



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](#)

의학박사 학위논문

MicroRNA 조절을 통한
상처 치유 기전에 관한 연구

2017년 8월

서울대학교 대학원

의학과 피부과학 전공

김 은 정

MicroRNA 조절을 통한
상처 치유 기전에 관한 연구

지도 교수 박 경 찬

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2017년 4월

서울대학교 대학원
의학과 피부과학 전공
김 은 정

김 은 정 의 의학박사 학위논문을 인준함

2017년 6월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

The Roles of MicroRNAs and Target Genes in Cutaneous Wound Healing

by

Eun Jung Kim, M.D.

(Directed by Kyoung Chan Park, M.D., Ph. D)

A Thesis Submitted to the Department of Medicine
in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
of Doctor of Philosophy in Medicine (Dermatology) at
Seoul National University College of Medicine

June, 2017

Approved by thesis committee:

Professor _____ **Chairman**

Professor _____ **Vice Chairman**

Professor _____

Professor _____

Professor _____

요약 (국문초록)

피부 상처의 치유 과정은 손상된 피부의 기능을 회복하기 위해 수많은 인자들이 작용하는 생리적 과정으로 여기에 관여하는 유전자들의 조절이 중요하다. MicroRNA는 표적 유전자의 특정 부위에 결합하여 유전자 발현을 조절하는 RNA로 상처 치유 과정의 여러 시기에서 microRNA의 발현 변화가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

최근에 피부 줄기 세포 조절과 항상성 유지에 필요한 미세 환경을 제공하는 기저막의 주성분인 4형 콜라겐 (COL4A3)이 MIR135b의 표적 유전자임이 밝혀졌으며 MIR135b를 억제시키면 4형 콜라겐 발현이 증가하여 각질형성세포의 증식 능력이 증가한다는 연구 결과가 있었다.

각질 형성세포의 증식과 연관된 MIR135b가 COL4A3 유전자뿐 아니라 상처 치유 과정에 관여하는 다른 유전자의 발현에도 영향을 미칠 것으로 기대하고 그 역할을 알아보하고자 본 연구를 시행하게 되었다.

생물정보학적 기법을 이용하여 MIR135b와 추정 결합 부위를 가진 후보 유전자들을 선별한 후 그 중 정상적인 상처 치유 과정에서 중요한 조절자 역할을 하는 것으로 알려진 FOXO1에 대한 luciferase reporter assay를 통해 FOXO1이 MIR135b의 표적 유전자임을 확인하였고 각질형성세포에 MIR135b를 transfection 시킨 후 western blot을 통해 FOXO1 발현 감소를 확인하였다.

또한 피부 상처 치유에 효과적인 물질 중 하나로 알려진 polydeoxyribonucleotide (PDRN)를 각질형성세포에 48시간 처리한 후 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 통해 MIR135b 감소와 FOXO1 mRNA의 발현 증가를 확인하였다.

이러한 연구 결과는 다양한 microRNA와 유전자들의 발현 변화에 의해 미세하게 조절되는 상처 치유과정에서 PDRN이 MIR135b 발현을 억제하고 그 표적인 FOXO1 발현을 증가시켜 정상적인 피부 상처 치유 과정을 촉진시킬 수 있음을 보여주며 MIR135b - FOXO1이라는 새로운 상처 치유 조절 경로의 가능성을 시사해 준다.

주요어: 상처 치유, microRNA, MIR135b, FOXO1,
Polydeoxyribonucleotide (PDRN)

학번: 2009-31076

약자 및 용어 정리

MIR135b: microRNA135b

FOXO: forkhead transcription factors of O class

PDRN: polydeoxyribonucleotide

qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

mRNA: messenger RNA

IL-1 α : interleukin-1 α

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-6: interleukin-6

TNF- α : tumor necrosis factor- α

FGF-2: fibroblast growth factor-2

bFGF: basic fibroblast growth factor

IGF-1: insulin-like growth factor-1

KGF: keratinocyte growth factor

TGF- β : transforming growth factor- β

VEGF-A: vascular endothelial growth factor-A

HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α

PDGF: platelet-derived growth factor

HB-EGF: heparin-binding EGF-like growth factor

IFN- γ : interferon- γ

NGF: nerve growth factor

3'UTR: 3'- untranslated region

WT: wild type

MT: mutant type

SHIP2: SH2-containing phosphoinositide 5-phosphatase 2

TLR: toll-like receptor

MMP: matrix metalloproteinase

PPARs: peroxisome proliferator-activated receptors

cDNA: complementary DNA

siRNA: small interfering RNA

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

RIPA: radioimmunoprecipitation assay

PVDF: polyvinylidene fluoride

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

MCP-1: macrophage chemoattractant protein-1

SOCS: suppressor of cytokine signaling

SIP1: Smad-interacting protein 1

GTP: guanosine triphosphate

HGF: hepatocyte growth factor

STAT: signal transducer and activator of transcription

CIS: cytokine –inducible SH-2 containing protein

SPRR: small proline-rich

EDC: epidermal differentiation complex

shRNA: short hairpin RNA or small hairpin RNA

ROS: reactive oxygen species

PA: plasminogen activator

tPA: tissue-type plasminogen activator

uPA: urokinase-type plasminogen activator

PAI: plasminogen activator inhibitor

uPA-R: urokinase-type plasminogen activator receptor

SERPIN: serine protease inhibitor

HEK293 cell: human embryonic kidney cell 293

PI3-Kinase: phosphatidylinositol 3-kinase

TCF: T-cell factor

DSG3: desmoglein 3

IFN- α : interferon- α

IRAK1: IL-1 receptor associated kinase 1

TIMP3: tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 3

PP6: protein phosphatase 6

목 차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	10
III. 결과	16
IV. 고찰	30
참고문헌	41
영문초록	54

I. 서론

건강하고 아름다운 피부에 대한 열망은 갈수록 증가하고 있으며 젊고 건강한 피부를 유지하기 위한 노력은 계속되고 있다. 건강하고 아름다운 피부를 유지하기 위해서는 피부 손상을 최대한 줄이고 뜻하지 않게 상처를 입은 경우 흉터의 발생을 최소화 시키고 피부가 원래의 기능과 구조를 회복할 수 있도록 도와주는 일이 중요하다. 상처 치유의 과정은 복잡하지만 여러 가지 염증 세포들과, 각질형성세포, 섬유모세포, 사이토카인 (cytokine), 성장 인자 (growth factor)들의 유기적인 상호작용과 이들을 조절하는 유전자의 발현 및 미세 환경들이 복합적으로 작용한다. 이러한 상처 치유 과정의 특정 단계를 조절하는 microRNA의 역할에 대한 연구를 통해 그 과정을 조절할 수 있다면 피부의 항상성 유지에 도움이 될 것으로 기대된다.

1.1 피부 상처 치유 과정

피부 상처 치유 과정은 크게 지혈 (hemostasis) 및 염증 (inflammation)기, 증식 (proliferation)기, 성숙 (maturation)기의 단계를 거치면서 이루어진다(Reinke and Sorg., 2012). 상처에 의해 손상 받은 혈관들은 혈액 손실을 줄이고 조직 사이를 채우기 위해 혈관 수축이 일어나며 혈액 응고 덩어리 (blood clot)를 형성하게 되는데 이는 혈소판에 의해 시작된다. 이러한 혈액 응고 덩어리들은 fibronectin, vitronectin, thrombospondin과 같은 섬유성 물질을 포함하여 장차 상처 부위로 이동해 올 백혈구, 각질형성세포, 섬유모세포, 내피 세포들을 위한 기본 골격 구조의 역할을 하며 성장 인자들에 대한

저장소로서의 역할을 하게 된다. 혈소판은 화학주성 인자 (chemotactic factor)를 분비하여 백혈구의 침윤을 일으키고 혈소판과 이동해 온 백혈구가 분비하는 사이토카인과 성장 인자들이 다음 과정에 중요한 역할을 하게 된다 (Martin., 1997). IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 염증 반응을 활성화시키고, FGF-2, IGF-1, TGF- β 는 콜라겐 합성을 활성화시키며 FGF-2, VEGF-A, HIF-1 α 는 혈관형성 (angiogenesis)을 촉진시킨다 (Werner and Grose., 2003).

염증기의 초기에는 보체의 활성화, 혈소판 탈과립, 세균 분해 산물들에 의해 호중구들이 상처 부위로 모여들어 세균에 대한 탐식작용을 하고 단백분해효소를 분비하여 괴사된 조직을 분해시키는 역할을 한다. 또한 이들이 분비하는 다양한 사이토카인은 다른 염증 세포들을 상처부위로 이동시키기 위한 화학주성 인자로 작용한다 (Eming et al., 2007). 이후 피부 손상 3일째 쯤 대식세포가 상처부위로 들어와 병원체와 세포 조각들을 탐식하고 (Tziotzios et al., 2012), TGF- β , TGF- α , bFGF, PDGF, VEGF 등 성장 인자를 합성하여 세포 증식과 세포외 기질 형성을 촉진시켜 성공적인 상처 치유 과정에서 필수적인 역할을 한다 (DiPietro and Polverini., 1993). 이와 같이 염증기는 세포의 이동에 관여하는 성장 인자와 사이토카인을 공급하여 다음 단계의 상처 회복 과정에 결정적인 역할을 하게 된다 (Leibovich and Ross., 1975).

증식기는 재상피화 (re-epithelialization), 혈관신생, 육아 조직 (granulation tissue) 형성으로 요약 할 수 있다. 재상피화 과정은 상처 변연부에 위치한 각질형성세포와 모낭이나 땀샘에서 기원한 상피 줄기세포에 의해 이루어지고 이러한 과정은 EGF, KGF, IGF-1, NGF와 같은 성장 인자들이나 사이토카인이 매개하는 신호 전달 과정에 의해

활성화되는 것으로 알려져 있다 (Werner and Grose., 2003). 혈관형성 과정은 VEGF, PDGF, bFGF와 serine protease thrombin과 같은 성장 인자들이 혈관 내피 세포의 수용체에 부착하여 세포 내 신호전달 체계들을 활성화시키며 시작된다. 활성화된 내피 세포는 단백 분해 효소를 분비하여 상처 부위로 이동하고 증식한다 (Sorg et al., 2007). 증식기의 마지막 단계에서는 급성 육아조직이 형성되면서 동시에 조직 리모델링이 시작된다. 육아 조직은 섬유모세포, 대식세포, 모세혈관들과 성긴 콜라겐 다발들이 고밀도로 구성되어 있고 혈관조직도 풍성하게 존재하는데 이중 콜라겐과 세포 외 기질을 생산하는 섬유모세포의 역할이 두드러진다 (Barker., 2011). $IFN-\gamma$, $TGF-\beta$ 와 같은 사이토카인 조절 하에 섬유모세포는 조직 손상을 복구하기 위해 콜라겐, fibronectin과 같은 새로운 결합 조직 기질을 합성한다 (Madden and Peacock., 1971). 궁극적으로 세포 이동과 조직화에 필요한 상처 기질의 전구물질인 섬유모세포의 수는 근섬유모세포로의 분화와 세포자멸 (apoptosis)에 의해 감소하게 된다 (Hinz.,2007).

피부 상처 치유 과정의 마지막 단계인 성숙, 리모델링 단계는 세포자멸에 의해 육아 조직 형성이 중단되어 혈관과 세포 성분이 거의 관찰되지 않는 특징이 있다. 성숙기 동안 3형 콜라겐은 보다 단단한 1형 콜라겐으로 대체되는 등의 세포 외 기질의 변화를 겪게 되고 (Gurtner and Evans., 2000), 근섬유모세포가 상처를 수축시키며 혈관형성의 과정들이 점차 감소하게 된다 (Robson et al., 2001).

1.2 상처 치유 과정에서 microRNA의 역할

MicroRNA (miRNA)는 작은 내재성 RNA 분자로 표적이 되는 mRNA의 3' UTR에 결합하여 mRNA를 분해시키거나 번역 (translation)을 억제하여 유전자 발현을 조절한다 (Bartel., 2004). 상처 치유 과정의 특정 단계에서는 이와 연관된 microRNA들의 발현 변화가 일어나 해당 유전자들의 발현을 조절하는데 이러한 과정에 문제가 생기게 되면 비정상적인 치유 과정이 일어나게 된다 (Shilo et al., 2007).

