J. Soc. Cosmet. Sci. Korea
Vol. 47, No. 3, September 2021, 205-212

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2021.47.3.205

섬유아세포에서 프로모터 다형성에 의한 Matrix Metalloproteinase-1 의 발현에 관한 연구

이 진 우 · 정 유 정 · 봉 심 규 · 박 노 준 · 이 상 헌 · 노 민 수* · 임 경 민** · 김 수 남†

한국과학기술연구원 천연물연구소
*서울대학교 약학대학, 교수
**이화여자대학교 약학대학, 교수

(2021년 7월 28일 접수, 2021년 8월 31일 수정, 2021년 9월 10일 채택)

Study on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 by Promoter Polymorphism in Human Dermal Fibroblast

Jin Woo Lee, Yujung Jung, Sim-Kyu Bong, No-June Park, Sang Heon Lee, Minsoo Noh[1], Kyung-Min Lim[2], and Su-Nam Kim†

Natural Products Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, 679, Saimdang-ro, Gangneung-si, Gangwon-do 25451, Korea
[1]College of Pharmacy, Seoul National University
[2]College of Pharmacy, Ewha Womans University

(Received July 28, 2021; Revised August 31, 2021; Accepted September 10, 2021)

요 약: 본 연구는 피부 섬유아세포에 자외선을 조사하거나 TNF-α를 처리하면 세포에 따라 MMP-1의 발현이 다르게 나타나는데, 이것이 MMP-1 프로모터의 다형성에 의해서 나타남을 밝히기 위해 수행되었다. 시판하는 23 종의 primary 섬유아세포에 대하여 MMP-1 프로모터의 -1607 부위의 유전형을 분석한 결과 6 개의 1G/1G 유전형, 10 개의 1G/2G 유전형, 7 개의 2G/2G 유전형을 가진 섬유아세포를 확인할 수 있었다. Hs68과 Detroit 551 세포주는 1G/2G 유전형을 가지는 것으로 확인되었다. 1G/1G 유전형은 TNF-α 처리에 의해 대조군에 비해 MMP-1이 2 배 높게 발현되었으며, 자외선에 의해서는 거의 발현되지 않았다. 1G/2G 유전형의 경우는 TNF-α 처리에 의해 MMP-1이 2.45 배 높게 발현되었으며, 자외선에 의해서는 1.4 배 MMP-1이 발현되었다. 2G/2G 유전형의 경우는 TNF-α 처리에 의해 MMP-1이 1.35 배 발현되었으며, 자외선에 의해서는 2.5 배로 높게 발현되었다. 즉 1G 유전형은 TNF-α에 의해, 2G 유전형은 자외선에 의해 발현이 유도되는 것으로 추정할 수 있으며, -1607 위치에 하나 더 삽입된 G에 의해서 Ets 전사인자가 결합할 수 있는 site가 만들어져서 MMP-1의 발현이 증가한다고 추정할 수 있으며, 피부 노화와 관련하여 섬유아세포에서는 이에 대한 연구가 전혀 진행되어 있지 않아서 향후 추가로 연구되어야 할 부분이다. 피부는 내인성 노화와 광노화의 영향을 동시에 받는 기관이므로, 피부 노화를 개선하기 위한 타겟으로 MMP-1의 발현을 분석할 경우에는 실험 조건에 적합한 유전형을 가지는 세포를 선택하여 연구를 진행하는 전략을 세워야 할 필요성이 대두된다.

Abstract: The skin fibroblasts of different origins showed different expression levels of MMP-1 in response to TNF-α treatment or UV irradiation. We hypothesized that this is caused by polymorphism in the MMP-1 promoter region. To elucidate it, first of all, we analyzed and classified the genotype of the -1607 site of the MMP-1 promoter in 23 commercially

