

Paeonol에 의한 표피줄기세포 활성화

김도형[†] · 김호진 · 여혜린 · 이천구 · 이상화

LG 생활건강 기술연구원

(2016년 3월 23일 접수, 2016년 4월 20일 수정, 2016년 5월 17일 채택)

Activating the Proliferation of Keratinocyte Stem Cells by Paeonol, a Compound from Natural Herb

Do Hyung Kim[†], Hyo Jin Kim, Hyerin Yeo, Cheon Goo Lee, and Sang Hwa Lee

Skin Research Center, Research Park, LG Household & Healthcare Ltd., 84 Jang-dong,
Youseong-gu, Daejeon 34114, Korea

(Received March 23, 2016; Revised April 20, 2016; Accepted May 17, 2016)

요약: 피부의 가장자리에 위치한 표피는 개체의 생존에 절대적으로 중요하며, 기저막에 위치한 표피줄기세포에 의해 평생 끊임없이 재생되고 있다. 표피줄기세포는 한정된 세포분열을 진행하고 각질세포로 분화하는 transit amplifying (TA) 세포를 만들어 냈으므로 오랜 기간 재생에 필요한 많은 각질세포를 만들어 낼 수 있다. 본 연구에서는 표피줄기세포 세포분열 활성화 화합물로 목단으로부터 추출한 페오놀(paeonol)을 350여 개의 화합물들로부터 검색해 냈다. 이러한 세포분열 활성화 효능은 표피줄기세포 특이적으로 나타나며, 표피줄기세포의 지표로 알려진 p63 단백질의 발현 경향은 페오놀을 처리한 표피줄기세포에서 변화하지 않음을 유세포분석법으로 확인하였다. 콜로니형성 분석에서는 페오놀을 처리한 표피줄기세포가 1.3배 이상 더 나은 콜로니 형성능을 보여 주었다. 그리고 PCR array 분석을 통해서 페오놀의 효능은 여러 신호전달에 의해 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과들로부터 페오놀이 줄기세포성에 영향을 주지 않고 표피줄기세포의 재생능력을 향상시키므로 표피줄기세포 활성화 물질로서 화장품 소재로 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

Abstract: Epidermis is continuously regenerated by keratinocyte stem cells (KSCs) residing in basement membrane, which is critical to the survival of an organism. KSCs are believed to persist during the whole lifetime and generate an enormous number of keratinocytes, required for the maintenance of epidermis, through transit amplifying cells dividing definite times until they become differentiated. In this report, we have developed a phenolic compound, paeonol, purified from Moutan Cortex, as a KSC proliferation activator, by screening about 350 herbal compounds. The cell proliferation activation by paeonol is specific for KSC not for keratinocyte, and no significant difference in the expression of p63 protein, a KSC marker, in KSCs treated with paeonol was observed in FACS analysis with anti-p63 antibody. In the colony forming assay, paeonol-treated KSC showed improved colony forming activity more than 1.3 fold. In addition, the result of PCR array shows that the activity of paeonol is through several signal pathways involving stem cell functions. These results suggest that paeonol could enhance KSC proliferation activity without reduction in stemness and could be applied to cosmetics as a KSC activating ingredient.

Keywords: anti-aging, paeonol, keratinocyte stem cell, p63 protein, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: kimdhyung@lgcare.com)
call: 042)860-8456

1. 서 론

표피는 피부의 제일 외각에 존재하는 방어막으로써 미생물 감염이나 물리적 자극을 막아 주며 수분 증발을 막아서 피부 보습을 유지하는데 중요하다. 표피는 기적 막에 위치한 표피줄기세포로부터 transit amplifying (TA)세포가 만들어지고 몇 번의 세포 분열 후 각질세포로 분화가 이루어지면서 표피층 바깥 방향으로 밀려 올라가게 되고 최종적으로 각질을 만들어서 유지가 된다[1-4]. 이와 같이 표피층을 유지하기 위해서 표피줄기세포, TA세포, 그리고 각질 세포들이 평생 동안 끊임없이 세포 분열과 분화를 해야만 한다. 그중에서도 표피줄기세포는 평소에는 간헐적으로 분열하여 TA세포와 표피줄기세포를 하나씩 만드는 이중 세포 분열을 진행하고, 피부가 손상을 받았을 때에는 집중적으로 분열을 하여 표피층 재건에 필요한 TA세포와 각질 세포들을 만들어낸다[5,6].