상처 치유 과정에서 염증성 사이토카인의 중요한 역할 중 하나는 혈관형성을 조절하는 것이다 (Tonnesen et al., 2000). 배아 발달 과정에서 내피 세포의 microRNA를 deletion시키면 다양한 자극에 대한 혈관형성 반응이 손상됨을 관찰 할 수 있다 (Suarez et al., 2008). 혈관형성을 촉진시키는 microRNA로 MIR126, MIR130a, MIR210, MIR296, MIR378 등이 보고 되었고 혈관형성을 억제시키는 것으로 MIR92a, MIR17, MIR15b, MIR16, MIR20a, MIR20b, MIR320, MIR221, MIR222 등이 있다. 이 중 MIR15b, MIR16, MIR22a는 VEGF를 표적으로 작용한다. 염증을 조절하는 microRNA로는 TLR2에 작용하는 MIR105, PDGF 수용체에 작용하는 MIR140, TNF- α 에 작용하는 MIR146a와 MIR125b가 알려져 있다.

증식기에는 각질형성세포의 증식과 관련 되어 SHIP2에 작용하는 MIR205 (Yu et al., 2008), 전사 인자 E2F3에 작용하는 MIR210 등이 보고 되었다 (Biswas et al., 2010).

리모델링 단계에 관여하는 microRNA로는 1형과 2형 콜라겐의 발현을 조절하는 MIR29a, 세포 외 기질 단백, Smad와 β -catenin과

같은 단백을 억제하는 MIR29b, MIR29c 등이 알려져 있다 (van Rooij et al., 2008).

1.3 각질형성세포 증식과 MIR135b

상처 치유 과정에서 모낭이나 땀샘 기원의 상피 줄기세포와 상처 주변부 기저층에 위치한 각질형성세포가 기질분해효소 (MMP)의 작용에 의해 기저막으로부터 이동하여 재상피화에 기여한다 (Xu et al., 2013). 표피 줄기세포에 관한 연구에서 김 등은 피부 표피세포를 4형 콜라겐에 부착되는 정도에 따라 RA (rapidly-adhering) 세포, SA (slowly-adhering) 세포, NA (non-adhering) 세포로 구분하였고 이중 RA 세포는 표피 줄기세포 표지자로 추정되는 p63을, SA 세포와 NA 세포는 줄기세포의 운명을 결정하는 c-Myc을 발현한다고 보고하였다. 또한 표피 재생 능력을 알아보기 위해 세 종류의 세포를 이용하여 인공 피부 모델을 만들어 실험을 진행하였는데 RA 세포를 이용하여 제작한 인공 피부의 표피가 다른 두 종류 세포를 이용하여 만든 피부에 비해 잘 구조화되어 있고 표피 기저층에 integrin α_6 , integrin β_1 을 잘 발현함을 확인하고 RA 세포가 표피 줄기세포임을 보고한 바 있다 (Kim et al., 2004). Joyce 등은 증상화된 표피는 MIR135b를 발현하고 MIR135b가 표피 각질화에 연관되어 있음을 시사하였다 (Joyce et al., 20011). MIR135b와 표피의 증식 및 분화와의 연관성에 관한 최근 연구에서는 SA 세포에서 MIR135b가 높게 발현된다는 점과 배양된 각질형성세포에 MIR135b mimic를 transfection시키면 나타나는 공포 형성 등의 퇴행성 변화를 보고 MIR135b가 각질형성세포 초기 분화에 관여할 것으로 보고하였다. MIR135b가 각질형성세포의 증식능력에

미치는 영향을 확인하기 위한 실험에서는 *ib-MIR135b* 피부 모델에서 *p63*, *PCNA*, *type IV collagen*, *integrin α_6* , *integrin β_1* 발현 증가를 확인하였고 *COL4A3* 유전자가 *MIR135b*의 표적 유전자임을 밝혔다. 즉 *MIR135b*를 억제시켜 이의 표적인 4형 콜라겐 발현을 증가시킴으로써 표피 기저 세포들의 증식 능력을 향상시킬 수 있다는 결과를 얻었다 (Choi et al., 2014).

최 등은 이러한 연구결과를 항노화 효능이 있다고 알려진 오가피 추출물의 효능을 통해 확인하였다. 오가피 추출물은 항산화 효과로 인해 항노화 물질로 알려져 있다. 이 중 주요 성분인 *phlorizin*이 각질형성세포의 증식능력에 미치는 영향을 알기 위한 실험에서 *phlorizin*를 처리한 피부 모델은 *p63*, *PCNA*, *type IV collagen*, *integrin α_6* , *integrin β_1* 발현이 증가되어 있었으며 또한 *phlorizin*를 72시간 동안 각질형성세포에 처리하여 배양한 후 시행한 qRT-PCR 결과 *MIR135b* 감소와 *type IV collagen mRNA* 증가를 확인하였다. 이러한 결과들은 *phlorizin*이 *MIR135b* 발현을 억제하고 표적인 4형 콜라겐 발현을 증가시켜 미세환경 변화를 유도함으로써 표피 세포들의 증식 능력을 향상시킬 수 있음을 보여주었다 (Choi et al., 2016).

1.4 상처 치유 과정에서 전사 인자 (FOXO1)의 역할

상처 치유 과정에서 전사 인자들이 중요한 역할을 하는데 *C-Jun*, *PPARs*, *FOXO1*이 대표적이다. *C-Jun*은 *HB-EGF*의 발현에 관여하여 각질형성세포를 상처 부위에 충원시키고 증식시키는데 기여한다 (Li et al., 2003). *PPARs*는 각질형성세포의 이동, 증식, 분화를 촉진시킨다 (Michalik et al., 2005). *PPAR α deletion wounded mice*을 이용한

연구에서는 상처 치유 초기에 각질형성세포의 이동과 증식이 감소하여 상처 치유가 지연되었고, PPAR β deletion 연구에서는 각질형성세포의 부착과 이동 감소가 상처 치유를 지연시켰다 (Michalik et al., 2005).

FOXO는 FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6 네 종류가 있으며, FOXO1과 FOXO3는 거의 대부분의 조직에서 발현된다 (Van Der Vos and Coffey., 2011). FOXO는 표적 유전자 전사 과정을 활성화시키거나 억제시켜 증식, 세포자멸, 대사, 염증반응, 분화 등의 다양한 세포 반응을 조절한다 (Yu et al., 2014). 이 중 FOXO1은 glutathione peroxidase 2 (GPX-2)와 같은 항산화 유전자들과 DNA repair enzyme을 조절하여 각질형성세포를 산화적 스트레스로부터 보호함으로써 각질형성세포의 이동과 증식을 촉진시켜 상처 치유에 관여한다 (Ponugoti et al., 2013).

상처 치유 과정에서 중요한 단계인 각질형성세포의 이동은 integrin, MMP의 적절한 발현과 TGF- β 1과 같은 성장 인자들이 중요한데 FOXO1은 이들의 발현을 조절하여 각질형성세포의 이동을 촉진시킨다. 쥐의 각질형성세포에서 FOXO1을 deletion시켜 시행한 실험에서 각질형성세포의 이동이 50% 감소하고 증식이 22% 감소 됨을 확인하였다. 또한 TGF- β 1의 발현이 대조군에 비해 71% 정도 감소하고 이는 TGF- β 1을 처리하여 회복되었다 (Ponugoti et al., 2013).

상처 치유 과정의 초기와 중기에 과도한 세포자멸이 일어나게 되면 회복 과정에 악영향을 미치게 되는데 FOXO1 deletion은 TGF- β 발현을 감소시켜 세포자멸을 1.6배 증가시킨다는 실험결과가 있었다. FOXO1 deletion은 *Bim*과 같이 세포자멸을 촉진시키는 유전자를

활성화시키므로 FOXO1이 정상 조건에서 과도한 세포자멸을 억제하는 기능을 하는 것으로 보고되었다 (Ponugoti et al., 2013).

1.5 상처 치유를 촉진시키는 인자들

PDRN은 50-1,500 kDa (80~2,200bp)의 특정 분자량 분포를 갖고 있는 DNA 혼합체로 80~200 kDa에 가장 많은 DNA 분절체가 모여 약리 효과를 나타낸다. 송어와 연어의 정액에서 특별한 정제 및 멸균 과정을 거쳐 추출되며 adenosine A_{2A} 수용체를 통해 상처 치유를 촉진시키는 것으로 알려져 있다 (Thellung et al., 1999). PDRN은 일차 배양 실험에서 섬유모세포 (Sini et al., 1999)와 골모세포 (Guizzardi et al., 2003)의 성장을 촉진하고 in vivo 실험에서 혈관형성을 증가시켜 혈류를 회복시킴으로써 상처 치유를 촉진시킨다는 연구가 있었다 (Galeano et al., 2008).

임상적으로 말초 혈관 폐쇄 질환에서 새로운 혈관형성을 통해 효과를 나타내고 (Bitto et al., 2008), 만성 당뇨 발 궤양 치료에 효과가 있으며 (Squadrito et al., 2014) 최근에는 여성형 탈모 환자에서 효과가 있었다는 보고가 있다 (Lee et al., 2015). 또한 피부 재생을 촉진시킬 목적으로 PDRN 성분을 진피에 주사하여 임상적으로 널리 이용하고 있다. 하지만 PDRN이 각질형성세포에 미치는 영향에 관한 기존 연구는 없었다.

현재까지 피부 상처 치유와 연관된 microRNA에 대한 연구 결과들은 부족하다. 최근 표피 증식과 연관되어 MIR135b의 표적 유전자로 COL4A3가 확인되었고 4형 콜라겐 발현 증가에 의한 각질형성세포 증식 능력 향상에 대한 연구가 있었다. 각질형성세포의 증식은 상처

치유 과정에서 필수적인 요소이므로 MIR135b가 COL4A3 뿐 아니라 새로운 표적 유전자를 통해 상처 치유 과정에 관여할 수 있을 것이라는 생각을 갖게 되었다. 따라서 상처 치유에 효과적인 것으로 알려진 물질인 PDRN을 각질형성 세포에 처리하여 MIR135b의 발현 변화를 확인하고 상처 치유에 관여하는 새로운 표적 유전자를 찾아 낸다면 상처 치유 과정에서 새로운 microRNA의 역할과 작용 기전을 이해할 수 있을 것으로 생각하여 본 연구를 계획하게 되었다.

II. 재료 및 방법

2.1 각질형성세포 배양

피부 각질형성세포의 일차 배양은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 정상 신생아의 포피에서 절취한 피부를 무균 상태에서 2x15 mm 크기의 절편으로 만들어 2.4 U/mL dispase (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Germany)로 37°C에서 약 30분간 처리하여 표피와 진피를 분리하였다. 분리된 표피를 세절 (chopping)하여 basal keratinocyte growth media (EpiLife, Cascade Biologics, Portland, OR)에 human keratinocyte growth supplement와 항생제 (100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin)가 포함된 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 배양된 각질형성세포의 2nd-7th 세대를 실험에 사용하였다.

2.2 PDRN 세포 독성(세포 생존능) 검사

각질형성세포를 배양 용기에 5x10³/well (96-well plate)의 조건으로 seeding하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 PDRN (Pharmaresearch Products, Seongnam, Korea) 0, 1, 10, 30, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL를 농도 별로 처리하여 24시간 더 배양한 후 EZ-cytox (EZ300S, 대일랩서비스, Seoul, Korea) 시약을 10 µL/well 첨가하여 2시간 더 배양하였다. GloMax Multi Detection System (Promega, Madison, WI)에서 450 nm 흡광도를 측정하여 PDRN에 대한 각질형성세포의 cell viability 상대 값을 구하였다.

