 CHSY3은 연속적으로 GlcUA와 GalNAc 두 당을 부착하고, CSGalNAcT1와 CSGalNAcT2는 네번째 공통당의 GlcUA에 첫번째 GalNAc를 부착하는 활성을 갖는다. CHPF2는 GlcUA 만을 연결한다.

글리코사미노글리칸 (Glycosaminoglycan, GAG)는 6 종류가 있다.

앞서 PG에서 설명한 바와 같이 GAG 유형은 당 특이적으로 구분되는 6 종류로 분류된다. 또한 HA와 다른 GAG로도 나뉠 수 있는데, 특징이 매우 다르다. HA는 우선, 핵심 단백질에 붙지 않고, 황산화되지 않는다. 또한 원형질막에서 Hyaluronan synthases (HAS)에 의해 합성된다. 한편, 나머지 GAG는 총 항산화 GAG (Sulfated GAG, sGAG)라고 묶일 수 있으며, CS, DS, HS, HP, KS가 모두 포함된다. 이들은 높이 황산화되어 있고, 특이적인 핵심 단백질에 결합하며, 또한 소포체 (Endoplasmic reticulum)를 거쳐 골지체 (Golgi apparatus)에서 합성된다. 높은 황산화는 바로 이들이 음전하가 높은 이유이며, 이를 통해 물 분자와 결합하여 조직 내의 수분을 유지하는 데 기여할 수 있는 특징을 갖는다.

일반적으로 CS, DS, KS -PG는 콜라겐과 엘라스틴을 안정화시키는 것으로 알려져 있다. HS PG는 세포 표면에서 세포 부착과 이동, 신호전달에 관여하고 기저막에서는 경계 형성 및 세포와 신호 전달 분자에 부착하는 기능이 있고, HP PG는 서글리신 (Serglycin)이 잘 알려져 있는데, 비만 세포 (Mast cell)의 염증에 대한 역할에 관여한다. CS/DS와 관련된 합성 과정을 다음에서 이어서 설명하도록 하겠다.

콘드로이틴 설페이트 (Chondroitin sulfate, CS)와 더마탄 설페이트 (Dermatan sulfate, DS)의 합성 과정

CS/DS의 합성 과정의 개시는 HS/Hep과 동일하며, DS는 CS가

합성되고 나서 전환된다. KS는 개시부터 아예 다른 당이 부착된다. CS/DS, HS/Hep의 핵심 단백질이 새로 합성되면 세린 (Serine) 잔기에 동일한 4 개의 당이 순차적으로 부착되어 GlcUAβ1-3Galβ1-3Galβ1-4Xylβ1- (GlcUA-Gal-Gal-Xyl-; GlcUA, Glucuronic acid; Gal, Galacorse; Xyl, Xylose)의 구조로 된 공통 연결 부위 (common linkage region)를 형성한다. 이 과정에 관여하는 효소에는 β-xylosyltransferase 1과 2 (*XYLT1*과 *XYLT2*), β 1,4-galactosyltransferase-VII (*B4GALT7*), β 1,3-galactosyltransferase-VI (*B3GALT6*), 및 β 1,3-glucuronosyltransferase-III (*B3GAT3*)가 있다. 그 다음으로 각 당사슬 특이적인 두 가지의 당이 연속적으로 부착된다. CS/DS 사슬의 경우 GalNAc (N-acetylgalactosamine)와 GlcUA가 반복적으로 합성되며, CHSY1 (Chondroitin Sulfate Synthase 1), CHPF (Chondroitin Polymerizing Factor), CHSY3, CSGalNAcT1 (Chondroitin Sulfate GalNAc Transferase, CSGlcAT), CSGalNAcT2, CHPF2 (Chondroitin Sulfate GlcUA Transferase)의 여섯 가지 효소가 관여한다. CHSY1, CHPF 및 CHSY3은 연속적으로 GlcUA와 GalNAc 두 당을 부착하고, CSGalNAcT1와 CSGalNAcT2는 네번째 공통당의 GlcUA에 첫번째 GalNAc를 부착하는 활성을 갖는다. CHPF2는 GlcUA만을 연결한다. CS 사슬은 6개 효소의 활성에 의해 연장되고, Gal 당의 C-4 또는 C-6 부위에 황산화되어 sGAG의 특징을 갖는다. 그 후, DS 에피머레이즈 (Epimerase)에 의해 βGlcU가 αIdoUA로 변환되어

DS 사슬로 전환되고, CS/DS-4-O-sulfotransferase 또는 C6ST, GalNAc4S-6ST 및 UST의 작용으로 황산화된다 (Mizumoto et al., 2013, Sugahara and Mikami, 2007).

이러한 GAG 관련 효소는 GAG 생합성 효소가 클로닝되고 특성 분석이 이뤄지면서 최근 몇 년 동안 연구되었다. 이에 생리학적 기능은 아직 잘 알려져 있지 않지만, 녹아웃 연구나 유전 질환 연구 분야에서 피부와 관련된 몇몇 보고가 있었다. 대표적으로, 세린 잔기에 4개의 공통 당을 만드는데 작용하는 효소들 중 하나인 *B4GALT7*의 돌연변이는 피부가 탄력을 잃고 처지는 것처럼 보이는 Ehlers-Danlos 증후군 (EDS) 프로게로이드 (Progeroid) 형태를 유발한다 (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2004, Kresse et al., 1987, Seidler et al., 2006).

A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) 5

ADAMTS5는 A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs의 구성원으로, 아그레케네이즈 2 (Aggrecanse 2)라고도 알려져 있다. 이들은 아그레칸 (Aggrecan) 핵심 단백질의 Glu373-Ala374 결합을 절단하는 다중도메인 메탈로프로테이네이즈로, 아연 촉매 도메인과, 비촉매 보조 도메인인 디스인테그린 도메인 (Disintegrin domain), 트롬보스폰딘 도메인 (Trombospondin domain), 시스테인-풍부 도메인 (Cysteine-rich domain), 스페이서 도메인 (Spacer domain)을 포함한다 (Gendron et

al., 2007). ADAMTS5는 아그레칸을 분해하는 주요 활성 외에도 데코린, 비글리칸 및 브레비칸 (Brevican)과 같은 다른 PG에 대한 단백질 분해 활성이 보고되었다 (Gendron et al., 2007, Verma and Dalal, 2011). 또한 아포 지단백 E-null 마우스 (Apolipoprotein E-null mice) 에서, ADAMTS5가 현저하게 감소했는데, 동시에 죽상 동맥 경화성 대동맥 (Atherosclerotic aortas)에 바이글리칸과 베르시칸이 축적된 것이 보고되었다 (Didangelos et al., 2012). 그러나 피부노화에 대한 연구는 거의 없다.

인슐린-유사 성장 인자 1 (Insulin-like growth factor, IGF-1)

IGF-1은 여러 조직의 세포 생존, 성장 및 대사를 포함한 다양한 생리적 기능을 조절하는 포유류의 중요한 성장 인자 중 하나이다 (Christopoulos et al., 2015, Laron, 2001). 인간 IGF-1은 70 개의 아미노산으로 구성되며 인슐린과 유사한 분자 구조를 가지고 있다. 그러나 구조적 유사성에도 불구하고 인슐린 수용체에 결합하는 IGF-1의 능력은 1 % 정도로 낮은 친화성을 갖는다 (Lewis et al., 2010). 단백질 티로신 카이네이즈 수용체 (Protein tyrosine kinase receptor)인 IGF-1 수용체도 인슐린 수용체와 높은 상동성을 갖는다. IGF-1은 피부를 포함한 거의 모든 인체 조직에서 생성되며 특히 간에서 많이 발현되어 인체에 순환된다 (Gennigens et al., 2006). IGF-1 수치는 출생 후부터 사춘기까지는 높게 유지되지만, 나이가 들면서 점차 감소하는 것으로 잘 알려져 있으며 (Yu and Rohan, 2000),

노인에서 IGF-1 분비 감소는 여러 가지 노화 증상을 유발하는 것으로 여겨진다 (Bartke et al., 2003). 피부에서 IGF-1은 표피 각질 세포 (keratinocyte)에서는 발현되지 않으며, NHDF에서 합성되고 분비된다. 또한 그 수치는 노화된 피부에서도 감소하는데, IGF-1 수용체의 발현 자체는 청년 피부와 노인 피부에서 차이가 없지만, 청년 피부에서만 IGF-1에 의한 수용체 활성화가 나타난다 (Lewis et al., 2010).

본 연구의 목적

PG 바이글리칸과 데코린은 피부에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 노화 측면에서 PG에 대한 보고가 여러 차례 있었지만 피부 노화와 관련된 연구는 많지 않다. 내인성 노화에서 데코린의 크기 감소, 노화된 피부에서 총 sGAG의 감소, 태양 자외선에 의한 인간 피부의 데코린 분해 또는 NHDF에서 자외선 조사에 의한 단당사슬-바이글리칸 형태 증가 등이 밝혀졌다. 본 연구의 목적은 다음과 같다.

1. 내인성 노화에서 바이글리칸과 데코린의 발현 변화를 관찰한다.
2. 광노화에서 바이글리칸과 데코린의 발현 변화를 관찰한다.
3. 발현 변화의 기전을 합성과 분해를 통해 밝힌다.
4. IGF-1이 바이글리칸과 데코린에 영향을 미치는지 확인하고, 노화의 관점에서 설명한다.
5. 바이글리칸과 데코린의 기능을 확인한다.

연구 재료 및 방법

연구 / 윤리적 승인

피험자로부터 피부 조직을 획득하여 세포 배양 또는 조직 분석에 사용했다. 사람 피험자와 관련된 모든 절차는 서울대학교 기관 심의위원회로부터 사전 승인을 받았으며, 모든 피험자에게 서면 동의를 받았다. 이 연구는 헬싱키 선언에 설명된 원칙에 따라 수행되었다. (IRB no. 1510-129-716, 2015-12-11)

세포 배양

1차 NHDF는 10 세에서 19 세 사이의 건강한 남성 기증자의 포피 표본에서 분리되었다. 그런 다음, 10 % 소 태아 혈청 (Fetal bovine serum, FBS, Gibco, Rockville, MD, USA)과 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (Penicillin-streptomycin, Gibco)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM, Welgene, 대구, 대한민국) 배지 및 37 ℃의 공기 온도와 5 % CO2 농도가 유지되는 가습 세포배양기에서 세포를 배양했다.

siRNA를 사용한 유전자 침묵 (Gene Silencing)

NHDF는 비 표적 음성 대조군 siRNA (AccuTarget ™ Negative control siRNA, Bioneer, 대전, 대한민국) 또는 표적 siRNA (300

nM)로 G-fectin (Genolution, 서울, 대한민국)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 동시에 파종 및 형질 감염되었다. 형질 감염 후 24 시간 및 48 시간에 배지를 신선한 무 혈청 DMEM으로 교체했다. 형질 감염 후, 표시된 시간에 웨스턴 블롯 분석을 위한 세포 용해물 및 배양 배지를 수확하였다.

사람 피부 시료

생체 내에서 사람 피부의 mRNA 또는 단백질 발현의 변화를 조사하기 위해, 22 명의 한국인 자원 봉사자를 모집하여 청년과 노인 집단으로 나누었다. RNA의 경우, 청년 집단 (연령의 평균 ± 표준오차, 28.2 ± 2.24 세, 중앙값, 26.5, 범위, 20 ~ 40 세)의 샘플 10 개와 노인 집단의 샘플 9 개 (연령의 평균 ± 표준오차, 79.56 ± 2.40 년; 중앙값, 78; 범위, 70-94 년)를 분석하였고, 웨스턴 블롯의 경우, 청년 집당 (연령의 평균 ± 표준오차, 27.5 ± 2.69 세, 중앙값, 23; 범위, 21-40 세) 및 노인 집단 (연령의 평균 ± 표준오차, 81.38 ± 2.35 세, 중앙값, 79.5) 각각 8 개 샘플 범위, 75-94 년)이 분석되었다. 햇볕이 차단된 엉덩이 부위와 햇볕에 노출된 팔뚝 부위에서 조직 생검을 실시한 후 즉시 조직을 액체 질소에 보관했다. 이후 전체 피부 표본을 55 ℃ 인산 완충 식염수 (Phosphate-buffered saline, PBS)에서 2 분 동안 배양한 후 표피와 진피로 분리하였다. 그 후 진피를 액체 질소를 이용한 분쇄법으로 분쇄하고 mRNA와 단백질을 분석하였다.

웨스턴 블롯 분석 (Western blot assay)

웨스턴 블롯 분석을 위한 단백질을 추출하기 위해 Complete Mini 프로테이즈 억제제 칵테일 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 및 포스파테이즈 억제제 칵테일 (Phosphatase inhibitor cocktails, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함 된 1X SDS-샘플 버퍼 (Sample buffer)로 세포 배양 접시를 얼음 위에서 긁어 세포를 수확한 다음 95 ℃에서 5 분간 가열했다. 또한, 분비된 단백질을 검출하기 위해 세포 배양 배지를 수집했다. 동일한 수의 세포에서 추출한 동일한 부피의 배지를 4x SDS-샘플 버퍼와 혼합하고 95 ℃에서 5 분 동안 가열했다.

조직 시료의 경우, 단백질 추출을 위해 Complete Mini 프로테이즈 억제제 칵테일, 포스파테이즈 억제제 칵테일, 고농도의 SDS (1.75 %) 및 2-머캅토에탄올 (2-Mercaptoethanol, 715mM)이 함유된 4x SDS-용해 완충액을 사용했다. 액체 질소를 이용하여 분쇄한 후 시료의 무게를 측정하고, 무게에 따라 4x SDS-용해 용액을 첨가한 뒤 95 ℃에서 5 분간 가열하였다.

동일한 양의 시료를 건 뒤, SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로오스 막 (Nitrocellulose membranes)으로 옮겼다. 5 % 탈지유로 차단한 후, 막을 표 2에 나열된 1 차 항-인간 항체와 다 클론 (Polyclonal, GeneTex, Irvine, CA, USA) 또는 단일 클론 2 차 항체 (Monoclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA)로 면역 블롯 (Immunoblot)했다. 그 다음 강화된 화학 발광 (Enhanced

chemiluminescence, ECL. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 검출되었다. CCD 카메라인 Amersham Imager 680 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 프로그램에서 식별된 불포화 신호를 분석에 사용했다. 단백질 분석에서는 β-액틴 (β-actin) 또는 폰슈S (Ponceau S, Elpis-Biotech, 대전, 대한민국) 신호를 사용하여 대조 신호를 확인했다.

정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

배양된 NHDF에서 RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 총 RNA를 분리했다. First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 1 마이크로그램 (Microgram)의 총 RNA를 cDNA로 변환했다. 제조업체의 지침에 따라 TB green ™ Premix Ex Taq ™ (Cat # RR420A, Takara Bio)를 사용하여 7500 Real-Time PCR 시스템 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 qRT-PCR을 수행했다. 프라이머는 세포 시료에는 올리고 dT (Oligo dT)를 사용하고, 조직 시료에는 무작위 프라이머를 사용했다. 프라이머 서열은 표 1에 나열하였다. PCR 조건은 50 ℃에서 2 분, 이어서 95 ℃에서 15 초로 40 주기, 60 ℃에서 1 분이었다. 데이터는 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 방법으로 분석되었으며, *36B4*에 대한 유전자 발현의 상대 변화로 표시되었다.

효소결합면역흡착검사 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA를 위한 단백질 샘플을 준비하기 위해, 조직을 액체 질소를 사용하여 분쇄한 후 Complete Mini 프로테이즈 억제제 칵테일과 포스파테이즈 억제제 칵테일이 함유된 1x RIPA 용해 용액으로 진피 조직에서 단백질을 추출했다. 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 (Bicinchoninic acid protein assay, Sigma-Aldrich)에 의해 결정되었다. 그런 다음 동일한 농도 및 부피의 샘플을 제조업체의 지침에 따라 CHSY1 ELISA 키트 (Kit, MBS7203596, MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 사용하여 ELISA로 측정했다.

면역 형광 염색 (Immunofluorescence staining)

염색 분석을 위해, 사람 피부 샘플은 24 시간 이상 동안 10 % 포르말린에 고정되었다. 이후 샘플을 파라핀에 매립하고 4 μm 절편으로 절단했다. 그런 다음 절편을 탈 파라핀 화하고, 항원 검색(Antigen retrieval) 절차없이 실온에서 10 분 동안 Ultra V Protein Block (Epredia, Kalamazoo, MI, USA)을 사용하여 차단한 다음 CHPF에 대한 1 차 항체 (1:500)와 함께 가습 통에 넣어 4 ℃에서 밤새 배양했다. 이후 2 차 항체는 실온에서 1 시간 동안 1:400의 alexa 594 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하고, 세포 핵 대조 염색에는 DAPI를 1:1000으로 실온에서 RT 10 분 간 사용했다. 그런 다음 Faramount Aqueous Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA,

USA)을 사용하여 장착되었다. 마지막으로 공 초점 현미경 (Leica TCS STED CW, Germany)을 사용하여 형광 이미지를 획득했다.

재조합 인간 IGF-1 (Recombinant Human IGF-1, rhIGF-1) 처리

rhIGF-1 처리를 위해, NHDF를 무 혈청 DMEM에서 48 시간 동안 굶겼다. 그 다음 250 ng/mL의 rhIGF-1 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)을 포함하는 신선한 무 혈청 DMEM으로 지정된 시간만큼 세포를 처리하고 mRNA 및 단백질 분석을 위해 수확했다.

통계 분석

GraphPad Prism 소프트웨어 v.5.0.3 (GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행했다. 맨-휘트니 *U* 검정 (Mann-Whitney *U* 검정), 윌콕슨 부호-순위 검정 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test), 대응표본 *t*-검정 (Paired *t*-test), 일원분산분석 (One-way ANOVA)에 이어 본페로니 (Bonferroni)의 사후검정을 사용하여 그룹을 비교했다. 자료는 세 개 이상의 독립적인 실험의 평균 ± 표준오차로 표시되었으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$로 설정되었다.