† 주 저자 (e-mail: snkim@kist.re.kr)
call: 033-650-3503

available primary fibroblasts, and then we examined the expression of MMP-1 by TNF-α or UVB stimulation for each classified genotype. As a result of the analysis, fibroblasts with 6 1G/1G genotypes, 10 1G/2G genotypes, and 7 2G/2G genotypes were identified. Hs68 and Detroit 551 cell lines were confirmed to have 1G/2G genotypes. In the 1G/1G genotype, MMP-1 was expressed twice as high as that of the control group by TNF-α treatment, and was hardly expressed by UV light. In the case of the 1G/2G genotype, MMP-1 was expressed 2.45 fold higher by TNF-α treatment, and 1.4 fold by UV light than the control. In the case of the 2G/2G genotype, MMP-1 was expressed 1.35 fold by TNF-α treatment, and was highly expressed by 2.5 fold by ultraviolet rays compared to control. It can be estimated that MMP-1 expression is better induced in the 1G genotype by TNF-α and in the 2G genotype by UV light. In addition, it can be presumed that MMP-1 expression is increased by creating a site where the Ets transcription factor can bind by another G inserted at the -1607 position. These studies have not been conducted at all in fibroblasts in relation to skin aging, so it is an area that needs to be further studied in the future. In conclusion, since the skin is an organ that is affected by both intrinsic aging and photoaging at the same time, when analyzing the expression of MMP-1 as a target for improving skin aging, it is necessary to select cells with a genotype suitable for the experimental conditions of the study.

Keywords: *MMP-1 promoter, -1607 1G/2G polymorphism, fibroblast, TNF-α, UVB*

1. 서 론

피부 노화에 대한 연구는 전통적으로 광노화와 내인성 노화에 대한 연구가 이루어졌으며, 2차원 배양을 기본으로 하는 세포 수준에서 표피를 구성하는 각질형성세포와 멜라닌형성세포, 진피를 구성하는 섬유아세포를 중심으로 연구가 진행되어 왔다 [1,2]. 피부의 항노화 전략은 기능성화장품 고시원료인 레티놀에서 보이는 것처럼 진피의 구성 단백질인 콜라겐의 생합성 및 분해에 초점이 맞추어져서 진행되어 왔으며, 주름 개선 기능성시험은 콜라겐 생합성, 콜라게나제(matrix metalloproteinase, MMP)활성 억제, 엘라스타제 활성 저해로 이루어져 있다[3,4].

MMP는 matrixin으로도 알려져 있으며 Ca^{++}의존성 Zn 함유 endopeptidase이며, 세포외 기질(extra cellular matrix, ECM) 단백질을 분해할 수 있는 효소로 1962년 올챙이 꼬리가 소실되는 과정에서 최초로 발견되었다. MMP는 세포증식, 이동, 분화, 혈관신생, 세포자멸사, 숙주 방어과정에서 중요한 역할을 하고 있으며, 세포외 기질을 분해하고 조직을 리모델링하는 과정에서 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 및 암 등의 여러 가지 병적인 상황과도 연계되어 있음이 밝혀져 있다. MMP를 기능적으로 나누면, 콜라겐을 분해하는 collagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13), 젤라틴을 분해하는 gelatinase (MMP-2, MMP-9), 광범위한 세포외 기질 단백질을 분해하는 stromelysin (MMP-3, MMP-10), membrane type MMPs로 나누어진다. 피부의 노화에는 다양한 MMP들이 관여하지만 대표적으로 콜라겐을 분해하는 MMP-1, MMP-8, 젤라틴을 분해하는 MMP-2, MMP-9, 다른 MMP의 propeptide를 잘라줌으로써 활성화시켜주는 MMP-3 등이 중요한 MMP로 여겨지고 있다[5,6].

MMP는 여러 분자 수준에서 조절되는데, 전사(transcription) 과정, mRNA 안정성(stability), 번역 효율(translational efficiency), enzyme compartmentalization, proenzyme 활성, endocytosis 등에 의해 조절된다. MMP의 활성은 세포외 공간에서 주로 내인성 inhibitor인 tissue inhibitor of MMP (TIMP)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며, 피부가 노화되면서 MMP-1과 MMP-3은 증가하고, TIMP-1은 감소하는 것으로 알려져 있다[7].