2.3 qRT – PCR을 이용한 MIR135b 발현 정도 확인

각질형성세포를 배양용기에 1.5×10^5 /well (6-well plate)의 조건으로 seeding 시킨 후 0, 150, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 PDRN이 포함된 배지에서 48시간 배양하였다. MIR135b의 발현 정도를 보기 위한 qRT-PCR을 위해 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 total RNA를 분리하고 10 ng의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.

cDNA는 total RNA 10 ng, 5x TaqMan MicroRNA assays-hsa-miR135b (4427975, 002261, Applied Biosystems) 3 μL , RNU48 (4427975, 001006, Applied Biosystems) 3 μL , RNase-free water 7.81 μL 를 넣고 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (4366596, Applied Biosystems)을 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® (TP600, Takara, Japan)에서 16°C 30분, 42°C 30분, 85°C 5분에서 반응시켜 만들었다.

Real time RT-PCR은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. cDNA template (25 ng/ μL) 1.33 μL , 20x TaqMan MicroRNA assays -hsa-miR135b (4427975, 002261, Applied Biosystems) 1 μL 또는 RNU48 (4427975, 001006, Applied Biosystems) 1 μL , 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix II (4440040, Applied Biosystems) 10 μL , RNase-free water 7.67 μL 로 구성된 PCR 반응액으로 StepOne™ Real-time PCR system® (4369074, Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 반응을 총 40회 반복하였다.

2.4 qRT - PCR을 이용한 FOXO1 mRNA 발현 정도 확인

2.3 실험과 동일한 방법으로 PDRN을 처리하여 48시간 배양 후 total RNA를 분리하고 2 µg의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.

cDNA합성은 total RNA 2 µg, oligo(dT) 15 primer와 함께 70°C 5분 반응 시킨 후 dNTP mixture, GoScript Reverse Transcriptase, MgCl₂ (Promega, Madison, WI)를 추가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분간 반응시킨 후, 70°C에서 15분간 비활성화 시켰다.

Real time RT-PCR은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. cDNA template 1 µL, 10 pmoles/µL primer F (GAPDH: endogenous control, FOXO1: target gene) 1 µL, 10 pmoles/µL primer R (GAPDH: endogenous control, FOXO1: target gene) 1 µL, 2x SYBR green 5 µL, RNase-free water 2 µL로 구성된 PCR 반응액으로 StepOne™ Real-time PCR system® (4369074, Applied Biosystems, Foster City, CA) 에서 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응은 95°C에서 10분 반응 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 반응을 총 40회 반복 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C에서 15초 반응시켰다.

2.5 Luciferase reporter assay

MIR135b에 대한 추정 결합 부위인 FOXO1의 3' UTR 에 대한 wild type 및 mutant type fragment를 제작하여 (Macrogen, Seoul, Korea) PCR을 통해 증폭시켰다. 이 후 각각을 pmirGlo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI)에 cloning시켰다. Vector를 E.coli (DH5 α)에 transformation시킨 후 배양하여 plamid DNA (FOXO1 construct, wild type 또는 mutant type)를 분리하였다.

Reporter assay를 위해 HCT 116 세포 (KCLB 10247)를 24-well plates에 seeding (5×10^4 /well) 시킨 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 이후 FOXO1 construct (500 ng/well, wild type 또는 mutant type)와 50 nM의 Pre-miRTM hsa-miR-1 miRNA Precursor Positive Control (AM17150, Ambion, Austin, TX)과 Pre-miRTM hsa-miR-135b miRNA Precursor (AM17100, PM13044, Ambion, Austin, TX)를 각각 transfection 시켰다. Transfection에는 Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)과 siPORTTMNeoFXTM Transfection Agent (AM4510, Ambion, Austin, TX)를 사용하였다.

Transfection 24시간 후 Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI)을 이용하여 firefly luciferase 활성도 (FOXO1 발현 정도를 보기 위함)와 Renilla luciferase 활성도 (일정한 발현을 보여 기준치를 제공함)를 GloMax Multi Detection System (Promega, Madison, WI)에서 발광 정도로 측정하여 그 상대적인 비율 (firefly luciferase activity / Renilla luciferase activity)을 구하였다. 각각의 실험은 세 번씩 반복하여 그 평균값을 구하였다.

2.6 각질형성세포에 MIR135b transfection 후 Western blot analysis를 통해 FOXO1 단백질 발현 정도 확인

각질형성세포를 배양용기에 3.0×10^5 /well (6-well plate)의 조건으로 seeding 후 Pre-miRTM miRNA Precursor Negative Control (AM17110, Ambion, Austin, TX)과 Pre-miRTM hsa-miR-135b miRNA Precursor (AM17100, PM13044, Ambion, Austin, TX)를 각각 transfection 시킨 후 72 시간 동안 배양하였다. 이후 RIPA

buffer (EBA-1149, ELPIS Biotech, Daejeon, Korea)를 사용하여 total protein을 준비한 후 BCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology, Woburn, MA)를 이용해서 protein을 정량 하였다.

Western blot은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 12% acrylamide gel에 30 µg의 protein을 loading한 후 전기영동하여 크기 별로 분리하였다. PVDF Transfer Membrane (IPVH00010, Millipore, Billerica, MA)에 protein을 transfer시킨 후 5% skim milk (232100, BD Difco, Franklin Lakes, NJ)로 blocking 과정을 거친 다음 FOXO1 antibody (sc-34893, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), GAPDH antibody (sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)를 binding시켰다. 이후 secondary antibody를 binding 시키고 FluorChem E System (Cell Biosciences, Santa Clara, CA)을 이용하여 protein을 detection하였다. 단백질 발현 정도 (Intensity)는 ImageJ program을 사용하여 나타냈다.

2.7 NGS (next generation sequencing)

2.3 실험과 동일한 방법으로 각질형성세포를 배양용기에 1.5×10^5 /well (6-well plate)의 조건으로 seeding 시킨 후 0, 150, 300 µg/mL 농도의 PDRN이 포함된 배지에서 48시간 배양하여 total RNA를 분리하였다. PDRN 처리 후 각질형성세포의 유전자 발현을 보기 위해 분리된 각각의 RNA 2 µg으로 NGS를 의뢰하였다 (LAS, Gimpo, Korea).

RNA sequencing은 RNA quality 확인, library preparation, sequencing 순으로 시행되었다. 먼저 준비된 RNA의 quality를 Bioanalyzer RNA Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 확인한 후

Truseq Stranded mRNA Kit (Illumina, San Diego, CA)을 사용하여 mRNA sequencing 용 library를 제작하였다. RNA 2 µg으로부터 Poly-A tail을 가진 mRNA를 분리한 후 RNA를 작은 조각으로 절단하고 잘린 RNA는 random primer를 사용하여 first strand cDNA로 합성한 후 이를 기반으로 second strand cDNA를 합성하였다. 앞에서 합성한 cDNA에 sequencing adaptor를 결합한 후 sequencing adaptor가 붙은 cDNA library를 PCR로 증폭하였다. 준비된 library는 Bioanalyzer DNA Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 quality 확인 후 CFX96 Real Time System (BioRad, Hercules, CA)을 이용한 qPCR을 통해 정량화되었다. Sequencing은 NextSeq 500 Sequencing System (Illumina, San Diego, CA)을 통해 시행되었고 PDRN 처리 후의 유전자 발현 변화 분석 (DEG analysis)은 각각의 농도 별로 이루어졌으며 이후 functional category에 따른 분석을 시행하였다.

Ⅲ. 결과

3.1 각질형성세포에 대한 PDRN 세포독성

PDRN이 각질형성세포의 MIR135b 와 FOXO1 발현 변화에 미치는 영향을 알아보기로 PDRN을 세포독성이 없는 범위 내에서 적절한 농도로 처리하기 위해 각질형성세포에 대한 PDRN의 세포독성/생존률 검사를 시행하였다. 각질형성세포에 PDRN을 0, 1, 10, 30, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 별로 24시간 처리한 후 EZ-cytox assay를 통해 viability (%)를 구하였다. 세포독성 검사 결과 PDRN을 400 $\mu\text{g/mL}$ 까지 처리하여도 90% 이상의 세포 생존률이 유지됨을 확인하였다 (그림 1).

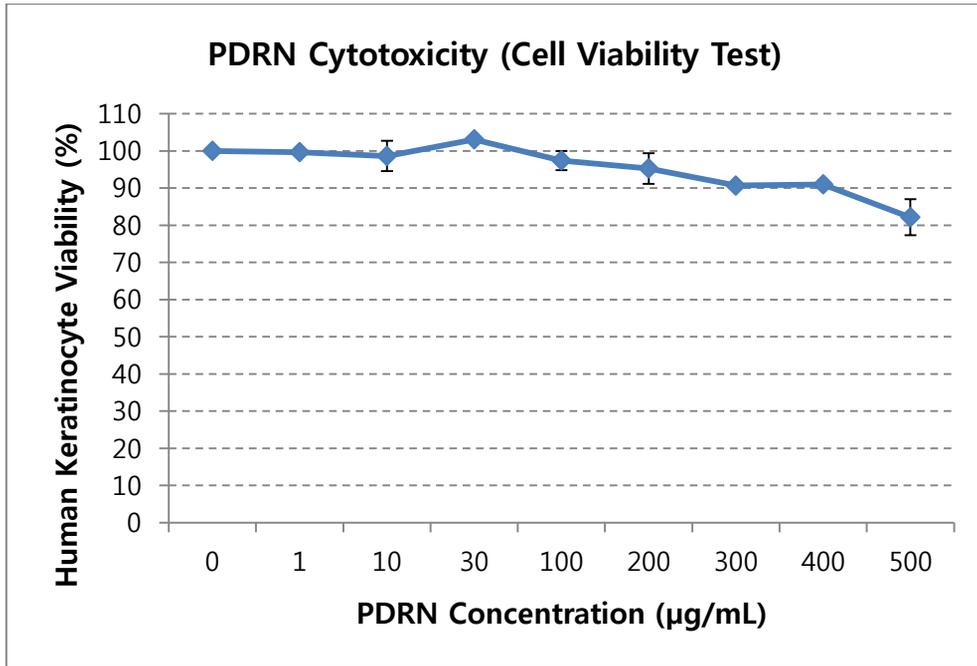
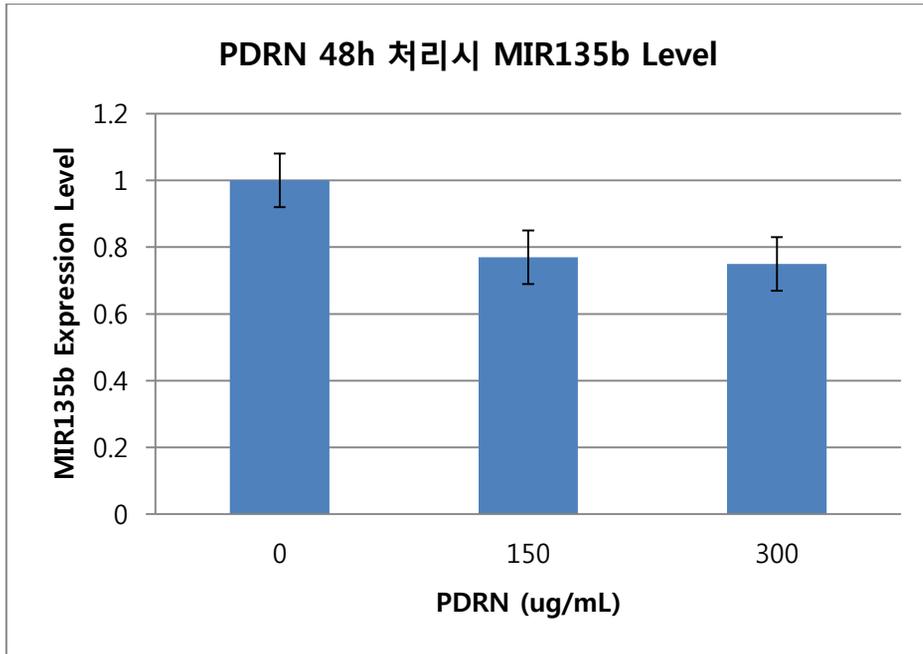


그림 1. 각질형성세포에 대한 PDRN 세포독성 검사

3.2 PDRN 처리 후 각질형성세포의 MIR135b 감소 확인

PDRN이 각질형성세포에서 MIR135b 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 각질형성세포에 PDRN 0, 150, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도 별로 48시간 동안 처리한 후 qRT-PCR을 통해 MIR135b 발현 정도를 확인하였다. PDRN을 처리하지 않은 군에 비해 150, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 처리 한 경우 각각 0.77, 0.75의 상대 값을 보여 PDRN이 각질형성세포에서 MIR135b 발현을 감소시키는 것을 확인하였다 (그림 2).

