

SKH-1 Hairless Mice에서의 히알루론산 경구 투여를 통한 피부 광노화 개선 효과

이성진 · 서윤희* · 윤민규 · 유희종 · †최수영*

(주)바이오랜드, *충북대학교 생물학과

Anti Photoaging Effects of Hyaluronic Acid following Oral Administration in SKH-1 Hairless Mice

Sung-jin Lee, YoonHee Seo*, Min-kyu Yun, Heui-jong Yu and †Soo-Young Choe*

R&D Center, Bioland Ltd, Ansan 15407, Korea

*Dept. of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Abstract

Photoaging is the main extrinsic aging factor that is induced due to UVB. Many studies have revealed that application of hyaluronic acid to the skin is effective in healing photoaging. However, the effect of hyaluronic acid through oral administration is unclear. The aim of this research was to investigate the effect on skin photoaging after oral administration of hyaluronic acid. During a ten week study, hyaluronic acid was fed to hairless mice, which were illuminated by UV radiation. After ten weeks, wrinkle indicator and histological changes were determined. Compared with the control group, the sample group had a decrease in wrinkle depth, thickness, and number. Especially, the HA 160 mg/kg group had a similar value of wrinkle depth ($19.44 \pm 0.75 \mu\text{m}$), number (654.00 ± 98.34), and thickness ($1.35 \pm 0.08 \text{ mm}$), when compared with the RA (retinoic acid) group ($19.28 \pm 0.95 \mu\text{m}$, 653.57 ± 83.54 , and $1.34 \pm 0.07 \text{ mm}$ respectively). Also, the treated group showed improved elastosis and decreased collagen degradation resulting from UV irradiation. Thus, we can conclude that hyaluronic acid has a positive effect in improving skin photoaging induced by UV radiation. Hyaluronic acid therefore has the potential to be an ingredient in skin health function foods.

Key words: hyaluronic acid, UVB, wrinkles, anti-aging, skin

서론

국민의 소득 증대에 따라 외모를 아름답게 관리하고 싶은 욕구가 많이 생겨나고 있으며, 그 욕구를 충족할 수 있는 화장품 및 건강기능성식품의 판매가 증대되고 있다(Gang 등 2009). 뿐만 아니라 전 세계적으로 노령화 사회가 진행됨에 따라 항노화(anti-aging)에 대한 관심이 점점 더 증가하고 있으며, 이는 여성뿐만 아니라 남성 역시 많은 관심을 보이고 있는 추세이다(Son 등 2005).

피부는 미(美)를 나타내는 매개체의 역할을 하며, 피부 노화방지는 화장품 및 건강기능식품 산업에서 많은 관심을 표

명하고 있다. 피부 노화의 원인은 크게 두 가지로 나눌 수 있다(Kim 등 2008). 내재적 노화는 유전적 요인이 크며, 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 진행이 되는 노화이다(Gilchrest BA 1982). 반면, 외재적 노화는 환경적 요인이 크며, 특히 UVB에 의한 피부 손상(광노화)이 가장 큰 원인으로 알려져 있다(Gilchrest BA 1990). UVB는 종양억제 유전자인 p53의 돌연변이(mutation)를 진행시켜 자가세포사멸(apoptosis)을 일으켜 피부암을 유발할 수 있다(Kanjilal 등 1993; Kress 등 1992). 또한, 세포 주기를 감소시켜 새로운 피부의 재생을 억제한다(Brash 등 1991; Ziegler 등 1993). UV로부터 피해를 입은 신체는 활성산소종(ROS; Reactive Oxygen Species)을 생성하는데

† Corresponding author: Soo-Young Choe, Dept. of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea. Tel: +82-10-4147-2288, Fax: +82-43-260-2298, E-mail: schoe@chungbuk.ac.kr

(Ichihashi 등 2003), ROS는 체내의 MMP(Matrix Metalloproteinase) 활성을 증가시켜 콜라겐의 분해를 촉진시키며(Fisher 등 1997), 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 활성화하여 히알루론산을 분해한다(Esser 등 2012).

