

Cordycepin에 의한 피부 섬유아세포 세포노쇠화 개선효과

김 호 진[†] · 이 소 영[†] · 김 도 형 · 진 무 현 · 노 석 선^{**} · 김 형 민^{***} · 최 인 화^{****} · 이 명 수^{****} · 이 상 화

LG 생활건강 기술연구원, *피부동의한방연구회, **대전대학교 한의과대학,
경희대학교 한의과대학, *한국한의학연구원
(2015년 5월 14일 접수, 2015년 6월 2일 수정, 2015년 6월 9일 채택)

Suppression of Cellular Senescence by Cordycepin in Replicative Aged Human Dermal Fibroblasts

Hyo Jin Kim[†], So Young Lee[†], Do Hyung Kim, Mu Hyun Jin^{*}, Seok-Seon Roh^{**},
Hyung-Min Kim^{***}, In-Hwa Choi^{****}, Myeong Soo Lee^{****}, and Sang Hwa Lee

Skin Research Center, Research Park, LG Household & Healthcare Ltd.,
84 Jang-dong, Youseong-gu, Daejeon 305-343, Korea
^{*}Whoo Oriental Herb & Skin Research Society
^{**}College of Korean Medicine, Daejeon University
^{***}College of Oriental Medicine, Kyunghee University
^{****}Korea Institute of Oriental Medicine

(Received May 14, 2015; Revised June 2, 2015; Accepted June 9, 2015)

요약: 세포 노쇠화(cell senescence)는 나이 들에 따른 내인성 노화 및 질병들에서 나타날 수 있는 세포의 노화인자 발현, 세포분열 정지 등의 현상으로 일컬어진다. 피부세포의 경우, 노화 및 외부요인으로 인한 세포 노쇠화가 일어나 세포분열의 정지 및 기능 이상이 관찰되며 이는 피부노화를 가속화시키는 요인이 된다. 본 연구에서는, cordycepin을 이용하여 노화된 피부세포의 세포 노쇠화 억제 및 기능 향상을 유도하여 피부노화 개선의 가능성을 제시하였다. 사람에서 유래한 섬유아세포를 이용하여 세포의 β -galactosidase 활성 세포염색 결과, 많은 계대의 세포에서 발현이 높게 나타남을 알 수 있었다. 항산화 및 항염 효과가 알려진 cordycepin을 많은 계대의 세포에 처리하였을 때 β -galactosidase 활성이 확연히 떨어짐을 확인하였고 무혈청 배지 조건에서 많은 계대 세포의 증식 및 생존율을 높이는 결과를 보였으며 세포 노쇠화와 많은 연관성이 대두되고 있는 미토콘드리아의 기능관련 실험을 진행한 결과, 높은 ROS억제능이 나타났다. 본 연구를 통하여 노화된 사람 피부 섬유아세포에서의 cordycepin의 세포 노화 개선능을 알 수 있었으며, 피부 항노화소재로서의 가능성을 확인하였다.

Abstract: Cell senescence can be identified by cellular changes that occur as a result of intrinsic aging and/or diseases. In case of skin cells, aging and cell senescence caused by external factors results in cessation of cell proliferation and cellular malfunction, which, in turn, accelerates skin aging. In this study, inhibition of cell senescence and enhancement of cell function were studied using cordycepin to evaluate the potential for skin anti-aging agent. By comparing with the number of senescence associated with β -galactosidase (SA- β -gal) positive cells in young and replicative aged human fibroblasts, it was found that replicative aged cells showed higher expression of β -galactosidase. Treatment of cor-

[†] 주 저자 (e-mail: chocow@lgcare.com)
call: 042)860-8438

dycepin - known as an anti-oxidative and anti-inflammatory agent - reduced β -galactosidase expression in senescent cells and enhanced cell survival in serum-free culture condition. Cordycepin also showed superb inhibition of ROS, which is another indicator of cell senescence. The results of this study proved the anti-aging effect of cordycepin on human fibroblasts and also proposed a possibility of its use as an anti-aging cosmetic ingredient.