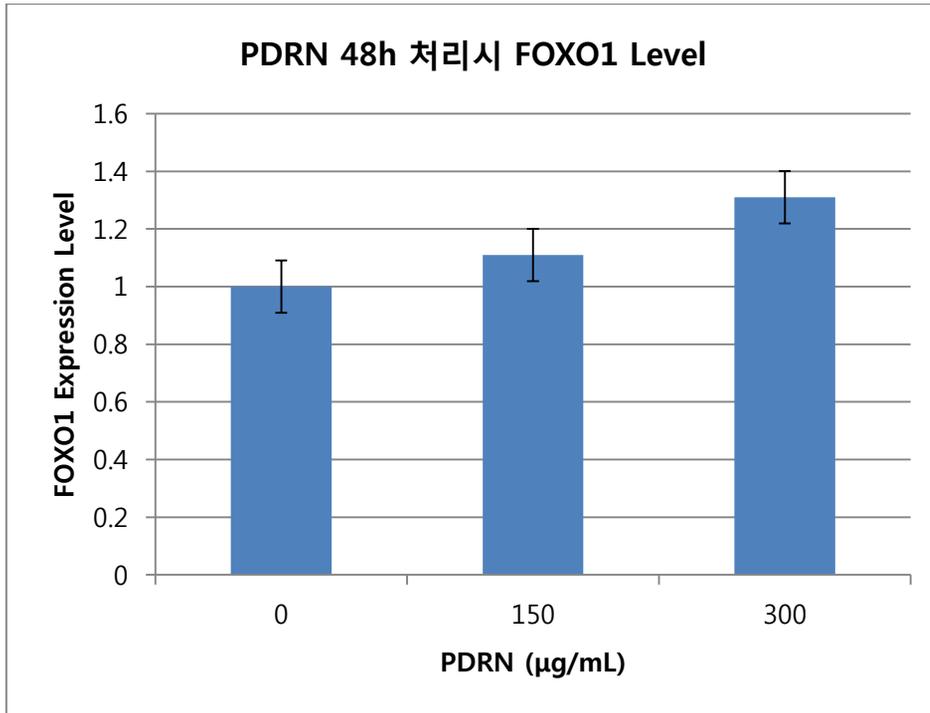


Sample	RQ
HK-Control	1.00
HK-PDRN 150 µg/ml	0.77
HK-PDRN 300 µg/ml	0.75

그림 2. PDRN 처리 후 MIR135b 발현 정도를 보기 위한 qRT-PCR 결과

3.3 PDRN 처리 후 각질형성세포의 FOXO1 발현 증가 확인

PDRN이 각질형성세포에서 FOXO1 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 각질형성세포에 PDRN-0, 150, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도 별로 48시간 동안 처리한 후 qRT-PCR을 통해 FOXO1 mRNA 발현 정도를 확인하였다. PDRN을 처리하지 않은 군에 비해 150, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 처리 한 경우 각각 1.11, 1.31의 상대 값을 보여 PDRN이 각질형성세포에서 FOXO1 발현을 증가시키는 것을 확인하였다 (그림 3).



Sample	RQ
HK-Control	1.00
HK-PDRN 150 µg/ml	1.11
HK-PDRN 300 µg/ml	1.31

그림 3. PDRN 처리 후 FOXO1 mRNA 발현 정도를 보기 위한 qRT-PCR 결과

3.4 Luciferase reporter assay를 통해 FOXO1이 MIR135b의 표적 유전자임을 확인

3.2, 3.3 실험 결과는 PDRN을 처리한 각질형성세포에서 MIR135b 발현이 감소하고 MIR135b에 대한 추정 결합 부위를 가진 것으로 알려진 FOXO1의 발현이 증가함을 qRT-PCR을 통해 보여주었다. FOXO1이 MIR135b의 표적 유전자임을 확인하기 위해 MIR135b에 대한 FOXO1 추정 결합 부위의 wild type과 mutant type 염기 서열 (그림 4)을 만들어 증폭 시킨 후 Luciferase용 Vector로 클로닝하여 배양된 세포에 precursor miRNA (MIR-1; positive control, MIR135b)와 함께 co-transfection 시킨 후 유전자 발현 정도를 luciferase 상대 활성도로 측정하였다 (그림 5, 표 1). 상대 활성도 측정결과 wild type인 경우 miR135b와 결합하여 mutant type에 비해 FOXO1 발현이 감소하여 FOXO1이 miR135b의 표적 유전자임을 확인할 수 있었다.

FOXO1 3' UTR (WT) 5' --CAATCTTTGCTATAATTGTAT**AAAGCCATA**AAATGTACATA--3'
MIR135B 3' -----AGUGUAUCCUUACUU**UUUCGGUAU**-5'
FOXO1 3' UTR (MT) 5' --CAATCTTTGCTATAATTGTAT-----AATGTACATA--3'

그림 4. MIR135b 추정 결합 부위에 대한 FOXO1 3'UTR wild type, mutant type 염기 서열

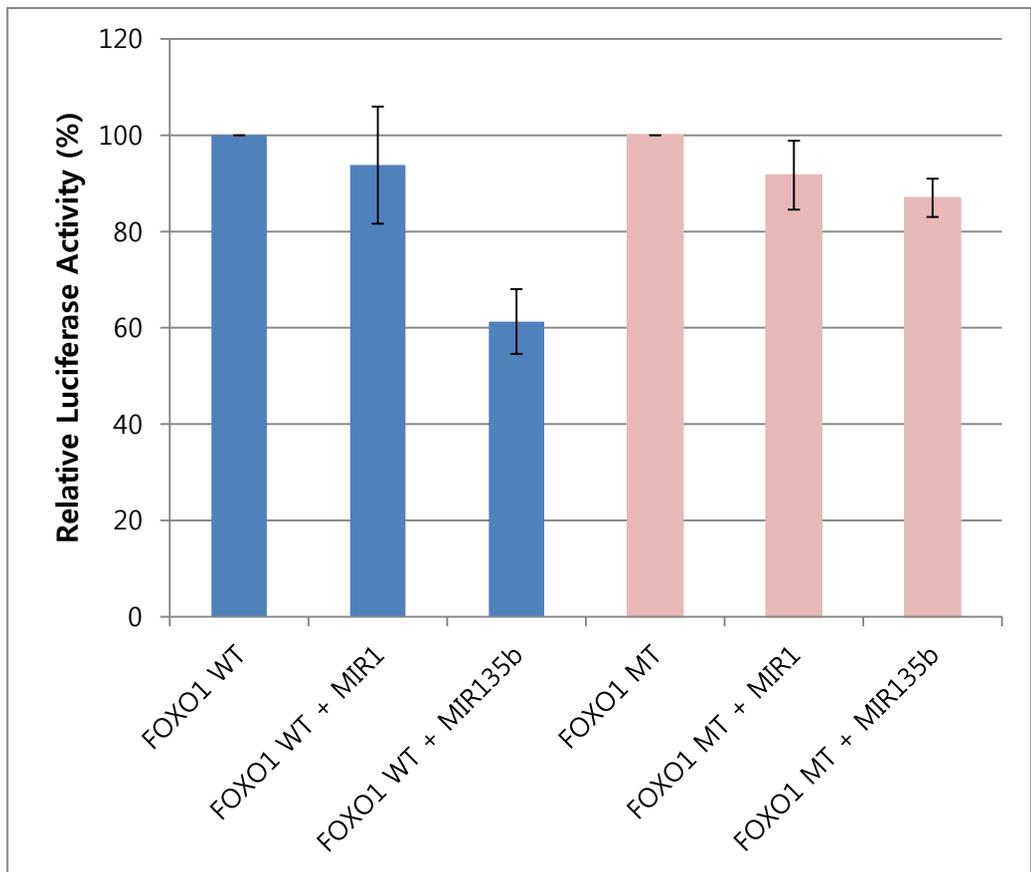


그림 5. MIR135b에 대한 FOXO1 wild type과 mutant type의 Luciferase 상대 활성도

	실험 1	실험 2	실험 3
FOXO1 WT	100.0	100.0	100.0
FOXO1 WT + MIR1	95.3	80.9	105.1
FOXO1 WT + MIR135b	62.8	54.0	67.2
FOXO1 MT	100.0	100.0	100.0
FOXO1 MT + MIR1	91.8	84.5	98.8
FOXO1 MT + MIR135b	90.9	83.0	87.0

	평균	표준편차
FOXO1 WT	100.0	0.00
FOXO1 WT + MIR1	93.8	12.18
FOXO1 WT + MIR135b	61.3	6.72
FOXO1 MT	100.0	0.00
FOXO1 MT + MIR1	91.7	7.15
FOXO1 MT + MIR135b	87.0	3.95

표 1. FOXO1에 대한 Luciferase Reporter Assay 결과

3.5 각질형성세포에서 MIR135b 작용에 의한 FOXO1 단백질 발현 감소 확인

각질형성세포 내에서 MIR135b 조절에 의한 FOXO1 단백질 발현 정도를 확인하기 위해 MIR135b (hsa-miR135b, Pre-miRNA precursor)를 각질형성세포에 transfection 시킨 후 western blot으로 확인한 결과 각질형성세포 내에서 MIR135b를 transfection시킨 경우 control에 비해 FOXO1 단백질의 발현 감소를 확인할 수 있었다 (그림 6).

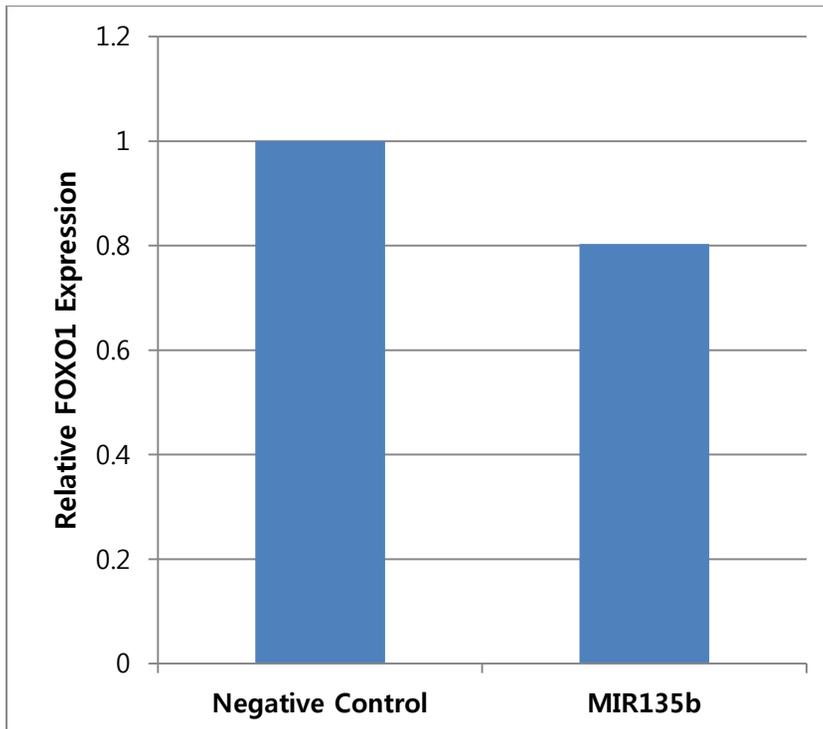
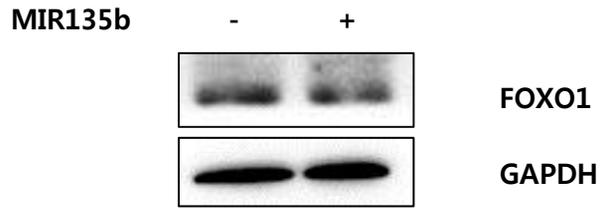


그림 6. MIR135b transfection된 각질형성세포의 FOXO1 단백 발현 정도

3.6 각질형성세포에 PDRN 처리 후 NGS 결과

각질형성세포에 PDRN 처리 후에 발현 변화를 보이는 유전자들 중 FOXO1 이외에도 표피 발달과 분화, 각질화 및 상처 치유, 재생과 연관되어 있는 것들로 NOTCH3, SPRR1A, SPRR1B, SPINK5, TGM1 등의 발현이 증가 하였으며 SERPINB2, SERPINE1, SOCS3 등의 발현 감소가 있었다 (표 2, 그림 7). 또한 MIR135b와 추정 결합 부위를 가지는 것으로 알려진 유전자들 중 COL4A3, DSG3, ITGAV의 발현 증가가 확인되었다.