표 1. 사용된 프라이머 시퀀스 (Primer Sequence) 목록

표적 유전자		시퀀스 (5’−3’, F: Forward, R: Reverse)
BGN	F	GTC TAT CTG CAC TCC AAC AA
	R	TGG ATG GCC AGG CGG TCA GT
DCN	F	AGC TGA AGG AAT TGC CAG AA
	R	GCC ATT GTC AAC AGC AGA GA
XYLT1	F	TGT CTA CGA TGA GCC TGA CG
	R	AAG CGG TCA GCA AGG AAG TA
XYLT2	F	GGT GGC ATT CCT ATC CAA GA
	R	GTC AGC ACG AAC CAG TCA GA
CHSY1	F	GGG AAA GTT CCC AGT GAC AA
	R	AAC ATC AAA GCC ACC CAC TC
CHPF	F	GGC AGC CTC AGA ACA AGA AG
	R	CGG TGG TAC AGG TCC TCA CT
CHSY3	F	GAA TGC CAA GAG CAG AGG AC
	R	TGC TGA AGA TAG GCA TGA CG
CSGalNAcT1	F	CGA GGA CTC TTC CAC CTC TG
	R	TTG CGA AGG TGA GCC TCT AT
CSGalNAcT2	F	CTG ATT GTG TGT GGG ATT GC
	R	CGG GCA GGT GAA GAT ACC TA

CHPF2	F	AAG CAC CCT GTG GAC ACT CT
	R	CTC CTG GAA ATG GAC TGG AA
ADAMTS5	F	GCT ACT GCA CAG GGA AGA GG
	R	GGC AGG ACA CCT GCA TAT TT
IGF1	F	ACG GCT GGA CCG GAG ACG GTC
	R	CTA CTT GCG TTC TTC AAA TGT
IGF1R	F	CGA GTA CTT GCT GCT GTT CCG AGT
	R	CAC AGC GCC AGC CCT CAA ACC TGT
36B4	F	TCG ACA ATG GCA GCA TCT AC
	R	TGA TGC AAC AGT TGG GTA GC

표 2. 사용된 1차 항체 목록

표적 단백질	숙주	상품 번호	공급자
Biglycan	Goat IgG	AF2667	R&D Systems
Decorin	Mouse IgG	MAB143	R&D Systems
MMP-1	Rabbit IgG	Customized	Lab Frontier
Procollagen 1A	Mouse IgG	SP1.D8	Developmental Studies Hybridoma Bank
Tropoelastin	Rabbit IgG	PR398	Elastin Products Company, INC
CHSY1	Rabbit IgG	GTX115638	Genetex
CHPF	Rabbit IgG	PA5-26056	Thermo Fisher Scientific
ADAMTS5	Rabbit IgG	PA5-32142	Thermo Fisher Scientific
β-actin	Goat IgG	sc-1616	Santa Cruz
β-tubulin	Rabbit IgG	sc-9104	Santa Cruz

연구 결과

결과 1. 내인성 노화된 사람 피부 진피에서 바이글리칸과 데코린의 변화

먼저 실제 노화된 피부 조직에서 바이글리칸과 데코린의 변화를 관찰하였다. 청년과 노인의 피험자를 모집하고, 광노화 요소를 통제하기 위해 태양광으로부터 보호된 엉덩이 부위를 조직 생검하여 진피를 분리한 뒤 단백질을 추출하여 비교하였다.

우선, 이당사슬-바이글리칸 (Intact form, Biglycosylated-biglycan)은 온전한 PG형태의 바이글리칸이고 단당사슬-바이글리칸 (Monoglycosylated-biglycan)이나 GAG 사슬이 없는 핵심 단백질 (Core protein) 형태는 합성 중간체 또는 분해된 형태이다. 조직 시료에서 크기는 명확하지 않지만, 그림 2와 같이 이당사슬-바이글리칸 (> 140kDa), 단당사슬-바이글리칸 (> 70 kDa), 핵심 단백질 형태 (40kDa)의 세 가지 형태로 관찰되었고, 세 가지 형태를 모두 합한 총량이 유의하게 감소하였다. 바이글리칸의 크기는 이당사슬-바이글리칸, 단당사슬-바이글리칸 또는 둘을 합한 전체 당사슬-바이글리칸 (Glycosylated biglycan)에 대해 분자량을 산출하여 확인하였고, 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향을 보였다.

데코린의 경우 온전한 PG형태는 단당사슬-데코린 (Intact form, Monoglycosylated-decorin)이고 GAG 사슬이 없는 핵심 단백질

형태는 마찬가지로 합성 중간체 또는 분해된 형태이다. 그림 2에서 단당사슬-데코린 (> 70kDa), 핵심 단백질 (<50kDa)의 두 형태 모두 관찰되며, 양은 통계적으로 유의하지 않지만 약간 감소하는 경향을 보였다. 크기에 대해서는 단당사슬-데코린의 분자량을 산출한 결과, 유의하게 감소하는 것을 확인했다 (그림 3).

한편, 바이글리칸과 데코린 면역 블랏 (Immunoblot)을 통해 광범위하게 검출된 신호가 실제 바이글리칸과 데코린인지 검증하는 과정이 필요하였다. 이에, 시료에 당 사슬을 분해하여 프로테오글리칸의 핵심 단백질만 남기는 콘드로이티네이즈 ABC (Chondroitinase ABC, ChABC)를 처리하고 웨스턴 블롯을 함께 수행하였다 (그림 2a와 3a). ChABC 처리되지 않은 시료에서 광범위하게 검출된 표적 신호가 ChABC 처리에 의해 핵심 단백질 크기에서만 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 광범위한 신호가 모두 바이글리칸 또는 데코린 임을 검증할 수 있었다.

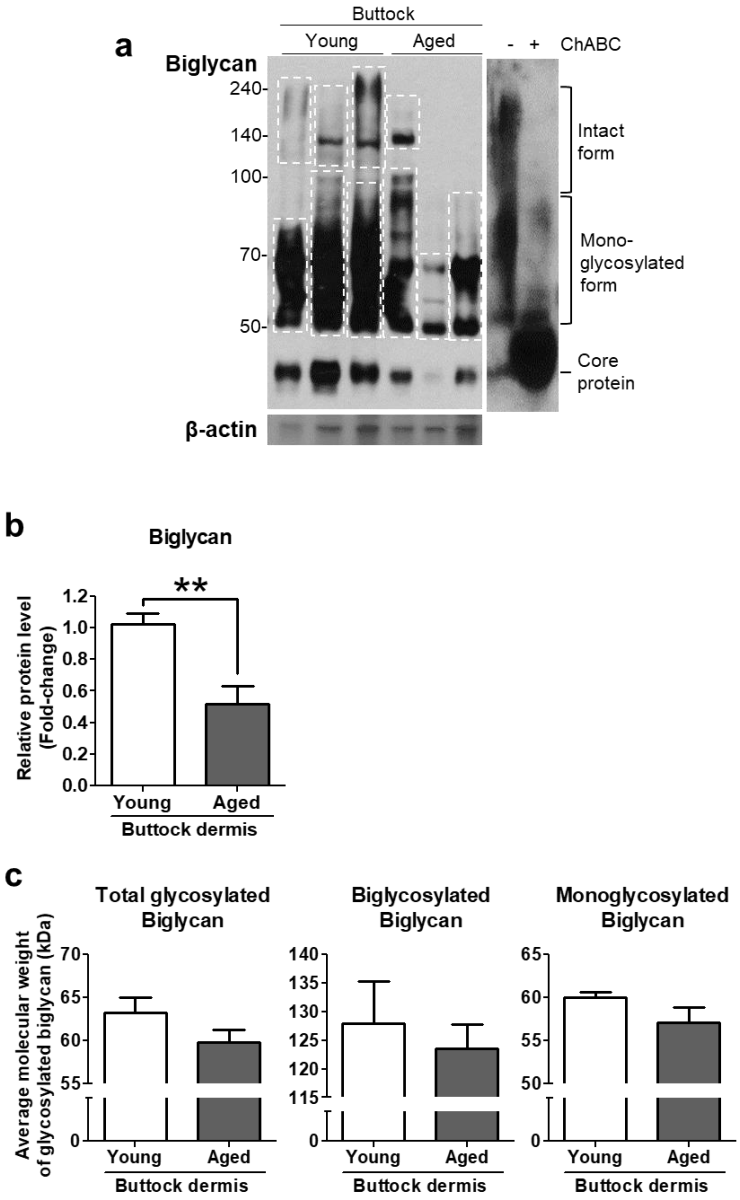


그림 2. 내인성 노화된 사람 진피에서의 바이글리칸의 변화

바이글리칸 발현은 청년과 노인 엉덩이 진피에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯 (Western blot)으로 확인하였다. (a) 당 사슬을 끊어 프로테오글리칸 형태를 핵심 단백질 (Core protein)로 전환해주는 콘드로이티

네이즈 (Chondroitinase, ChABC)를 처리한 시료를 함께 분석하여 광범위한 표적 신호가 모두 바이글리칸이라는 것을 검증하였다. β-액틴 (Actin)은 대조 신호 (로딩 컨트롤, Loading control)를 나타낸다. ImageJ를 사용하여 신호 강도를 분석하고, 대조 신호인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. (b) 상대 단백질 수준 (Relative protein level) 값은 상대적인 변화 배수 (Fold-change)의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (N = 6). (c) 분자량은 CCD 카메라, 아머샴 이미저 프로그램 (Amersham Imager)을 사용하여 산출되었으며, 전체, 이당사슬-바이글리칸과 단당사슬-바이글리칸으로 나타내었다 (N = 3). 통계 분석은 맨-휘트니 U 검정 (Mann-Whitney U 검정)을 사용하여 수행했다. (** P (유의확률) <0.01)

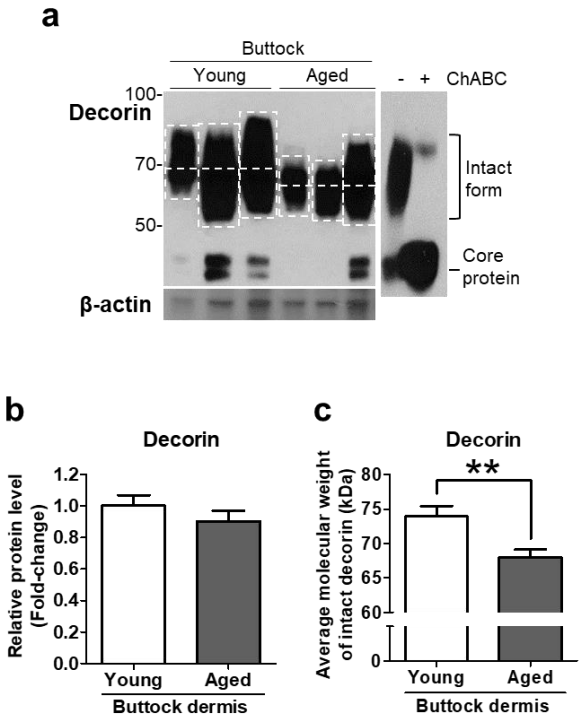


그림 3. 내인성 노화된 사람 진피에서의 데코린의 변화

데코린 발현은 청년과 노인 엉덩이 진피에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다. (a) ChABC를 처리한 시료를 함께 분석하여 광범위한 표적 신호가 모두 데코린이라는 것을 검증하였다. β-액틴은 로딩 컨트롤을 나타낸다. (b) ImageJ를 사용하여 밴드 강도를 분석하고, 로딩 컨트롤인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. 상대 단백질 수준 값은 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (Young; N = 12, Aged; N = 14). (c) 분자량은 CCD 카메라, 아머샴 이미저 프로그램 (Amersham Imager)을 사용하여 산출되었다 (Young; N = 14, Aged; N = 14). 맨-휘트니 U 검정을 사용하여 통계 분석을 수행했다. (** P <0.01)

결과 2. 광노화된 사람 진피 조직에서의 바이글리칸과 데코린의 변화

한편, 이전 연구에서 광노화 피부 조직에서 DMMB 비색 분석을 통해 총 sGAG가 증가하는 것을 확인하였다 (Oh et al., 2018). 이를 고려하여 광노화에서 바이글리칸과 데코린의 양은 감소하지만 크기는 증가할 것이라는 가설을 세웠다. 이를 확인하기 위해 동일한 노인층 피험자에서 태양광에 노출되지 않은 엉덩이 부위와 노출된 하완 부위의 조직 생검을 진행하고, 진피를 분리한 뒤 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯으로 관찰했다. 엉덩이 대비 하완에서의 단백질 발현을 비교하였는데, 바이글리칸의 총량에서는 통계적으로 유의하지는 않지만 감소하는 경향성이 나타났다. 바이글리칸 크기는 전체적으로 이동하는 경향이 있어 전체 당사슬화 바이글리칸에 대해서 분자량을 산출하였고, 분자량이 유의하게 증가했다 (그림 4). 데코린의 경우 양이 유의하게 감소하였고, 분자량은 유의하게 증가한 것으로 확인되었다 (그림 5).

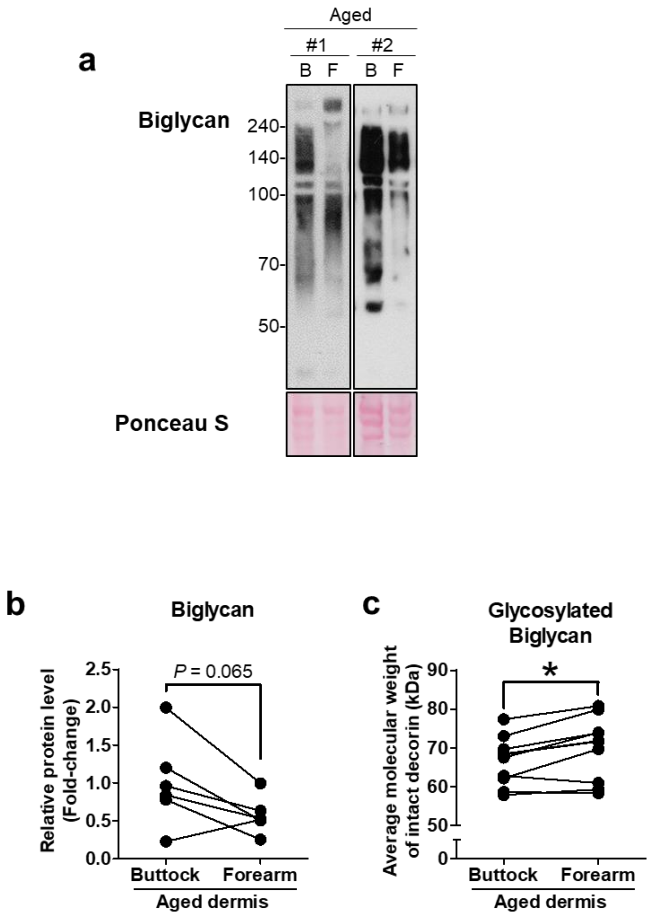


그림 4. 광노화된 사람 진피에서의 바이글리칸의 변화

바이글리칸 발현은, 청년과 노인 엉덩이 진피에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯으로 발현을 확인하였다. (a) 당 사슬을 끊어 프로테오글리칸 형태를 핵심 단백질로 전환해주는 ChABC를 처리한 시료를 함께 분석하여 광범위한 표적 신호가 모두 바이글리칸이라는 것을 검증하였다. β-액틴은 대조 신호를 나타낸다. (b) ImageJ를 사용하여 신호 강도를 분석하고, 대조 신호인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다 (N = 6). (c) 분자량은 CCD 카메라, 아머샴 이미저 프로그램 (Amersham Imager)을

사용하여 산출되었다 (N = 10). 광노화 비교를 위해 엉덩이 대비 하완에서의 발현을 짝지어 비교하고, 통계 분석은 윌콕슨 부호-순위 검정 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test)을 사용하여 수행되었다.

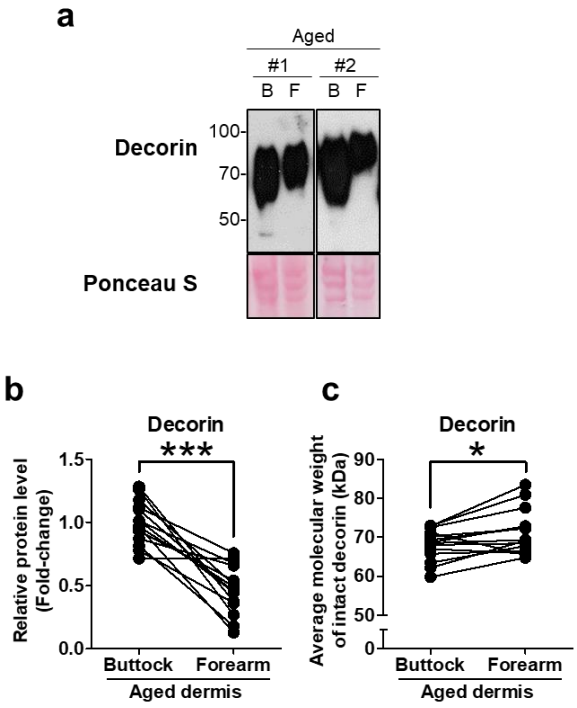


그림 5. 광노화된 사람 진피에서의 데코린의 변화

데코린 발현은, 청년과 노인 엉덩이 진피에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다. (a) ChABC를 처리한 시료를 함께 분석하여 광범위한 표적 신호가 모두 데코린이라는 것을 검증하였다. β-액틴은 로딩 컨트롤을 나타낸다. (b) ImageJ를 사용하여 밴드 강도를 분석하고, 로딩 컨트롤인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. 상대 단백질 수준 값은 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (Young; N = 12, Aged; N = 14). (c) 분자량은 CCD 카메라, 아머샴 이미저 프로그램을 사용하여 산출되었다 (Buttock; N = 14, Forearm; N = 14). 광노화 비교를 위해 엉덩이 대비 하완에서의 발현을 짝지어 비교하고, 통계 분석은 윌콕슨 부호-순위 검정을 사용하여 수행되었다 (* P <0.05, *** P <0.001).

결과 3. 노화에서 바이글리칸과 데코린이 발현이 감소하지만, 전사 감소에 의한 것은 아니다.