Keywords: anti-aging, cordycepin, cell senescence, dermal fibroblasts, β -galactosidase

1. 서 론

세포 노쇠화(cell senescence)는 세포 주기관련 유전자 발현의 변화 및 노화인자의 발현, 세포분열의 정지 등의 현상이 나타나는 것을 말한다. 이는 사람의 정상세포가 배양조건에서 많은 계대수를 반복하였을 때 세포증식의 한계가 나타나는 현상을 발표한 Hayflick과 Moorhead에 의해 처음 명명되었다[1,2]. 세포 노쇠화는 외부 스트레스 및 세포 내 DNA손상, 텔로미어 기능의 이상 및 크로마틴의 변화 등이 원인으로 작용하여 나타나며 노화(aging) 및 노화로 인한 질병과 많은 연관이 있다[3-5]. 세포 노쇠화는 종양억제단백질인 p53과 Rb에 의해 유도되는 세포 주기 관련인자 p21^{Cip1/WAF1}과 p16^{Ink4}이 세포의 증식 이상 및 불균형한 성장인자 분비를 촉진하며 senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 활성화[6] 등을 유발한다.

피부는 인체의 최외각층을 이루는 조직으로서 외부의 자외선 또는 활성산소 등의 많은 외부적 영향을 받으며 피부세포는 이러한 자극에 의해 세포 노쇠화가 가속화되어 세포활성이 감소하고 결국 피부노화의 가속화 및 병변이 나타나게 된다. 세포 노쇠화에 따른 피부노화현상에 관하여 미토콘드리아 DNA 변이를 직접적인 요인 중 한가지로 밝힌 연구가 있었으며[7], 방사선(radiation)[8] 또는 유전자 독성물질[9]과 같은 외부 자극을 이용한 유도를 통하여 세포 노쇠화 개선을 위한 연구[10]가 진행되고 있다.

Cordycepin은 동충하초(*Cordyceps militaris*)로부터 분리된 물질로 3'-deoxyadenosine이라고도 불리우며 항산화 및 항염 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있는 물질이다. 섬유아세포의 NF- κ B 신호경로를 차단하여 자외선에 의한 기질단백질 분해효소(matrix metalloproteinase) 생성을 억제하는 효과가 밝혀졌으며[11], 유전자독성(genotoxicity)에 의해 유도된 세포 노쇠화

를 증재한다는 것[12] 또한 최근 연구를 통하여 알려지게 되었다.

본 연구에서는 세포 노쇠화 현상이 나타나는 사람의 피부세포에서 cordycepin이 미치는 영향 및 변화양상을 *in vitro* 실험을 통하여 밝혀내고자 replicative aged fibroblasts에 적용하여 세포 노쇠화 개선 효과를 관찰하였으며 항노화소재로서의 가능성을 확인하였다.

2. 실험방법

2.1. Cordycepin 분리 시약 및 기기

본 실험에 사용한 동충하초(*C. militaris*)는 서울특별시 동대문구 제기동 경동시장에서 구입하여(화산랜드) 사용하였다. 실험에 사용한 column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (no. 9385, Merck, Germany)을, gel chromatography용 충전제는 Diaion HP-20 (Sigma, USA) 및 Sephadex LH-20 (GE healthcare, Sweden)을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel60F254 (Merck, Germany) 또는 RP-18254Sprecoatedplate (Merck, Germany)를 사용하였다. Cordycepin 표준품은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. Cordycepin의 분리