Biologic processes	Differential expressed genes	
	Increase	Decrease
Wound healing	NOTCH3	SERPINE1, SERPINB2 PLAU, PLAT, ITGA2, ITGA5
Epithelium development	LOR, SPINK5 FLG, TGM1 SPRR1A, SPRR1B KRT4	PTHLH, SPRR2A CNFN
Regulation of cell proliferation	PTGS1, CDKN2B	IL31RA, PTGS2 CSF3, CSF2
Anti-apoptosis	HSPB1	SOCS3, SERPINB2 IL31RA, TGM2
Response to wounding	NOTCH3, KRT1	PLAT, PLAUR ITGA2, , ITGA5 SERPINE1
Regeneration	NOTCH3	SOCS3, SERPINE1 PLAU, PLAUR

표 2. PDRN을 처리하지 않은 각질형성세포와 PDRN 150 µg/mL 처리한 각질형성세포 간의 차별화된 유전자 발현 결과 (p<0.01)

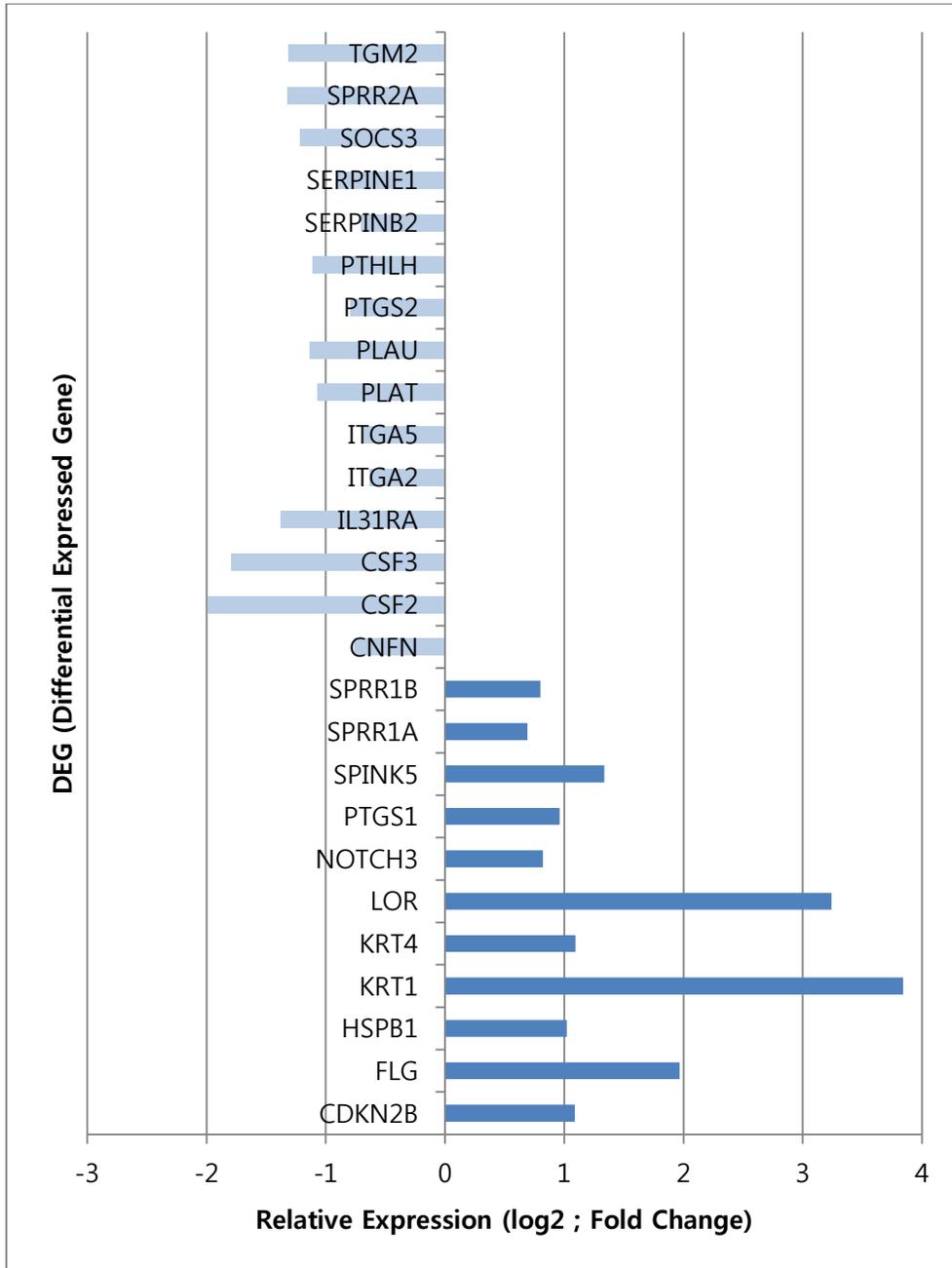


그림 7. PDRN을 처리하지 않은 각질형성세포와 PDRN 150 µg/mL 처리한 각질형성세포 간의 차별화된 유전자 발현 결과 (p<0.01)

IV. 고찰

MicroRNA는 19-24개의 nucleotide로 구성된 작은 RNA로 표적 유전자의 mRNA 3' 말단의 특정 부위와 상보적으로 결합하여 세포 내 유전자 발현을 조절한다 (Schneider., 2012). 하나의 microRNA가 수백 개의 유전자들을 조절할 수도 있으며 하나의 유전자가 여러 개의 microRNA에 의해 조절되기도 한다. 이러한 microRNA는 새로운 형태의 생체 조절 물질로서 다양한 생물학적 과정에 관여할 것으로 생각되고 있으며 피부 각질형성세포의 분화와 증식과 같은 피부 생물학적 과정도 조절 하는 것으로 알려져 있다. 표피의 분화 및 증식과 연관된 MIR203, MIR34a/c, 줄기 세포 분화에 관여하는 MIR125b, 모발 주기와 연관되어 MIR31 등이 보고된 바 있다 (Hildebrand et al., 2011). 이 중 MIR203은 중층 상피에서 줄기 세포 관련 p63의 발현을 억제하여 표피 세포의 기저부에서 상층부로 이동 조절한다. 또한 피부과의 대표적 질환인 건선에서 그 발현이 증가되어 있는데, SOCS3에 작용하여 염증 반응과 각질형성세포의 증식에 관여한다 (Joyce et al., 2011). 이 외에도 MIR155와 아토피 피부염, MIR125b, MIR203, MIR221/222와 건선, MIR196a, MIR137, MIR182, MIR193b와 악성 흑색종과의 연관성이 알려져 있다 (Schneider., 2012).

피부가 손상을 받으면 피부의 항상성 유지를 위한 상처 치유가 시작되는데 크게 염증 반응, 재상피화, 육아조직 형성, 기저막과 세포외 기질의 리모델링, 표피와 진피의 성숙 등의 과정을 거친다. 이 과정에는 중성구, 대식세포, 혈소판, 각질형성세포, 섬유모세포 등의 다양한

세포들과 사이토카인, 성장 인자들이 유기적으로 관여하게 된다 (Raja et al., 2007). MicroRNA는 이러한 상처 치유 과정의 특정 단계에서도 조절자로 작용하여 피부 상처 치유에 영향을 미치게 된다. (Barnerjee et al., 2011).

염증 반응은 면역 반응을 개시하여 감염을 제거하고 상처 치유 과정의 다음 단계를 가능하게 하는 사이토카인과 성장 인자들을 제공한다. Harris 등은 microarray를 통해 인간의 배꼽 정맥 내피 세포에서 MIR126이 높게 발현되는 것을 확인하였고, 이를 knock down 시켰을 때 백혈구의 내피세포로의 부착이 증가하고 TNF- α 에 의해 VCAM-1의 발현이 유도된다고 하였다. VCAM-1의 발현은 백혈구의 혈류로부터 상처 부위로의 이동을 촉진시켜 염증 반응을 가속화 시킨다 (Harris et al., 2008). MIR125b도 TNF- α 를 통해 염증 반응을 조절하는 것으로 알려졌다 (Suarez et al., 2010). TGF- β 는 상처 치유의 여러 단계에서 중요한 역할을 하는데 염증이 초기에 혈소판으로부터 분비되어 중성구, 단핵구, 대식세포 등의 다른 염증 세포를 유인하는 역할을 한다. 이러한 과정은 TGF β R1의 3'UTR에 결합하는 MIR128a에 의해 조절된다. 또한 상처 부위로 이동한 면역 세포들의 분화도 microRNA 조절 하에서 이루어지는데, MIR424는 단핵구와 대식세포의 분화에, MIR223은 골수성 세포들의 분화에 각각 관여하는 것으로 알려져 있다 (Roy and Sen., 2012). 이 외에도 MIR124a는 MCP-1을 억제하여 염증 반응을 감소시키고 (Nachamachi et al., 2009) MIR146a는 TLR4에 작용하여 염증 반응을 조절한다 (Roy and Sen., 2012).

재상피화 과정은 상처 기저부 기질의 형성, 표피 각질형성세포의 상처부위로의 이동, 각질형성세포의 증식, 새롭게 형성된 상피의 분화

등의 단계를 포함한다 (Raja et al., 2007). 재상피화 과정에서 필수적인 단계인 각질형성세포의 이동은 다양한 신호 전달 체계를 통해 정교하게 조절된다 (Ridly et al., 2003). MIR205는 SHIP2를 억제하여 Akt 신호 전달 체계 활성화를 통해 각질형성세포의 이동을 촉진시키고 이 과정은 또 다른 microRNA인 MIR184에 의해 길항된다 (Yu et al., 2010). 표피의 분화 및 건선과 연관되어 앞서 언급된 MIR203은 표피의 기저층 상부에 발견되는 가장 풍부한 microRNA 중 하나로 p63을 억제할 뿐 아니라 (Sonkoly et al., 2010) GTP 결합 단백질의 일종인 Ran1, actin에 대한 조절자로 작용하는 Rho1을 직접 억제하여 각질형성세포의 이동과 증식을 조절한다 (Viticchie et al., 2012). 또한 SOCS3를 감소시켜 염증 반응에 관여하고 (Sonkoly et al., 2007) HGF에 의해 유도된 각질형성세포의 이동을 조절한다고 보고 된 바 있다 (Tokumaru et al., 2005). MIR210은 저산소증 상태에서 HIF-1 α 를 통해 유도되고 E2F3 전사 인자를 억제시켜 상처 변연부 각질형성세포의 증식을 억제한다 (Biswas et al., 2010). 이는 상처가 치유되지 않고 지속되는 원인 중 하나로 만성 상처는 허혈에 의한 저산소 상태에서 MIR210이 증가하고 각질형성세포 증식이 억제되어 발생한다 (Sen, 2009).

포유류의 태아 피부는 임신 말기까지는 흉터 없이 치유되는데 이러한 과정은 TGF- β 와 밀접한 연관성이 있다. TGF- β 의 아형 중 TGF- β 1, TGF- β 2는 흉터를 형성하는 방향으로, TGF- β 3는 흉터를 줄이는 방향으로 작용한다 (Shah et al., 1995). 상처 리모델링 과정에 관여하는 microRNA 중 MIR29a는 1형과 2형 콜라겐 발현을 직접적으로 조절하고 (Maurer et al., 2010), MIR29b, MIR29c는 임신 후기부터 배아에서 그 발현이 증가하여 TGF- β 신호 전달과 연관된 Smads, β -catenin을 조절한다 (Cheung et al., 2010). 또한

MIR192는 SIP1에 작용하여 1형 콜라겐 발현을 증가시킨다 (Kato et al., 2007).

