

배양된 섬유아세포에서 탄력소 mRNA의 분석*

계명대학교 의과대학 피부과학교실

류영욱·이규석

서 론

피부 및 여러 장기의 세포외기질은 교원질과 비교원질 성분의 복잡한 복합체이다. 피부 뿐만 아니라 여러 조직에서 정상적인 생리작용을 위해 세포외기질은 적당량과 상호작용이 필요하다. 그러므로 섬유아세포에서 세포외기질 유전자의 발현을 조사 연구하여 정상 생물학적 및 생화학적 작용을 이해하는 것이 이에 관계된 질환의 병인을 밝혀 내는데 중요한 역할을 할 것이다.

세포외기질은 대부분 섬유아세포에서 생성되며 그 종류로는 교원질(collagen), 탄력소(elastin), proteoglycans, fibronectin, laminin 등이 있다. 이 중 교원질이 70% - 80%로 대부분을 차지하고, 탄력소 섬유는 정상성인피부의 진피에서 2% - 4% 정도 차지하나^{1, 2)} 탄력성과 복원성의 특징을 지녀 피부의 구조와 기능을 담당하게 하는 중요한 인자이다.

본 연구는 keloid 환자와 정상대조군의 피부조직의 섬유아 세포를 배양하고, 태반조직의 RNA를 분리하여 탄력소, fibronectin, β -actin 등의 세포외기질 mRNA를 Northern blot hybridization 및 slot-blot hybridization 방법으로 유전자를 재결합시켜 탄력소 mRNA의 질적, 양적변화를 분자 생물학적으로 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

임상적 및 병리조직학적으로 확진된 켈로이드 환자의 병변부위와 대조군의 정상 피부에서 생검한 피부절편을 잘게 썰어 10% fetal calf serum을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로

37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하고 trypsinization으로 세대배양 한뒤 3-6 세대의 피부 섬유아 세포를 얻었다. 성별 및 연령에 맞추어 선택한 산모에서 태반조직을 얻어 즉시 -70°C에 냉동한 다음 300mg씩 조직분쇄기로 분쇄하여 그 추출액을 채취하였다.

2. 실험 방법

1) RNA 분리

RNA분리는 chloroform : isoamylalcohol 추출법³⁾을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. 배양된 섬유아 세포와 조직분쇄기로 분쇄하여 채취한 태반조직 추출액을 각각 단백질 변성제인 pH 7.0의 guanidium thiocyanate 완충액(이하 GT buffer)에 모은뒤 chloroform-isoamylalcohol, 2 M Na-acetate와 phenol을 첨가하여 용액을 균질화 시키고 4°C에서 20분간 10,000rpm으로 원심분리한 다음 상층부를 채취하여 isopropanol을 첨가하고 다시 30분간 원심분리하여 침전물을 얻어, GT buffer에 녹였다. 1시간 이상 -70°C에서 저장한뒤 다시 원심분리 한다음 depec(die-thylpyrocarbonate)-treated water에 녹여 spectrophotometer로 260nm에서 RNA 농도를 측정하였다.

2) cDNA probe 정제

2.35kb elastin cDNA, 1.3kb fibronectin cDNA, 2.0 kb β -actin cDNA 등으로 형질변형 시킨 *Escherichia coli* 균주 HB 101에서 Triton-lysozyme 방법⁴⁾으로 각각의 plasmid DNA를 분리하여 Yang 등⁵⁾의 방법으로 cDNA를 정제하였다. Nick translation⁶⁾은 각각의 cDNA 탐지자를 ³²P로 표지(labeling)시키는 과정으로 cDNA 25 μ g/ μ l, ³²P-dCTP 2 μ l, dATP, dGTP, dTTP 3 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, enzyme mixture 2 μ l를 혼합하여 15°C에서 60분간 가온한 다음 stop buffer 2 μ l를 첨가하여 반응을 중단시켰다. cDNA는 특히 활성도가 1 \times 10⁸ cpm/ μ g 이상되게 하였다.