건조된 동충하초(*C. militaris*) 100 g을 에탄올(Ethanol, EtOH) 2 L를 가하여 상온에서 2일간 냉침하여 추출하였다. 이를 여과해 얻은 추출액을 감압 농축하여 에탄올 추출물(8.4 g)을 얻었다. 에탄올 추출물을 증류수로 현탁시켜 Diaion HP-20 gel chromatography를 실시하였다. 증류수, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 에탄올을 순차적으로 가하여 6 개의 소분획을 얻었다. 이 중 소분획 Fr. 2 (650 mg)를 CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (7/2/0.5)의 조성으로 silica gel column chromatography를 실시하여 5 개의 소분획으로 나누었다. 이 중 소분획 fr. 3 (140

mg)을 메탄올(Methanol, MeOH)을 용출용매로 하여 Sephadex LH-20 gel chromatography를 실시하여 화합물 1 (112 mg)을 얻었으며, 표준품과 TLC 및 HPLC를 통해 비교하여 cordycepin으로 동정하였다.

2.3. 섬유아세포 배양

본 실험 전반에서 사용된 사람피부 유래 섬유아세포는 ATCC (USA)에서 구입하였다. 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)과 1% Penicillin/Streptomycin solution이 첨가된 배양액 조건에서 배양하였다. 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 찼을 때 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, USA)를 이용하여 계대 배양을 진행하였다.

2.4. Senescence β -galactosidase assay

섬유아세포의 β -galactosidase 활성실험은 100 mm² 배양용 접시에 2×10^6 개의 섬유아세포를 배양액 조건에서 깔고 12 h 뒤 우태아 혈청이 들어가지 않은 DMEM 배양액 조건에서 cordycepin을 처리하여 24 h 둔 뒤, 세포를 거두어 구입한 β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega, USA)에 명시된 방법으로 진행하였으며 β -galactosidase 세포염색 실험은 6 well 배양용 플레이트에 5×10^5 개의 섬유아세포를 배양액 조건에서 깔고 12 h 뒤 우태아 혈청이 들어가지 않은 DMEM 배양액 조건에서 cordycepin을 처리하여 24 h 둔 뒤, 배양액을 제거하고 PBS (Gibco-BRL, USA)로 2번 세척한 뒤 구입한 Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling, USA)를 이용하여 명시된 방법으로 진행하였다.

2.5. Real-time PCR (qPCR)

6 well 배양용 플레이트에 5×10^5 개의 섬유아세포를 배양액 조건에서 깔고 24 h 뒤, 배양한 섬유아세포를 수확하여 RNA easy mini kit (Qiagen, USA)으로 RNA를 분리하여 정량 후, 1 mg의 RNA를 GeneAmp[®] RNA PCR kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 역전사 반응은 Mycycler[®] PCR 기기(Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA를 Taqman universal master mix (Applied biosystems, USA)와 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여

Real-time PCR system (Applied biosystems, USA)으로 발현을 측정하였다. Real-time PCR에 사용된 프라이머는 GAPDH, p21^{Cip1/WAF1}, p16^{Ink4A}이다.

2.6. Cell cycle analysis

세포주기 분석실험을 위해 35 mm² 배양용 접시에 1×10^6 개의 섬유아세포를 배양액 조건에서 깔고 12 h 뒤 우태아 혈청이 들어가지 않은 DMEM 배양액 조건에서 cordycepin을 처리하여 24 h 둔 뒤, 배양한 섬유아세포를 수확하여 PBS로 두 번 세척한 후 3 mL의 70% Ethanol solution 에서 4 °C에 최소 2 h 동안 세포 고정 하고, 50 mg/mL Propidium Iodide (Sigma- Aldrich, USA)와 0.1%의 Triton X-100(Sigma-Aldrich, USA) 및 0.1 mg/mL DNase-free RNase A (Sigma- Aldrich, USA)가 포함된 PBS 용액 500 μ L에서 30 min 실온에 둔 뒤, Fluorescence Activated Cell Sorting system (FACS Calibur[™], BD, USA)장비를 통하여 분석하였다.