한편 상처 치유 과정에서 C-Jun, PPARs, FOXO1, STAT3 등의 전사 인자들도 표적 유전자 전사 과정을 활성화시키거나 억제시켜 세포 증식과 자멸, 사이토카인 분비, 염증 반응, 분화, 항산화 작용 등의 다양한 세포반응을 조절한다. Ponugoti 등은 정상적인 상처 치유 과정에서 FOXO1의 역할을 알아보기 위해 진행된 실험 결과 keratinocyte-specific FOXO1 deletion mice에서 상처 치유가 지연되었다고 하였다. 이들은 FOXO1이 상처 회복 과정에서 각질형성세포에 미치는 직접적인 효과를 알기 위해 FOXO1 siRNA를 이용하여 FOXO1 knock down 실험을 진행하여 상처 틈 사이에 존재하는 각질형성세포 수의 감소와 각질형성세포의 이동에 관여하는 TGF- β 1 발현 감소를 확인하였다. 또한 FOXO1 발현 감소가 활성 산소를 증가시키고 각질형성세포를 산화적 스트레스에 취약하게 하여 각질형성세포의 이동과 증식을 감소시키고 세포자멸을 증가시킨다고 하였다. 즉 FOXO1은 각질형성세포의 이동에 필수적인 TGF- β 1의 발현을 증가시키고 과도한 활성 산소로부터 각질형성세포를 보호하여 상처 치유를 촉진시킬 것이라고 보고하였다 (Ponugoti et al., 2013). 또 다른 전사인자인 STAT3는 EGF, TGF- α , HB-EGF, HGF, IL-6 등에 의해 활성화되어 각질형성세포의 이동을 촉진시킨다 (Tarnawski and Jones., 1998; Yasukawa et al., 2003; Tokumaru et al., 2005).

Sano 등은 keratinocyte-specific STAT3 - disrupted mice에서 각질형성세포의 이동이 현저히 감소하고 상처 치유가 지연된다고 하였다. (Sano et al., 1999). 또한 STAT3와 연관된 상처 치유 과정에서

SOCS3가 STAT3의 과도한 활성을 조절하여 적절한 상처 치유를 가능하게 한다는 보고가 있었다 (Zhu et al., 2008).

표피 줄기세포의 증식 능력과 연관된 최근의 연구에서는 MIR135b가 표피 줄기세포의 조절과 유지에 중요한 역할을 하는 4형 콜라겐 (COL4A3) 발현을 조절하여 표피 기저 세포의 증식 능력에 영향을 미친다고 하였다 (Choi et al., 2014).

이번 연구에서는 MIR135b가 상처 치유에 관여하는지 알아보기 위해 상처 치유에 효과적인 물질로 이미 알려진 PDRN을 각질형성세포에 처리한 후 MIR135b 발현 변화를 일으키는지 알아보려고 했고, 실험 결과 각질형성세포의 MIR135b 발현 감소를 확인할 수 있었다. MIR135b의 표적 유전자로 알려진 COL4A3 이외에 MIR135b의 새로운 표적 유전자를 찾아 상처 치유 과정에서 그 역할을 알아보려고 생물 정보학적 기법을 활용하여 몇 개의 후보 유전자들을 선별하였다.

이 중 정상적인 상처 치유 과정에서 TGF- β 1을 증가시키고 각질형성세포의 이동을 향상시켜 상처 치유를 촉진시키는 중요한 전사 인자로 알려진 FOXO1 (Hameedaldeen et al., 2014)에 대한 luciferase reporter assay를 통해 FOXO1이 MIR135b의 표적 유전자임을 확인하였으며 MIR135b를 각질형성세포에 직접 transfection시킨 후 FOXO1 단백질의 발현 감소를 western blot을 통해 확인하였다. 또한 PDRN을 각질형성세포에 처리하여 MIR135b의 표적인 FOXO1 mRNA 발현 증가를 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

마지막으로 PDRN을 각질형성세포에 처리한 후 일어나는 유전자 발현 변화를 보기 위해 NGS를 시행한 결과 MIR135b에 대한 추정 결합 부위를 가진 유전자 중에는 기존 연구에서 표적 유전자로 알려진 COL4A3, 본 연구에서 luciferase assay를 통해 MIR135b의 표적 유전자로 확인된 FOXO1 외에도 DSG3, ITGAV의 발현 증가가 있었다. 또

한 표피의 발달과 분화, 상처 치유와 연관된 유전자들로 알려진 SPRR1A, SPRR1B, NOTCH3, SERPINE1, SERPINB2, SOCS3 등의 발현 변화를 확인하였다.

MIR135b는 이번 연구를 통해 상처 치유와 연관된 전사 인자로 알려진 FOXO1 발현을 조절하는 microRNA로 밝혀졌다. PDRN을 각질형성 세포에 처리 후 MIR135b에 추정 결합 부위를 가지는 유전자 중 DSG3, ITGAV의 발현 증가는 이들이 MIR135b의 새로운 표적 유전자일 가능성을 암시해 준다. Desmoglein 3는 표피 세포 사이의 부착에 관여하며 세포 내 신호 전달 과정을 통해 표피 세포의 증식과 이동, 분화에 관여할 것이라는 연구 결과가 있었다 (Mannan et al., 2011). Integrin αv 는 정상 표피에서는 발현이 미미하지만 상처 부위의 이동하는 각질형성 세포에서 그 발현이 증가하며 integrin $\beta 5$, $\beta 6$ 와 각각 heterodimer를 형성하여 상처의 재상피화에 기여할 것으로 보인다 (Clark et al., 1996). 향후 연구를 통해 MIR135b의 새로운 표적 유전자로 DSG3, ITGAV를 확인할 수 있다면 상처 치유 과정에서 MIR135b의 역할에 대한 이해를 넓힐 수 있을 것으로 보인다.

SPRR 유전자군 (gene family)은 인간 염색체 1q21에 위치하고 있는 EDC (epidermal differentiation complex)의 일부로 표피의 분화 및 각질화를 조절한다. SPRR 단백질은 다양한 형태의 스트레스로부터 유도되어 피부 장벽을 회복하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 (Carbral et al., 2001). 배양된 각질형성세포에 시행한 wound scratch assay에서 SPRR 단백질은 상처 변연부에 발현이 크게 증가하고 돌출되어 이동하고 있는 각질형성세포에서 가장 높게 발현되었다. SPRR 발현과 각질형성세포 이동과의 직접적인 연관성을 알아보기 위한 실험에서는 SPRR 유전자에 대한 shRNA를 발현하는 각질형성세포에서 SPRR 발현이 감소하여 세포 이동이 감소하고 상처 치유가 지연된다고 하였다. Vermeij 등은 이에 대한 기전으로 SPRR단백이 세포 내에서 과도한 ROS를 제거하여

상처 치유 과정에서 각질형성세포의 이동을 향상 시킬 것이라고 하였다. (Vermeij and Backendorf., 2010). 본 연구에서 각질형성세포에 PDRN을 처리한 후 NGS 결과에서 SPRR1A 및 SPRR1B의 발현 증가를 확인할 수 있었고 이를 통해 PDRN이 상처 치유 과정에서 SPRR 유전자들의 발현 증가를 통해 각질형성세포의 이동을 촉진시킬 수도 있을 것으로 생각되었다.

Sonkoly 등은 분화 정도에 따른 각질형성세포의 microRNA 발현 차이를 보기 위해 일차 배양된 각질형성세포에 저농도와 고농도의 칼슘을 각각 처리하여 48시간 후 발현된 microRNA를 확인하였는데, MIR17 family (MIR20a, MIR19a, MIR19b, MIR92, MIR93), MIR221 family (MIR221, MIR222), MIR26 family (MIR26a, MIR26b), MIR99 family (MIR99a, MIR100), MIR125 family (MIR125a, MIR125b), MIR15 family (MIR15b, MIR16) 등은 증식하고 있는 각질형성세포와 분화 중인 각질형성세포 모두에서 높게 발현되었으나 MIR203은 분화 중인 각질형성세포에서만 높게 발현되었다 (Sonkoly et al., 2010). 이러한 microRNA 중에서 MIR222가 SPRR1A에 대한 추정 결합 부위를 가지고 있다 (www.targetscan.org). 기존 보고에서는 MIR222가 TIMP3 (tissue inhibitor of MMP3)를 억제시켜 MMP를 활성화시킴으로써 각질형성세포의 이동과 증식에 관여할 것이라고 하였다 (Zibert et al., 2010). 이번 연구에서는 MIR222와 SPRR1A에 대한 luciferase assay를 시행해 보지는 못했으나 SPRR1A가 MIR222의 새로운 표적 유전자임을 확인한다면 상처 치유 과정을 조절하는 MIR222의 작용 기전에 대한 이해를 넓힐 수 있을 것이다.

재상피화 과정에서 각질형성세포에 의해 plasminogen이 plasmin으로 활성화되는 과정은 각질형성세포 이동과 관련된 세포 주변부 단백질 분해에 중요하다 (Romer et al., 1988). 이러한 활성화는 PA (plasminogen activator)에 의해 이루어지는데 각질형성세포는 tPA, uPA 두 종류를

생산한다. 표피 결손을 채우기 위해 이동 중인 각질형성세포에서는 uPA와 uPA-R가 유도되고 plasmin에 의한 단백질 분해는 각질형성세포가 임시로 형성된 fibrin 기질을 뚫고 이동할 수 있게 한다 (Clark et al., 1982). PA는 PAI (SERPIN)에 의해 조절되므로 PAI가 상처 치유 과정에서 일정 부분 역할을 하는 것으로 알려져 있고 (Simone and Higgins., 2015) 이 중 SERPINE1은 MIR145에 대한 추정 결합 부위를 가지고 있다 (www.targetscan.org). 이번 연구에서는 PDRN 처리 후 uPA (PLAU)와 tPA (PLAT) 및 PAI (SERPINE1, SERPINB2) 유전자 발현 감소를 확인 할 수 있었고 PDRN이 상처 치유 과정에서 각질형성세포의 이동에 필요한 단백 분해 과정에도 관여할 것으로 추정해 볼 수 있었다.

본 연구에서 각질형성세포에 PDRN을 처리 후 증가된 NOTCH3는 세포자멸을 억제하는 과정에 관여하며 MIR206에 의해 조절될 것으로 보여진다 (Mills and Cowin., 2013). 포유류에는 네 종류의 Notch (NOTCH1~4) 수용체가 존재하며 (Krebs et al., 2000) Notch 유전자들은 세포의 증식과 분화, 이동에 관여하는 것으로 알려졌다 (Jourte et al., 1998). 표피 세포에서 Notch 신호 전달은 각질형성세포의 분화에 연관된 것으로 알려졌는데 NOTCH1에 의한 신호 전달을 방해하면 표피 분화 표지자들의 발현 감소가 관찰된다는 보고가 있었다 (Rangarajan et al., 2001). HEK293 세포를 이용한 연구에서는 NOTCH3가 세포 사이의 상호작용을 매개하는 N-cadherin 발현을 증가시켜 세포 생존과 성장을 촉진시키고 PI3-Kinase/AKT 신호 전달 과정을 활성화시켜 세포자멸로부터 세포를 보호한다고 하였다. 또한 NOTCH3는 Wnt/TCF 경로를 통해 세포 증식에 관여한다(Wang et al., 2007).