끊임없는 세포 분열을 통해서 세포들을 공급해 주는 상피조직의 줄기세포들을 유지하는데 중요한 유전자들 중 하나로 p63 유전자가 보고되었다[7,8]. 유전자 조작 마우스를 이용한 실험에서 p63 유전자가 제거된 줄기세포들은 미성숙 세포 분열을 진행하게 되고 따라서 줄기세포가 지속적으로 감소함을 보고하였다. 이후 진행된 연구를 통해서 피부 표피줄기세포에서만 TAp63 단백질 발현을 억제하는 유전자조작 마우스에서 비정상적인 피부 노화, 물집, 피부 궤양, 모발 이상들이 관찰되며, 이러한 현상은 TAp63 단백질이 피부줄기세포의 세포 노화를 막고 유전자 안정성을 유지시켜 주는 역할 때문으로 알려져 있다[9]. 또한 다양한 연령대의 사람으로부터 얻은 피부조직에서 분리한 피부줄기세포(skin-derived precursor cell, SKP)를 조사한 결과 연령에 따라 그 숫자와 분화 능력이 감소하는 경향성을 보임을 보고하였다[10]. 이를 통해 표피줄기세포가 나이가 들어감에 따라 감소하고 이로 인해 피부 노화 현상이 초래된다고 알려지고 있다.

본 연구에서는 노화에 따른 표피줄기세포 감소를 개선하기 위해서 천연물 유래 화합물 라이브러리로부터 표피줄기세포의 세포 분열 능력을 개선하는 화합물을 검색하여 페오놀을 찾았다. 그리고 페오놀에 의한 세포분열주기 변화를 관찰하고, 표피줄기세포 마커인 p63 단백질의 발현 변화 관찰을 통해 그 효능을 검증

하였다. 이번 연구를 통해 페오놀의 표피줄기세포 재생 활성화를 통한 피부 안티에이징 소재로서 효능을 확인하였으며, 안티에이징 화장품 소재로 가능성을 제안하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 천연물 유래 화합물 라이브러리

본 실험에 사용한 천연물 유래 화합물 라이브러리를 구성하고 있는 화합물들은 중국 업체(Shaanxi Huike Botanical Development)를 통해서 구입하여 사용하였다. 라이브러리 검색을 통해서 검출된 페오놀은 Sigma에서 구매한 paeonol (H35803, Sigma, USA)를 표준품으로 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 통해 동일 물질임을 확인하였다.

2.2. CCK-8 분석법

세포의 성장률은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Japan)을 이용하여 판매사에서 제공한 실험법에 따라 측정하였다. 96-well plate에 키운 세포에 물질을 처리하고, 72 h 동안 배양한 후, 각 well 당 CCK-8 용액을 10 μ L씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 세포배양기에서 3 h 동안 반응시켰다. 그리고 ELISA reader (Epoch, Bio-tech Instruments Inc, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. 표피줄기세포 및 표피세포 배양

본 실험에 사용된 사람 피부 유래 표피줄기세포(human epidermal keratinocyte progenitor cell)는 CELLnTEC (HPEKp.05, Switzerland)에서 구입하였다. 세포는 PCT epidermal keratinocyte medium (Cnt-57, Switzerland)에 소 뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract) 10%와 penicillin/streptomycin solution 1%가 첨가된 배양액 조건에서 계대 배양하였다. 매번 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 정도 찼을 때 accutase (CELLnTEC, Switzerland)를 이용하여 계대 배양을 진행하였다.

2.4. BrdU 분석법

DNA 합성 시에 결합되는 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)를 이용한 효소결합 면역반응시스템(ELISA)

(Roche, Switzerland)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 세포 복제 정도를 측정하였다. 48-well plate에 1개의 표피줄기세포를 배양 후 물질을 처리하고, 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 72 h 배양하였다. 이후 BrdU를 최종 농도 1 μM이 되도록 첨가한 후 3 h을 더 배양하였다. 이후, FixDenat로 상온에서 30 min 고정하고, anti-BrdU-peroxidase로 상온에서 90 min을 처리한 후, substrate solution을 첨가하여 실온에서 20 min 간 반응시켰다. ELISA reader (Epoch, Bio-tech Instruments Inc., USA)를 이용하여 370 nm와 492 nm에서 각각 흡광도를 측정하고, 370 nm 흡광도에서 492 nm 흡광도를 뺀 값을 사용하였다.