2.7. ATP assay

세포의 ATP를 측정하기 위해 CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA)를 구입하여 사용하였다. White 96 well 배양용 플레이트에 한 well 당 8×10^3 개의 섬유아세포를 깔아준 후, 12 h 뒤 cordycepin을 포함한 DMEM 배양액으로 교체한 뒤 37 °C에서 24 h 배양한다. 배양액을 제거하고 CellTiter-Glo[®] 시료와 DMEM 배양액을 1 : 1 비율로 섞어 한 well 당 50 μ L씩 넣고 세포용해 및 발광반응을 위해 일정시간 상온에 둔 뒤, VICTOR (PerkinElmer, USA)기기를 통하여 발광을 측정한다.

2.8. ROS assay

세포의 ROS를 측정하기 위해 CM-H₂DCFDA (Invitrogen,USA)를 구입하여 사용하였다. Black 96 well 배양용 플레이트에 한 well 당 8×10^3 개의 섬유아세포를 깔아준 후, 12 h 뒤에 cordycepin을 포함한 DMEM 배양액으로 교체한 뒤 37 °C에서 24 h 배양한다. 배양액을 제거하고 10 μ mol의 H₂DCFDA를 포함한 DMEM배양액을 넣고 37 °C에서 1 h 동안 반응시킨 후, VICTOR기기를 이용하여 여기(excitation)값 550 및 발광(emission)값 580 파장대의 형광을 측정한다.

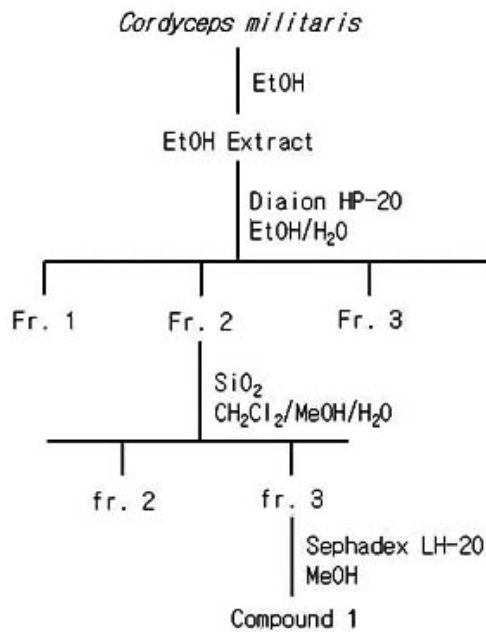


Figure 1. Isolation scheme of compound 1.

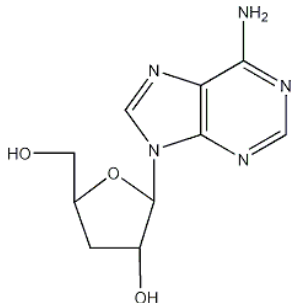


Figure 2. Chemical structure of compound 1.

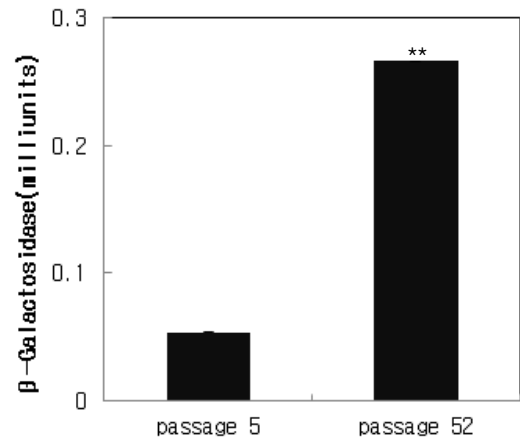
2.9. 통계적 분석

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, Student's t-test법을 이용하여 p -value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