MIR206은 골격근에 특이적인 microRNA로 근육 발달에 관여하고 (Kim et al., 2006) 에스트로겐 수용체를 표적으로 하여 에스트로겐 양성 지방암에서 그 발현이 감소되어 있는 것으로 알려져 있다 (Kondo et

al., 2008). 표피 증식 질환인 건선에서 그 발현이 증가되어 있다고 보고된 바 있으나 (Ichihara et al., 2011) 각질형성세포에서의 역할은 명확히 알려져 있지 않다. Song 등은 MIR206과 NOTCH3 유전자 3'UTR 사이의 상보성을 확인하고 자궁경부암 세포인 HeLa 세포를 이용한 luciferase assay를 통해 NOTCH3가 MIR206의 표적 유전자임을 확인하였다. 또한 이들은 MIR206이 NOTCH3 발현을 감소시킴으로써 세포자멸을 유도하고 HeLa 세포의 이동과 중심 형성을 억제하여 종양 억제자의 역할을 할 것으로 보고하였다 (Song et al., 2009). 피부 상처 치유 과정에서 MIR206의 역할에 대해 보고된 바는 없으나 재생피화 과정에서 NOTCH3를 통해 각질형성세포의 이동과 증식에 관여할 수도 있을 것으로 생각된다.

SOCS 단백질은 SOCS 1~7, CIS (cytokine inducible SH-2 containing protein) 여덟 종류로 구성되어 있으며 (Croker et al., 2008) 상처 치유와 연관된 다양한 사이토카인과 성장인자를 조절한다 (Feng et al., 2016). 최근 연구에서는 다리 정맥 궤양 환자들의 상처 변연부 조직 중 낫지 않은 만성 상처 부위에서 SOCS3가 높게 발현된다고 하였고 SOCS3가 IL-6에 의한 STAT3 활성화를 억제하여 상처 치유 과정의 염증기에 조절자 역할을 할 것이라고 보고하였다 (Feng Y et al., 2016). Linke 등은 SOCS3 발현이 상처 부위 각질형성세포에 미치는 영향을 알아보고자 쥐의 SOCS3 cDNA와 소의 keratin (K)5 promoter를 재조합한 Tsgn-K5/SOCS3 mice를 이용하여 실험을 진행하였다. 이들의 연구 결과에 의하면 Tsgn-K5/SOCS3 mice는 피부 표피의 기저층에 SOCS3의 지속적 발현을 보이고 여기서 추출된 각질형성세포에서는 STAT3의 인산화가 억제되었으며 wound scratch assay에서 각질형성세포의 이동 감소가 있었다. 또한 Tsgn-K5/SOCS3 mice에 인위적인 손상을 가했을 때 상처 변연부 상피는 위축된 상태로 관찰되며 상처 치유가 지연된다고 하였는데 위축된 상피에서는 각질형성세포의 증식이 현

저하게 감소하고 그 수도 감소되어 있었다. 따라서 이들은 각질형성세포에서 SOCS3가 세포 증식과 이동을 억제하여 재생피화 과정을 지연시킬 것이라고 보고하였다 (Linke et al., 2010).

SOCS3 발현을 조절하는 microRNA로는 앞서 기술한 바 있는 MIR203 (Sonkoly et al., 2007)과 MIR19a가 있다. MIR19a는 SOCS3 유전자의 3'UTR과 상보적인 결합 부위를 가지고 있으며 SOCS3 mRNA를 현저하게 감소시켜 STAT3를 통한 IFN- α 와 IL-6 신호 전달을 활성화시킨다는 보고가 있었다 (Collins et al., 2013). 이번 연구 결과에 따르면 PDRN 처리 후 각질형성세포에서 SOCS3의 발현 감소가 있었다. 이는 SOCS3를 지속적으로 발현하는 만성 상처의 치료에 PDRN이 효과를 보이는 임상 결과를 일부 설명해 준다. 또한 정상 표피의 분화 과정에 관여하는 MIR203이 SOCS3를 통해 상처 치유 과정의 염증기와 증식기에 조절자 역할을 할 것으로 보인다.

결론적으로 이번 연구 결과는 PDRN이 adenosine A_{2A} 수용체를 통한 기전 이외에도 재생피화 과정에서 각질형성세포의 이동과 증식에 관여하는 여러 유전자들의 발현과 이를 조절하는 다양한 microRNA들의 상호작용을 통해 상처 치유에 관여할 수 있는 가능성을 보여준다 (그림 8). 또한 다양한 유전자와 이를 조절하는 microRNA들이 관여하는 복잡한 상처 치유 과정에서 MIR135b와 새로운 표적 유전자인 FOXO1 발현 변화가 일정 부분 역할을 할 것으로 기대된다.

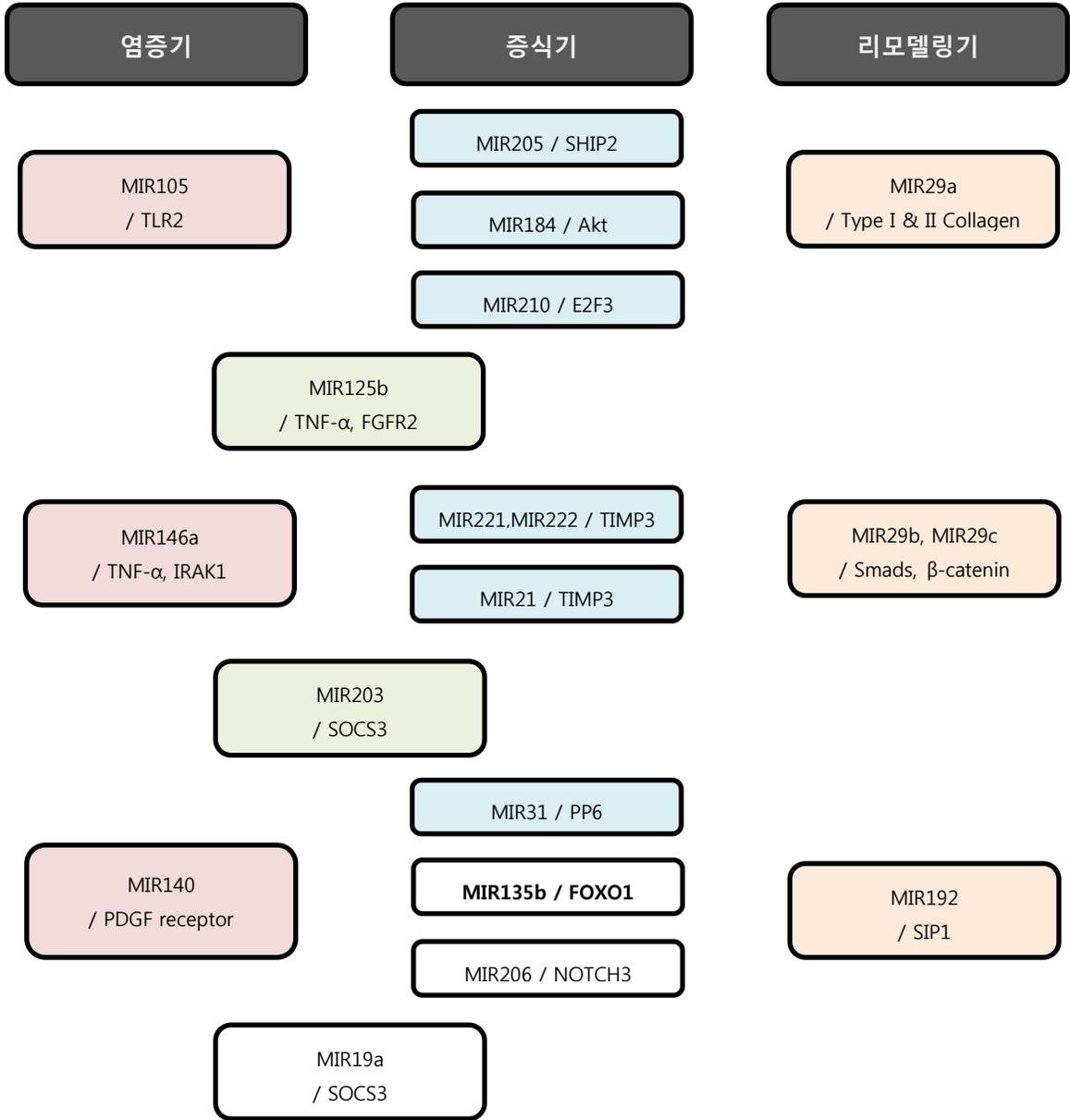


그림 8. 상처 치유에 관여하는 microRNAs와 표적 유전자

참 고 문 헌

- Reinke JM. and Sorg H. (2012) Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 49, 35–43.
- Martin P. (1997) Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81.
- Werne S. and Grose R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835–70.
- Eming SA., Krieg T. and Davidson JM. (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127, 514–25.
- Tziotzios C., Profyris C. and Sterling J. (2012) Cutaneous scarring pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction. *Am Acad Dermatol* 66, 13–24.
- DiPietro LA. and Polverini PJ. (1993) Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Inst Mitt* 92, 238–47.
- Leibovich SJ. and Rose R. (1975) The role of the macrophage in wound repair. *Am J Pathol* 78, 71–100.
- Sorg H., Krueger C. and Vollmar B. (2007) Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 211, 810–8.
- Barker TH. (2011) The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine.

Biomaterials 32, 4211–4

Madden JW. and Peacock EE. (1971) Studies on the biology of collagen during wound healing, 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. *Ann Surg* 174, 511–20.

Hinz B. (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J invest Dermatol* 127, 526–37.

Gurtner GC. and Evans GRD. (2000) Advances in head and neck reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 106, 672–82.

Robson MC., Steed DL. And Franz MG. (2001) Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 38, 72–140

Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–97.

Shilo S., Roy S., Khanna S. and Sen CK. (2007) MicroRNA in cutaneous wound healing: a new paradigm. *DNA Cell Biol* 26, 227–37.

Tonnesen MG., Feng X. and Clark RA. (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5, 40–6.

Suarez Y., Fernandez–Hernando C., Yu J., Gerber SA., Harrison KD., Pober JS., Iruela–Arispe ML., Merckenschlager M. and Sessa WC. (2008) Dicer–dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 14082–7.

Yu J., Ryan DG., Getsios S., Oliveria–Fernandes M., Fatima A. and

- Lavker RM. (2008) MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. Proc Natl Acad Sci USA 105, 19300-5.
- Biswas S., Roy S., Banerjee J., Hussain SR., Khanna S., Meenakshisundaram G., Kuppusamy P., Friedman A. and Sen CK. (2010) Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds. Proc Natl Acad Sci USA 107, 6976-81.
- van Rooij E., Sutherland LB., Thatcher JE., DiMaio JM., Naseem Rh., Marshall WS., Hill JA. and Olson EN. (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA 105, 13027-32.
- Xu F., Zhang C. and Graves DT. (2013) Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. BioMed Res Int 2013, 1-9.
- Kim DS., Cho HJ. and Choi HR. (2004) Isolation of human epidermal stem cells by adherence and reconstruction of skin equivalents. Cell Mol Life Sci 61, 2774-81.
- Joyce CE., Zhou X. and Sia J. (2011) Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. Hum mol Genet 20, 4025-40.
- Choi HR., Nam KM., Park SJ., Kim DS., Huh CH., Park WY. and Park

- KC. (2014). Suppression of miR135b increases the proliferative potential of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 134, 1161–4.
- Choi HR., Nam KM., Lee HS., Yang SH. Kim YS., Lee JS., Date A., Toyama K. and Park KC. (2016) Phlorizin, an active ingredient of *Eleutherococcus senticosus*, increases proliferative potential of keratinocytes with inhibition of MIR135b and increased expression of type IV collagen. *Oxidative Medicine and cellular Longevity* 6, ID 3859721.
- Li G., Gustafson–Brown C., Hanks SK., Nason K., Arbeit JM., Pogliano K., Wisdom RM. and Johnson RS. (2003) C–Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell* 4, 865–77.
- Michalik L., Feige JN.,Gelman L., Pedrazzini T.,Keller H., Desvergne B. and Wahli W. (2005) Selective expression of a dominant–negative form of peroxisome proliferator–activated receptor in keratinocytes leads to impaired epidermal healing. *Mo Endocrinol* 19, 2335–48.
- Michalik L., Desvergne B., Tan NS., Basu–Modak S., Escher P., Rieusset J., Peters JM., Kaya G., Gonzalez FJ. and Zakany J. (2001) Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator–activated receptor (PPAR) α and PPAR β mutant mice. *J Cell Biol* 135, 799–814.
- Ponugoti B., Xu F., Zhang C., Tian C., Pacios S. and Graves DT. (2013) FOXO1 promotes wound healing through the up–

regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress. *J Cell Biol* 203, 327–43.