2.5. FACS 분석법

세포주기 분석실험을 위해 35 mm 배양용 접시에 1 × 10⁶개의 표피줄기세포를 배양액 조건에서 깔고 12 h 뒤 소 뇌하수체 추출물이 들어가지 않은 배양액 조건에서 페오놀을 처리하여 24 h 배양 후, 표피줄기세포를 수확하여 PBS로 두 번 세척한 후 3 mL의 70% 에탄올에서 4 °C에 최소 2 h 동안 세포고정 하고, 50 μg/mL propidium iodide (Sigma, USA)와 0.1%의 Triton X-100 (Sigma, USA) 및 0.1 mg/mL DNase-free RNase A (Sigma, USA)가 포함된 PBS 용액 500 μL에서 30 min 간 실온에 둔 뒤, fluorescence activated cell sorting system (FACS CaliburTM, BD, USA) 장비를 통하여 분석하였다.

2.6. Western Blotting 분석법

6-well plate에서 배양한 세포에 물질을 처리하고, 일정 시간 배양 후 배양액을 제거한다. 그 후 cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Inc., USA)를 넣고 세포를 scraper로 긁어내고 1.5 mL 튜브로 옮긴 후 sonication을 수행하였다. Cell debris를 제거하기 위해 15000 rpm에서 15 min 간 원심 분리 후 상등액을 SDS-PAGE에서 전기영동 분석을 하였다. 이후 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 옮겨 30 min 동안 상온에서 5% skim milk (in TBST: Tris buffer saline with Tween 20 ; 25 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 반응시켰다. 1 h가 지난 후 anti-p63 (4A4) 항체(sc-8431, Santa Cruz, USA)를 넣어 상온에서 3 h 동안 반응시켰다. TBST로 10 min씩

3번 세척 후 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체(Cell Signaling Technology, USA)와 1 h 동안 상온에서 반응한 후 다시 TBST로 10 min 간 3회 반복하여 세척하였다. 이후 검출 시약(ECL solution)을 처리한 후 UV fluorescence 장비(Fusion Fx5TM, Vilber Lourmat, Germany)를 사용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

2.7. Colony Forming Assay

표피줄기세포의 콜로니 형성능을 확인하기 위하여, 100 mm 배양용 접시에 6 × 10³ 세포를 24 h 동안 배양한 후, 물질을 처리하고 배양액 조건에서 14일 간 배양하였다. 이후 10% formalin과 0.3% toluidine blue 혼합액을 처리하여, 세포를 염색한 후 형성된 콜로니를 확인하였다. 일정한 크기 이상 되는 콜로니를 Fusion Fx 5 image system (Vilber Lourmat, Germany)의 colony counting 분석법을 이용하여 측정하였다.

2.8 통계적 분석

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 천연물 유래 화합물 라이브러리 검색

노화에 따라서 감소하는 표피줄기세포를 재생시켜 주는 효능 소재를 찾기 위하여 350여 종의 천연물 유래 화합물 라이브러리로부터 표피줄기세포 분열 활성을 높여 주는 화합물을 검색하였다. Figure 1A에서 설명한 것과 같이 실험법에 기술된 CCK-8 측정법을 활용하여 3일 동안 자란 표피줄기세포의 숫자를 비교하여, 페오놀을 표피줄기세포 세포 분열 활성화 소재로 발굴하였다(Figure 1B).

3.2. 페오놀의 표피줄기세포 증식 활성화

페오놀을 세포 실험에 사용하기 전에 독성 테스트를 실시하여 Figure 2A에서와 같이 50 μg/mL까지는 표피줄기세포에 전혀 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 기본배지에 페오놀을 처리한 것과 무처리군 그리고 배양배지에 키운 것을 비교해 보면 Figure 2B에서와 같