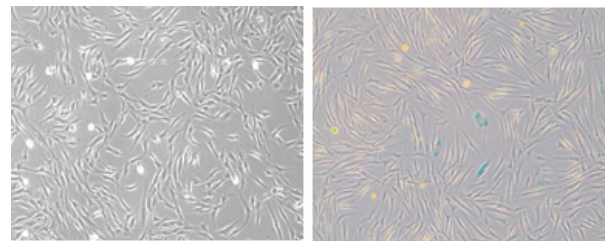
3. 결과 및 고찰

3.1. Cordycepin의 분리 및 정제

동충하초(*C. militaris*)의 에탄올 추출물을 증류수로 현탁시켜 Diaion HP-20 gel chromatography를 통해 6개의 분획으로 나누었으며, silica gel column chromatography 및 Sephadex LH-20 gel chromatography를



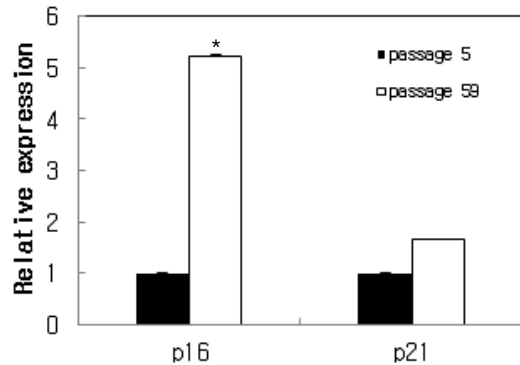
(A)



passage 5

passage 59

(B)



(C)

Figure 3. Cell senescence in replicative aged human dermal fibroblasts. (A) The activity of β -galactosidase was measured in cell lysates. (B) β -galactosidase-expressing cells (green) were appeared in replicative aged fibroblasts. (C) Senescence-related gene expressions were increased in replicative aged fibroblasts. Each bar in the graph represents mean \pm S.D (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 1과 같이 실시하여 화합물 1 (Figure 2)을 얻었다. 분리된 화합물 1을 구입한 표준품과 TLC 및 HPLC를 통해 비교하여 cordycepin으로 확인하였다.

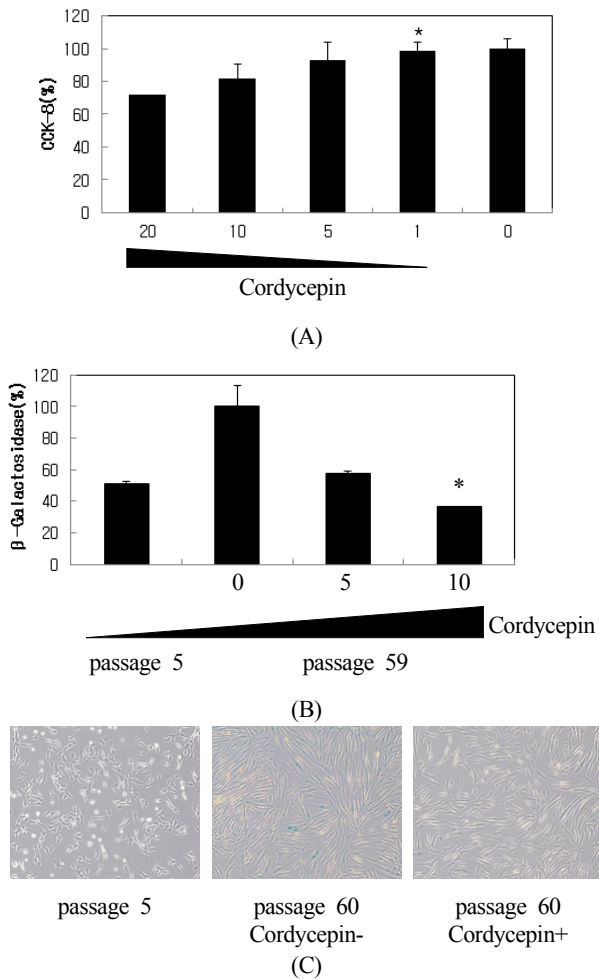


Figure 4. Senescence suppression by treating cordycepin. (A) Cell viability test was evaluated through CCK-8 assay (1 to 20 mg/mL cordycepin). (B) The activity of β -galactosidase was performed, and data were expressed as a percentage of 56-passaged fibroblasts w/o cordycepin (1 to 10 mg/mL cordycepin). (C) β -galactosidase-expressing cells (green) were appeared in 60-passaged fibroblasts w/o cordycepin. Each bar in the graph represents mean \pm S.D (* $p < 0.05$).