바이글리칸의 발현량은 내인성 노화에서 감소하고 (그림 2), 광노화에서는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향을 보였으며 (그림 3), 데코린의 발현량은 내인성 노화에서는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있었고 (그림 4) 광노화에서 유의하게 감소하였다 (그림 5). 이러한 정량적 변화가 전사의 감소로 인한 것인지 확인하기 위해 qRT-PCR로 mRNA 발현을 관찰하였다. 그림 6a에서 볼 수 있듯이 바이글리칸과 데코린의 mRNA는 내인성 노화 진피에서 오히려 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 광노화에서는 감소하는 경향은 있지만 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다. 이 결과로부터 바이글리칸과 데코린의 양적 감소는 전사가 줄어들어 감소한 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. 이것은 PG 분해 효소의 증가 또는 전사 후 번역 과정의 감소와 같은 요인이 관련되었을 수 있음을 시사한다.

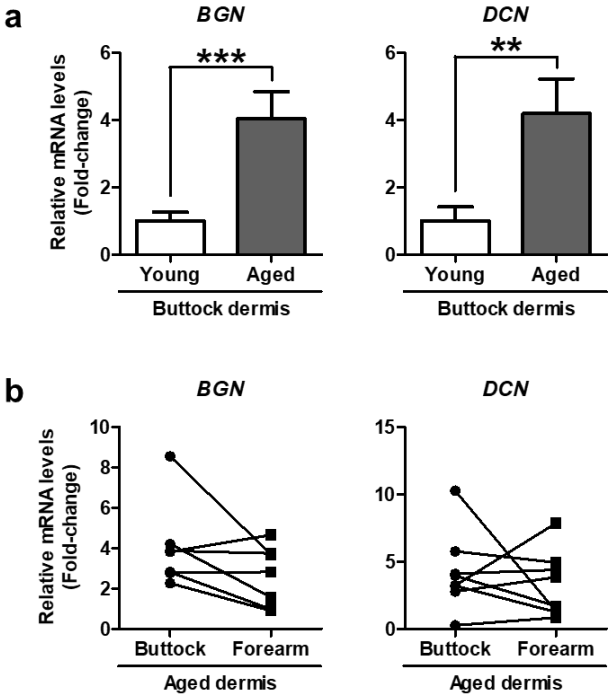


그림 6. 내인성 노화와 광노화 진피에서의 바이글리칸과 데코린의 mRNA 발현

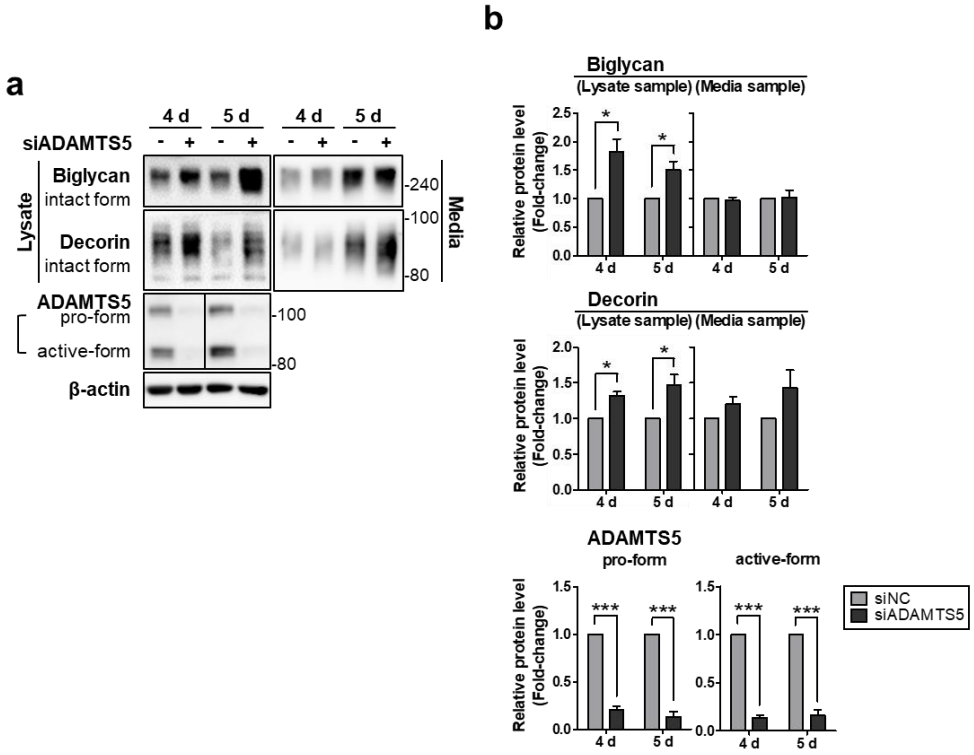
단백질 추출을 위해 모집된 조직과 동일한 내인성 노화와 광노화 조직에서 총 RNA를 추출하고, *BGN*과 *DCN*의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 각 표적 mRNA의 발현은 *36B4*의 발현으로 보정하였다. (a) 내인성 노화 비교를 위해 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 맨-휘트니 *U* 검정을 사용하여 통계 분석을 수행했다. (Biglycan, Young; N = 8, Aged; N = 7) (Decorin, Young; N = 7, Aged; N =8) (b) 광노화 비교를 위해 엉덩이 대비 하완에서의 발현을 짝지어 비교하고, 통계 분석은 윌콕슨 부호-순위 검정을 사용하여 수행되었다 (Biglycan, Buttock; N = 7, Forearm; N = 8) (Decorin, Buttock; N = 8, Aged; N =8). (** P <0.01, *** P <0.001)

결과 4. NHDF에서 ADAMTS5가 바이글리칸과 데코린을 분해한다.

노화에서 바이글리칸과 데코린이 감소하는 것이 생합성 증가가 아니라 바이글리칸, 데코린 분해 효소가 증가되었기 때문일 것이라고 생각하고 가설을 새로 설정하였다. 예비 실험에서 젊은 피부조직과 노화된 피부조직을 마이크로어레이 (Microarray)로 비교 분석하였다. 그 결과, 바이글리칸과 데코린의 분해 활성에 대한 보고가 있었던 분해 효소 중에서 ADAMTS5와 호중구 엘라스테이즈 (Neutrophil elastase), 그랜자임 B (Granzyme B)가 증가했다. 이 중 호중구 엘라스테이즈는 발현 확인이 잘 되지 않았고, 그랜자임 B는 조직 면역 염색 결과 비만세포에서만 발현되는 것처럼 보였다. 또한 mRNA로 확인했을 때, ADAMTS5가 발현이 훨씬 높았기 때문에 ADAMTS5를 표적으로 선정하였다. ADAMTS5라는 분해효소는, 주요 기질이 아그레칸이고, 데코린, 바이글리칸 및 브레비칸과 같은 다른 PG에 대한 단백질 분해 활성도 알려졌다 (Gendron et al., 2007, Verma and Dalal, 2011).

이에 ADAMTS5 siRNA를 사람의 NHDF에 주입한 후 세포 용해물과 세포 배양 배지를 4 일과 5 일 째에 수확하였다. 단백질 분석에서 ADAMTS5는 글리코실화 (Glycosylation)로 인해 각 세포 유형에 따라 크기가 다르게 나타날 수 있으며, 활성화되지 않은 전구체 형 (Pro-form, 100-120kDa)은 대략적으로 100kDa의 분자 질량으로 나타나고, 절단된 활성 형 (Active-form)은 더 작은 크기 (70-85 kDa)에서 나타난다 (Fosang et al., 2008, Kumar et al., 2012, Longpre et al., 2009). 그림 7에서는 두 가지 주요 형태인 전구체 형과

활성 형의 ADAMTS5가 나타났고, ADAMTS5 siRNA 주입 세포와 음성 대조군 (Negative control, NC) siRNA 주입 세포를 비교했을 때, 세포 용해물 시료에서 ADAMTS5의 단백질 발현이 잘 억제된 것이 확인되었다. 그리고, ADAMTS5가 억제되었을 때 세포 용해물의 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현은 4 일과 5 일 모두에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 배양된 배지에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과를 통해 NHDF에서 ADAMTS5가 바이글리칸과 데코린을 분해하는데 핵심적으로 기여하고 있음을 확인할 수 있었다.



①

그림 7. Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs)에서 A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) 5의 녹다운 (Knockdown)에 따른 바이글리칸과 데코린의 발현 증가

ADAMTS5 siRNA를 NHDF에 처리한 뒤 4 일 또는 5 일 째에 세포 용해물과 배양된 배지를 모두 수확하였다. 이들 시료의 단백질로 웨스턴 블롯을 수행하였고, ImageJ를 사용하여 신호 강도를 분석하고, 대조 신호인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. 상대 단백질 수준 값은 상대

① 공동연구성과물 Lee H, Lim J, Oh JH, Cho S, Chung JH. IGF-1 Upregulates Biglycan and Decorin by Increasing Translation and Reducing ADAMTS5 Expression. Int J Mol Sci 2021;22(3).

적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (N = 4). 대응표본 *t*-검정 (Paired *t*-test)을 사용하여 통계적 비교를 수행했다. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

결과 5. ADAMTS5 발현은 내인성 노화된 진피에서 증가하고 광노화에서는 더욱 증가한다.

NHDF에서 ADAMTS5가 바이글리칸과 데코린의 분해에 중요하게 기여한다는 것을 확인하였으므로, 그 다음으로 ADAMTS5가 노화와 함께 증가하여 노화에서 바이글리칸과 데코린의 발현량이 감소하는 변화의 원인으로 작용하는지 살펴볼 필요가 있었다. 이를 확인하기 위해 그림 2 – 그림 6에서와 동일한 내인성 노화 조직과 광노화 조직 시료에서 발현량을 확인하였다. 그 결과 내인성 노화에서 ADAMTS5의 mRNA와 단백질 모두 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (그림 8a와 8b). 한편, 광노화에서는 mRNA는 감소했지만 단백질은 증가했다 (그림 8c와 8d). mRNA가 감소하는 이유는 명확하지 않지만, 그럼에도 불구하고 ADAMTS5의 단백질은 크게 증가했으며, 웨스턴 블롯에서 검출된 ADAMTS5의 형태가 활성형이기 때문에 실제로 작용하는 효소가 증가한다는 측면에서 더욱 의미가 있다.

이를 통해 내인성 노화에서의 바이글리칸 발현량과 광노화에서의 데코린 발현량의 유의미한 감소가 노화에 따라 증가된 ADAMTS5의 분해에 의한 것이라고 생각할 수 있다.

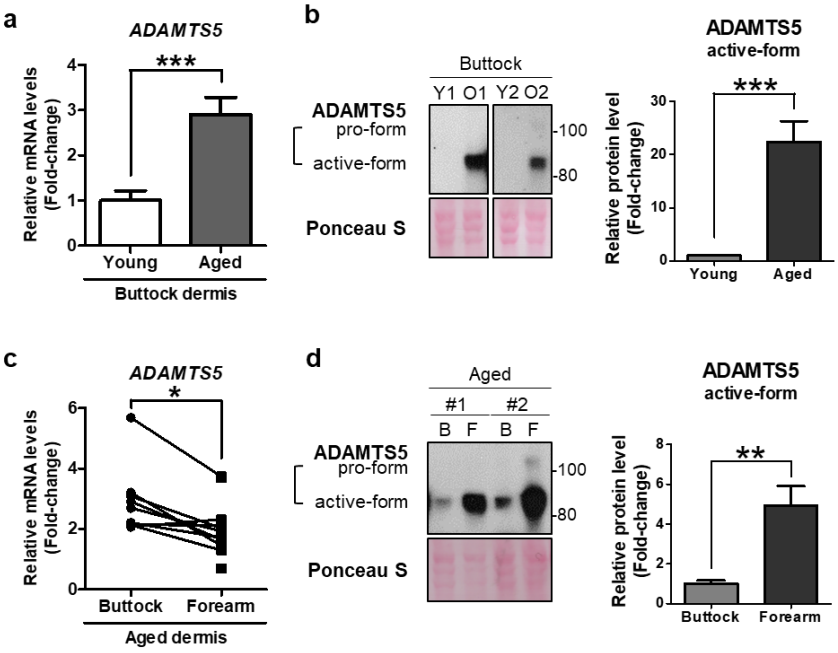


그림 8. 내인성 노화 및 광노화된 진피에서의 ADAMTS5 발현

(a, b) 내인성 노화에서의 비교를 위해 청년과 노인의 엉덩이 진피에서 추출한 RNA 또는 단백질을 비교하였다. RNA발현은 *36B4*에 대해, 단백질 발현은 대조 신호로 사용된 폰슈S (Ponceau S) 염색에 대해 각각 보정하였다. 결과 값은 상대적인 변화 배수 의 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 맨-휘트니 *U* 검정을 사용하여 통계 분석을 수행했다. (a) (Young; N = 10 Aged; N = 9) (b) (Young; N = 8 Aged; N = 8) (c, d) 광노화 비교를 위해 엉덩이 대비 하완에서의 발현을 짝지어 비교하고, 통계 분석은 (c) 맨-휘트니 *U* 검정이나 (d) 윌콕슨 부호-순위 검정 (Young; N = 9 Aged; N = 11) 을 사용하여 수행되었다 (Buttock; N = 8, Aged; N =8) (* P <0.05, ** P <0.01). (Y; Young 청년, O; Old 노인, B; Buttock 엉덩이, F; Forearm 하완)

결과 6. CHSY1과 CHPF의 녹다운이 바이글리칸과 데코린의 크기 감소를 유도한다.

내인성 노화에서 바이글리칸의 크기는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향을 보였고 데코린은 크기가 유의하게 감소했다 (그림 2과 3). 한편, 광노화에서는, 바이글리칸과 데코린의 크기가 유의하게 증가했다 (그림 4과 5). 핵심 단백질 크기와 GAG 사슬 길이를 더하면 곧 온전한 PG의 크기가 되기 때문에, 노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기가 변하는 것은 곧 CS/DS 사슬 길이가 변하기 때문이라고 가설을 세웠다.

CS/DS 사슬을 연장하는 효소는 6 가지가 있다. 그 중에서 바이글리칸과 데코린의 사슬 길이에 가장 큰 영향을 미치는 CS/DS-합성효소를 찾기 위해, NHDF에 6 종류의 효소에 대한 siRNA를 처리하여 녹다운시키고 4 일 후 세포 용해물과 배양 배지를 수확하였다. 웨스턴 블롯으로 분석했을 때, 그림 9과 같이 바이글리칸과 데코린의 크기 감소가 CHSY1 발현을 억제했을 때 가장 컸으며, CHPF 발현 억제에 의해서도 나타나는 것을 알 수 있었다. ChABC처리를 통해 넓은 범위로 검출되는 모든 신호가 각각의 PG에 해당함을 확인했다.

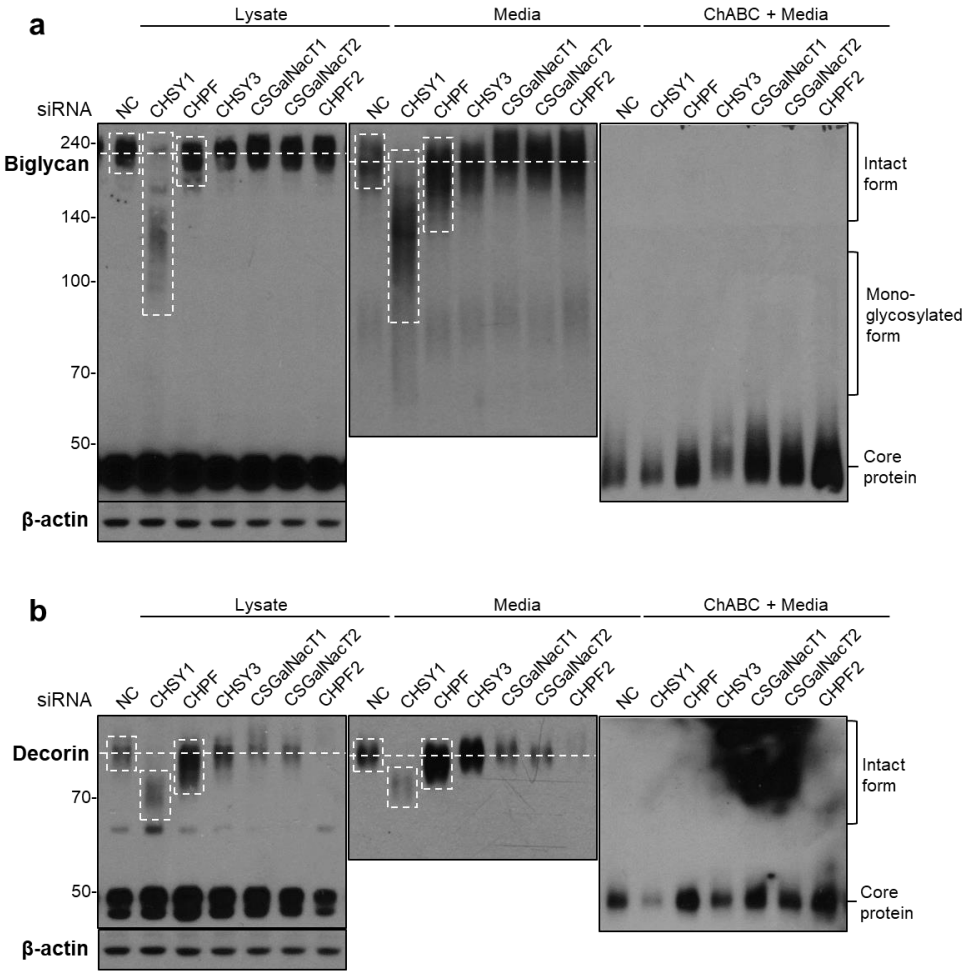


그림 9. NHDF에서 Chondroitin Sulfate Synthase 1 (CHSY1) 또는 Chondroitin Polymerizing Factor (CHPF)의 녹다운에 의한 바이글리칸과 데코린의 크기 감소

NHDF에 6 개의 CS/DS-합성효소 siRNA를 처리하고 4 일 후에 세포 용해물과 세포 배양 배지를 수확하였다. 바이글리칸과 데코린 단백질은 웨스턴 블롯으로 분석되었고, ChABC가 처리된 시료를 함께 분석하여 광범위한 표적 신호의 변화가 해당 PG라는 것을 검증하였으며 β-액틴은 대조 신호로 사용되었다. 실험은 각각 다른 사람에서 유래한 1차

NHDF를 이용하여 독립적으로 3회 수행되었다.