MMP의 발현을 조절하는 외부 자극은 염증성 사이토카인, 성장인자, 글루코코르티코이드, 레티노이드 등이며, 이와 관련되는 전사인자는 NF-kB, MAPK, STAT, Smad 등이며, 이들은 IL-1β, TNF-α, oncostatin M과 같은 리간드에 의해 활성화되는 신호전달 경로에 포함된다. MMP 유전자의 조절에 관련되는 프로모터상의 주요 site는 AP-1, PEA3, NF-kB, STAT responsive elements이며, 이는 외부 인자들의 변화에 따라 다양한 전사인자들의 결합과 결합복합체에 의해 조절될 수 있음을 시사한다. 그 외 많이 연구되지는 않았지만 후성 유전학적으로도 조절되는데, 프로모터 부위에 CpG islands의 methylation과 히스톤 단백질의 acetylation에 의해서 조절될 수 있음이 일부 밝혀졌으며, 자외선에 의한 MMP-1의 프로모터 활성에 histone aceyltransferase인 P300이 중요한 역할을 함이 알려져 있다[6].

MMP의 발현은 프로모터 다형성(polymorphism)에 의해서도 조절될 수 있음을 가정할 수 있는데 실제로 MMP 프

로모터의 다형성에 대한 연구는 암에서 많이 연구되었으며, MMP-1 (-1607 1G/2G), MMP-2 (-1507 G/A, -1306 C/T, -735 C/T), MMP-3 (-1171 5A/6A), MMP-7 (-181 A/G), MMP-8 (-799 C/T, -381 A/G, +17 C/G), MMP-9 (-1562 C/T), MMP-12 (-82 A/G)에 대한 연구가 보고되어 있으며, 프로모터의 염기가 변화하게 되면, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9의 프로모터 활성은 높아지고, MMP-2, MMP-3, MMP-12의 프로모터 활성은 낮아진다고 보고되어 있다[6,8]. 2015년 스위스 연구진의 보고에 따르면, 평균 연령 73.5 세의 여성 697 명의 코호트연구에서 MMP-1 2G allele과 MMP-3 6A allele이 피부주름과 기도폐쇄와 연관성이 높다고 밝혀졌다[9]. MMP-1 프로모터의 다형성은 −1607 1G/2G, -519 A/G, -422 T/A, -340 T/C, -320 T/C의 5 개 site가 보고되어 있으나, 이 중 −1607 위치의 다형성이 중요함이 여러 질환에서 보고되었다[10-12].

본 연구는 시판되고 있는 여러 섬유아세포들에 광노화를 유도하기 위해 자외선을 조사하거나, 내인성 노화를 유도하기 위해 TNF-α를 처리하였을 때 MMP-1 의 발현이 세포에 따라 서로 다르게 나타남에 의문을 품고 그 규칙이 프로모터의 다형성에 의해서가 아닐까라는 가설을 세우고 이를 밝히기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포배양

섬유아세포는 인간의 진피에서 분리된 primary 세포로 Lonza (Lonza, USA), Cefobio (CEFO CO. Ltd., Korea), Biosolution (Biosolution CO. Ltd., Korea)에서 구매 또는 기부 받아서 사용하였으며, Hs68 및 Detroit 551 세포주는 ATCC (american type culture collection, USA)에서 구매하여 사용하였다. 섬유아세포들은 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, USA)와 1% penicillin/streptomycin (10,000 U pen/mL, 10,000 μg strep/mL) (Invitirogen, USA)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Hyclone, USA) 배지를 이용하여 37 ℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포는 85 ~ 90%의 confluency를 가지도록 2 ~ 3 일 간격으로 계대 배양을 시행하고, passage 4 ~ 6에 해당하는 세포를 실험에 사용하였다.

2.2. TNF-α 처리 및 자외선 조사

섬유아세포는 24 h 동안 혈청 없는 DMEM배지에서 배양하였고, 이후 TNF-α (10 ng/mL) (Sigma-aldrich, USA)를 처리하거나, UVB를 조사 (20 mJ/cm^2) 하고 혈청 없는 배지에서 24 h 더 배양하였다. 방출 스펙트럼이 280 ~ 360 nm 이며, 최대 312 nm인 Sankyo Denki G15T8E (Sankyo Denki, Japan) UVB 램프를 UV 광원으로 사용하였으며, UVB 광의 세기는 UVB 미터(HD2102.01, Delta Ohm, Italy)로 측정하였다.