3.2. Replicative aged dermal fibroblasts에서의 세포 노쇠화

세포 노쇠화는 높은 연령의 피부 유래 섬유아세포 일수록 증가하며 많은 계대 배양이 진행된 세포에서도 비슷한 경향이 나타나는 것으로 보고되었다[13]. 내인성 노화의 과정과 유사한 replicative aging을 통한 *in vitro* 세포 노쇠화 모델 구축 및 확인 실험을 진행하였다.

우선, 많은 계대 배양을 진행한 사람 유래 피부 섬유

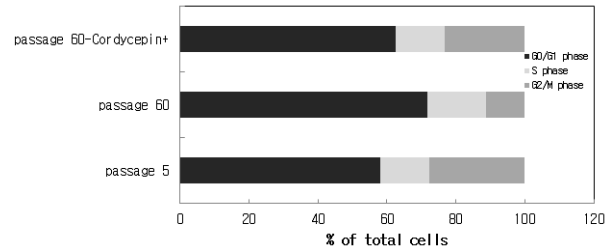


Figure 5. Cell cycle analysis was performed using PI staining. Data were showed as a percentage of total 2×10^4 analyzed cells.

유아세포 및 적은 계대 배양을 진행한 섬유아세포의 β -galactosidase 활성 및 세포염색을 통하여 비교한 결과, 많은 계대의 세포에서 β -galactosidase의 많은 분포 및 높은 활성이 나타남을 알 수 있었다(Figure 3A, 3B). 또한, p16^{Ink4A}와 p21^{Cip1/WAF1}의 유전자 발현을 비교해 본 결과, 많은 계대의 세포에서 모두 높게 나타남을 확인하였다(Figure 3C).

3.3. Cordycepin의 세포 노쇠화 억제 효과

세포 노쇠화가 나타나는 섬유아세포에서 cordycepin의 영향을 알아보기 위해, 많은 계대 배양을 진행한 섬유아세포에 처리하여 β -galactosidase 활성 및 세포염색 실험을 진행하였다. 세포 독성실험을 실행하여 cordycepin의 처리 농도를 설정하고(Figure 4A) 실험한 결과, 처리 농도에 따라 효소 활성이 감소하여 적은 계대의 섬유아세포와 유사한 정도로 나타나는 것을 확인하였으며(Figure 4B), 많은 계대의 섬유아세포에 5 μ g/mL cordycepin을 처리하고 β -galactosidase 세포염색을 통하여 효소의 발현 또한 급격히 떨어지는 것을 확인하였다(Figure 4C).

3.4. Cordycepin에 의한 세포주기의 변화

세포 노쇠화로 인한 세포 주기 억류(cell cycle arrest)는 활성화된 p21^{Cip1/WAF1} 및 p16^{Ink4}에 의해 G1 주기(phase)가 정지되어 나타나며 cordycepin이 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 PI (Propidium Iodide)로 염색하여 FACS 분석기기를 이용한 세포 주기를 비교하였다. 많은 계대를 진행한 섬유아세포에 5 μ g/mL cordycepin을 처리한 결과, G2/M 주기의 세포 비율이 급격히 증가하고 G0/G1 주기의 세포 비율이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 5).