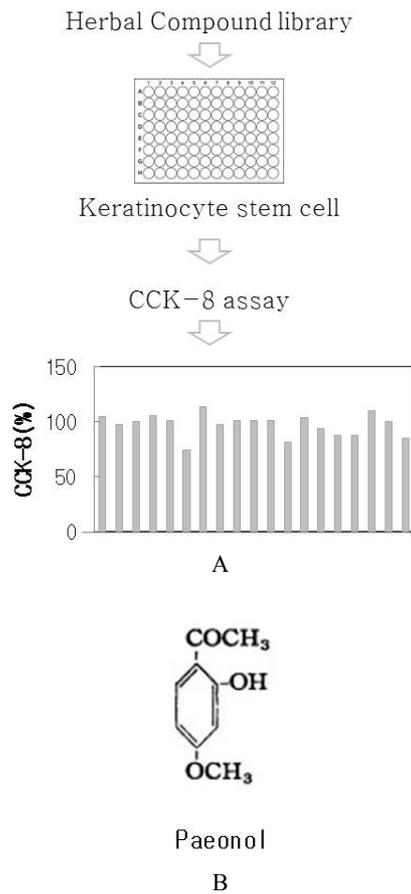


Figure 1. The activator of proliferation of keratinocyte stem cell was found in the chemical library as described in (A). (A) The screening scheme of keratinocyte stem cell proliferation activator. (B) Chemical structure of paeonol discovered as the activator of proliferation of keratinocyte stem cell.

이 페오놀을 처리한 군에서 무처리군에 비해 1.35배 정도 세포 수가 증가한 것을 관찰할 수 있다. 이는 배양배지에 키운 것에 비해서도 높은 정도이다. 그리고 페오놀이 각질세포(epidermal keratinocyte)에도 유사한 효능을 나타내는지 알아보기 위해 실험한 결과 페오놀 처리군은 무처리군과 유사한 정도의 세포 수 증가를 보였으며, 혈청이 들어간 배양배지에서는 무처리군에 비해 1.5배 이상 세포 수가 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2C). 이를 통해서 페오놀에 의한 표피줄기세포 세포 수 증가는 줄기세포에 특이적으로 나타나는 효능임을 확인할 수 있었다.

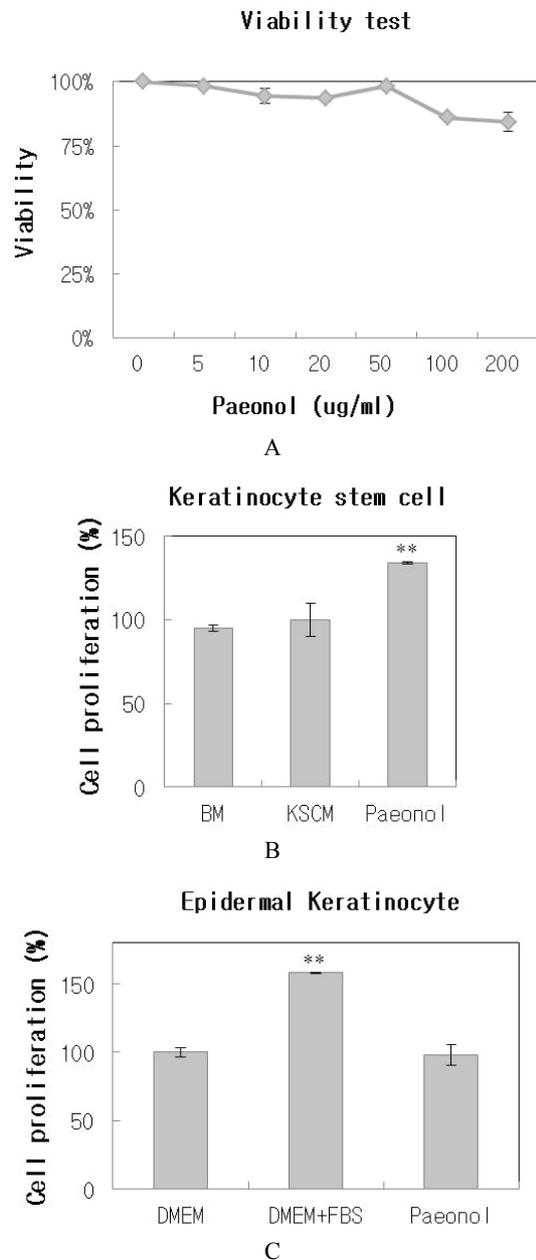


Figure 2. The proliferation activity of keratinocyte stem cell was induced by paeonol. (A) The viability of keratinocyte stem cell was determined with treatment the indicated amounts of paeonol. (B) Keratinocyte stem cell proliferation was measured in basal media containing paeonol (20 μ g/mL) using CCK-8. KSCM, complete media for keratinocyte stem cell, was used as positive control. (C) Cell proliferation of epidermal keratinocyte was measured as described in (B) and DMEM media containing FBS was used as positive control. Each bar in the graph represents mean \pm S.D. (* p < 0.05, ** p < 0.01).