2.3. 염색체 DNA 추출, PCR 및 염기서열 분석

섬유아세포를 100 mm dish에 1 × 10^6 cells/well의 농도로 분주하고 부착시킨 후, 24 h 배양하고, 세포를 수거한 후에 QIAGEN FlexiGene DNA kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 염색체 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 사용하기 전까지 -20 ℃에 보관하였다. 추출된 DNA를 이용하여 MMP-1 프로모터의 −1607 부위의 유전자형을 포함하도록 전후로 primer를 디자인하여 유전자의 단편을 증폭하였으며, 사용된 primer는 forward; 5'-TCA CCC TTG TTT CCC AGG C-3', reverse; 5'-CGG TGT CAC CAG TGC TAT CT-3' 이다. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 TAKARA Ampilification kit (TAKARA biomedical co., Japan)을 사용하였으며, DNA 1 μL, 10x EX taq buffer 2 μL, dNTP MIX 1.6 μL, EX Taq 0.1 μL, 10 pmol/L의 primer 각 1 μL, DW 13.3 μL를 넣어 총 반응용액을 20 μL로 하여 denaturation 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 45 s, 72 ℃ 30 s에 30 cycle의 조건으로 PCR 자동화기계(T100^{TM} Thermal Cycler, BIO-RAD, USA)에서 중합반응을 시행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하여 band를 확인한 후, 솔젠트사(SolGent Co., Ltd, Korea)에 염기서열분석을 의뢰하여 염기서열을 얻어서 분석에 사용하였다.

2.4. RNA 추출, cDNA 합성 및 RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

섬유아세포에 TNF-α를 처리하거나, UVB를 조사한 후, Total RNA는 Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조자가 제시한 protocol대로 수행하여 얻었다. 먼저 RLT Buffer로 세포를 용해한 다음 각각 RW1 buffer, RPE buffer로 wash하고 원심분리하는 과정을 통해 얻었다. 수득한 RNA는 diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water (Invitrogen, USA)에 녹인 뒤 nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 정량하였다. Total RNA 농도는 1 μg으로 보정하고 cDNA synthesis Kit (TAKARA biomedical

CO., Japan)을 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 실험에 사용하였다. 합성한 cDNA로부터 MMP-1 과 GAPDH의 발현 양을 확인하기 위하여 TAKARA Ampilification kit (TAKARA biomedical co., Japan)을 사용하여, DNA 1 μL, 10x EX taq buffer 2 μL, dNTP MIX 1.6 μL, EX Taq 0.1 μL, 10 pmol/L의 primer 각 1 μL, DW 13.3 μL를 넣어 총 반응용액을 20 μL로 하여 denaturation 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 45 s 72 ℃ 30 s에 30 cycle의 조건으로 PCR 자동화기계에서 중합반응을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 primer는 MMP-1에 대해서는 forward로 5'-CGA ATT TGC CGA CAG AGA TGA-3', reverse로 5'-GTC CCT GAA CAG CCC AGT ACT T-3' 이 사용되었으며, GAPDH에 대해서는 forward로 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', reverse로 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' 이 사용되었다. 증폭된 DNA에 대해서는 QIAxcel® Advance system (Qiagen, Germany)을 이용하여 전기영동 및 발현 양 분석을 수행하였다.

2.5. 잠정적인 전사인자 결합 부위 분석

−1607 전후의 110 베이스의 서열을 ALGGEN PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) 프로그램에 적용하여 잠정적으로 결합 가능한 전사인자를 분석하였다.

2.6. 통계처리

본 연구에서 시행된 실험은 세포주마다 총 3 회 수행되었고, 데이터의 통계적 유의성 검정은 student's *t*-test로 시행되었다. 결과 값들은 mean ± standard deviation (SD)으로 표시하였고 p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 섬유아세포의 MMP−1 프로모터 −1607 위치의 다형성 분석

프로모터의 다형성을 분석하기 위하여 Cefobio사 세포 6개, Biosolution사 세포 7 개, Lonza사 세포 10 개와 Hs68, Detroit 551 등 총 25 개의 세포를 사용하여 −1607 위치 전후로 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 다형성은 1G/1G, 1G/2G, 2G/2G로 나타났다(Figure 1). 분석 결과 1G/1G 유전형은 6 개, 1G/2G 유전형은 10 개, 2G/2G 유전형은 7 개로 밝혀졌다. 좀 더 자세히 살펴보면, Hs68과 Detroit 551 세포는 1G/2G 유전형으로 확인되었으며, Cefobio사 세포는 1G/2G 유전형 2 개와 2G/2G 유전형 4 개로 확인되었으며, Biosolution사 세포는 1G/1G 유전형 1개, 1G/2G 유전형 4 개 2G/2G 유전형 2 개로 확인되었으며, Lonza사 세포는 1G/1G 유전형 5개 1G/2G 유전형 4 개, 2G/2G 유전형 1개로 확인되었다(Table 1). 연구에 사용한 각 세포별 자세한 유전형 및 정보는 Table 2에 자세히 기술하였다.