3) Northern blot 및 slot-blot 유전자 재결합반응

* 이 논문은 1993년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

Northern blot 분석을 하기 위하여 추출한 RNA 표본을 formaldehyde 및 formamide로 변성시킨 후 0.8% agarose gel에 10-30v 전압으로 18시간 동안 전기영동하여 RNA를 분절시킨 다음 nitrocellulose filter(Bio-Rad Laboratories)에 약 12시간 동안 전이하였다⁸⁾.

Slot-blot 분석^{9, 10)}은 먼저 RNA 표본을 formaldehyde로 변성시킨 후 4.0, 2.0, 1.0 및 0.5 μ g 4단계로 희석한 뒤 vacuum manifold(Schleicher & Schuell)를 이용하여 nitrocellulose filter 위에 점적하였다.

상기의 방법으로 얻은 각각의 필터들을 공기건조시킨 후, 78°C에서 1시간 30분 동안 가온하여 RNA를 필터에 결합시켰다. 그 다음 필터는 0.75M NaCl, 0.075M Na-citrate, 0.5M Na-phosphate, 0.02% polyvinylpyrrolidone, salmon sperm DNA 및 50% formamide를 함유한 용액에 42°C에서 12시간 동안 prehybridization하였다. RNA-cDNA 유전자 재결합 반응은 ³²P 표지 cDNA probe가 함유된 상기 용액에 42°C에서 24시간 시행하였다. 표적 mRNA와 유전자 재결합 반응을 시킨 필터는 0.3M NaCl/30mM Na-citrate로 실온에서, 그리고 0.12M NaCl/15mM Na-citrate, 75mM NaCl/7.5mM Na-citrate/0.1% NaDodSo₄ 및 37.5mM NaCl/3.75mM Na-citrate/0.1% NaDodSo₄로는 65°C에서 각각 10분간 세척하였다. 그 다음 필터는 공기건조시켜 강화 스크린이 장치된 카세트안의 X-ray 필름(Kodak)에 -70°C에 3일간 노출시킨 다음 현상하였다. mRNA량의 측정에는 IBM 컴퓨터 연결된 음영농도 계측기를 사용하여 정량하여, 수치는 cDNA 탐지자 각각의 특이활성 및 cDNA의 크기에 따라 교정하였다.

성 적

1. 탄력소, fibronectin, β -actin 유전자의 Northern blot 분석

켈로이드 환자의 병변조직과 대조군 피부조직부터 배양한 섬유아세포와 태반조직에서 RNA를 분리한 후 Northern blot 분석을 한 결과 ³²P 표지 탄력소, fibronectin 및 β -actin cDNA 소식자와 유전자 재결합 특이성을 보였다. 배양된 대조군과 켈로이드의 섬유아세포, 태반조직에서의 탄력소, fibronectin 및 β -actin은 분자 크기가 각각 3.5kb, 8.0kb 및 2.0kb인 mRNA transcript 소견을 보여 서로 질적인 변화는

없었다(Fig. 1).

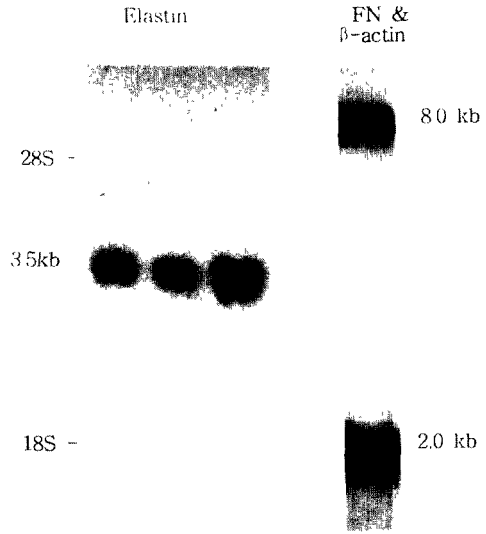


Fig. 1. Northern transfer analysis of elastin, fibronectin and β -actin specific mRNA transcripts for cultured skin fibroblast(lane 1, 4), placenta tissue(lane 2), and keloid fibroblast(lane 3)