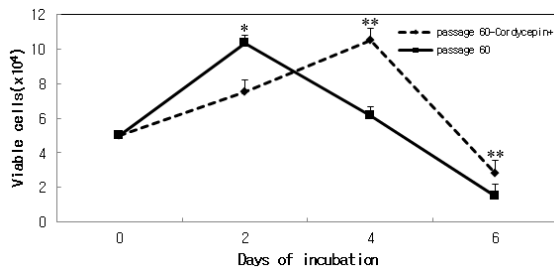


Figure 6. Cell viability test was evaluated in serum-free culture condition for 6 days. Each bar represents mean \pm S.D (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.5. Cordycepin의 세포분열능 및 세포 생존능 향상

Replicative aging을 진행한 섬유아세포의 세포 분열 및 세포 생존에 관련한 cordycepin의 영향을 세포 수 측정으로 알아보았다. 우태아 혈청을 포함하지 않은 DMEM 배양액 조건에서 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cordycepin을 처리한 세포군과 처리하지 않은 세포군의 6일 간의 세포 수 변화를 비교해 본 결과, cordycepin을 처리한 세포군이 최대 4일까지 세포분열이 일어나는 것을 확인하였으며 무처리 세포 군 대비 더 높은 세포 생존율을 유지하는 결과를 보였다(Figure 6).

3.6. Cordycepin에 의한 미토콘드리아 기능 활성 증가

최근 연구에서 세포 내 미토콘드리아의 기능 부전 및 미토콘드리아 DNA 손상이 세포 노쇠화의 직접적인 요인이 될 수 있음이 밝혀진 바, 이에 많은 계대를 진행한 섬유아세포와 적은 계대를 진행한 섬유아세포의 세포 내 에너지 대사 관련한 미토콘드리아의 기능평가를 실시하였다. 많은 계대의 섬유아세포에 Cordycepin을 처리한 결과, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 무처리 군 대비 ATP가 올라가는 것을(Figure 7A) 확인하였고 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 감소하는 것은 세포 독성의 영향으로 예상된다. ROS 또한 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 급격히 감소되는 것으로 나타났다(Figure 7B). 일정 농도의 cordycepin 처리 세포 군에서 가장 높은 수치를 나타냈으며 이는 적은 계대의 섬유아세포의 활성과 유사한 결과를 보였다.

4. 결 론

본 연구에서는 동충하초로부터 분리된 cordycepin을

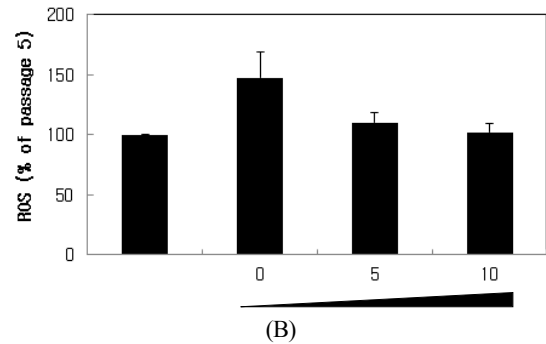
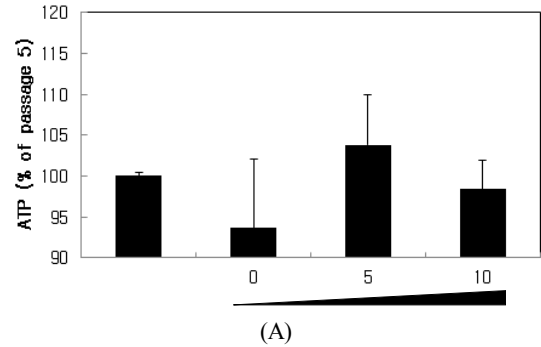


Figure 7. Up-regulation of Mitochondrial functions by cordycepin. (A), (B) The data of ATP and ROS assays were expressed as a percentage of 5-passaged fibroblasts (5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cordycepin). Each bar in the graph represents mean \pm S.D.