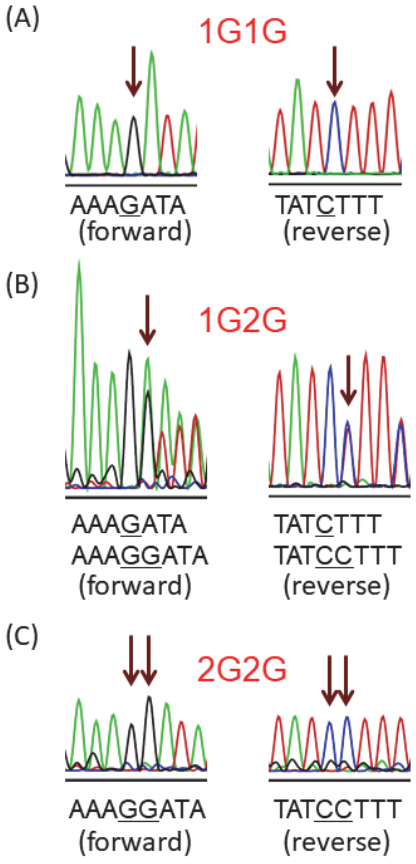

Figure 1. Nucleotide sequences of single nucleotide polymorphism (SNP) for MMP-1 promoter at −1607 site. (A) 1G/1G. (B) 1G/2G. (C) 2G/2G.

Table 1. Polymorphism of MMP-1 Promoter in Primary Human Dermal Fibroblasts

Polymorphism (-1607)	Cefobio	Biosolution	Lonza	Sum
1G/1G	0	1	5	6
1G/2G	2	4	4	10
2G/2G	4	2	1	7
Sum	6	7	10	23

Table 2. Detailed Information of Fibroblasts Used in This Study

Cell	Cat. No.	Lot No.	Company	Passage	SNP (-1607)	Year
HDF	CB-HDF-0010	40F05-045	Cefobio	6	2G/2G	2015(P)
		40T12-062	Cefobio	5	2G/2G	2015(P)
		40T11-059	Cefobio	5	1G/2G	2015(P)
		50T06-070	Cefobio	5	2G/2G	2015(P)
		50T09-071	Cefobio	5	1G/2G	2015(P)
		50T11-069	Cefobio	5	2G/2G	2015(P)
HDF-A	-	HDF074	Biosolution	6	1G/2G	2017(D)
		HDF078A	Biosolution	6	1G/2G	2017(D)
		HDF084	Biosolution	6	2G/2G	2017(D)
		HDF079	Biosolution	6	1G/2G	2017(D)
		HDF080	Biosolution	6	2G/2G	2017(D)
		HDF082	Biosolution	6	1G/1G	2017(D)
		HDF054B	Biosolution	6	1G/2G	2017(D)
NHDF-neo	CC-2509	-	Lonza	4	1G/1G	2015(D)
		-	Lonza	5	1G/1G	2017(D)
NHDF-ad	CC-2511	-	Lonza	6	1G/2G	2017(D)
		-	Lonza	6	1G/1G	2014(D)
		-	Lonza	6	1G/1G	2010(D)
		-	Lonza	6	1G/2G	2009(D)
		-	Lonza	6	2G/2G	2016(D)
		-	Lonza	6	1G/1G	2017(D)
		-	Lonza	6	1G/2G	2013(D)
		-	Lonza	6	1G/2G	2012(D)
Hs68	CRL-1635™	-	ATCC	20	1G/2G	2012(P)
Detroit 551	CRL-110™	-	ATCC	25	1G/2G	2011(P)

SNP; Single nucleotide polymorphism, P; purchased, D; donated, Year; purchased or donated year