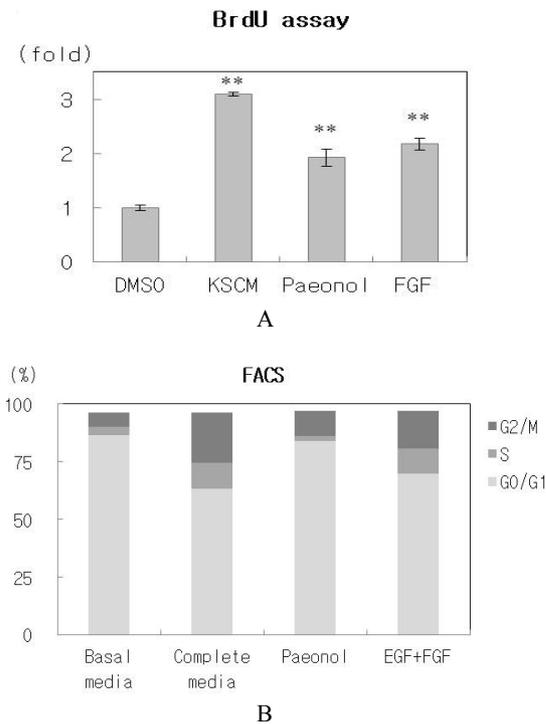


Figure 3. Paeonol accelerated cell cycle progression of keratinocyte stem cell. (A) DNA replication rate was detected in keratinocyte stem cell through BrdU assay. KSCM and bFGF (100 ng/mL) was used as positive control. (B) Cell cycle progression of keratinocyte stem cell was determined through FACS analysis with BrdU labeling. KSCM and EGF (100 ng/mL) + bFGF (100 ng/mL) were used as positive controls. Each bar in the graph represents mean \pm S.D. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3. 표피줄기세포의 세포 주기 측정

세포 수가 증가하기 위해서는 필연적으로 세포 분열이 활성화 되어야 하고, 이는 세포 주기 중 S 주기와 G2/M 주기가 차지하는 비율이 높아지게 만든다. 페오놀이 표피줄기세포 세포 주기에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포 분열이 진행 중인 세포를 측정할 수 있는 BrdU 분석법을 활용하였다. Figure 3A에서 보이는 것과 같이 세포 분열을 촉진하는 사이토카인(cytokine)이 함유된 배양배지에서 키운 표피줄기세포는 기본배지에 비해 3배 이상 BrdU로 염색된 세포가 늘어난 것을 확인할 수 있으며, 페오놀을 처리한 군에서도 약 1.8 배 이상 늘어난 것을 확인할 수 있다. 사이토카인의 세포 분열 촉진 효능을 검증하기 위한 실험군인 bFGF 처리 실험군에서도 약 2배 정도 BrdU 염색 세포가 늘어

난 것을 확인할 수 있다. Figure 3B에서는 FACS 기기를 활용하여 BrdU 염색 세포를 분석하여 각각의 세포 주기에 해당하는 세포의 비율을 관찰한 결과를 보여 주고 있다. 배양배지와 사이토카인 처리군에서 S 주기와 G2/M 주기가 3배 이상 늘어나 있으며 페오놀 처리군에서는 S 주기는 약간 줄어들었지만 G2/M 주기가 늘어나 둘의 합은 무처리군에 비해 1.5배 이상 늘어난 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과로부터 페오놀이 휴지기에 있는 표피줄기세포를 세포 분열의 주기 중에 DNA가 복제되고 두 개의 딸세포로 나뉘지는 S 주기와 G2/M 주기로 유도하여 세포 분열을 활성화 하는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. 표피줄기세포 마커(p63) 분석