결과 7. 노화된 피부에서의 CS/DS-합성효소 발현 변화

세포 실험에서 RNA간섭을 통한 CHSY1과 CHPF의 억제가 바이글리칸과 데코린의 크기 변화를 가져온다는 것을 확인했기 때문에 노화에서도 CHSY1, CHPF와 함께 6 CS/DS-합성효소들의 mRNA 발현을 관찰하고자 했다. 내인성 노화에서 바이글리칸의 크기는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향을 보였고 데코린의 크기는 유의하게 감소했는데 (그림 2와 3), 이 6 가지 CS/DS-합성효소 mRNA는 오히려 증가하는 경향을 보였고, 심지어 CHSY1과 CHSY3를 제외하고 통계적으로 유의했다 (그림 10a). 광노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기는 유의하게 증가했는데 (그림 4과 5), 6 가지 CS/DS-합성효소는 유의미한 변화를 보이지 않았다 (그림 10b). 따라서 이러한 결과로 미루어 볼 때, 노화에서 바이글리칸과 데코린의 당사슬의 길이가 변화하는 이유는 직접적인 CS/DS-합성효소들의 발현 조절을 통하는 것이 아닐 수 있는 것으로 생각되었으나, 각 효소들의 단백질의 변화를 확인해 볼 필요가 있을 것으로 생각되었다.

CS/DS-합성효소의 mRNA 변화로는 노화에서 PG의 크기 변화를 설명하기 어려웠다. 하지만, 실제 단백질의 발현이 mRNA발현보다 더 중요하기 때문에, 이들 CS/DS-합성효소의 단백질 발현을 확인하는 과정이 필요했다. 특히 그림 9에서 바이글리칸과 데코린의 크기 감소에 가장 크게 기여한 CHSY1과 CHPF를 중점적으로 살펴보고자 하였다. 그러나 웨스턴 블롯으로 CS/DS-합성효소를 확인하기는 쉽지 않았기 때문에, CHSY1은 ELISA, 그리고 CHPF는 조직 면역형광염색법으로

단백질 발현을 확인하였다.

내인성 노화에서 바이글리칸의 크기는 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향을 보였고 데코린의 크기는 유의하게 감소했는데, *CHSY1* mRNA는 통계적으로 유의하지 않지만 오히려 증가하는 경향을 보였다 (그림 10a). 그림 11a에서 ELISA로 확인했을 때에도, CHSY1 단백질이 통계적으로 유의하지 않지만 오히려 증가하는 경향을 보였다. 또한 광노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기는 유의하게 증가했는데, *CHSY1* mRNA는 유의미한 변화를 보이지 않았다 (그림 10b), 그림 11a에서 ELISA로 확인했을 때에도 광노화에서 CHSY1 단백질은 유의미한 변화를 보이지 않았다.

한편 내인성 노화에서 *CHPF* mRNA도 바이글리칸과 데코린의 크기 변화 방향과 달리 오히려 유의하게 증가했지만, 그림 11b의 조직 염색에서 CHPF 단백질은 감소하는 경향을 보였다. 광노화에서는 *CHPF* mRNA가 바이글리칸과 데코린의 크기 증가와 달리 유의미한 변화를 보이지 않았고, 그림 11b에서는 CHPF 단백질이 감소하는 것처럼 나타났다. 조직 면역형광염색법은 정량적이지 않고 정성적인 실험기법이기에 유의성을 따지기는 어렵지만, 총 28인의 조직에서 염색한 결과를 살펴봤을 때, 크게 유의한 결과는 보이지 않았다.

결과적으로 CS/DS-합성효소들의 발현 변화 양상은 노화와 관련된 바이글리칸과 데코린의 크기 변화와 일치하지 않았고, 이러한 결과로 미루어 볼 때, 노화에서 바이글리칸과 데코린의 당사슬의 길이가 변화하는 이유는 직접적인 CS/DS-합성효소들의 발현 조절을 통하는

것이 아닌 것으로 생각되었으며, 예상치 못한 다른 요인들이 관여하고 있는 것으로 생각된다.

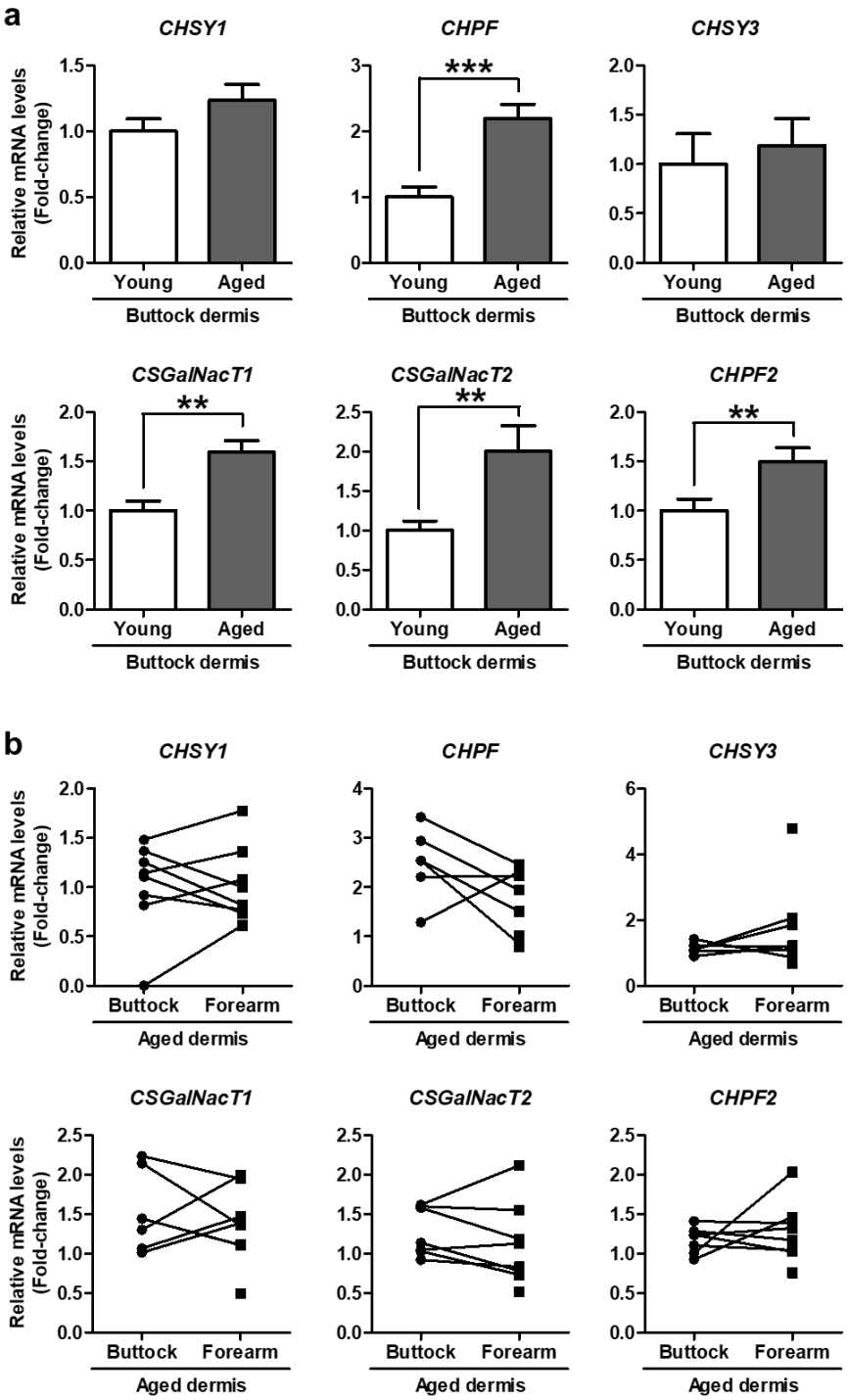


그림 10. 내인성 노화와 광노화 진피 조직에서의 6 가지 CS/DS-합성

효소들의 mRNA 발현

단백질 추출을 위해 모집된 조직과 동일한 내인성 노화와 광노화 조직에서 총 RNA를 추출하고, *BGN*과 *DCN*의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 각 표적 mRNA의 발현은 *36B4*의 발현으로 보정하였다. (a) 내인성 노화 비교를 위해 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 맨-휘트니 *U* 검정을 사용하여 통계 분석을 수행했다. (Young; N = 16 Aged; N = 16) (b) 광노화 비교를 위해 엉덩이 대비 하완에서의 발현을 짝지어 비교하고, 통계 분석은 윌콕슨 부호-순위 검정을 사용하여 수행되었다. (Buttock; N = 8, Aged; N =8) (** P <0.01, *** P <0.001)

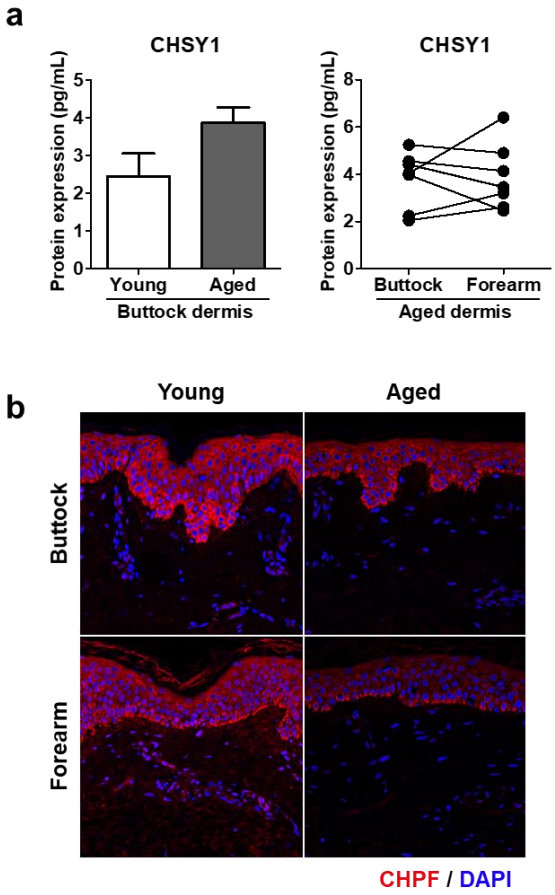


그림 11. 내인성 노화 및 광노화된 조직에서의 CHSY1과 CHPF 단백질 발현.

이전에 설명된 내인성 노화 및 광노화 조직과 동일한 조건의 조직에서 분석이 시행되었다. (a) 단백질을 리파용해 완충용액 (RIPA lysis buffer)으로 추출하고 정량하여 동일한 농도를 CHSY1 효소결합면역흡착검사로 분석하였다. 내인성 노화 비교를 위해 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 맨-휘트니 U 검정을 사용하여 통계 분석을 수행했다. (Young; N = 6, Aged; N = 8) (b) CHPF 단백질 발현

은 파라핀 (Paraffin) 조직에서 면역형광염색법을 통해 확인되었다. 청년 14인 (남성 7인, 여성 7인)과 노인 14인 (남성 7인, 여성 7인)에게 얻은 조직을 같은 날 분석을 수행하였고 그 중 대표 이미지로 나타내었다. 붉은 색은 CHPF를 나타내고, 푸른 색은 세포 핵에 대한 다피 (DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole) 대조 염색이다. 사진은 공초점 현미경 (Confocal microscopy)으로 관찰한 것으로 배율은 x400이다.

결과 8. NHDF에서 IGF-1은 전사 증가 없이, 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현을 증가시킨다.

결과 1에서 바이글리칸과 데코린이 노화와 관련하여 양이 감소하는 것을 보여주었다. 내인성노화에서 바이글리칸의 발현량이 감소하고 데코린의 발현량은 통계적으로 유의하지 않지만 감소 경향을 보이며, 광노화에서는 바이글리칸의 발현량은 통계적으로 유의하지 않지만 감소 경향을 보이고 데코린의 발현량이 유의하게 감소했다. 그러나 바이글리칸과 데코린의 mRNA는 내인성 노화에서는 오히려 증가하고, 광노화에서는 통계적으로 유의하지 않고 감소하는 경향성만 보였다. 따라서 노화에서 바이글리칸과 데코린 발현량의 감소는 합성의 감소 측면으로는 설명할 수 없었으며, 노화된 피부에서 분해효소인 ADAMTS5의 증가로 인해 분해가 증가하는 결과를 보여주었다.

한편 노화에서 성장 인자의 수치는 감소하는 것으로 잘 알려져 있기 때문에, 성장 인자가 바이글리칸과 데코린의 발현 변화를 설명하는 또 다른 요인이 될 수 있다는 가설을 세웠다. 예비 실험에서 여러 성장 인자를 처리해보았고, 그 중에서도 PIGF (Placental growth factor, 태반 형성 인자), AREG (Amphiregulin, 앰피레귤린), 그리고 IGF-1이 바이글리칸과 데코린의 발현량을 증가시키는 효과가 있었다. 그 중에서도 IGF-1에 의한 발현량의 증가가 가장 효과적이었기에 IGF-1을 표적으로 선정하였다.

이에 NHDF에 rhIGF-1 (재조합 인간 IGF-1, recombinant human IGF-1)을 처리하여 바이글리칸과 데코린의 발현에 대한 효과와 세부

기전을 관찰하였다. 최근 연구에서 2700 명 이상의 피험자를 대상으로 혈청 IGF-1 수치를 측정한 결과, 18 세 그룹의 중앙값은 374.1 ng/mL이었고 70 세 그룹의 중앙값은 92.7 ng/mL로 200-300 ng/mL 감소했다 (Zhu et al., 2017). 본 연구에서는 250 ng/mL의 농도가 생리적으로 허용 가능한 범위라고 보고, 250 ng/mL의 IGF-1을 NHDF에 처리하였다.

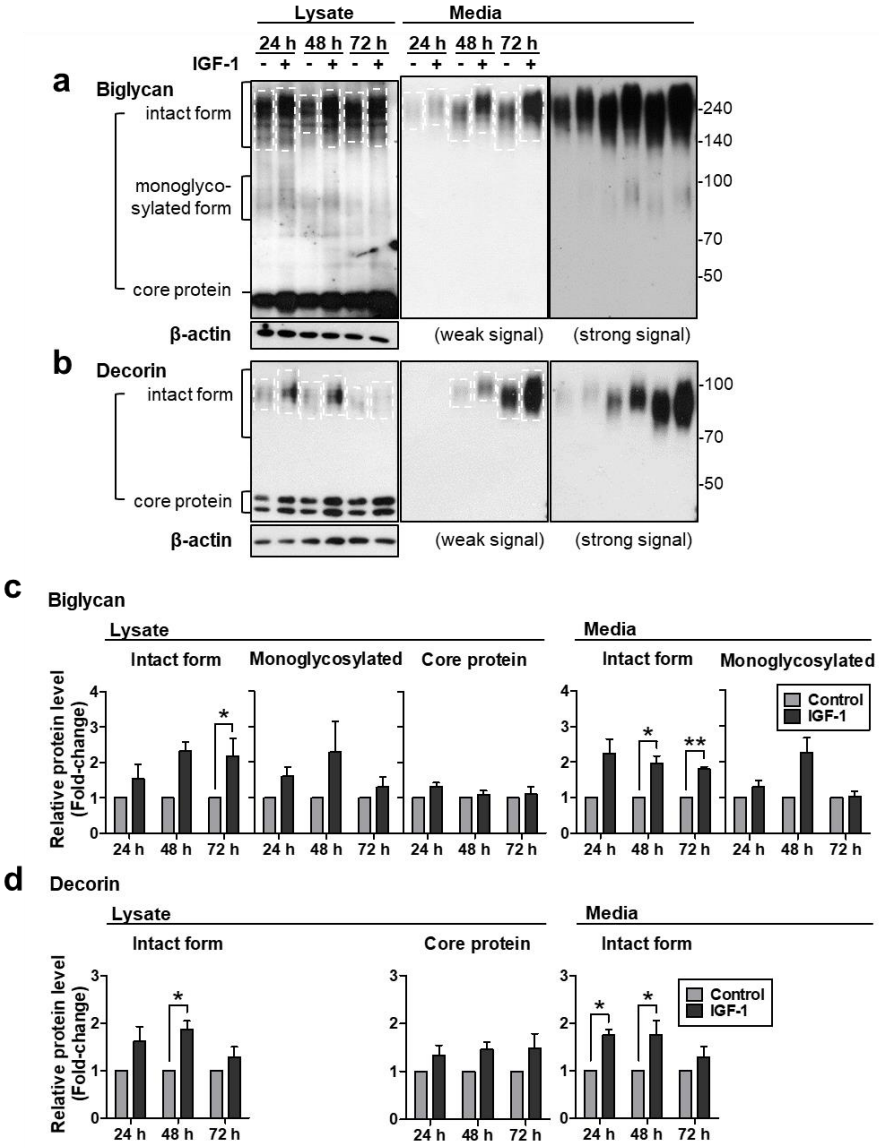
그림 12에 나타내어진 시점에서 세포 용해물과 세포 배양 배지를 수확하고 웨스턴 블롯으로 분석했을 때, 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 바이글리칸은 세가지 형태로 나타났는데, 세포 용해물에서 바이글리칸의 핵심 단백질 형태 (40kDa)가 가장 강력하게 검출되었으며 온전한 이당사슬-바이글리칸 형태 (> 140kDa)도 강력하게 검출되었다. 그리고 단당사슬-바이글리칸 형태 (> 70 kDa)는 희미하게 검출되었다. 배양된 배지에서도 이당사슬-바이글리칸은 강하게, 단당사슬-바이글리칸은 희미하게 검출되었고, 핵심 단백질 바이글리칸은 검출되지 않았다. rhIGF-1 처리에 의해 모든 형태의 바이글리칸 단백질 발현이 증가했으며 (그림 12a) 온전한 형태의 이당사슬-바이글리칸 (Intact form) 단백질 신호를 밀도 측정으로 분석했을 때, 세포 용해물에서 72 시간 째, 세포 배양 배지에서는 48 시간과 72 시간 째에 모두 유의하게 증가했다 (그림 12c).