히알루론산(HA; Hyaluronic acid)은 아미노당과 우론산으로 이루어지는 복잡한 다당류로서, N-아세틸글루코사민과 글루쿠론산으로 이루어진 고분자 화합물이다(Laurent & Fraser 1992). 소의 안구 또는 닭의 벼슬에서 추출을 하였지만, 최근에는 미생물의 산물을 통해 얻고 있다(Kaye 1950; Laurent 등 1960; Swann 1968). HA는 자기 무게의 1,000배 가량의 물을 함유할 수 있으며, 피부에서 수분을 저장하고 유지하는 역할을 한다(Tammi 등 1991). 사람은 나이가 들어감에 따라 피부 내에 존재하는 HA의 양이 점점 줄어드는데, 이로 인해 피부의 윤기가 줄어들고 주름살이 늘어간다(Meyer & Stern 1994). HA를 피부에 도포하였을 때 광노화로 인한 피부노화의 개선 효과는 증명되었지만(Pavicic 등 2011), HA 경구 투여 시, UVB로부터 발생된 피부 광노화 개선 효과에 관한 연구 결과는 아직 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 HA를 hairless 쥐에게 경구 투여하였을 때 주름 개선 및 피부 두께 등의 평가를 진행하였으며, 피부 조직학적 평가를 통해 UV로부터 유도된 광노화에 대한 HA의 피부 개선효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 히알루론산의 제조

본 연구에서 사용한 HA는 다음과 같이 제조하였다. *Streptococcus zooepidemicus*를 37°C, pH 7의 조건에서 16~18시간 배양한다. 사용된 배지는 멸균수에 포도당, 소이펄톤, 이스트와 KH_2PO_4 를 첨가하여 제조하였다. 배양이 완료되면, 배지를 살균 및 여과한다. 포도당을 포함하는 저분자 부산물은 한외여과를 진행한다. 아세트산나트륨(sodium acetate)을 처리 후, 에탄올을 첨가하여 침전과정을 진행한다. 침전물을 수득한 후 건조하여 HA 분말을 얻는다.

2. 실험동물 사육 및 사료 섭취

본 평가를 위한 실험동물은 4주령 암컷 SKH-1 hairless mice를 (주)대한바이오텍(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 동물 입수 후 2주의 적응기간을 거친 후, 8마리씩 총 6군으로 분리하여 실험하였다. 실험군은 정상 대조군(Nor. Group), 주름 유발군(Con. group), 양성대조군(Retinoic acid; RA), HA에 대한 농도에 따른 세 군(10 mg/kg, 40 mg/kg, 160 mg/kg)을 포함한 총 6군으로 나누어 14주에 걸쳐 실험을 진행하였다(Fig. 1). 실험동물은 일정한 조건(온도: 22 ± 2 °C, 습도: $50 \pm 10\%$, 명암

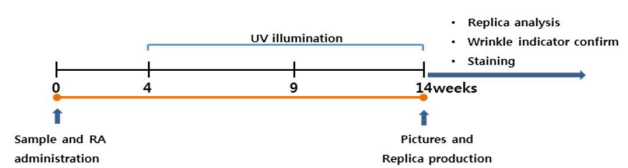


Fig. 1. Period for experiment and its abbreviation

주기: 12시간 점등/12시간 소등, 조도: 200~300 Lux, 환기회수: 10~15 회/시간)의 환경에서 사육하였다. 사료는 121°C에서 15분간 멸균하여 건조시킨 후 자유섭취 하였으며, 음수는 1차 증류수로 자유급수 하였다.