표피줄기세포의 마커로는 integrin $\alpha 6$, keratin 15 등 여러 단백질들이 알려져 있지만 그중 p63 단백질이 표피줄기세포 증식과 항노화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이에 p63 단백질에 대한 항체를 이용하여 p63 단백질 발현 표피줄기세포를 FACS 기기로 분석을 하였고, Figure 4A에서 보듯이 페오놀을 처리하더라도 표피줄기세포에서 p63 발현이 특이적으로 변화하는 세포는 관찰되지 않음을 볼 수 있다. Western blotting 분석을 통해서 페오놀에 의한 표피줄기세포군 내 p63 총량의 변화를 보면 대조군에 비해 늘어나 있음을 알 수 있고 이는 표피줄기세포 활성화 물질로 보고된 hyaluronic acid (HA)와 EGF 처리군에서도 유사한 결과를 관찰할 수 있다(Figure 4B)[11]. GAPDH는 loading control로 involucrin은 각질세포 분화 마커로 각각 발현량을 확인하였다. 이를 통해서 페오놀이 표피줄기세포의 자기 복제 능력만을 활성화하고, 각질세포로 분화를 유도하지는 않는 것을 확인할 수 있다.

3.5. Colony Forming Assay (CFA)

줄기세포는 일반 세포들과 달리 하나의 세포에서 세포 분열을 통해서 세포의 군집인 콜로니를 형성할 수 있는 능력을 가지고 있어서, 이러한 콜로니 형성 관찰을 통해서 줄기세포 특이적인 지속적 세포 분열 활성을 측정할 수 있다. 표피줄기세포 500여 개를 100 mm 플레이트에서 14일 동안 키우게 되면 Figure 5에서 보는 것과 같이 콜로니가 형성되는 것을 관찰할 수 있다. 무처리군과 비교해 볼 때 페오놀을 처리한 군에서 확

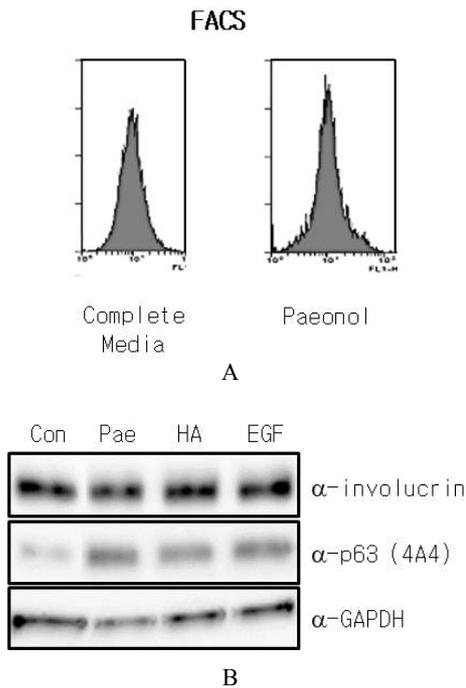


Figure 4. The differentiation of keratinocyte stem cell to keratinocyte was not induced by paeonol. (A) Expression of p63 protein was measured using FACS system. (B) Western blotting analysis with anti-p63 (4A4) antibody in keratinocyte stem cell treated with indicated materials. Paeonol (20 μ g/mL), HA (10 μ g/mL), and EGF (100 ng/mL) were used as positive control.

연히 많은 수의 콜로니가 나타남을 관찰할 수 있으며, 그 크기 또한 상대적으로 크를 확인할 수 있다. 콜로니를 정량적으로 분석하기 위해서 Fusion Fx 5 image system의 colony counting 분석법을 이용하여 콜로니 개수를 측정 한 결과 무처리군은 65개, 페오놀 처리군은 87개로 1.3배 정도 증가한 것으로 나타났다. 위의 결과로 페오놀을 처리하면 표피줄기세포의 지속적 세포 분열이 활성화 되어 더 크고, 더 많은 수의 콜로니가 형성되는 것을 볼 수 있다.