3.2. −1607 부위의 다형성이 MMP−1 발현에 미치는 영향 분석

앞의 항에서 확인된 유전자형에 대하여 MMP-1의 발현에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 내인성 노화를 유도하기 위해서는 TNF-α (10 ng/mL)를, 광노화를 유도하기 위하여 UVB (20 mJ/cm^2)를 조사하였다. 1G/1G 유전형 6 개에 대해 분석한 결과 TNF-α 처리에 의해서는 약 2 배 정도 MMP-1의 발현이 증가하였으며, 자외선 조사에 의해서는 MMP-1의 발현이 거의 유도되지 않았다. 1G/2G 유전형에 10 개에 대해 분석한 결과 TNF-α 처리에 의해서는 약 2.45 배 정도 MMP-1의 발현이 증가하였으며, 자외선 조사에 의해서는 약 1.4 배 정도 MMP-1의 발현이 증가하였다. 2G/2G 유전형에 7 개에 대해 분석한 결과 TNF-α 처리에 의해서는 약 1.35 배 정도 MMP-1의 발현이 증가하였으며, 자외선 조사에 의해서는 약 2.5 배 정도 MMP-1의 발현이 증가하였다 (Figure 2). Hs68과 Detroit 551 세포주는 TNF-α에 의해서는 MMP-1의 발현이 잘 유도되지만, 자외선에 의해서는 경우에 따라서 발현의 변동 폭이 심한 것이 1G/2G 유전형을 가지기 때문으로 설명될 수 있다. 국내 자원자에서 분리한 피부 세포를 판매하는 Cefobio와 Biosolution사의 세포는 주로 1G/2G와 2G/2G 유전형을 가지며, 코카시안 등에서 분리한 피부 세포를 판매하는 Lonza사의 세포는 주로 1G/1G, 1G/2G의 유전형을 가지는 것으로 확인되므로, 피부노화 관련 연구를 수행할 때는 프로모터의 유전형을 분석한 후 용도에 따라서 선택하여 사용하는 것이 실험의 성공 가능성을 높이는 방법 중의 하나일 수 있을 것으로 사료된다.

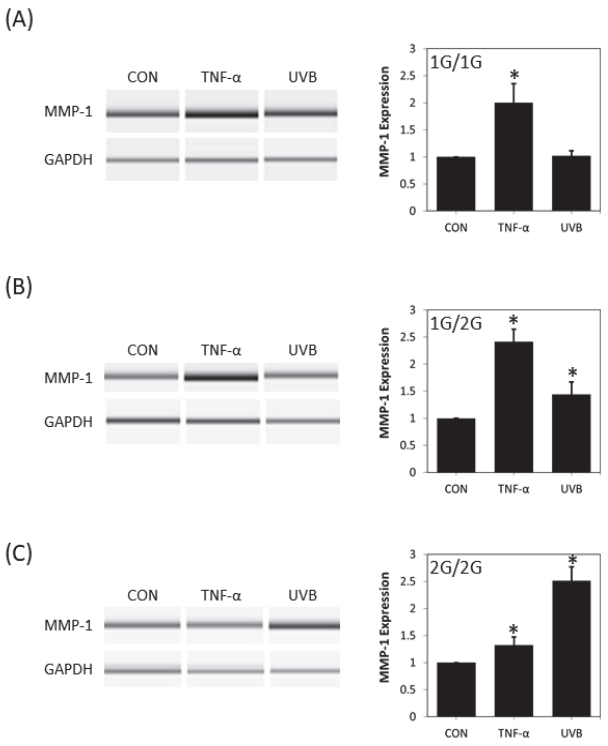

Figure 2. Analysis of the expression levels of MMP-1 in primary fibroblasts with three types of SNPs. The expression levels of MMP-1 was measured after treating fibroblast with TNF-α (10 ng/mL) or UVB (20 mJ/cm^2) for 24 h. The left panel shows a representative picture of RT-PCR for 1G/1G (A), 1G/2G (B), or 2G/2G(C) genotypes. And each bar of the right panel represents the mean ± SD of three independent experiments for each genotypes. $^*p < 0.05$ vs. control (CON).