3. 주름유도

광노화에 의한 주름을 발생시키기 위해 정상 대조군을 제외한 5군에 매 주 3번 조사를 원칙으로 하여 UVB 조사를 실시하였다(UV 조사장치, L&T, Korea). 먼저 예비시험을 통해 100 mJ/cm^2 , 150 mJ/cm^2 , 200 mJ/cm^2 조사량을 조사하고, 24시간이 지난 후 최초의 홍반이 나타나는 자외선 조사량인 1MED (minimal erythemal dose)를 150 mJ/cm^2 로 정하였다. UV 조사를 시작한 첫째 주에 1 MED(150 mJ/cm^2), 둘째 주에 2 MED, 셋째 주에 3 MED, 넷째 주에서 열째 주까지 4 MED를 조사하였다(Fig. 1). 10주 동안 조사하여 총 UV 조사량이 90 MED (13,500 mJ/cm^2)가 되도록 했으며, UV 조사량은 UV radiometer로 측정하였다.

4. 시험물질 투여 및 기간

양성 대조군에 투여하는 시험물질은 Retinoic acid(RA)로 일주일당 0.01% 농도로 3회, 100 $\mu\text{L}/\text{회}$ 도포하였다. HA 투여군은 UVB 조사 4주전부터 투여하여 UVB 조사기간 10주를 포함한 총 14주 동안 10 mL/kg으로 1일 1회 경구 투여하였다(Fig. 1).

5. In vivo에서의 주름 개선 평가

UVB에 의해 생성된 주름에 대한 개선 효과를 알아보기 위해 육안평가 및 주름 replica를 제작하여 주름 길이와 깊이, 주름의 수를 측정하였다(Bae 등 2012). 주름 replica는 10주 후 제작하였다. Mice를 Ether로 마취하여 등 아래쪽 동일한 부위에 disc(diameter 10 mm)를 붙이고 silicon rubber(silflo, Germany)에 catalyst 1~2방울과 섞어주어 disc 위에 바른다. 1~2분 후에 silicon rubber가 굳으면 떼어내어 측정용 replica에 고정시켜 dust-free 상태에서 skin visioline VL650(Courage Khazaka, Germany)을 이용해 주름의 개수와 깊이 그리고 주름 길이를 측정하였다. 또한 사진촬영(D3.100, Nikon, Japan)을 통해 육안적 피부변화의 관찰에 대한 참고자료로서 이용하였고, UV

조사 개시 후 10주 후 실시하였다.

결과 및 고찰

6. 피부 두께 측정

UV 조사가 시작된 시점으로부터 10주 후 쥐의 등 가운데 부분에서 조금 아래쪽으로 너비 1 cm 되는 부위를 표시하여 vernier caliper로 피부 두께를 측정하였다.

7. 피부조직병리학적 관찰

광노화에 의해 발생한 교원섬유와 탄력섬유의 양과 형태 및 HA의 급여효과를 관찰하기 위해 Masson's trichrome staining 및 Verhoeff's staining을 진행하였다.

1) Masson's trichrome 염색 관찰

UVB로부터 발생한 광노화 중 교원섬유의 양과 형태를 관찰하기 위해 Masson's trichrome staining을 진행하였다(Song 등 2013). 쥐를 에테르로 과마취하여 희생한 후, 피부조직을 취하여 10% formalin 용액에 24시간 이상 고정한다. 이후 수세, 탈수, 투명, 칩투 과정을 진행하고, 이 과정을 거친 조직을 paraffin으로 포매하여 5 μ m의 두께로 절편한 후 염색과정을 진행하였다. 염색은 56°C Bouin's solution에 15분간 담그고, Masson's trichrome(Masson's trichrome stain LG solution; Sigma, St. Louis, MO, USA) 염색 후 진피층 내의 교원섬유의 양과 형태를 광학현미경(Olympus CKX41, Tokyo, Japan)을 사용해 200배의 배율로 관찰하였다.