3.6. RT² Profiler PCR Arrays

메커니즘 탐색을 위해서 줄기세포 관련 유전자 89종을 한번에 RT-PCR로 분석하는 RT² Profiler PCR Array (Qiagen)를 수행하였다. 결과는 Table 1에서와 같이 0.65배 이하로 발현량이 감소한 유전자는 4종, 1.5배 이상 증가한 유전자는 37종으로 나타났다. 증가한 유전자 중에는 self-renewal에 관여한다고 알려진 유전자

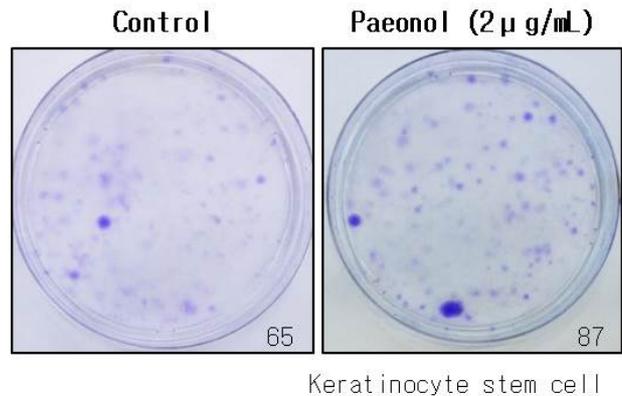


Figure 5. Paeonol induced the colony formation activity of keratinocyte stem cell. After keratinocyte stem cell was cultured in KSCM with or without paeonol for 14 days, and then the plate was taken a picture and colonies were counted using Fusion Fx 5 image system. Numbers at the bottom right corner of picture indicate detectable colonies.

4종을 비롯하여 텔로미어(telomere) 복제에 중요한 TERT 유전자와 WNT 신호전달 관련 유전자 2종, Notch 신호전달 관련 유전자 5종이 포함되어 있다. 이를 통해서 페오놀이 self-renewal 관련 유전자와 줄기세포에서 중요한 WNT/Notch 신호전달 관련 유전자의 발현을 유도하여 표피줄기세포의 재생 능력을 활성화시키고, TERT 유전자를 활성화함으로써 텔로미어 상실에 의한 세포 노화 현상을 막아 주는 것을 알 수 있다. 위와 같이 페오놀은 특정한 하나의 유전자나 신호전달 체계를 통해 표피줄기세포 재생을 활성화 하는 것이 아니라 다양한 유전자들의 발현을 조절하여 표피줄기세포 재생을 유도하는 것을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 노화가 진행되면서 감소하는 표피줄기세포를 재생시키는 안티에이징 소재를 찾고자 천연물 유래 화합물 라이브러리에서 표피줄기세포 활성화 소재를 검색하였으며, 페오놀을 표피줄기세포 세포 분열 활성화 물질로 발굴하였다. 표피줄기세포의 세포 분열 주기 변화 분석을 통해 페오놀이 휴지기의 세포를 복제기로 유도하여 표피줄기세포의 세포 분열을 활성화하는 것을 확인하였다. 페오놀에 의한 세포 분열 활성화가 표피줄기세포의 분화에는 영향을 주지 않음

Table 1. Down-regulated and Up-regulated Genes in Keratinocyte Stem Cell by Treatment with Paeonol

	Gene name	Fold	Function
Down-regulated genes	ALDH2	0.63	Metabolic marker
	COL2A1	0.5	Mesenchymal cell lineage marker
	CTNNA1	0.63	Cell adhesion molecules
	DLL1	0.63	Cell-cell communication (notch)
	ACAN	1.6	Mesenchymal cell lineage marker
	ACTC1	1.6	Embryonic cell lineage marker
	ALPI	1.6	Mesenchymal cell lineage marker
	AXIN1	1.6	Regulation of the cell cycle
	BMP1	1.59	Cytokines & growth factor
	BMP2	1.6	Cytokines & growth factor
	BMP3	1.56	Cytokines & growth factor
	CD3D	1.6	Hematopoietic cell lineage marker
	CD4	1.6	Cell adhesion molecules
	CD8A	1.53	Hematopoietic cell lineage marker
	CD8B	1.6	Hematopoietic cell lineage marker
	COL9A1	1.6	Cell adhesion molecule
	CXCL12	1.6	Cytokines & growth factor
	DHH	1.55	Symmetric & asymmetric cell division
	DLL3	1.6	Notch signaling
	DTX1	1.6	Notch signaling
DTX2	1.59	Notch signaling	
Up-regulated genes	EP300	1.6	Regulation of the cell cycle (notch)
	FGF3	1.6	Regulation of the cell cycle
	FGF4	1.6	Regulation of the cell cycle
	GDF2	1.6	Cytokines & growth factors
	GDF3	1.6	Cytokines & growth factors
	GJB1	1.6	Cell-cell communication
	GJB2	1.59	Cell-cell communication
	IGF1	1.6	Cytokines & growth factors
	KAT2A	1.6	Chromatin modification enzymes & remodeling factor (notch)
	KAT7	1.6	Self-renewal marker
	MYOD1	1.6	Embryonic cell lineage marker
	NEUROG2	1.6	Self-renewal marker
	PDX1	1.6	Embryonic cell lineage marker
	PPARD	1.6	WNT signaling
	S100B	1.6	Neural cell lineage marker
	SOX1	1.58	Self-renewal marker
	SOX2	1.6	Self-renewal marker
	TERT	1.6	Chromatin modification enzymes & remodeling factors
	TUBB3	1.58	Neural cell lineage marker
	WNT1	1.6	WNT signaling