3.3. −1607 부위의 잠정적인 전사인자 분석

1G 유전형과 2G 유전형에 결합할 수 있는 전사인자들이 서로 다른지를 확인하기 위하여 ALGGEN PROMO 사이트에서 분석해보았다. 분석 결과 여러 가지 전사인자들이 확인되었는데, 동일하게 검색된 인자를 제외하고 결합 가능한 전사인자는 1G에 대해서는 GATA-3가 확인되었으며, 2G에 대해서는 HELIOS, Elk-1, Lvb-binding factor, P300, FACB 등이 잠정적으로 결합할 수 있는 전사인자로 추정되었다(Table 3). 암 연구에서는 −1607 위치에 G가 하나 더 삽입되면, Ets 전사인자가 결합할 수 있는 site가 만들어져서 MMP-1이 mRNA나 단백질 수준에서 발현이 증가한다고 보고되어 있으며 이는 폐암과 결장암에 대한 민감도가 증가되는 것과 관련되어 있다[13,14]. 피부세포에서는 2G/2G 유전형을 가지는 흑색종이 좋지 않은 예후를 보인다는 보고가 있었다[15]. Elk-1에 대해 살펴보면, ETS Like-1 protein이며 전사인자로 작용하며 장기기억형성, 약물 중독, 알츠하이머병, 다운증후군, 유방암, 우울증 등과 관련있다고 알려져 있으며, 섬유아세포에서 피부노화와 관련된 연구는 보고되어 있지 않다[16,17]. 향후 유전형에 따른 섬유아세포를 활용하여 −1607 위치를 중심으로 전사인자들과의 직접적인 결합에 대한 연구를 수행하여 어떤 전사인자들이 유전형에 따른 MMP-1의 발현에 중요하게 영향을 미치는지 밝혀야 할 것으로 사료된다.

Table 3. Putative *cis*-elements Located at −1661/-1553

AAAGATA	AAAGGATA
GATA-3	HELIOS
	Elk-1
	Lvb-binding factor
	P300
	FACB

Putative *cis*-elements searched using ALGGEN PROMO. Only transcription factors that differ between two SNPs were listed.

4. 결 론

본 연구에서는 시판되고 있는 여러 섬유아세포에 대하여 MMP-1 프로모터의 −1607 위치의 유전형을 분석하고 분류한 후, 각 유전형에 대하여 TNF-α를 처리하거나, 자외선을 조사한 후 MMP-1의 발현에 미치는 영향을 확인해 보았다. 총 23 개의 primary 섬유아세포에 대하여 분석한 결과 6 개의 1G/1G 유전형, 10 개의 1G/2G 유전형, 7 개의 2G/2G 유전형을 가진 섬유아세포를 확인할 수 있었다. 1G/1G 유전형은 TNF-α 처리에 의해 MMP-1이 대조군에 비해 2 배 높게 발현되었으며, 자외선에 의해서는 거의 발현되지 않았다. 1G/2G 유전형의 경우는 TNF-α 처리에 의해 MMP-1이 2.45 배 높게 발현되었으며, 자외선에 의해서는 MMP-1이 1.4 배 발현되었다. 2G/2G 유전형의 경우는 TNF-α 처리에 의해 MMP-1이 1.35 배 정도 발현되었으며, 자외선에 의해서는 MMP-1이 2.5 배 높게 발현되었다. 즉 1G 유전형은 TNF-α에 대해, 2G 유전형은 자외선에 의해 발현이 유도되는 것으로 추정할 수 있다. 또한 실험에 사용한 세포수가 통계를 내기에는 적은 수이기는 하지만 국내 자원자에서 유래된 세포들은 주로 1G/2G와 2G/2G 유전형을 가지며, 코카시안에서 유래된 세포들은 주로 1G/1G와 2G/2G

유전형이 더 많은 것으로 추정된다. 암 연구에서는 -1607 위치에 하나 더 삽입된 G에 의해서 Ets 전사인자가 결합할 수 있는 site가 만들어져서 MMP-1의 발현이 증가한다고 보고되어 있는데, 피부 노화와 관련하여 섬유아세포에서는 이에 대한 연구가 전혀 진행되어 있지 않아서 향후 추가로 연구되어야 할 부분이다.