2) Verhoeff's staining

광노화 중 탄력섬유의 양과 형태 및 HA 급여의 효과를 관찰하기 위해 Verhoeff's staining을 진행하였다(Bae 등 2012). 쥐를 에테르로 과마취하여 희생한 후 피부조직을 취하여 10% formalin 용액에 24시간 이상 고정한다. 이후 수세, 탈수, 투명, 칩투 과정을 진행하고, 이 과정을 거친 조직을 paraffin으로 포매하여 5 μ m의 두께로 절편한 후 염색과정을 진행하였다. 염색은 elastin staining kit(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 있는 elastin stain solution으로 먼저 염색하고, ferric chloride solution으로 감별 수세 후 Van Gieson solution으로 염색하여 진피층 내의 탄력섬유의 변형을 광학현미경(Olympus CKK41, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였다.

8. 통계처리

모든 자료들은 평균과 표준편차로 나타내었으며, SPSS program(SPSS INC, ver.12.0)을 이용하여 통계해석을 실시하였다. One-way analysis of variation(ANOVA)을 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험 군을 확인하기 위해 Dunnett's *t*-test 다중검정을 실시하였다(유의수준 $p < 0.05$).

1. 체중 변화 관찰

시험기간 동안 실험동물의 체중 변화를 관찰하였다. 시험 기간 중 정상 군을 포함한 모든 군에서 체중 증가가 있었으며, 각 군간 체중에 대한 통계적 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

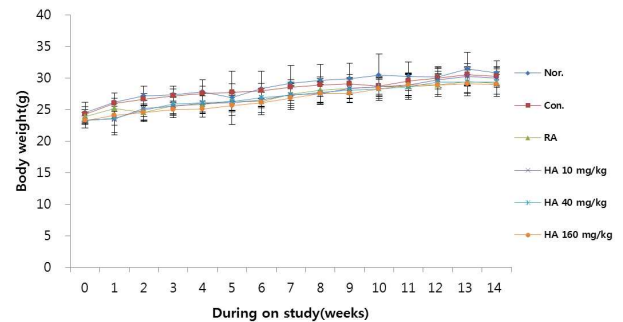


Fig. 2. Body weights in hairless mice. Each point represents the mean (n=8)

2. 주름 Replica를 통한 피부주름의 형태학적 변화

UVB 조사로 유도된 광노화로부터 HA가 주름에 미치는 영향을 알아보기 위하여 UVB 조사 후 10주가 지난 후의 시험동물의 등에 replica를 이용해 피부주름의 형태를 확인하였다(Fig. 3). 주름유발군(Con.)의 주름은 정상대조군(Nor.)에 비해 굴곡이 두껍고 깊은 주름의 형상을 띠고 있었다. 농도별로 시료를 급여하였을 때, 시료의 농도가 높아질수록 주름의 깊이와 형상이 주름유발군과 분명하게 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

3. In vivo에서의 주름지표의 변화

10주간의 UVB 조사가 끝난 후, 시험동물의 등에 주름 replica를 제작하여 주름지표를 측정하였다(Fig. 4). 주름 유발 10주차에서는 주름유발군은 주름의 깊이가 $22.46 \pm 2.67 \mu$ m, 주름의 두께는 1.68 ± 0.05 mm, 주름 수는 793.60 ± 92.59 로 정상대조군(Nor.)에 비해 증가하였다. 양성대조군(RA)에서 주름의 깊이, 두께 및 주름 개수는 각각 $19.28 \pm 0.95 \mu$ m, 1.34 ± 0.07 mm, 653.57 ± 83.54 로 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. HA 실험군 역시 주름의 깊이, 두께, 주름 수가 주름유발군에 비해 줄어드는 경향을 보였으며, 160 mg/kg의 농도에서는 주름의 깊이가 $19.44 \pm 0.75 \mu$ m, 주름의 두께는 1.35 ± 0.08 mm, 주름 수는 645.00 ± 98.34 로 양성대조군의 결과와 비슷한 수치를 보였다. 반면, 주름 길이는 주름유발군에 비해 감소하는 경향이 있지만, 통계적 유의성은 없었다. 40 mg/kg과 160 mg/kg의 결과에서 주름의 깊이와 길이의 효능은 확인할 수 있었