온전한 형태의 단당사슬-데코린 (Intact form, > 70kDa)의 발현은 세포 용해물과 세포 배양된 배지 시료에서 유의하게 증가했으며, 핵심

단백질 형태 (Core protein, 이중선, <50kDa)의 발현은 통계적으로 유의하지 않지만 세포 용해물에서 증가하는 경향이 있었는데, 이는 배양된 배지에서는 검출되지 않았다 (그림 12b). 단당사슬-데코린의 단백질 신호를 밀도 측정으로 분석했을 때, rhIGF-1 매개 증가가 세포 용해물에서는 48 시간에, 배지 시료에서는 24 시간 및 48 시간에 유의미하다는 것을 보여주었다 (그림 12d).

또한, 바이글리칸과 데코린의 크기는 rhIGF-1에 의해 증가했다. 이러한 크기 변화는 IGF-1의 잘 알려지지 않은 조절 기전에 의해 CS/DS-합성효소가 증가하여 바이글리칸과 데코린에 붙어 있는 CS/DS GAG 사슬 길이가 증가하기 때문일 수 있다.

한편 rhIGF-1을 처리하고 최대 72 시간까지 바이글리칸과 데코린의 mRNA 수준을 확인했을 때, 모든 시점에서 유의한 변화를 보이지 않았다 (그림 13). 이러한 결과는 rhIGF-1 처리에 의한 바이글리칸과 데코린의 단백질 양의 증가가 각 mRNA 발현의 유도, 곧 전사 증가 때문이 아니라 전사 후 조절 (post-transcriptional regulation) 때문일 수 있음을 시사한다.



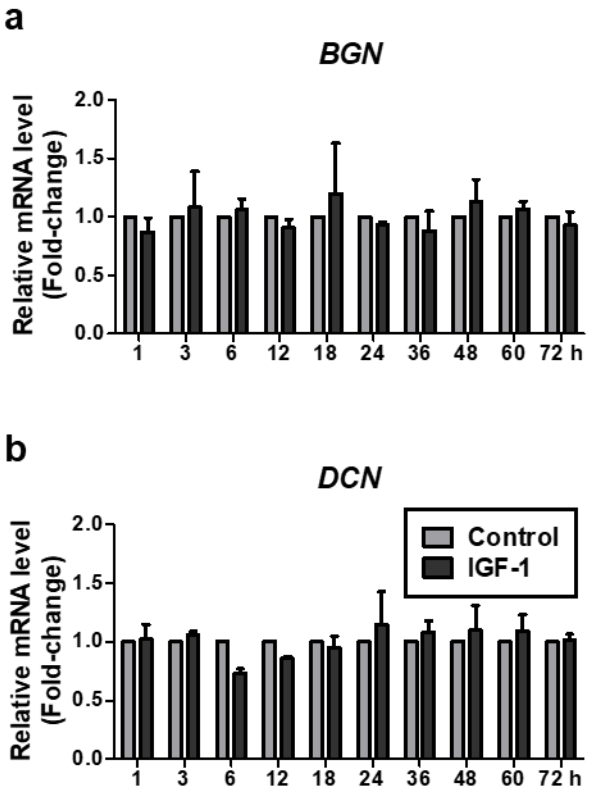
②

그림 12. NHDF에서 인슐린 유사 성장 인자-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1)에 의한 바이글리칸과 데코린 단백질 발현 증가

rhIGF-1을 250 ng/mL의 농도로 NHDF에 처리한 뒤, 표시된 시점에서

② 공동연구성과물 (임지영)ibid.

수확했다. 세포 용해물 및 세포배양 배지에서 (a) 바이글리칸 및 (b) 데코린의 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 분석했다. (c, d) 상대적인 단백질 양은 ImageJ를 사용하여 신호 강도를 분석하고, 대조 신호인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. 상대 단백질 수준 값은 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (N = 4). 대응표본 t-검정을 사용하여 통계적 비교를 수행했다. (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)



③

그림 13. NHDF에서 IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 mRNA 발현 변화

rhIGF-1을 250 ng/mL의 농도로 NHDF에 처리한 뒤, 시간 경과에 따라 표시된 시점에서 수확했다. 총 RNA를 추출하고, *BGN*과 *DCN*의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 각 표적 mRNA의 발현은 *36B4*의 발현으로 보정하였고, 대조군과의 상대적인 비교를 위해 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차로 나타내었다 (N = 4). 통계적 검증은 대응표본 *t*-검정을 사용해서 수행했다.

③ 공동연구성과물 (임지영) ibid.

결과 9. IGF-1은 NHDF에서 단백질 번역을 강화하여 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현을 증가시킨다.

IGF-1이 NHDF에서 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현을 증가시키는 과정에서 mRNA 유도가 관찰되지 않았다. 그런데 IGF-1은 단백질 번역을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있기 때문에 (Blackstock et al., 2014), IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 전사 후 번역의 증가 여부를 조사했다.

이를 위해 전사를 억제하는 악티노마이신 D (Actinomycin D, Act D)와 번역을 억제하는 시클로헥시미드 (Cycloheximide, CHX)를 처리하고 그 효과를 확인하고자 했다. 기저 상태 또는 rhIGF-1 처리 상태의 1차 NHDF에 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 대조 물질 또는 Act D, CHX를 18시간 동안 처리한 뒤 수확하였다. 세포 용해물 시료는 웨스턴 블롯으로 분석하였는데, Act D 처리 시료에서 바이글리칸과 데코린의 온전한 형태 (Intact form)와 핵심 단백질 (core protein)의 양은 DMSO 대조군에서와 같이 rhIGF-1 자극에 의해 유의하게 증가한 반면, CHX를 처리하면 rhIGF-1에 의한 발현 증가가 보이지 않는 것을 확인하였다. Act D와 CHX에 대한 반응이 잘 알려진 I형 프로콜라겐 (Type I procollagen)을 확인하여 (Blackstock et al., 2014), Act D와 CHX가 잘 작용한 것을 확인할 수 있었다 (그림 14). 이러한 결과를 통해 IGF-1에 의해 바이글리칸과 데코린 단백질이 양이 증가하는 것이, IGF-1에 의한 전사의 증가보다는 전사 후 단백질 번역의 증가 때문일 수 있다는 것을 시사한다.

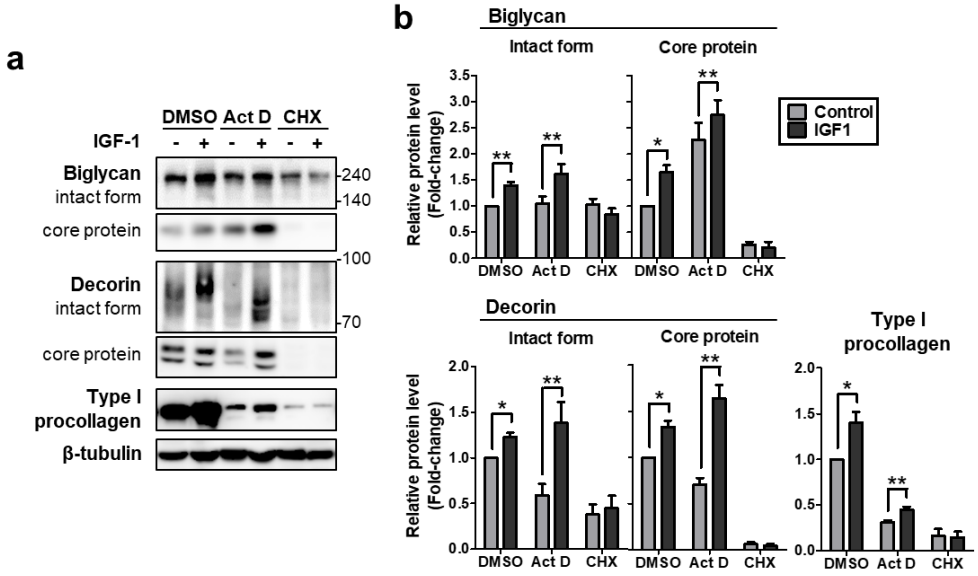
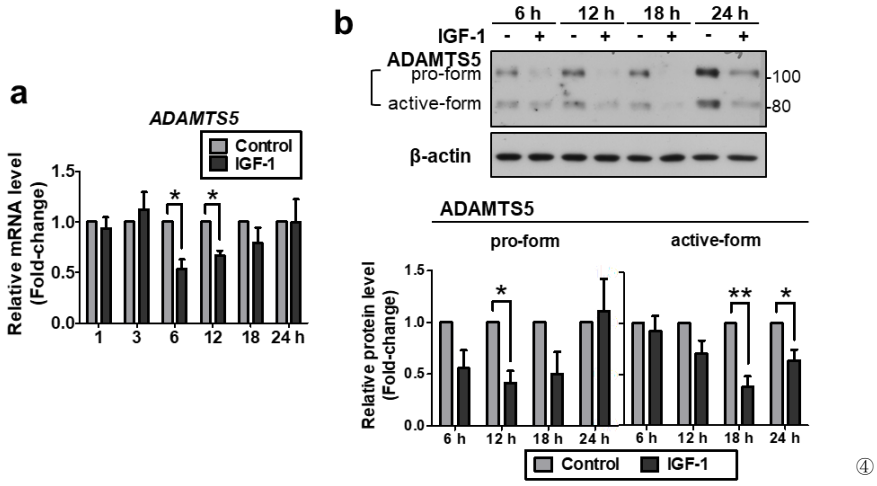


그림 14. NHDF에서 IGF-1의 번역 강화를 통한 바이글리칸과 데코린 단백질 발현의 증가

악티노마이신 D (Actinomycin D, Act D, 1 μg/mL) 또는 시클로헥시미드 (Cycloheximide, CHX, 25 μg/mL)를 기저 상태 또는 rhIGF-1 처리 상태의 NHDF에 18 시간 동안 처리했다. 세포 용해물 및 배양된 배지의 단백질은 웨스턴 블롯으로 분석했다. 상대적인 단백질 양은 ImageJ를 사용하여 신호 강도를 분석하고, 대조 신호인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. 상대 단백질 수준 값은 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (N = 4). 대응표본 t-검정을 사용하여 통계적 비교를 수행했다. (* P <0.05, ** P <0.01)

결과 10. IGF-1은 NHDF에서 ADAMTS5의 발현을 하향 조절한다.

바이글리칸과 데코린의 단백질 합성을 직접적으로 증가시키는 것 외에도 IGF-1이 분해 메커니즘에 관여하는지 궁금했다. 따라서 rhIGF-1 자극에 의해 ADAMTS5 발현이 변하는지 조사하였다. ADAMTS5의 mRNA 수준은 rhIGF-1 처리 후 6 시간과 8 시간에 현저히 감소했다 (그림 15a). 세포 용해물에서의 단백질 발현은 전구체 형 (Pro-form)의 경우 12 시간에, 활성 형 (Active-form)의 경우 18 시간과 24 시간 째에 현저히 감소했다 (그림 15b). 이는 IGF-1에 의해 ADAMTS5 발현이 억제되기 때문에, 노화된 피부에서 IGF-1이 감소하면, ADAMTS5 발현이 증가하고, 그 결과 바이글리칸과 데코린 단백질 분해를 증가시키는 기전을 제시하는 결과이다.



④

그림 15. NHDF에서 IGF-1의 ADAMTS5에 대한 하향 조절

rhIGF-1을 250 ng/mL의 농도로 NHDF에 처리한 뒤, 표시된 시점에서 수확했다. (a) 총 RNA를 추출하고, *ADAMTS5*의 발현을 qRT-PCR로 측정하였다. 각 표적 mRNA의 발현은 *36B4*의 발현으로 보정하였고, 대조군과의 상대적인 비교를 위해 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차로 나타내었다 (N = 4). (b) 세포 용해물에서 ADAMTS5의 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 분석했다. 상대적인 단백질 양은 ImageJ를 사용하여 신호 강도를 분석하고, 대조 신호인 β-액틴에 대해 보정하여 나타냈다. 상대 단백질 수준 값은 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (N = 4). 대응표본 t-검정을 사용하여 통계적 비교를 수행했다. (* P <0.05, ** P <0.01)

④ 공동연구성과물 (임지영)ibid.

결과 11. NHDF에서 바이글리칸을 녹다운시키면 I형 프로콜라겐 (Type I procollagen)이 줄고 기질 금속단백질분해효소-1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1)이 증가된다.

바이글리칸과 데코린은 진피에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되지만 활발히 연구되지는 않았다. 따라서 진피에 가장 풍부한 기질 단백질인 콜라겐, 그 다음으로 풍부한 엘라스틴, 그리고 대표적인 콜라겐 분해효소인 기질 금속단백질분해효소-1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1)과 같은 매트릭스 관련 단백질과 바이글리칸 또는 데코린의 연관성을 조사했다. 이를 위해 NHDF에 바이글리칸과 데코린의 siRNA를 처리하고, 4 일 후에 수확하여 웨스턴 블롯으로 단백질을 분석했을 때, 모든 형태의 바이글리칸과 데코린 단백질 발현은 각각의 siRNA에 의해 효과적으로 감소되었다 (그림 2a). 그리고 바이글리칸과 데코린은 종종 함께 다뤄지기 때문에 서로의 녹다운에 따라 발현이 변하는지 확인하고자 했지만, 세포에 따라 상대방의 녹다운에 따른 발현 증감이 일관되지 않게 나타나서 유의한 변화를 관찰하기 어려웠다.

다음으로 콜라겐과 엘라스틴에 대한 영향을 조사했다. 바이글리칸을 녹다운했을 때 I형 프로콜라겐이 유의하게 감소했을 뿐 아니라, 배양된 배지의 MMP-1 발현도 유의하게 증가했다 (그림 2b). 트로포엘라스틴은 변화가 없었다. 데코린을 녹다운한 경우에는 I형 프로콜라겐과 MMP-1의 변화는 없었고, 트로포엘라스틴은 데코린 녹다운으로 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지 않았다. 이

결과를 통해 바이글리칸이 진피의 주요한 구성 물질인 콜라겐을 보호하며, 피부 노화에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

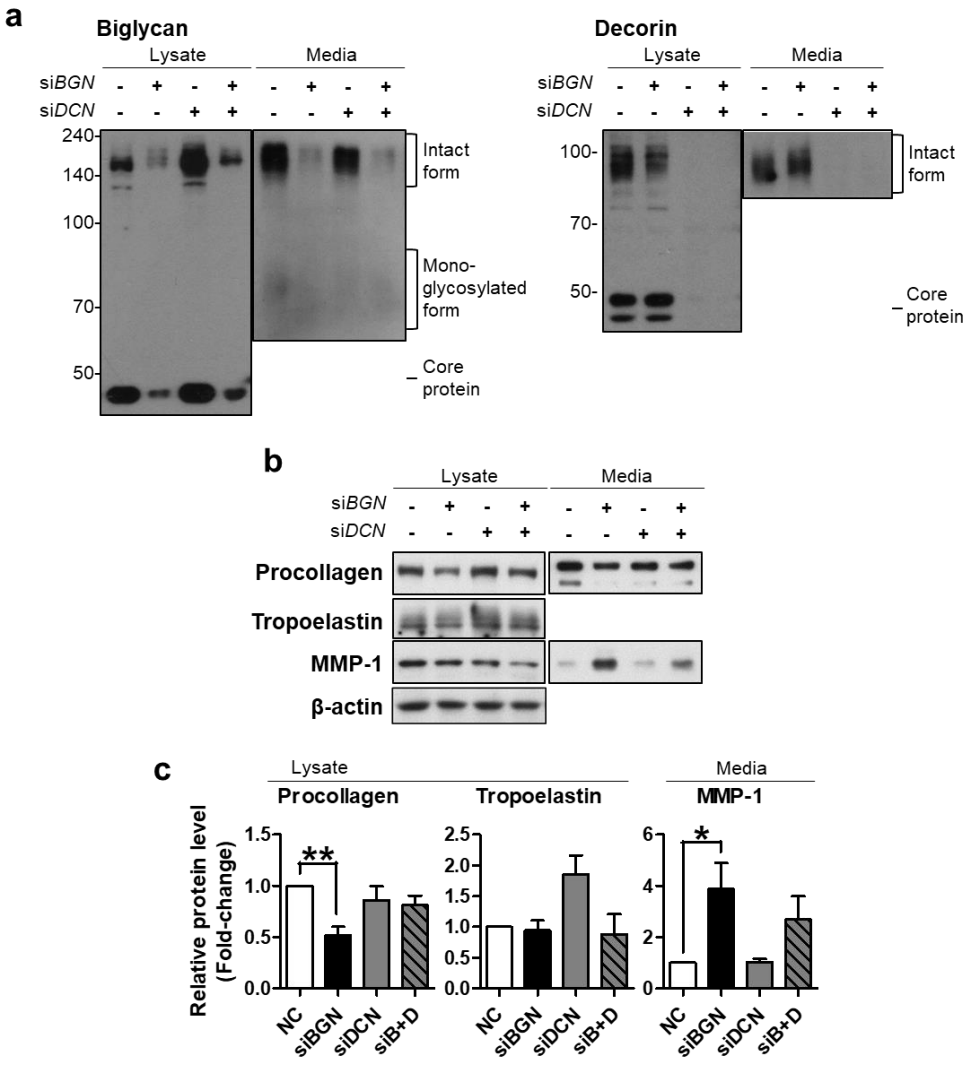


그림 16. NHDF에서 바이글리칸과 데코린의 녹다운이 기질 관련 단백질에 미치는 영향

NHDF에 바이글리칸과 데코린의 siRNA를 처리하고 4 일 후에 수확하여, 웨스턴 블롯으로 세포 용해물 및 배양된 배지의 단백질을 검출하였다. 신호 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석되었고, 대조 신호인 $\beta-$ 액틴의 강도로 보정되었다. 실험은 독립적으로 수행되었고, 상대