피부는 내인성 노화와 광노화의 영향을 동시에 받는 기관이므로, 피부 노화를 개선하기 위한 타겟으로 MMP-1의 발현을 분석할 경우에는 실험 조건에 적합한 유전형을 가지는 세포를 선택하여 연구를 진행하는 전략을 세워야 할 필요성이 대두된다. 또한, MMP-1의 발현을 측정할 때 자외선과 TNF-α를 동시에 주어서 유도하게 되면, 유전형에 의한 영향을 덜 받을 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging: A comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol.*, **11**(5), 398 (2002).
2. P. Henrot, P. Laurent, E. Levionnois, D. Leleu, C. Pain, M. E. Truchetet, and M. Cario, A method for isolating and culturing skin cells: Application to endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes from punch biopsies in systemic sclerosis skin, *Front. Immunol.*, **11**, 566607 (2020).
3. J. P. M. Cleutjens, The role of matrix metalloproteinases in heart disease, *Cardiovasc. Res.*, **32**(5), 816 (1996).
4. M. Zasada and E. Budzisz, Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments, *Postepy. Dermatol. Alergol.*, **36**(4), 392 (2019).
5. A. Page-McCaw, A. J. Ewald, and Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**(3), 221 (2007).
6. M. Fanjul-Fernández, A. R. Folgueras, S. Cabrera, and C. López-Otín, Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models, *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**(1), 3 (2010).
7. G. Herrmann, P. Brenneisen, M. Wlaschek, J. Wenk, K. Faisst, G. Quel, C. Hommel, G. Goerz, T. Ruzicka, T. Krieg, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts *in vitro* reminiscent of cellular senescence, *J. Cell. Sci.*, **111**(Pt6), 759 (1998).
8. S. Dey, N. Ghosh, D. Saha, K. Kesh, A. Gupta, and S. Swarnakar, Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) Promoter polymorphisms are well linked with lower stomach tumor formation in eastern Indian population, *PLoS One*, **9**(2), e88040 (2014).
9. A. Vierkötter, T. Schikowski, D. Sugiri, M.S. Matsui, U. Krämer, and J. Krutmann, MMP-1 and -3 promoter variants are indicative of a common susceptibility for skin and lung aging: Results from a cohort of elderly women (SALIA), *J. Invest. Dermatol.*, **135**(5), 1268 (2015).
10. J. Y. Chen, K. C. Chang, and Y. M. Liou. Matrix metalloproteinase 1 1G/2G gene polymorphism is associated with acquired atrioventricular block via linking a higher serum protein level, *Sci. Rep.*, **10**(1), 9900 (2020).
11. C. L. Hsiao, L. C. Liu, T. C. Shih, Y. L. Lai, S. W. Hsu, H. C. Wang, S. Y. Pan, T. C. Shen, C. W. Tsai, W. S. Chang, C. H. Su, T. D. Way, J. G. Chung, and D. T. Bau, The association of matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms with breast cancer, *In Vivo*, **32**(3), 487 (2018).
12. Y. Zhou, Q. Gao, D. He, A. Deng, R. Huang, Y. Li, C. Tan, C. Guo, Q. Guo, L. Wang, G. Yang, and H. Zhang, Matrix metalloproteinase-1 promoter -1607 bp 1G/2G polymorphism associated with increased risk of spinal tuberculosis in Southern Chinese Han population, *J. Clin. Lab. Anal.*, **31**(6), e22136 (2017).
13. Y. Zhu, M. R. Spitz, L. Lei, G. B. Mills, and X. Wu, A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility, *Cancer Res.*, **61**(21), 7825 (2001).
14. M. Woo, K. Park, J. Nam, and J. C. Kim, Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **22**(7), 1064 (2007).
15. S. Ye, S. Dhillon, S. J. Turner, A. C. Bateman, J. M.

Theaker, R. M. Pickering, I. Day, and W. M. Howell, Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism, *Cancer Res.*, **61**(4), 1296 (2001).

16. V. N. Rao, K. Huebner, M. Isobe, A. Ar-Rushdi, C. M. Croce, and E. S. Reddy, *elk*, Tissue-specific *ets*-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints, *Science*, **244**(4900), 66 (1989).
17. A. Besnard, B. Galan-Rodriguez, P. Vanhoutte, and J. Caboche, Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain, *Front. Neurosci.*, **5**, 35 (2011).