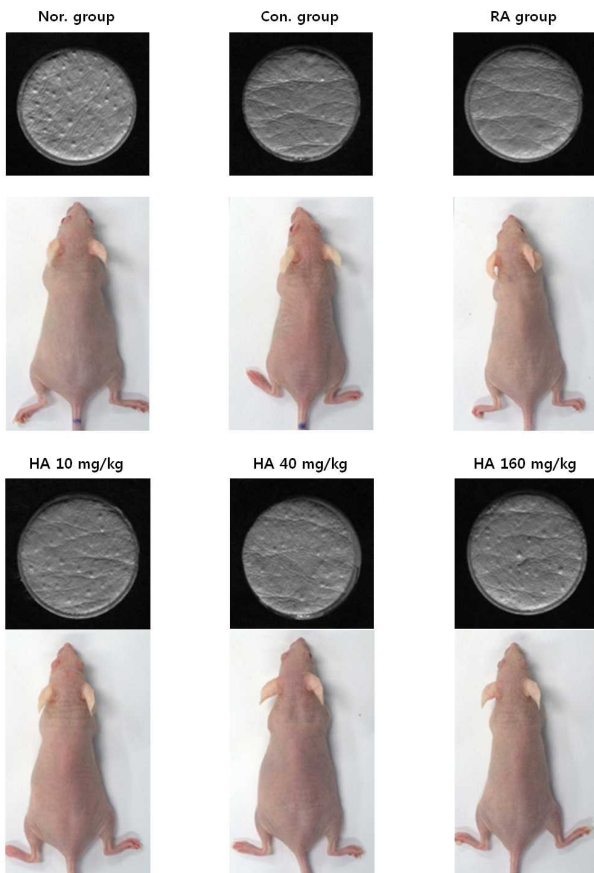


Fig. 3. Anti-wrinkle effect of HA on UVB-induced hairless mice skin at 10 weeks later

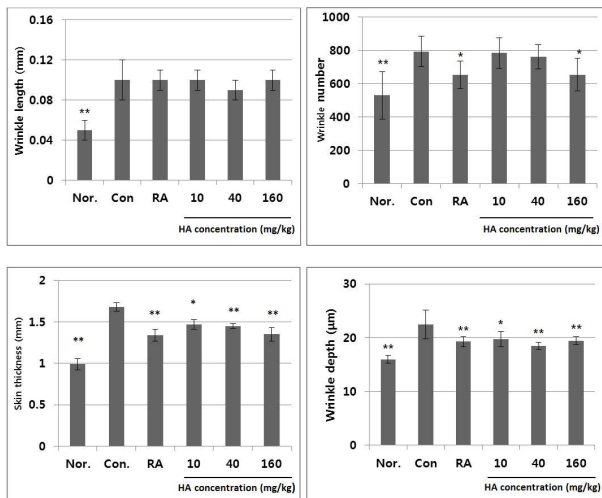


Fig. 4. Effect of administration of tested materials on UVB-induced wrinkle formation on dorsal skin of hairless mice at the end of week 10. The values are mean±S.D. of 8 SKH-1 hairless mice. Significant difference from UVB-treated group by Dunnet's *t*-test: **p*<0.05, ***p*<0.01

며, 평균값이 160 mg/kg에서 40 mg/kg보다 증가하는 양상을 보였지만 유의적 차이를 나타내지 않으므로, HA의 피부재생 효과를 확인할 수 있다.