단백질 수준은 상대적인 변화 배수의 평균 ± 표준오차를 나타낸다 (N ≥ 3). 통계적 비교는 일원분산분석 (one-way ANOVA)에 이어 던넷의 사후 검정 (Dunnett's post-hoc test)으로 수행하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

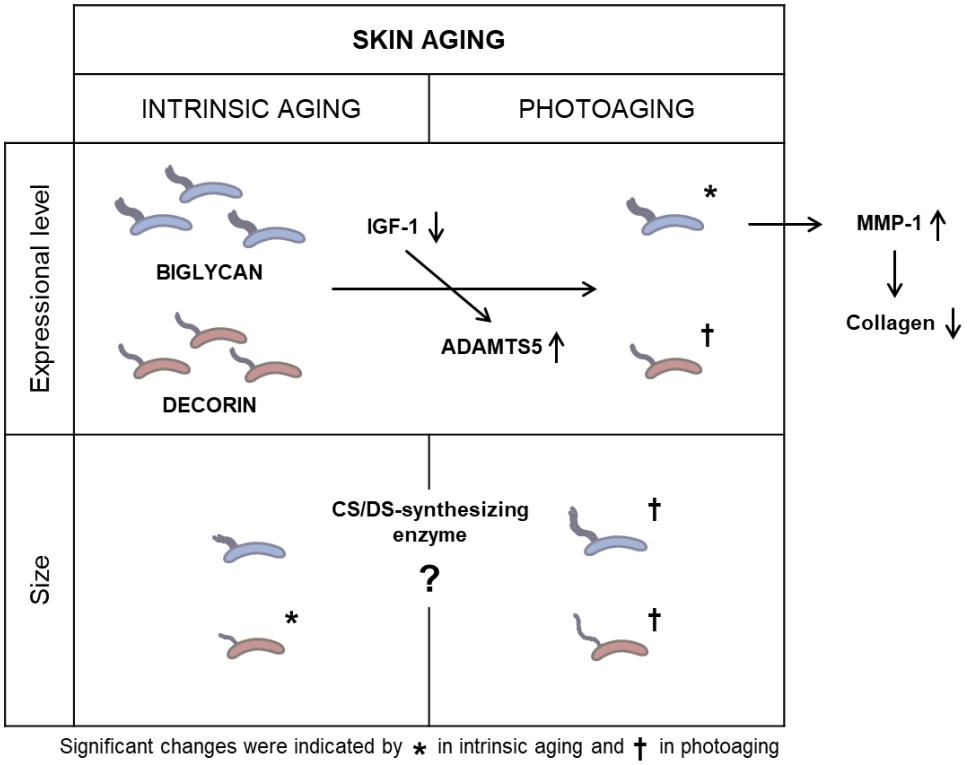


그림 17. 피부의 내인성 노화 및 광노화에서 바이글리칸과 데코린에 미치는 영향과 기전에 대한 모식도

유의한 변화는 내인성 노화에서 *, 광노화에서 †로 나타내었다.

고 찰

본 연구는 사람 피부의 내인성 노화 및 광노화를 포괄하는 피부 노화 과정 전반에서 바이글리칸과 데코린의 발현 변화를 관찰하고, 그 발현 변화의 기전을 설명하는 데 중점을 두었다. 더불어 바이글리칸과 데코린의 중요성을 확인하고, 노화 방지를 위한 새로운 표적으로 제시하였다.

고찰 1. 피부 노화 조직에서 PG를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과에 대한 고찰과 최근의 연구 검토를 통한 단백질 추출 방법의 향상 방안에 대한 논의

먼저, 피부 노화 진피에서의 바이글리칸과 데코린의 발현을 관찰했다 (그림 2와 3). 웨스턴 블롯으로 단백질의 변화를 분석한 결과, 이전 보고와 유사한 결과는, 내인성 노화에서 바이글리칸의 발현을 조직염색으로 확인한 것과 같이 양이 유의하게 감소한 것과 (Lee et al., 2016), 데코린의 크기가 유의하게 감소한 것이다 (Carrino et al., 2011, Li et al., 2013a). 그런데 전반적으로 프로테오글리칸의 웨스턴 블롯을 통한 발현 변화를 분석하기는 쉽지 않았고 특히 크기를 측정하는 데는 어려움이 있었다. 우선 PG는 단백질과 당 사슬의 복잡하고 고유한 구조이기 때문인데, PG는 그 자체로도 크기가 크지만, 세포 밖 기질에서

다른 기질 단백질 및 PG와 함께 불용성 고분자를 형성한다. 이 때문에 추출이 쉽지 않고, 유레아 (Urea)나 보다 강력한 계면활성제 (detergent)를 사용하거나 이온교환 컬럼 (Column), 순차적인 분획을 얻어 이용하는 방식이 이용되고 있다. 사실, 노화 과정에서 피부 기질에는 여러 불용성 물질이 축적되고, 자외선과 같은 외부 자극에 의해 추가적인 변형이 일어날 수 있기 때문에 더욱 추출이 어려울 수 있다. 본 연구에서는 일반적으로 사용되는 단백질 용해 용액인 리파보다 SDS (Sodium dodecyl sulfate) 함량을 높인 SDS-용해 용액을 사용하였고, 높은 농도로 바이글리칸과 데코린을 진피에서 검출할 수 있었으며 피부 노화에 따른 유의한 발현 변화를 관찰할 수 있었다. 하지만, PG를 효과적으로 추출하는 방법에 대해서는 여전히 이견이 있고, 또한 용해액마다 웨스턴 블롯에서 PG의 발현이 표현되는 형태가 다르게 나타나기 때문에 (Bell et al., 2013), 추가적인 분석이 필요할 수 있다. 그 때문인지, 기질단백질을 관찰한 연구에서는 웨스턴 블롯과 같은 정량적인 방식 대신 염색(Lee et al., 2016)이나, 전자현미경 방식으로 정성적으로 묘사한 연구가 많다 (Danielson et al., 1997, Li et al., 2013b). 또한 GAG의 길이에 대해서도 방사성표지된 황 ([^{35}S]-SO4)을 통해 새로 합성된 GAG 사슬에 모집된 방사성표지를 계산하여 GAG길이를 보여주는 보고도 있다 (Al Gwairi et al., 2016). 이를 활용하면 더욱 용이하게 결과가 해석될 수 있다.

고찰 2-1. 노화에서 바이글리칸과 데코린을 분해하는 효소로 ADAMTS5를 선정하게 된 근거 제시.

노화에서 바이글리칸과 데코린의 발현 변화 기전을 연구하기 위해 mRNA의 변화를 확인하였으나, 이를 통해 단백질 변화를 설명하기는 어려웠다 (그림 6). 그런데, 기질 단백질을 전사의 증감으로 설명하는 것은 실제 조직에 적용하기는 무리가 있을 수 있다. 세포 외 기질 단백질은 세포 밖으로 방출되어 축적되기 때문에 세포 내 순환 주기로 밀접히 통제되기 어렵기 때문이다. 때문에 세포 외에서 작용하는 분해 효소를 관찰하는 것이 합당할 수 있는데, 최근 연구에서 호중구 엘라스테이즈는 데코린을, 그랜자임 B는 데코린과 바이글리칸 모두를 분해하는 것으로 보고되었다 (Fosang et al., 2008, Kumar et al., 2012, Li et al., 2013b). 본 연구에서는 골관절염과 같은 뼈의 노화 관련 질병에서 주요한 표적인 ADAMTS5를 관찰하였다. 연골 세포에서 ADAMTS5는 역할이 잘 알려져 있는데, 연골 세포에 중요한 PG인 아그레칸을 분해하는 주 효소이기 때문이다. 그러나 피부에서는 아그레칸이 진피 섬유 아세포에서 주요한 PG가 아니기 때문에 ADAMTS5의 역할이 거의 보고되지 않았다. 하지만 ADAMTS5는 사람 피부의 주요 PG인 바이글리칸과 데코린, 베르시칸 (Li et al., 2013a)을 포함한 다른 PG도 분해한다고 보고되었다 (Oh et al., 2011). 이는 곧 사람 피부 노화에서 ADAMTS5에 대한 연구의 필요성을 의미했고, 본 연구에서 콜라겐을 보호하는 바이글리칸과 데코린을 분해하여 피부 노화의 표현형을 나타내는데 기여하는 것으로 밝혀졌다.

고찰 2-2. 노화에서 바이글리칸과 데코린을 분해하는 효소로서 ADAMTS5의 의미.

콜라게네이즈 (Collagenase), 엘라스테이즈 (Elastase)와 같은 기질 분해 효소는 피부 노화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 오랫동안 알려져 왔다 (Longpre et al., 2009, Verma and Dalal, 2011). 바이글리칸과 데코린은 콜라겐 섬유를 완전하게 유지하는 역할을 하기 때문에 (Corsi et al., 2002, Danielson et al., 1997), 이들의 분해는 곧 콜라겐 섬유 분해, 그리고 피부 노화로 이어질 수 있다. 또한, 본 연구에서 바이글리칸 녹다운이 MMP-1이 더욱 증가하는 결과를 가져오기도 했고 (그림 16), 실제로 데코린의 분해가 광노화 과정에서 콜라겐 섬유의 분해를 촉진한다고 입증한 논문도 있었다 (Li et al., 2013b). 따라서 바이글리칸과 데코린의 분해 효소는 피부 노화를 촉진할 수 있는 것으로 판단되며 (Iranmanesh et al., 1991), 본 연구는 ADAMTS5이 바이글리칸과 데코린의 분해 효소라는 측면에서 새로이 가능한 역할을 제시하였다. 이는 또한 NHDF에서 바이글리칸과 데코린 단백질 발현이 ADAMTS5 siRNA의 주입에 의해 증가되었다는 관찰 결과로 입증할 수 있다 (그림 7). 더욱이, 노화된 인간 엉덩이 피부 조직에서 ADAMTS5의 mRNA와 단백질 발현이 크게 증가했으며, 특히 ADAMTS5의 활성 형태의 단백질이 증가하므로 (그림 8), 실제로 노화된 진피에서 ADAMTS5의 기질인 바이글리칸, 데코린을 포함한 여러 단백질의 분해가 일어날 수 있음을 나타낸다. 그리고 이는 콜라겐

섬유의 분해로 이어질 수 있다. 따라서, 본 연구에서 규명한 바를 바탕으로, ADAMTS5의 억제는 피부 노화 방지를 위한 새로운 전략으로 제안될 수 있을 것이다.

고찰 2-3. ADAMTS5와 관련한 결과 해석.

한편, 그림 7의 ADAMTS5 siRNA 처리에 의한 바이글리칸 및 데코린의 발현량 증가는 세포 용해물 샘플에서는 유의미한 것으로 관찰되었지만 세포 배양 배지에서는 그렇지 않았다. 본인의 의견으로는, 바이글리칸과 데코린은 콜라겐, 엘라스틴 또는 피브릴린과 같은 다른 기질 단백질과 결합하여 최종적으로 세포외기질에 통합되어 불용성 기질 물질이 형성되기 때문에 (Oh and Chung, 2019), 배지가 이들의 최종 목적지가 아니다. 그래서 세포 용해물을 추출할 때, 일반적인 리파 용액보다 고농도로 강력한 계면활성제 SDS를 함유하고 있는 SDS-용해 용액으로 세포 배양 접시에서 채집하였는데, 이 과정에서 단순 세포 용해물 외에도 불용성 세포외기질 단백질들이 일부 함께 추출될 수 있다. 따라서 세포 용해물 시료에서 관찰된 바이글리칸과 데코린의 증가는 부분적으로 이 불용성 세포외기질에서 유래된 것일 수 있다. 이러한 관점에서 볼 때 배지에서 바이글리칸과 데코린의 증가가 명확하게 관찰되지 않은 이유는, 배지가 PG가 세포 밖으로 방출된 후 불용성 세포외기질로 형성되어가는 과정에 있는 경유 단계이기 때문일 것으로 추측된다.

또한, 광노화된 조직에서는 내인성 조직과는 달리 ADAMTS5의

mRNA가 감소하는 가운데 단백질이 증가했다 (그림 8c와 8d). 이 기전을 본 연구에서 다루지 않아 명확하지 않지만, 광노화에서는 TGF-β가 증가하는데, TGF-β ADAMTS5를 감소시킬 수 있다 (Cross et al., 2005). 그럼에도 불구하고 단백질 양이 증가하는 것은, 비만 세포의 과립에 ADAMTS5가 많이 함유되어 있기 때문에 전체적인 진피 조직에서 추출한 단백질로 비교한 그림 8d의 결과에서는 유의한 증가를 가져왔을 것이다 (Wernersson and Pejler, 2014).

고찰 3-1. 노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기를 변화시키는 기전: CS/DS-합성효소의 단백질 분석에 대한 방법론적인 고찰.

그 다음으로, 피부 노화에서의 바이글리칸과 데코린의 크기 변화를 설명하기 위해 웨스턴 블롯으로 CS/DS-합성효소의 단백질을 관찰하고자 했다. 그런데 세포와 기질을 함께 분석하는 조직 시료에서 PG를 높은 효율로 추출하게 되면서 예상치 못한 맹점이 생겼다. 진피에서는 세포보다 기질의 비율이 월등히 높기 때문에, 기질에 존재하는 PG를 높게 추출하기 위해 상대적으로 많은 양의 용해액을 사용하였고 이는 상대적으로 시료에서 세포 내 단백질의 비율이 적어지는 결과를 가져왔다. 그러나 세포 내 단백질에 초점을 맞추어 적은 양의 용해액을 사용하면 기질 단백질이 잘 추출되지 않는다. 이러한 딜레마 (Dilemma, 양도논법) 때문에 기질 단백질과 PG를 분석했을 때, 동일한 시료에서 동시에 세포내 단백질인 CS/DS-합성효소의 단백질 발현을 분석하기는 것은 어려웠다. 또한, 가까스로

분석을 하고자 했으나 조직의 비특이적인 신호가 강력하여 표적단백질의 신호가 가려지는 것을 발견했다. 웨스턴 블롯으로 관찰하는 여타 단백질 표적들은 분자량이 일정하여 광범위한 신호를 관찰하지 않지만, 본 연구에서는 바이글리칸과 같이 분자량이 특히 광범위하게 나타나는 표적 (50 kDa의 핵심 단백질부터, 70 kDa 부근의 단당사슬-바이글리칸, 140kDa 이상의 이당사슬-바이글리칸)을 관찰하면서 이 현상을 발견하게 되었다. 이러한 비특이적인 신호는 조직 내의 혈액에서 유래한 알부민 (Albumin)이나 항체 등의 고농도 단백질들로 추정되며, 바이글리칸이나 데코린의 경우에는 단백질 양이 충분하여 신호의 검출에 문제가 없었지만, 세포 내 단백질과 같이 농도가 낮은 표적의 경우, 분자량에 따라 비특이적 신호에 의해 표적 신호가 가려지는 경우도 있었다. 이들은 1차 항체의 면역 블랏 (Immunoblot)없이도 검출되며, 50 kDa와 70 kDa 부근에서 특히 강하게 나타난다. 다른 항체들을 구매하고, 이차항체를 다클론 (Polyclonal) 대신 단일클론 (Monoclonal)을 사용하고, 강력한 차단 용액 (Blocking solution)을 사용하고, 심지어 면역침강법 (Immunoprecipitation, IP)으로 비특이적인 신호들을 제거하려고 하였지만 성공하지 못하였다. 사실 CS/DS-합성효소는 세포에서도 검출이 쉬운 편은 아니다. 세포 내에서도 이차 기관인 골지체 내에 위치하기 때문에 추출이 쉽지 않고, 특히 CHSY1은 프린지 도메인 (Fringe domain)을 가져 그 부분이 환원 용액에 의해서 잘리는 구조이기 때문에, 조직에서 비 환원 (Non-reducing) 조건의 용해 용액으로만 온전한 크기를 관찰할 수 있다는

보고도 있었다 (Tian et al., 2010). 실제로, 환원 조건과 비환원 조건을 비교했을 때, 이 보고에서만큼 극적인 변화를 보이지는 않지만 siRNA를 처리한 시료에서 원래 분자량인 약 90 kDa 부근의 위치가 아닌 50 kDa 부근에서도 감소를 관찰할 수 있다. 이렇게 웨스턴 블롯의 기술적인 문제가 여럿 있었기 때문에 다른 방식의 분석이 요구되었다.

그래서 CS/DS-합성효소 중에서 바이글리칸과 데코린의 크기를 가장 크게 감소시켰던 CHSY1과 그 다음으로 감소시켰던 CHPF를 각각 ELISA와 면역형광염색법으로 확인하였다 (그림 11). CS/DS-합성효소가 내인성 노화에서 감소하고 광노화에서 증가할 것이라 기대하였으나, CHSY1에서는 내인성 노화에서 통계적으로 유의하지 않지만 오히려 증가하는 경향성이 보였고 광노화에서는 유의한 변화가 없었다. CHPF는 내인성 노화에서 감소하는 경향이 보이고 광노화에서도 역시 감소하는 경향이 보였지만 염색은 정성적인 분석이어서 유의한 변화를 관찰하기가 어려웠다. 사실, 효소 활성이 단백질 양보다 더 중요할 수 있기 때문에 단백질 발현의 변화를 설명할 수 없다고 해서 가설이 틀렸다고 할 수는 없지만, CS/DS-합성효소의 활성을 측정하기는 쉽지 않아 실망스러운 결과였다. 또한 전체적으로 본 연구를 시작하기 전 마이크로 어레이 (Micro array)를 통한 예비 실험 결과에서 CHPF의 발현이 감소 했었는데, 연구가 진행되며 조직을 추가로 분석하자 mRNA에서 CHPF가 감소되지 않는 것으로 나타났기 때문에 논란의 여지가 있어 현재까지의 연구로는 종합적으로 결론을 내리기 어렵다. 이에 관해서는 또 다른 가설로 검증하는 것이 필요하다.

고찰 3-2. 노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기를 변화시키는 기전: GAG-분해효소에 대한 가설.