2. 탄력소 유전자의 slot-blot 분석

Slot blot 분석을 통하여 대조군, 켈로이드 환자, 태반조직에서의 탄력소 mRNA량을 정량하여 비교하였다(Fig. 2). 정상피부, 켈로이드, 태반조직에서 탄력소 유전자의 발현양은 각각 103 \pm 29 unit/ μ g, 150 \pm 43 unit/ μ g, 25 \pm 7 unit/ μ g이었다. 탄력소 유전자의 발현량은 켈로이드가 정상 피부와 태반조직에 비

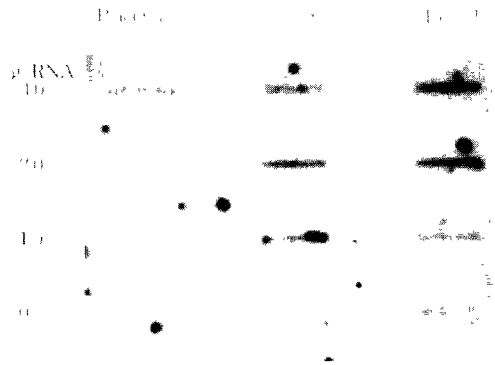


Fig. 2. Slot-blot analysis of mRNA isolated from skin(S), placenta(P), keloid(K) fibroblast. Total RNA was isolated, and different amounts, 4.0, 2.0, 1.0 and 0.5 μ g, were dotted nitrocellulose filters.

하여 각각 1.46배, 6배로 가장 많이 나타났으나, I형 교원질과의 비는 태반조직, 정상피부, 켈로이드 순이었다(Table. 1, Fig. 3).

Table 1. Quantitation of elastin mRNA levels in cultured fibroblasts

	Elastin	$\alpha_1(I)$ collagen	E/ $\alpha_1(I)$
skin	103±29	1528±505	0.067
placenta	25±7	81±23	0.30
keloid	150±43	4720±150	0.031

* Densitometric absorbance units.

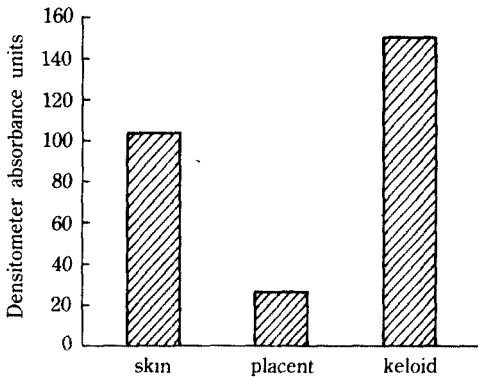


Fig. 3. Relative concentration of elastin mRNA in skin, placenta and keloid.

고 찰

선천성 및 후천성의 많은 진피질환의 생화학적 및 생물학적인 재현상을 연구함에 있어, 각종 세포외 기질 mRNA를 검출함으로써 어떻게 그 유전자가 발현되는가를 분석할 수 있다. 최근에는 경피증^{11, 12)}, 켈로이드¹³⁻¹⁵⁾ 등 여러질환의 병인을 알아내는데 섬유아세포에서 각종 교원질, 탄력소 및 fibronectin 등의 세포외 기질 mRNA를 분석하고 있다. mRNA를 분석 및 검출하는 방법으로 Northern blot, Slot blot 및 In situ hybridization 등이 있는데, Northern blot 유전자 재결합 방법은 RNA복합체에서 hybridization probe에 상응하는 특이한 mRNA의 분자크기를 분석하며¹⁶⁾, Slot blot 분석은 표본내 RNA의 정량적 분석이 가능하고, In situ hybridization은 세포내 및 조직표본에서 표적 DNA 또는 mRNA를 직접 검출하여 그 분포와 발현 양상을 규명할 수 있다¹⁷⁾.