4. 피부의 조직학적 변화

1) Masson's trichrome staining 관찰

교원섬유는 UV로부터 손상이 되면 교원섬유망이 망가지고 제 기능을 다하지 못한다. 이러한 손상된 교원섬유망이 피부에 쌓이게 되면 노화의 원인이 된다(Varani 등 2001). 진피층 내 교원섬유의 양과 형태를 확인하기 위해 Masson's trichrome staining을 진행하였다(Fig. 5). 정상대조군은 교원섬유의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적이지만, 주름유발군은 교원섬유가 파괴되어 밀도가 영성하고 배열이 불규칙적이며 양도 많이 줄어 있다. 양성대조군과 시료처리군에서는 주름유발군에 비해 교원섬유의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적으로 나타났으며, 시료처리군의 농도가 높아짐에 따라 형태가 더욱 조밀해지는 것을 확인하였다.

2) Verhoeff's staining 관찰

UV에 노출된 피부의 진피층에서는 탄력섬유의 분해가 일어나는데, 이는 엘라스타아제 라는 효소가 활성화되어 탄력섬유의 분해를 촉진하며, 탄력섬유망을 망가뜨리며, 호중구에 염증을 일으켜, 탄력섬유증인 elastosis를 일으킨다(Labat-Robert 등 2000). 진피층 내 탄력섬유의 양과 형태를 관찰하기 위해 Verhoeff's staining을 진행하였다(Fig. 6). 정상대조군은 탄력섬유의 배열이 규칙적이고 조밀하지만, 주름유발군은 변성되고 영긴 탄력섬유증이 관찰되었다. 양성대조군과 시료처리군에서는 주름유발군에 비해 변성된 탄력섬유증의 크기와 빈도가 줄어들었으며, 시료의 농도가 높아질수록 뚜렷하게 관찰되었다.

요 약

본 연구에서는 HA에 대하여 UVB로 주름을 유도시킨 hairless mice에게 경구 투여를 하였을 때, 주름 개선에 미치는 영향을 관찰하였다. 쥐는 UV를 쬐어 광노화를 진행하였으며, HA는 UVB에 노출시키기 4주 전부터 투여하여 총 14주 동안 투여하였다. 주름 개선 평가는 replica 제작하여 주름의 길이, 깊이, 개수, 두께로 평가하였다. 또한, 피부의 조직학적 평가를 통해 진피층 내 교원섬유와 탄력섬유의 양과 형태를 관찰하였다. 10주 동안의 HA를 급여하였을 때 주름의 깊이, 두께, 개수를 측정된 주름 개선 평가에서 세 항목 모두 개선되는 결과를 보였다. 특히 HA의 160 mg/kg 농도에서는 주름의 깊이는 19.44±0.75 μm, 주름 수는 654.00±98.34, 주름두께는 1.35±