Transcription of stem cell-related genes in keratinocyte stem cell was analyzed through RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen). Genes that were down-regulated less than 0.65 fold or up-regulated more than 1.5 fold are listed.

을 p63 마커 확인을 통해서 검증하였으며, 줄기세포의 특성 중 하나인 콜로니 형성을 보는 CFA에서도 개선 효과를 나타내었다. 폐오놀의 작용 기작을 알기 위하여 줄기세포 관련 89종 유전자의 발현 변화 분석을 한 결과 41종에서 유의미한 변화를 관찰하였으며, 그 중에서 self-renewal 관련 유전자들, 텔로미어 복제 관련 유전자, WNT/Notch 관련 유전자들의 발현이 증가하였다. 이를 통해 폐오놀이 줄기세포의 자기복제에 관련된 여러 신호 전달 체계에 복합적으로 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 폐오놀의 표피줄기세포 세포 분열 활성화 효능을 발굴하였고, 이를 통해 노화에 따른 표피줄기세포 감소를 막아주는 안티에이징 소재로 활용 가능성을 확인하였다. 앞으로 임상 시험을 통한 생체 내에서 폐오놀의 표피줄기세포 재생에 대한 효능 연구를 추가적으로 수행할 필요가 있다고 판단된다.

Reference

1. R. M. Lavker and T. T. Sun, Epidermal stem cells: properties, markers, and location, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(25), 13473 (2000).
2. L. Alonso and E. Fuchs, Stem cells of the skin epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(suppl1), 11830 (2003).
3. C. Blanpain and E. Fuchs, Epidermal stem cells of the skin, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **22**, 339 (2006).
4. A. Webb, A. Li, and P. Kaur, Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin, *Differentiation*, **72**(8), 387 (2004).
5. P. Kaur, Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential, *J. Invest. Dermatol.*, **126**(7), 1450 (2006).
6. J. R. Bickenbach, M. M. Stern, K. L. Grinnell, A. Manuel, and S. Chinnathambi, Epidermal stem cells have the potential to assist in healing damaged tissues, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **11**(1), 118 (2006).
7. M. Senoo, F. Pinto, C. P. Crum, and F. McKeon, p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia, *Cell*, **129**(3), 523 (2007).
8. G. Pellegrini, E. Dellambra, O. Golisano, E. Martinelli, I. Fantozzi, S. Bondanza, D. Ponzin, F. McKeon, and M. D. Luca, p63 identifies keratinocyte stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(6), 3156 (2001).
9. X. Su, M. Paris, Y. J. Gi, K. Y. Tsai, M. S. Cho, Y. L. Lin, J. A. Biernaskie, S. Sinha, C. Prives, L. H. Pevny, F. D. Miller, and E. R. Flores, TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance, *Cell Stem Cell*, **5**(1), 64 (2009).
10. N. Gago, V. Perez-Lopez, J. P. Sanz-Jaka, P. Cormenzana, I. Eizaguirre, A. Bernad, and A. Izeta, Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells, *Stem Cells*, **27**(5), 1164 (2009).
11. H. R. Choi, Y. A. Kang, J. I. Na, S. Y. Huh, C. H. Hur, K. H. Kim, and K. C. Park, Oligosaccharides of hyaluronic acid increased epidermal cell stemness by modulation of integrin expression, *J. Cosmet. Dermatol.*, **11**(4), 290 (2012).