탄력소는 주로 smooth muscle cell에서 형성되어 대동맥, 동맥혈관들에 많이 존재하며¹⁸⁾ 또한 피부의

섬유아세포에서 형성되어 진피에 탄력섬유 형성에 주로 역할을 한다. 탄력섬유는 정상 성인 피부의 진피에서 차지하는 비율이 2내지 4% 정도로 비교적 적은양을 차지하나¹⁾, 탄력성과 복원성의 특징을 지녀 피부의 구조와 기능을 담당하게 하는 중요한 인자이다. 이러한 탄력섬유는 생화학적, 구조적으로 서로 상이한 두가지 인자로 구성되어 있는데, 결합 조직 단백질인 탄력소와 elastic fiber associated microfibrillar component가 그것이다¹⁹⁾. 탄력소의 유전자는 2번 염색체의 short arm에 위치하며²⁰⁾, 탄력소의 전구체인 tropoelastin은 700개의 아미노산으로 구성되어 있다. 유전자의 구조를 보면 30kb의 genome을 가지는데 exon들이 큰 intron에 의해 서로 떨어져 위치함으로써 실제로 기능적 mRNA으로 전사되는 것은 7%에 불과하다²¹⁻²³⁾. 또한 특징적으로 탄력소의 전구체 mRNA분자들이 post-transcriptional processing과정에서 alternative splicing을 함으로서 primary sequency와는 다른 여러종류의 polypeptide가 만들어지는데, 이렇게 됨으로서 조직에서 각기 다른 탄력성과 복원성을 가지는 탄력섬유가 형성된다.

탄력소 유전자의 발현이 증가된 것으로 보고되는 질환으로는 dermatofibrosis lenticularis disseminata^{22, 24, 25)}와 elastoderma²⁶⁾ 등이 있고, 감소되는 것으로 보고되는 질환으로는 cutis laxa²⁷⁾, atrophoderma²⁵⁾들이며 pseudoxanthoma elasticum, elastoderma, actinic elastosis등의 질환도 유전자 발현의 변화가 있는것으로 보고되고 있다²⁷⁾.

본 연구에서는 대조군의 조직에서 배양한 섬유아세포에서의 탄력소, fibronectin, β -actin유전자 재결합성의 특이성은 Northern transfer 분석으로 확인하였는데 각각 3.5kb, 8.0kb, 2.0kb인 mRNA transcript소견을 보였다(Fig. 1). 이어서 slot blot분석을 통하여 켈로이드와 대조군의 elastin의 RNA를 조사한 결과 1.46, 1.3배가 증가된 것으로 나타나 위에서 보고된 질환과 같이 탄력소가 증가하는 것을 시사한다.

탄력소는 연령에 따라 다르게 나타나는데 일반적으로 태생기에는 낮은 mRNA치가 발현되고 출생 후 수십년 동안은 발현이 증가하다가 50세 이상에서 떨어짐을 보인다^{24, 28)}. 또한 노출 부위와 비노출 부위에서도 연령에 따른 각기 다른 변화를 보여주는데, 전자인 경우 microfibrillar component가 증가되며 elastotic material의 침착이 일어나며 fibroblastic

cell들이 많이 증식되는데^{29, 30)} 이것은 자외선 특히 UVA가 fibroblast의 과도한 탄력소를 만들게 하는 trigger factor가 되기 때문이다. 그러나 이때 형성된 탄력소가 기능적으로 완전하지는 않다³¹⁾. 이 경우 태양광선차단제를 사용함으로써 상부 진피에 탄력 섬유 형성을 억제하고 교원질 생산을 자극함으로써 actinic damage를 회복시킬수도 있다^{32, 33)}. 후자의 경우 fiber disintegration과 fragmentation을 보이는데 특히 70세 이상에서 이러한 현상이 두드러지게 나타나는 것으로 보아 나이가 증가함에 따라 탄력 섬유가 자발적으로 그리고 지속적으로 퇴행하는 것을 볼 수 있다^{34, 35)} 따라서 각 질병에서 환자의 연령과 노출 부위인지 아닌지에 따른 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

배양된 피부 섬유아세포 및 태반에서 탄력소, fibronectin, β -actin의 세포외 기질 유전자의 발현을 연구하기 위하여, Northern transfer를 실시했으며, 켈로이드 환자의 배양된 피부 섬유아세포에서 탄력소 유전자의 발현을 대조군과 비교 연구하기 위하여, slot-blot hybridization방법에 의하여 각각의 mRNA를 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다.

Northern blot분석 결과 탄력소, fibronectin, β -actin의 분자 크기는 3.5kb, 8.0kb, 2.0kb로 각각 측정되었다.