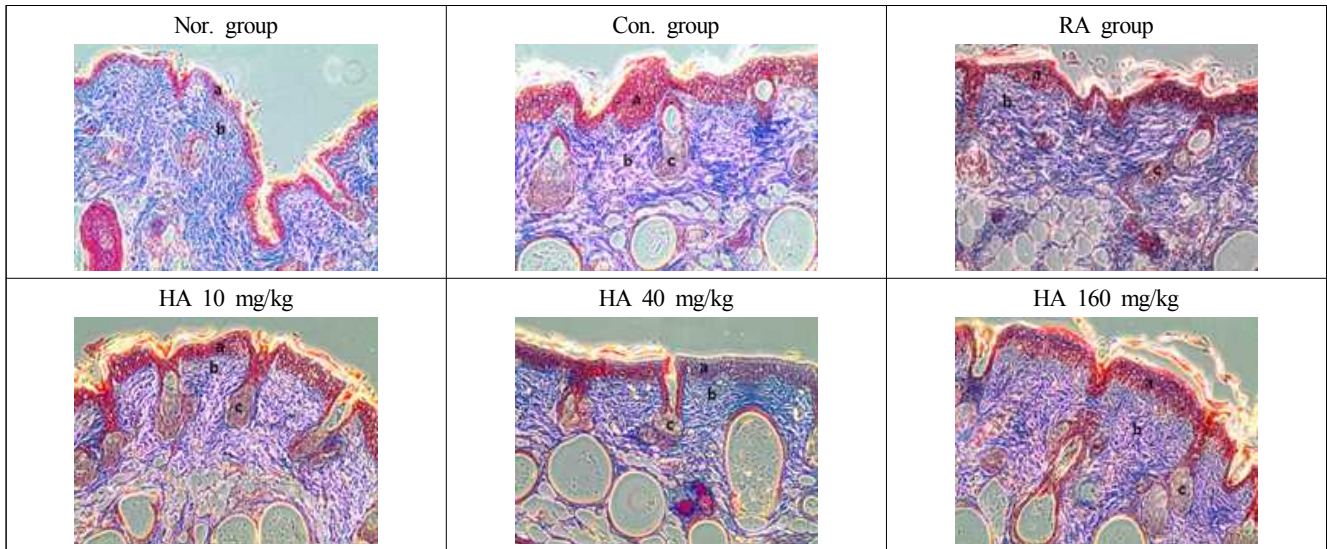


Fig. 5. Histological observation on collagen fibers in photoaged SKH-1 hairless mice skin after 14-week application of hyaluronic acid (×200). a: epidermis b: collagen fibers (blue) c: sebaceous gland hyperplasia

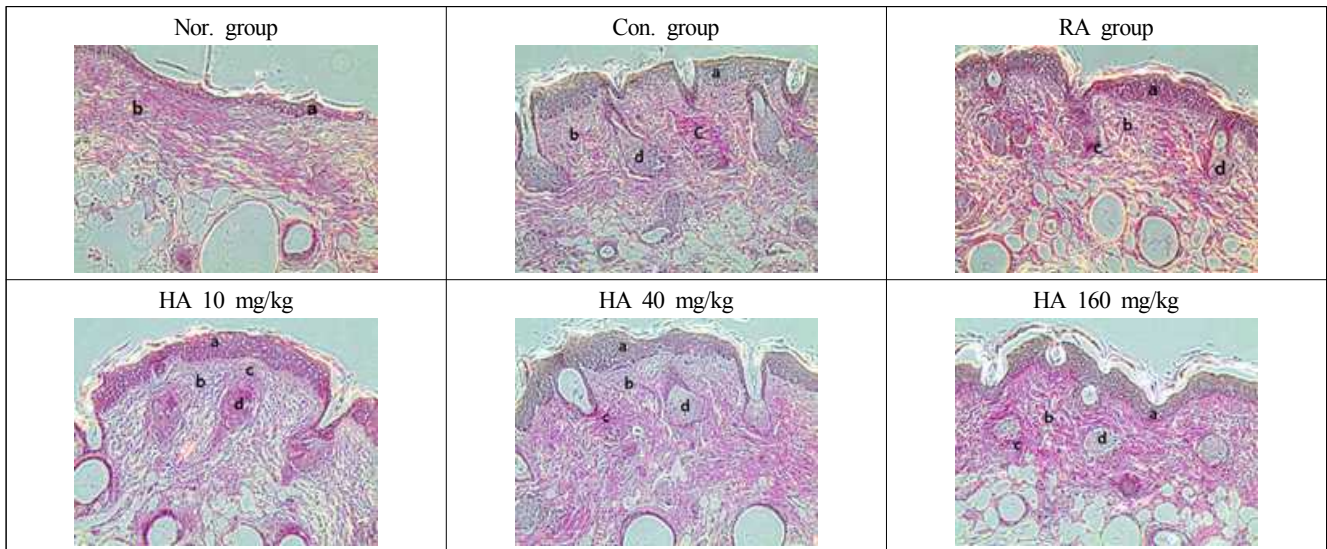


Fig. 6. Histological observation on Elastin fibers in photoaged SKH-1 hairless mice skin after 14-week application of hyaluronic acid (×200). a: epidermis b: collagen fibers (purple) c: elastosis d: sebaceous gland hyperplasia