이용한 피부 유래 섬유아세포의 세포 노쇠화 개선 효과를 *in vitro* 실험을 통하여 확인하였다. 사람 피부에서 유래한 replicative senescent fibroblasts를 통하여 피부 세포의 내인성 노화로 인한 세포 노쇠화와 유사한 모델을 구축하였고, 이에 cordycepin을 도입하여 피부 섬유아세포의 세포 노쇠화 개선 효과를 볼 수 있었다. 세포 노쇠화의 지표 인자인 β -galactosidase 억제효과를 활성실험 및 세포염색을 통하여 확인하였고 세포 주기 분석 실험에서 cordycepin을 처리하였을 때, replicative senescent fibroblasts의 G2/M phase가 증가하는 것으로 세포 분열 활성에 영향이 있음을 알 수 있었다. 이는 세포 수 측정을 통하여 대조군과 비교하였을 때 세포 분열능이 증가하는 것으로 재확인할 수 있었으며 세포 생존에도 영향이 있음을 알 수 있었다. 세포 내 ATP 및 ROS 측정결과를 통하여 cordycepin이 세포 노쇠화 및 세포의 항상성과 연관이 있는 미토콘드리아 활성에도 영향을 주는 것으로 나타났다. Cordycepin의 세포 노쇠화 개선 유도에 대한 자세한 세포신호 경로

분석 및 추가적인 효능 발굴을 위해 세포 분열 활성 관련 인자 발현 확인 및 사이토카인(cytokine) 발현 여부 등의 추가실험을 진행해야 할 것이다.

본 연구를 통하여 cordycepin의 세포 노쇠화 개선 효과 및 피부 항노화소재로서의 가능성을 확인하였고, 추가 실험분석 및 임상 실험을 통하여 세포노쇠화 개선 연구를 진행할 예정이다.

Reference

1. L. Hayflick, The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.* **37**(3), 614 (1965).
2. Jan M. van Deursen, The role of senescent cells in aging, *NATURE*, **509**(7501), 439 (2014).
3. C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell*, **153**(6), 1194 (2013).
4. D. J. Baker, et. al., Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency, *Nature Cell Biol.*, **10**, 825 (2008).
5. E. Sikora, T. Arendt, M. Bennett, and M. Narita, Impact of cellular senescence signature on ageing research, *Ageing Res. Rev.*, **10**(1), 146 (2011).
6. F. Debacq-Chainiaux, J. D. Erusalimsky, J. Campisi, and O. Toussaint, Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*, *Nat. Protoc.*, **4**(12), 1798 (2009).
7. M. J. Birket, J. F. Passos, T. von Zglinicki, and M. A. Birch-Machin, The relationship between the aging- and photo-dependent T414G mitochondrial DNA mutation with cellular senescence and reactive oxygen species production in cultured skin fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, **129**(6), 1361 (2009).
8. S. Zahnreich and C. Fournier, Radiation-induced premature senescence is associated with specific cytogenetic changes, *Mutat. Res.*, **701**(1), 60 (2010).
9. S. J. Robles and G. R. Adami, Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts, *Oncogene*, **16**(9), 1113 (1998).
10. R. Koziellet et. al., Methionine restriction slows down senescence in human diploid fibroblasts, *Aging Cell*, **13**(6), 1038 (2014).
11. Y. B. Lee et. al., Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts, *Exp. Mol. Med.*, **41**(8), 548 (2009).
12. L. Gu, H. Johno, S. Nakajima, T. Yoshitomi, S. Takahashi, and M. Kitamura, Intervention in genotoxic stress-induced senescence by cordycepin through activation of eIF2 α and suppression of Sp1, *Toxicol. Sci.*, **134**(2), 345 (2013).
13. D. Janson, M. Rietveld, R. Willemz, and A. E. Ghalbzouri, Effects of serially passaged fibroblasts on dermal and epidermal morphogenesis in human skin equivalents, *Biogerontology*, **14**(2), 131 (2013).