Sini P., Denti A., Cattarini G., Daglio M., Tira ME. and Balduini C. (1999) Effect of polydeoxyribonucleotides on human fibroblasts in primary culture. *Cell Biochem Function* 17, 107–14.

Guizzardi S., Galli C., Govoni P., Boratto R., Cattarini G., Martini D., Belletti S. and Scandroglio R. (2003) polydeoxyribonucleotide promotes human osteoblast proliferation: a new proposal for bone tissue repair. *Life Sci* 73, 1973–83.

Galeano M., Bitto A., Altavilla D., Minutoli L., Polito F., Calo M., Lo Cascio P., Stagno d Alcontres F. and Squadrito F. (2008) Polydeoxyribonucleotide stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Wound Repair Regen* 16, 208–17.

Bitto A., Polito F., Altavilla D., Minutoli L., Migliorato A. and Squadrito F. (2008) polydeoxyribonucleotide (PDRN) restores blood flow in an experimental model of peripheral artery occlusive disease. *J Vasc Surg* 48, 1292–300.

Squadrito F., Bitto A., Altavilla D, Arcoraci V., de Caridi G., de Feo ME., Corrao S., Pallio G., Sterrantino C. and Minutoli L. (2014) The effect of PDRN, an adenosine receptor A2A agonist, on the healing of chronic diabetic foot ulcers: Results of a clinical trial. *J. clin Endocrinol. Metab* 99, E746–53.

- Lee Sh., Zheng Z., Kang JS., Kim DY., Oh Sh. and Cho SB. (2015) Therapeutic efficacy of autologous platelet-rich plasma and polydeoxyribonucleotide on female pattern hair loss. *Wound Repair Regen* 23, 30–6.
- Schneider MR. (2012) MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. *Brit J Dermatol* 166, 22–8
- Hildebrand J., Rutze M., Walz N., Gallinat S., Wenck H., Deppert W., Grundhoff A. and Knott A. (2011) A comprehensive analysis of microRNA expression during human keratinocyte differentiation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 131, 20–9
- Raja K., Sivamani K., Garcia MS. and Isseroff RR. (2007) Wound re-epithelialization” modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 12, 2849–68
- Banerjee J., Chan YC. and Sen CK. (2011) MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol Genomics* 43, 543–56
- Harris TA., Yamakuchi M., Ferlito M., Mendell JT. and Lowenstein CJ. (2008) MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci* 105, 1516–21
- Suarez Y., Wang C., Manes TD. and Pober JS. (2010) TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol* 184, 21–

- Roy S. and Sen CK. (2012) MiRNA in wound inflammation and angiogenesis. *Microcirculation* 19, 224–32
- Nachamachi Y., Kawano S., Takenokuchi M., Nishimura K., Sakai Y., Chin T., Saura R., Kurosaka M. and Kumagai S. (2009) MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 1294–304
- Ridley AJ., Schwartz MA., Burridge K., Firtel RA., Ginsberg MH., Borisy G., Parsons. JT. and Horwitz AR. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–9.
- Yu J., Peng H., Ruan Q., Fatima A., Getsios S. and Lavkar RM. (2010) MicroRNA-205 promotes keratinocytes migration via the lipid phosphatase SHIP2. *FASEB J* 24, 3950–9
- Sonkoly E., Wei T., Pavez Lorie EP., Suzuki H., Kato M., Torma H., Stahle M. and Pivarcsi A. (2010) Protein kinase C-dependent regulation of miR-203 induces the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 130, 124–34
- Viticchie G., Lena AM., Cianfarani F., Odorisio T., Annicchiarico-Petruzzelli M., Gelino G. and Candi E. (2012) MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell death and Disease* 3, e435
- Sonkoly E., Wei T., Jason PC., Saaf A., Lundeberg L., Tengvall-

- Linder M., Norstedt G., Alenius H., Homey B., Scheynius A., Sahle M. and Pivarcsi A. (2007) MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? PLoS One 2, e670
- Tokumar S. Koji S., Yamasaki K., Shirakata Y., Hanakawa Y., Yahata Y., Dai X., Tohyama M., Yang L., Yoshimura A. and Hashimoto K. (2005) SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. Biochem Biophys Res Commun 327, 100–5
- Sen CK. (2009) Wound healing essentials: let there be oxygen. Wound Repair Regen 17, 1–18
- Shah M., Foreman DM. and Ferguson MW. (1995) Neutralization of TGF-beta1 and TGF-beta2 or exogenous addition of TGF-beta3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. J Cell Sci 108, 985–1002
- Maurer B., Stanczyk J., Jungel A., Akhmetshina A., Trenkmann M., Brock M., Kowal-Bielecka O., Gay RE., Michel BA., Distler JH., Gay S. and Dister O. (2010) MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 62, 1733–43
- Cheung J., Yu H., Deng S. and Shen G. (2010) MicroRNA profiling in mid- and late-gestational fetal skin: implication for scarless wound healing. Tohoku J Exp Med 221, 203–9
- Kato M., Zhang J., Wang M., Lanting L., Yuan H., Rossi JJ. and Natarajan R. (2007) MicroRNA-192 in diabetic kidney

glomeruli and its function in TGF- β -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3432-7

Tarnawski AS. and Jones MK. (1998) The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. *J Clin Gastroenterol* 27, S12-20

Yasukawa H., Ohishi M., Mori H., Murakami M., Chinen T., Aki D., Hanada T., Takeda K., Akira S., Hoshijima M., Hirano T., Chien KR. and Yoshimura A. (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4, 551-6

Sano S., Itami S., Takeda K., Tarutani M., Yamaguchi Y., Miura H., Yoshikawa K., Akira S. and Takeda J. (1999) Keratinocyte-specific ablation of Stat 3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* 18, 4657-68

Zhu BM., Ishida Y., Robison GW., Pacher-Zavisin M., Yoshimura A., Murphy PM. and Hennighausen L. (2008) SOCS3 negatively regulates the gp130-STAT3 pathway in mouse skin wound healing. *J Invest Dermatol* 128, 1821-9

Mannan T., Jing S., Foroushania SH., Forune F. and Wan H. (2011) RNAi-mediated inhibition of the desmosomal cadherin (desmoglein3) impairs epithelial cell proliferation. *Cell Prolif*

44, 301–10

- Clark RAF., Ashcroft GS., Spencer MJ., Larjava H. and Ferguson MWJ. (1996) Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from $\alpha v \beta 5$ to $\alpha v \beta 6$ integrins. (1996) *Brit J Dermatol* 135, 46–51
- Carbral A., Voskamp P., Cleton-Jansen AM., South A., Nizetic D. and Backendorf C. (2001) Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *J Biol Chem* 276, 19231–7
- Vermeij WP. and Backendorf C. (2010) Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing. *PLoS One* 5, e11957
- Zibert JR., Lovendorf MB., Litman T., Olsen J., Kaczkowski B. and Skov L. (2010) MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *J Dermatol Sci* 58, 177–85
- Romer J., Bugge TH., Fyke C., Lund LR., Flick MJ., Degen JL. and Dano K. (1988) Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *J Invest Dermatol* 90, 790–5
- Clark RAF., Lanigan JM., DellaPelle P., Manseau E., Dvorak HF. and Colvin RB. (1982) Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 70, 264–9
- Simone TM. and Higgins PJ. (2015) Inhibition of SERPINE1 function attenuates wound closure in response to tissue

injury: a role for PAI-1 in re-epithelialization and granulation tissue formation. *J Dev Biol* 3, 11–24

Mills SJ. And Cowin AJ. (2013) MicroRNAs and their roles in wound repair and regeneration. *Wound practice and research* 21, 26–40

Krebs LT., Xue Y., Norton CR., Shutter JR., Maguire M., Sundberg JP., Gallahan D., Closson V., Kitajewski J., Callahan R., Smith GH., Stark KL. and Gridley T. (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14, 1343–52

Rangarajan A., Talora C., Okuyama R., Nicolas M., Mammucari C., Oh H., Aster JC., Krishna S., Metzger D., Chambon P., Miele L., Aguet M., Radtke F. and Dotto GP. (2001) Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth and entry into differentiation. *EMBO J* 20, 3427–36

Wang T., Holt CM., Xu C., Ridley C., Jones R P O., Baron M. and Trump D. (2007) Notch3 activation modulates cell growth behavior and cross-talk to Wnt/TCF signaling pathway. *Cell Signal* 19, 2458–67

Kim HK., Lee YS., Sivaprasad U., Malhortra A. and Dutta A. (2006) Muscle specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 174, 677–87

Kondo N., Toyama T., Sugiura H., Fujii Y. and Yamashita H. (2008) miR-206 expression is down-regulated in estrogen receptor α -positive human breast cancer. *Cancer Res* 68,

- Ichihara A., Jinnin M., Yamane K., Fujisawa A., Sakai K., Masuguchi S., Fukushima S., Maruo K. and Ihn H. (2011) MicroRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *Brit J Dermatol* 165, 1003–10
- Song G., Zhang Y. and Wang L. (2009) MicroRNA-203 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation. *J Biol Chem* 284, 31921–7
- Crocker BA., Kiu H. and Nicholson SE. (2008) SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19, 414–22
- Feng Y., Sanders AJ., Morgan LD., Harding KG. and Jiang WG. (2016) Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing. *Regen Med* 11, 193–209
- Feng Y., Sanders AJ., Ruge F., Morris CA., Harding KG. and Jiang WG. (2016) Expression of the SOCS family in human chronic wound tissues: Potential implications for SOCS in chronic wound healing. *Int J Mol Med* 38, 1349–58
- Linke A., Goren I., Bosl MR., Pfeilschifter J. and Frank S. (2010) The suppressor of cytokine signaling (SOCS)–3 determines keratinocyte proliferative and migratory potential during skin repair. *J Invest Dermatol* 130, 876–85
- Collins A., McCoy C., Lloyd A., Farrelly C. and Stevenson N. (2013) miR-19a: an effective regulator of SOCS3 and enhancer of JAK-STAT signaling. *PLoS One* 8, e69090

Hawkes JE., Nguyen GH., Fujita J., Florell SR., Duffin KC., Krueger
GG. and O'Connell RM. (2016) MicroRNAs in psoriasis. J
Invest Dermatol 136, 365–71

Abstract

The Roles of MicroRNAs and Target Genes in Cutaneous Wound Healing

Eun-Jung Kim

Department of Medicine

(Dermatology Major)

The Graduate School

Seoul National University

Cutaneous wound healing is a complex physiologic process in which a number of factors act to restore skin function after injury. MicroRNAs are a group of RNAs that modulate gene expression by interacting with the specific region of the corresponding target gene messenger RNA (mRNA). Cutaneous wound healing involves changes in the expression of specific microRNAs and target genes, so microRNAs are important regulators in wound healing. Recently, a study showed that type IV collagen, which is the main component of the basement membrane that provides the microenvironment for regulation and homeostasis of the epidermal stem cells, is a target of MIR135b and that the suppression of MIR135b may improve the microenvironment and may increase the proliferative potential

of normal human keratinocyte.

In this study, we investigated the role of MIR135b in cutaneous wound healing process by identifying its new target gene. Using the bioinformatics technique, candidate genes and putative binding sites were screened, and FOXO1 was identified as a target gene of MIR135b by luciferase reporter assay for FOXO1, which plays an important role in normal wound healing process. After keratinocyte transfection with MIR135b, the decrease of FOXO1 protein expression was confirmed by western blotting.

In addition, qRT-PCR analysis showed that the level of MIR135b was decreased and expression of FOXO1 mRNA was increased in keratinocytes treated with PDRN, a wound healing booster.

These results demonstrate that PDRN can inhibit MIR135b expression and increase its target FOXO1 expression, promoting normal skin wound healing processes, suggesting the possibility of a new wound healing pathway, MIR135b-FOXO1.

Key words: cutaneous wound healing, microRNA, MIR135b, FOXO1, PDRN

Student Number: 2009-31076