0.08 mm로 양성 대조군(RA)의 결과(주름깊이; $19.28 \pm 0.95 \mu\text{m}$, 주름 수; 953.57 ± 83.54 , 주름두께; $1.34 \pm 0.07 \text{ mm}$)와 비슷한 수치를 나타내며, 우수한 피부 광노화 개선효과를 보였다. 하지만, 주름깊이의 결과에서는 유의적 차이를 나타내지 않았다. HA의 섭취로 인한 교원섬유 및 탄력섬유 염색을 통한 조직학적 평가에서는 UV에 의해 밀도가 엉성하고 배열이 불규칙적이던 섬유들이 개선된 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 보아 HA를 경구 투여 시 UV로부터 유도된 광노화 억제 및 피부주름 개선에 효능이 있음을 확인하였다.

References

- Bae IS, Shim MJ, Park MS, Kim YC. 2012. Morphological and histological changes in photoaged hairless mice induced by phellodendrin cortex water extract application. *Journal of Biomedical Research* 13:35-46
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma.

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:10124-10128
- Esser PR, Wölfle U, Dürr C, von Loewenich FD, Schempp CM, Freudenberg MA, Jakob T, Martin SF. 2012. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* 7:e41340
- Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New England Journal of Medicine* 337: 1419-1429
- Gang SR, Min KJ, Kim YC. 2009. The inhibitory effects of *Saururus chinensis* water extract on skin wrinkle in hairless mice. *Journal of the Korean Society of Cosmetology* 15: 1389-1398
- Gilchrist BA. 1982. Age associated changes in the skin. *Journal of the American Geriatrics Society* 30:139-143
- Gilchrist BA. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing/Dermatology Nurses' Association* 2:79-82
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21-39
- Kanjilal S, Pierceall WE, Cummings KK, Kripke ML, Ananthaswamy HN. 1993. High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: Evidence for strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Research* 53:2961-2964
- Kaye M. 1950. Isolation of sodium hyaluronate. *Nature* 166: 478-479
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2008. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 16:255-260
- Kress S, Sutter C, Strickland PT, Mukhtar H, Schweizer J, Schwarz M. 1992. Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Research* 52:6400-6403
- Labat-Robert J, Fourtanier A, Boyer-Lafargue B, Robert L. 2000. Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin: Effect of UV-irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57:113-118
- Laurent TC, Fraser J. 1992. Hyaluronan. *The FASEB Journal* 6: 2397-2404
- Laurent TC, Ryan M, Pietruszkiewicz A. 1960. Fractionation of hyaluronic acid the polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body. *Biochimica et Biophysica Acta* 42: 476-485
- Meyer LJ, Stern R. 1994. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 102: 385-389
- Pavicic T, Gauglitz GG, Lersch P, Schwach-Abdellaoui K, Malle B, Korting HC, Farwick M. 2011. Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD* 10:990-1000
- Son UD, Hwang JS, Chang IS. 2005. Approach of antiaging care in cosmetics. *The Society of Cosmetic Scientists of Korea* 31:213-218
- Song JH, Bae EY, Choi G, Hyun JW, Lee MY, Lee HW, Chae S. 2013. Protective effect of mango (*Mangifera indica* L.) against UVB-induced skin aging in hairless mice. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 29:84-89
- Swann DA. 1968. Studies on hyaluronic acid: I. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 156:17-30
- Tammi R, Säämänen A-M, Maibach HI, Tammi M. 1991. Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *Journal of Investigative Dermatology* 97: 126-130
- Varani J, Spearman D, Perone P, Fligel SE, Datta SC, Wang ZQ, Shao Y, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2001. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen *in vitro*. *The American Journal of Pathology* 158:931-942
- Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE. 1993. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of non-melanoma skin cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:4216-4220

Received 27 October, 2015
 Revised 2 November, 2015
 Accepted 26 November, 2015