예상되는 가설로는 몇 가지가 있는데, 바이글리칸과 데코린의 발현량 감소를 분해 효소인 ADAMTS5의 증가로 설명했던 것처럼, GAG 사슬에 대해서도 분해 효소가 증가할 수 있다. GAG 합성 과정에 많은 수의 효소가 관여하는 것처럼, GAG의 분해 과정에도 엑소글라이코시데이즈 (Exo-glycosidase), 엔도글라이코시데이즈 (Endo-glycosidase), 설파테이즈 (Sulfatase)에 속하는 여러 효소들이 관여하고 리소좀 (Lysosome)에서 분해가 종료된다 (Cechowska-Pasko et al., 2002, Griffin and Gloster, 2017). 여러 분해 효소 중에서 이듀로니데이즈가 DS의 분해에 관여하고, 피부 노화 RNA 시퀀싱 (Sequencing) 예비 실험 결과에서 청년 조직 대비 내인성 노화 조직에서의 발현이 0.544 가량으로 줄어든 것을 확인하였다. 이에 이듀로니데이즈에 대해서는 녹다운 실험을 시도해보았으나 바이글리칸과 데코린의 크기가 증가하는 것을 관찰할 수 없었다. 하지만 GAG의 분해 효소의 종류도 다양하기 때문에 다른 효소에 대한 가능성도 여전히 열려 있다.

고찰 3-3. 노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기를 변화시키는 기전: CS/DS-합성효소와 관련한 최근 연구를 통한 새로운 연구 방향 제시.

CS/DS-합성과정으로 돌아가 다른 측면을 살펴보면, 최근 연구에서

CHSY1과 관련된 흥미로운 연구가 있었다. 이 연구는 노화 과정에서 CS 사슬의 6-O-황화 (Sulfation) 대비 4-O-황화의 비율 (4S/6S)과 CS 사슬의 길이가 감소한다는 지난 보고에서 말미암아 진행됐고, 폴리아민 (Polyamine, Spermidine)이 고갈된 세포에서 이러한 현상이 발생하는데 CS 사슬을 연장하는 CHSY1과 연장 후 황화시키는 C4ST2 (4-O-설포트렌스퍼레이즈 2, 4-O-Sulfotransferase 2)의 감소도 함께 관찰했다는 내용이다. 흥미로운 사실은, CHSY1의 전사 후 번역은 5'-UTR (Untranslated region)의 RNA 사중구조 (RNA G-quadruplex, G4)로 인해 억제되어 있는데, 폴리아민이 G4구조를 약화시켜 CHSY1의 번역을 증가시킨다는 것이다 (Yamaguchi et al., 2018). 폴리아민은 노화에서 감소되어 있다는 보고가 있으므로 이와 관련된 연구가 또 하나의 열쇠가 될 수 있다 (Minois et al., 2011, Nishimura et al., 2006).

한편, 관절에 있어서는 골관절염이 노화와 관련하여 잘 알려진 질병이다. 이와 관련하여 작은 RNA 시퀀싱 (Small RNA sequencing)을 진행한 논문이 있었다. 여기서, miR-204라는 마이크로 RNA는 골관절염과 노화된 연골에서 증가하는 것으로 나타났는데, 이 miR-204는 CHSY1을 비롯하여 CSGalNAcT2, CHST11, CHST15 등의 발현을 현저히 낮추는 것으로 확인되었다. 피부에서도 이와 같은 기전을 생각해볼 수 있을 것이다 (Kang et al., 2019).

또한, CS/DS 합성 과정 중 DS 사슬로 전환된 이후 황산화시켜 최종 DS 사슬로 성숙시키는 효소인 D4ST1을 합성하는 유전자 녹아웃

마우스 (*CHST14*$^{-/-}$ mice)에서는 EDS 표현형과 같이 피부가 취약해진다는 보고가 있었다 (Hirose et al., 2020). CS연장-CS황산화-DS전환-DS황산화로 이어지는 CS/DS 합성 과정에서, CS연장과 관련된 CHSY1과 CHPF를 비롯한 6 개의 효소가 아닌 다른 효소들의 영향이 더 클 수도 있다.

본 연구에서 기전을 밝히지는 못했지만, 바이글라이칸과 데코린의 GAG사슬에 결함이 생기면 콜라겐 구조가 변형되면서 피부가 늘어지는 EDS 유사 표현형이 생기며 (Seidler et al., 2006), 또한 최근의 연구를 보면 CS의 증가가 피부를 향상시켰다는 보고들을 통해 CS가 피부에서 중요하다는 가설은 여전히 유효하다 (Chajra et al., 2016, Min et al., 2020). 단백질 또는 DNA 시퀀싱에 비해 뒤쳐져 있기는 하지만 다당류 시퀀싱 (Polysaccharide sequencing)을 통해 구조 분석을 하는 최신 기술을 도입하는 것도 한 가지 방법이 될 수 있을 것이다.

고찰 3-4. 광노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기가 증가하는 것의 의미 추론

내인성 노화에서 바이글리칸과 데코린의 크기는 감소하며, 이는 콜라겐 섬유를 안정화하는 기능의 약화로 이어진다. 하지만 광노화에서는 GAG의 양이 증가한다는 것에 대해서는 몇몇 보고가 있었지만 (Bernstein et al., 1996, Gniadecka et al., 1998, Oh et al., 2018), 바이글리칸과 데코린의 크기가 증가하는 것에 대해서는 보고된 바가 없었다. 이에 대해 본 연구에서 처음으로 밝혔으나, 기전 및

기능에 대해서는 충분히 확인하지 못했다.

바이글리칸과 데코린의 크기가 증가하는 것은 곧 GAG의 길이가 증가한다는 것인데, 증가된 GAG의 길이 또는 양이 미치는 영향에 대해서는 몇 가지를 추론해볼 수 있다. 우선 CS/DS GAG 사슬의 길이가 증가하면 성장 인자와의 결합, 접착 분자 (Adhesion molecule) 또는 다른 사이토카인 (Cytokine)에 대한 친화력이 증가될 수 있다. 때문에 이를 통해 염증 세포 축적, 세포 부착, 이동 및 증식과 같은 생물학적인 사건들에 영향을 미칠 수 있다 (Venkatesan et al., 2011).

또한, GAG는 자신의 부피 최대 1000배까지 물과 결합하여 수분을 보유하는 기능을 한다. 그러나 실제 광노화된 피부에서는 신생아 피부와는 달리 가죽과 같이 건조해 보이는 특징을 가지며, 공초점 현미경으로 조직학 적인 부분을 확인해보았을 때 GAG가 탄성 물질에 불균일하게 침착되어 있다는 보고가 있다 (Bernstein et al., 1996). 이렇게 GAG가 불균일하게 침착되면, 광노화된 피부 조직에서 GAG가 증가하더라도 수분과 정상적인 결합을 하지 못하게 될 수 있다.

고찰 4-1. 노화에서 바이글리칸과 데코린에 대한 IGF-1의 역할: 번역 강화를 통한 증가 기전에 대한 고찰.

본 연구에서는 또한, 바이글리칸과 데코린의 발현에 대한 IGF-1의 조절 효과를 조사했다. 피부 노화 과정에서 바이글리칸과 데코린의 중요성이 최근 대두되었지만, 그들의 조절 메커니즘은 완전히 밝혀지지 않았다. 한편 혈청 IGF-1 수치는 연령에 따라 감소하는 것으로 알려져

있으며 (Babelova et al., 2009, Kolb et al., 2001) 피부 주름 및 안면 노화와 관련이 있는 것으로 보인다 (Oh and Chung, 2019). 이와 관련하여 본인은, IGF-1이 바이글리칸과 데코린을 조절하는 것을 보여줌으로써, IGF-1의 피부 노화 과정에 대한 조절제로서의 가능성을 입증했다.

먼저, IGF-1이 NHDF에서 전사 후 번역을 강화하여 바이글리칸과 데코린의 발현을 상향 조절함을 보여주었다 (그림 12-14). IGF-1이 PI3K-AKT-mTOR 경로를 통해 번역을 향상 시킨다는 것은 잘 알려져 있다 (Christopoulos et al., 2015, Laron, 2001, Lewis et al., 2010). 그러나 IGF-1의 바이글리칸과 데코린에 대한 발현 조절과 관련한 보고는 대개 전사적 변화에만 초점을 맞추고 있으며, 조절 측면은 세포 유형에 따라 달라지는 것으로 보인다. 치주 인대 섬유 아세포에서는 IGF-1 처리로 바이글리칸과 데코린의 mRNA가 증가했고, 치은 섬유 아세포에서는 바이글리칸 mRNA는 변하지 않고 데코린 mRNA만 증가했다 (Gennigens et al., 2006). 반대로, MG63 골육종 세포 또는 골아 세포주에 IGF-1를 처리했을 때, 바이글리칸 mRNA 발현은 증가했다 (Yu and Rohan, 2000). 연골 세포에서는 바이글리칸과 데코린 모두에 대한 mRNA 발현 변화가 없었다 (Bartke et al., 2003). 본 연구에서는 NHDF에 rhIGF-1을 처리했을 때, 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현이 mRNA의 전사 변화없이 상향 조절되었다. 이는, Act D를 처리하여 전사를 차단하더라도 여전히 IGF-1에 의해 바이글리칸과 데코린 발현이 증가하였으나, 번역 억제제인

CHX를 처리하면 IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 증가가 저해되는 것으로 다시 한 번 검증되었다. 이러한 결과는 IGF-1-매개 번역 강화가 바이글리칸과 데코린 단백질 발현의 증가에 기여할 수 있음을 시사한다. 더욱이, 노인에서 혈청이나 피부의 IGF-1 수준이 감소하는 것으로 알려져 있다 (Babelova et al., 2009, Kolb et al., 2001). 이를 본 연구의 결과에 대입하여 추론하면, 내인성 노화된 피부에서 IGF-1의 수준이 감소하므로, 이에 부분적으로 바이글리칸과 데코린의 전사 후 번역이 하향 조절되어 단백질 발현이 감소해 있을 수 있다 (Lee et al., 2016).

고찰 4-2. 노화에서 바이글리칸과 데코린에 대한 IGF-1의 역할: 크기 증가 기전에 대한 고찰.

한편, IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 증가 결과에 있어서, 이들의 크기도 동시에 증가했다 (그림 12). 이에 예비 연구에서 CHSY1, CHPF, CHSY3에 대해 관찰했고, 세 효소 모두 IGF-1에 의해 mRNA 증가없이 단백질이 증가하며, CHSY3의 증가 폭이 가장 컸다 (본 논문에 결과를 싣지 않았음.). 또한, 그림 14의 Act D, CHX 실험과 동일한 시료에서 CHSY1, CHPF, CHSY3를 관찰했을 때, 세 효소 모두 IGF-1에 의해 증가한 단백질의 변화가 전사 억제제인 Act D에서는 그대로 유지되었지만, 번역억제제인 CHX의 처리에 의해 감소하는 것을 알 수 있었다. 이에, 세 효소 또한 IGF-1에 의한 번역 강화를 받는다고 생각되었지만, 바이글리칸과 데코린의 크기는 Act D에 의해 IGF-1에

의한 크기 증가가 억제되었기 때문에, 현재까지의 결과로는 CHSY1, CHPF, CHSY3로는 IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 크기 변화를 설명하기 어렵다. 이 과정에 다른 효소들이 관여할 수 있으며, 추가적인 실험이 요구된다.

PG의 GAG 길이의 조절에 대한 연구 보고는 거의 없지만, 한 논문에서 TGF-β가 망막 맥락막 내피 세포에서 PG의 GAG 사슬과 혈관 평활근 세포에서 바이글리칸 GAG 사슬의 과신장 (Hyperelongation)에 기여한다는 보고가 있다. 그러나 TGF-β의 경우, IGF-1의 결과에서와는 달리 XYLT1과 CHSY1 등 GAG-합성효소의 mRNA발현도 증가시키는 것으로 나타났다 (Al Gwairi et al., 2016, Mohamed et al., 2019, Rostam et al., 2016). 그러나 노화된 피부에서는 TGF-β 신호가 감소하는 것으로 알려져 있으므로, 노화된 피부에서 CHSY1의 mRNA가 감소하지 않기 때문에, TGF-β 신호 역시 CHSY1에 대한 핵심 조절 인자가 아닐 가능성이 높다.

고찰 4-3. 노화에서 바이글리칸과 데코린에 대한 IGF-1의 역할: ADAMTS5억제를 통한 바이글리칸과 데코린의 증가 기전.

또한, IGF-1의 바이글리칸과 데코린의 발현량에 대한 직접적인 상향 조절과 더불어, 간접적으로 ADAMTS5에 대한 하향 조절을 통한 또 다른 조절 기전을 제안했다. 이를 통해 본 연구는 NHDF에서 IGF-1의 처리에 의해 ADAMTS5 발현이 감소되고, 결과적으로 바이글리칸과 데코린의 단백질 발현을 증가시키는 것을 입증했다 (그림

15). 연골 세포에서 IGF-1 처리에 의해 아그레칸 분해 효소인 ADAMTS5의 발현이 감소했다고 보고된 바 있는데, 이는 본인의 결과와 동일하다 (Blackstock et al., 2014, Zhu et al., 2017). 따라서, 본 연구의 결과는 ADAMTS5가 피부에서 바이글리칸과 데코린을 분해할 수 있으며, IGF-1에 의한 ADAMTS5 발현 감소는 바이글리칸과 데코린의 분해의 감소에 기여할 수 있음을 나타낸다.

고찰 4-4. IGF-1 신호 전달 기작과 관련하여 광노화에서 예상되는 결과.

한편, 본 연구에서 내인성 노화에서 IGF-1에 의한 바이글리칸과 데코린의 변화는 관찰하였지만, 광노화에서는 확인하지 않았다. 최근 발표된 논문에 의하면, 자외선을 조사한 쥐의 피부를 면역조직화학염색으로 분석했을 때, IGF-1R의 발현이 확연히 줄어 있었다 (Jin et al., 2020). 이 결과를 통해 가정해본다면, 광노화에서는 더욱 IGF-1 신호 전달이 약화되었을 것으로 생각해볼 수 있다.

고찰 5. 바이글리칸과 데코린에 대한 기전 연구에 대한 고찰 및 추가 연구 방향 제시.

추가적으로, 바이글리칸을 녹다운했을 때, 콜라겐의 발현이 감소하고 MMP-1의 발현은 증가했다 (그림 16). 이전에 보고에 따르면 바이글리칸과 데코린을 녹아웃한 마우스 표현형에서 콜라겐 섬유의 지름이 불규칙해진다 (Corsi et al., 2002, Zhang et al., 2009). 또한

데코린은 콜라겐 섬유를 MMP-1으로부터 보호한다는 보고도 있다 (Li et al., 2013b). 전반적으로 바이글리칸과 데코린, 두 PG와 콜라겐의 관계는 명확하나. 바이글리칸과 MMP-1의 직접적인 조절 기전에 대한 보고를 찾긴 어려웠다. 때문에, 본 결과가 유의미한 것으로 생각되나, 추가적으로 MMP-1의 조절 기전을 찾고, 바이글리칸의 과발현을 통해 콜라겐이 증가되는지 검증하는 과정이 필요하다. 다만, 본 논문에서도 언급했듯이, 당사슬이 온전하게 붙어 있는 바이글리칸이 중요하므로, 단순히 바이글리칸만 과발현시키는 것이 유의미한 결과를 이끌 것이냐에 대한 심도 있는 고찰이 필요하다. 본인의 의견으로는 바이글리칸과 함께, 적어도 GAG 사슬의 합성을 개시하는 XYLT1, 2도 과발현하는 것이 필요할 것이며 세포 배양 배지의 당이 충분한 지도 중요한 요건이 될 것이다.

종합하자면, 본 연구는 피부에서 중요한 역할을 하는 바이글리칸과 데코린의 발현 변화를 총체적으로 관찰하고 기전을 밝혔다. 내인성 노화된 조직에서 바이글리칸의 양이 유의하게 감소되고 크기도 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있으며, 데코린의 양은 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있고 크기는 유의하게 감소하였다. 광노화된 조직에서 바이글리칸의 양은 통계적으로 유의하지 않지만 감소하는 경향이 있고 크기는 유의하게 증가했으며, 데코린의 양은 유의하게 감소하고 크기는 유의하게 증가했다. 이들의 양적 변화에는 노화 과정에서 IGF-1이 감소하는 것에 따라 이들의 전사 후

번역이 상대적으로 약화되는 것, 동시에 이들의 분해 효소인 ADAMTS5가 증가하는 것이 부분적으로 기여할 것으로 생각되며, 또한, 바이글리칸의 감소는 직접적으로도 MMP-1의 증가와 콜라겐의 감소로 이어지기에, 바이글리칸과 데코린, IGF-1과 ADAMTS5는 피부 노화의 중요한 표적이다. 바이글리칸과 데코린을 직접 상향조절하거나 ADAMTS5를 억제하고, 또는 피부에서 IGF-1 신호 전달을 향상시키기 위해 IGF-1R를 활성화시키는 등, 이들을 조절하는 것은 피부 노화 현상을 억제하는 전략으로 활용될 수 있을 것이다.

참고 문헌

Al Gwairi O, Osman N, Getachew R, Zheng W, Liang XL, Kamato D, et al. Multiple Growth Factors, But Not VEGF, Stimulate Glycosaminoglycan Hyperelongation in Retinal Choroidal Endothelial Cells. International journal of biological sciences 2016;12(9):1041-51.

Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. J Biol Chem 2009;284(36):24035-48.

Bartke A, Chandrashekar V, Dominici F, Turyn D, Kinney B, Steger R, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and aging: controversies and new insights. Biogerontology 2003;4(1):1-8.

Bell PA, Wagener R, Zaucke F, Koch M, Selley J, Warwood S, et al. Analysis of the cartilage proteome from three different mouse models of genetic skeletal diseases reveals common and discrete disease signatures. Biology open 2013;2(8):802-11.

Berendsen AD, Fisher LW, Kilts TM, Owens RT, Robey PG, Gutkind JS, et al. Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(41):17022-7.

Bernstein EF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. Brit J Dermatol 1996;135(2):255-62.

Blackstock CD, Higashi Y, Sukhanov S, Shai SY, Stefanovic B, Tabony AM, et al. Insulin-like Growth Factor-1 Increases Synthesis of Collagen Type I via Induction of the mRNA-binding Protein LARP6 Expression and Binding to the 5 ' Stem-loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA. Journal of Biological Chemistry 2014;289(11):7264-74.

Carrino DA, Calabro A, Darr AB, Dours-Zimmermann MT, Sandy JD, Zimmermann DR, et al. Age-related differences in human skin proteoglycans. Glycobiology 2011;21(2):257-68.

Carrino DA, Onnerfjord P, Sandy JD, Cs-Szabo G, Scott PG, Sorrell JM, et al. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. J Biol Chem 2003;278(19):17566-72.

Cechowska-Pasko M, Wolanska M, Pallka J. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in the skin of fasted rats. Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology 2002;131(3):551-7.

Chajra H, Auriol D, Joly F, Pagnon A, Rodrigues M, Allart S, et al. Reactivating the extracellular matrix synthesis of sulfated

glycosaminoglycans and proteoglycans to improve the human skin aspect and its mechanical properties. Clinical, cosmetic and investigational dermatology 2016;9:461-72.

Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. FASEB J 2004;18(9):948-58.

Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. Molecular cancer 2015;14:43.

Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 2002;17(7):1180-9.

Cross NA, Chandrasekharan S, Jokonya N, Fowles A, Hamdy FC, Buttle DJ, et al. The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. Prostate 2005;63(3):269-75.

Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo

RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. The Journal of cell biology 1997;136(3):729-43.

Didangelos A, Mayr U, Monaco C, Mayr M. Novel role of ADAMTS-5 protein in proteoglycan turnover and lipoprotein retention in atherosclerosis. J Biol Chem 2012;287(23):19341-5.

Faiyaz-Ul-Haque M, Zaidi SH, Al-Ali M, Al-Mureikhi MS, Kennedy S, Al-Thani G, et al. A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type. American journal of medical genetics Part A 2004;128A(1):39-45.

Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, Stanton H. ADAMTS-5: The story so far. European cells & materials 2008;15:11-26.

Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, Enghild JJ, Thogersen IB, Hughes C, et al. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. J Biol Chem 2007;282(25):18294-306.

Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP. Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. Critical reviews in oncology/hematology 2006;58(2):124-45.

Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S, Heidenheim M, Christensen DH,

Wulf HC. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. J Invest Dermatol 1998;111(6):1129-33.

Goldoni S, Humphries A, Nystrom A, Sattar S, Owens RT, McQuillan DJ, et al. Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. Journal of Cell Biology 2009;185(4):743-54.

Griffin LS, Gloster TM. The Enzymatic Degradation of Heparan Sulfate. Protein and peptide letters 2017;24(8):710-22.

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. Biochem J 1994;302 (Pt 2):527-34.

Hirose T, Mizumoto S, Hashimoto A, Takahashi Y, Yoshizawa T, Nitahara-Kasahara Y, et al. Systematic investigation of the skin in Chst14-/- mice: a model for skin fragility in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by CHST14 variants (mcEDS-CHST14). Glycobiology 2020.

Hwang JY, Johnson PY, Braun KR, Hinek A, Fischer JW, O'Brien KD, et al. Retrovirally mediated overexpression of glycosaminoglycan-deficient biglycan in arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointimae after vascular injury. Am J

Pathol 2008;173(6):1919-28.

Iacob S, Cs-Szabo G. Biglycan regulates the expression of EGF receptors through EGF signaling pathways in human articular chondrocytes. Connective tissue research 2010;51(5):347-58.

Iozzo RV, Buraschi S, Genua M, Xu SQ, Solomides CC, Peiper SC, et al. Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. J Biol Chem 2011;286(40):34712-21.

Iranmanesh A, Lizarralde G, Veldhuis JD. Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. J Clin Endocrinol Metab 1991;73(5):1081-8.

Jin CL, Oh JH, Han M, Shin MK, Yao C, Park CH, et al. UV irradiation-induced production of monoglycosylated biglycan through downregulation of xylosyltransferase 1 in cultured human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci 2015;79(1):20-9.

Jin Y, Cheng X, Huang X, Ding F, Lee SR, Wang F, et al. The role of Hrd1 in ultraviolet (UV) radiation induced photoaging. Aging (Albany NY) 2020;12(21):21273-89.

Kang D, Shin J, Cho Y, Kim HS, Gu YR, Kim H, et al. Stress-activated miR-204 governs senescent phenotypes of chondrocytes to

promote osteoarthritis development. Sci Transl Med 2019;11(486).

Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J. Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;280(6):L1327-34.

Kresse H, Rosthoj S, Quentin E, Hollmann J, Glossl J, Okada S, et al. Glycosaminoglycan-free small proteoglycan core protein is secreted by fibroblasts from a patient with a syndrome resembling progeroid. American journal of human genetics 1987;41(3):436-53.

Kumar S, Sharghi-Namini S, Rao N, Ge R. ADAMTS5 functions as an anti-angiogenic and anti-tumorigenic protein independent of its proteoglycanase activity. Am J Pathol 2012;181(3):1056-68.

Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. Mol Pathol 2001;54(5):311-6.

Lee DH, Oh JH, Chung JH. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. J Dermatol Sci 2016;83(3):174-81.

Lee H, Lim J, Oh JH, Cho S, Chung JH. IGF-1 Upregulates Biglycan and Decorin by Increasing Translation and Reducing ADAMTS5 Expression. Int J Mol Sci 2021;22(3).

Lewis DA, Travers JB, Somani AK, Spandau DF. The IGF-1/IGF-1R signaling axis in the skin: a new role for the dermis in aging-associated skin cancer. Oncogene 2010;29(10):1475-85.

Li Y, Liu Y, Xia W, Lei D, Voorhees JJ, Fisher GJ. Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. Sci Rep 2013a;3:2422.

Li Y, Xia W, Liu Y, Remmer HA, Voorhees J, Fisher GJ. Solar ultraviolet irradiation induces decorin degradation in human skin likely via neutrophil elastase. PLoS One 2013b;8(8):e72563.

Longpre JM, McCulloch DR, Koo BH, Alexander JP, Apte SS, Leduc R. Characterization of proADAMTS5 processing by proprotein convertases. Int J Biochem Cell Biol 2009;41(5):1116-26.

Miguez PA, Terajima M, Nagaoka H, Mochida Y, Yamauchi M. Role of glycosaminoglycans of biglycan in BMP-2 signaling. Biochem Biophys Res Commun 2011;405(2):262-6.

Min D, Park S, Kim H, Lee SH, Ahn Y, Jung W, et al. Potential anti-aging effect of chondroitin sulfate through skin regeneration. Int J Cosmet Sci 2020.

Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. Aging (Albany NY) 2011;3(8):716-32.

Mizumoto S, Ikegawa S, Sugahara K. Human genetic disorders caused

by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. J Biol Chem 2013;288(16):10953-61.

Mohamed R, Dayati P, Mehr RN, Kamato D, Seif F, Babaahmadi-Rezaei H, et al. Transforming growth factor-beta1 mediated CHST11 and CHSY1 mRNA expression is ROS dependent in vascular smooth muscle cells. Journal of cell communication and signaling 2019;13(2):225-33.

Nili N, Cheema AN, Giordano FJ, Barolet AW, Babaei S, Hickey R, et al. Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. Am J Pathol 2003;163(3):869-78.

Nishimura K, Shiina R, Kashiwagi K, Igarashi K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. Journal of biochemistry 2006;139(1):81-90.

Nomura Y. Structural change in decorin with skin aging. Connective tissue research 2006;47(5):249-55.

Oh J-H, Chung JH. Do Proteoglycans Mediate Chronic Photoaging? In: Watson REB, Griffiths CEM, editors. Cutaneous Photoaging. Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences: Royal Society of Chemistry; 2019. p. 231-74.

Oh JH, Kim YK, Jung JY, Shin JE, Chung JH. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin in vivo. Exp Dermatol 2011;20(5):454-6.

Oh JH, Shin MK, Lee H, Lim J, Choi M, Cho S, et al. Analysis of sulfated glycosaminoglycan composition change in intrinsically aged and photoaged human skin using an enzymatic degradation method. J Dermatol Sci 2018;92(3):281-3.

Perrimon N, Bernfield M. Cellular functions of proteoglycans--an overview. Seminars in cell & developmental biology 2001;12(2):65-7.

Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. J Biol Chem 2002;277(6):3950-7.

Rostam MA, Kamato D, Piva TJ, Zheng W, Little PJ, Osman N. The role of specific Smad linker region phosphorylation in TGF-beta mediated expression of glycosaminoglycan synthesizing enzymes in vascular smooth muscle. Cell Signal 2016;28(8):956-66.

Santra M, Reed CC, Iozzo RV. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially

overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. J Biol Chem 2002;277(38):35671-81.

Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. J Biol Chem 2014;289(51):35237-45.

Schonherr E, Beavan LA, Hausser H, Kresse H, Culp LA. Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro. Biochem J 1993;290 (Pt 3):893-9.

Seidler DG, Faiyaz-Ul-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SH, Teebi AS, et al. Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). J Mol Med (Berl) 2006;84(7):583-94.

Sugahara K, Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. Current opinion in structural biology 2007;17(5):536-45.

Tian J, Ling L, Shboul M, Lee H, O'Connor B, Merriman B, et al. Loss of CHSY1, a secreted FRINGE enzyme, causes syndromic brachydactyly in humans via increased NOTCH signaling. American journal of human genetics 2010;87(6):768-78.

Trask BC, Trask TM, Broekelmann T, Mecham RP. The microfibrillar

proteins MAGP-1 and fibrillin-1 form a ternary complex with the chondroitin sulfate proteoglycan decorin. Molecular biology of the cell 2000;11(5):1499-507.

Tufvesson E, Malmstrom J, Marko-Varga G, Westergren-Thorsson G. Biglycan isoforms with differences in polysaccharide substitution and core protein in human lung fibroblasts. European journal of biochemistry / FEBS 2002;269(15):3688-96.

Venkatesan N, Ouzzine M, Kolb M, Netter P, Ludwig MS. Increased deposition of chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycan and upregulation of beta1,3-glucuronosyltransferase I in pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011;300(2):L191-203.

Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. Journal of cellular biochemistry 2011;112(12):3507-14.

Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. Nature Reviews Immunology 2014;14(7):478-94.

Wiberg C, Heinegard D, Wenglen C, Timpl R, Morgelin M. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. J Biol Chem 2002;277(51):49120-6.

Xia W, Quan T, Hammerberg C, Voorhees JJ, Fisher GJ. A mouse model of skin aging: fragmentation of dermal collagen fibrils and reduced fibroblast spreading due to expression of human matrix metalloproteinase-1. J Dermatol Sci 2015;78(1):79-82.

Yamaguchi K, Asakura K, Imamura M, Kawai G, Sakamoto T, Furihata T, et al. Polyamines stimulate the CHSY1 synthesis through the unfolding of the RNA G-quadruplex at the 5'-untraslated region. Biochem J 2018;475(23):3797-812.

Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. J Natl Cancer Inst 2000;92(18):1472-89.

Zeng JP, Bi B, Chen L, Yang P, Guo Y, Zhou YQ, et al. Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: a robust model of cellular photoaging. J Dermatol Sci 2014;73(1):49-56.

Zhang G, Chen S, Goldoni S, Calder BW, Simpson HC, Owens RT, et al. Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. J Biol Chem 2009;284(13):8888-97.

Zhu HJ, Xu Y, Gong FY, Shan GL, Yang HB, Xu K, et al. Reference ranges for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) in healthy Chinese adults. Plos One 2017;12(10).

Abstract

The Expressional Changes of Biglycan, Decorin, and Their Regulatory Mechanisms in Skin Aging

Hanon Lee
Department of Biomedical Sciences
The Graduate School
Seoul National University

Skin aging can be divided into intrinsic aging and photoaging, and the main features are wrinkles and sagging skin. As molecular mechanisms, a decrease in collagen, a representative substance constituting the dermis, and an increase in matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), a collagen-degrading enzyme, are well known.

On the other hand, proteoglycan (PG) refers to a glycosylated protein in which one or more sugar chains called glycosaminoglycan (GAG) are linked to a protein, and these are also the main proteins that form skin by binding to matrix proteins such as collagen, elastin, and hyaluronic acid. Biglycan and decorin, the most abundant PGs in

the skin, contribute to the maintenance of skin tissue by stabilizing collagen fibers and protecting them from MMP-1. However, their expression changes or regulatory mechanisms in skin aging are not yet clear.

In addition, the decline of growth factors in aging is considered important, and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is also known to have reduced blood concentrations in the elderly and reduced action in aged skin. However, the role of IGF-1 in skin aging and its effect on PG have not been well studied.

Therefore, the purpose of the present study is to elucidate the expression changes in biglycan and decorin, their regulatory mechanisms, and their relationship with IGF-1 from the perspective of intrinsic aging and photoaging of the skin.

First of all, tissue biopsies were performed on the skin of the sun-protected buttock and sun-exposed forearm of the young and the elderly to confirm the changes in biglycan and decorin in actual skin. Then, the dermis was isolated and the extracted dermal proteins were analyzed by Western blot. To characterize the change in biglycan and decorin in intrinsic aging, I compared the buttock dermis of the young and the elderly, and found that the amount of biglycan was significantly decreased and the size tended to decrease. For decorin, its protein amount did not show significant

difference, and the size decreased significantly. Next, I examined the buttock and forearm of the same elderly subject, to confirm the change in photoaging. The amount of biglycan has a decreasing trend, and the size tended to increase although not significant, and for decorin, the amount decreased significantly while its size increased significantly. Thus, in intrinsic aging, both quantity and size tended to decrease, and in photoaging, quantity decreased but size increased, showing a difference in PG size regulation between intrinsic aging and photoaging.

Next, I analyzed mRNA expression using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) attempting to account for the quantitative change, wherein the mRNA of biglycan and decorin did not decrease in both intrinsically aged and photoaged tissues. Therefore, I assumed that it was not a decrease in synthesis through transcription, and that degrading enzyme of biglycan and decorin such as ADAMTS5 would increase. I treated Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs) with ADAMTS5 siRNA to check the change of biglycan and decorin protein amounts, and confirmed the increase in both biglycan and decorin. These results indicate that ADAMTS5 contributes to the degradation of biglycan and decorin, and subsequently, it was proved that ADAMTS5 was increased in aged tissues, confirming that it contributed to the degradation of biglycan and decorin even in

actual aging.

Since the size change of biglycan and decorin means a change in the length of the attached GAG chain, I examined the expression changes of the GAG-synthesizing enzymes. The GAGs of biglycan and decorin are classified as chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS), and most of them are composed of DS in the skin. Six types of GAG chain elongation enzymes of CS/DS are known, so I treated NHDFs with 6 types of siRNA for each enzyme to check their involvement in GAG chain length regulation of biglycan and decorin. From these results, I found that the enzyme which reducing the size of biglycan and decorin the most was chondroitin sulfate synthase 1 (CHSY1), and next was chondroitin polymerase factor (CHPF). Therefore, I attempted to investigate the actual expression of the two enzymes in human skin tissue. Since it was difficult to identify their expression by western blot, CHSY1 and CHPF were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence staining, respectively. In intrinsic aging, the size of biglycan tended to decrease and the size of decorin decreased significantly. However, CHSY1 tended to increase, contrary to what I assumed, and CHPF tended to decrease, which was insignificant. In photoaging, the size of biglycan tended to increase and the size of decorin increased significantly, but CHSY1

did not change significantly and CHPF even showed a tendency to decrease. Therefore, it seems that the size changes of biglycan and decorin are not mainly mediated by the expressional regulation of CS/DS-synthesizing enzymes during skin aging process.

On the other hand, the action of IGF-1 is known to decrease in aged skin. Therefore, I investigated the effect of IGF-1 on the expression change of biglycan and decorin, and as a result, found an increase in biglycan and decorin protein levels. However, the mRNA level did not increase, and it was confirmed that IGF-1 acts by enhancing post-transcriptional translation through inhibitor experiments. In addition, IGF-1 was found to inhibit the expression of ADAMTS5, which degrades biglycan and decorin. Through this, it was found that IGF-1 increases the biglycan and decorin, directly by increasing the protein synthesis, and indirectly by inhibiting the action of the degrading enzyme. Consequently, it could be speculated that a decrease in IGF-1 level in skin aging leads to a decrease in the synthesis of both PGs, and also an increase in the degradation of PGs with an increase in ADAMTS5.

Finally, I investigated the regulatory roles of biglycan and decorin on matrix proteins in NHDF using siRNA. As a result of the knockdown of the biglycan expression, the expression of type I collagen, an important component in the dermis, was reduced, and

the expression of the collagenase MMP-1 was increased.

In the present study, I observed changes of biglycan and decorin in intrinsic aging and photoaging, their regulatory mechanisms, and their functional importance. The main changes are that the amount of biglycan and decorin decreases in aging, that their degrading enzyme ADAMTS5 increases, and that the size of biglycan and decorin decreases in intrinsic aging and increases in photoaging. According to the results of the present study, it is speculated that the quantitative decrease in biglycan and decorin in intrinsic aging is due to the increased action of ADAMTS5 along with a direct decrease in protein synthesis caused by the decrease in the activity of IGF-1. In addition, it was confirmed that the quantitative decrease of this biglycan leads to a decrease in collagen and an increase in MMP-1, which are hallmarks of skin aging. However, the size reduction of biglycan and decorin in intrinsic aging and the size increase of them in photoaging did not occur through direct expression regulation of CS/DS-synthesizing enzymes. Taken together, in the process of skin aging, the action of IGF-1 decreases, resulting in a decrease in the expression of biglycan and decorin, which is further exacerbated by the increase in ADAMTS5, leading to direct or indirect decrease in collagen. Therefore, increasing IGF-1, biglycan, and decorin or inhibiting

ADAMTS5 could be a novel strategy for improving skin aging.

Keywords: Proteoglycan (PG), Biglycan, Decorin, Skin aging, ADAMTS5, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

Student Number: 2014-22025