Slot-blot 유전자 재결합 반응에 의한 탄력소 세포외기질의 mRNA량을 조직염색 측정기로 측정하면, 탄력소 mRNA의 양은 켈로이드가 정상피부와 태반조직에 비하여 각각 1.46배, 6배로 가장 많았으나 I형 교원질과의 비는 태반조직, 정상피부, 켈로이드 순이었다.

참 고 문 헌

1. Uitto J, Paul J L, Brockley K, et al: Elastic fibers human skin. *Lab Invest* 1983; 49: 499-511.
2. Weinstein G D, Boucek R J: Collagen and elastin in human dermis. *J Invest Dermatol* 1960; 35: 227-234.
3. Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
4. Clewell, Helinski DR: Effect of growth conditions

- on the formation of the realization complex of supercoiled colE1 deoxyribonucleic acid and protein in *E. coli*. *J Bacteriol* 1972; 110: 1135-1146.
5. Yang RA, Lis J WUR: Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis. *Method Enzymol* 1979; 68: 176-180.
6. Pigby PNJ, Dieckmann M, Rhodes L, et al: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1977; 113: 237-251.
7. Wahl GM, Starn, Starck GR: Efficient transfer of large DNA fragment from agarose gel to diabenzylozymethyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3683-3687.
8. Thomas PS: Hybridization of denaturated RNA and small DNA fragment transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 77: 5201-5205.
9. Abergel RP, Pizzuro D, Meeker AC, et al: Biochemical of the connective tissue in keloid and analysis of the collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 383-390.
10. Sasaki T, Majamaa K, Uitto J: Reduction of collagen production in keloid fibroblast cultured by 1-3, 4 dihydrobenzoate. *J Biol Chem* 1987; 262: 9397-9403.
11. Graves PN, Weiss IK, Perlsh JS, et al: Increased procollagen mRNA levels in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1983; 80: 130-132.
12. 이규석, 김석주, 서민호 등: 경피층 섬유아세포에서 세포외기질 mRNA분석. *대한피부과학회지* 1991; 29: 322-330.
13. Uitto J, Perejda AJ, Abergel RP, et al: Altered steady state ratio of typeI/III procollagen mRNA correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 33: 669-676.
14. 이규석, 박장환, 송준영 등: 켈로이드 섬유아세포에서 세포외 기질 mRNA의 분석. *대한의학협회지* 1990; 33: 669-676.
15. Lee KS, Song JY, Suf MH: Collagen mRNA expression detected by in situ hybridization in keloid tissue. *J Dermatol Sci* 1991; 2: 316-323.
16. Pollard JW, Perry CR, Thurston CF: Northern blotting, in method of molecular biology; Walker JM(ed): Clifton, *New Nucleic Acid Techniques*,

- ed 11. New Jersey, Human Press, 1988, pp 13-25.
17. Wicox JH, Gee CE, Robert JL: In situ cDNA: mRNA hybridization; developments of a technique to measure mRNA levels in individual cells. *Method Enzymol* 1986; 124: 510-533.
 18. Giro MG Hill KE, Sandberg LB, et al: Quantitation of elastin production in cultured vascular smooth muscle cells by a sensitive and specific enzyme-linked immunoassay. *Collagen Rel Res* 1984; 4: 21-29.
 19. Uitto J: Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in disease. *J Invest Dermatol* 1979; 72: 1-10.
 20. Beverly SE, Linda C, Norma OG, et al: Chromosomal localization of the Human Elastic Gene. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 873-882.
 21. Indikan YH, Ornatein GN, Sheppard P, et al: Alternative splicing of human elastin mRNA demonstrated by sequende analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5680-5684.
 22. Davidson JM, Crystal RG: The molecular aspect of elastin gene expression. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 133-137.
 23. Cicila EG, Yoon K, Ornstein GN, et al: *Elastin gene Structure and Function*. New York, Extracellular matrix, 1984, pp 333-350.
 24. Fazio MJ, Olsen DR, Chu ML, et al: Isolation and characterization of human elastin cDNAs and gene associated variation in elastin gene expression in cultured skin fibroblasts. *Lab Invest* 1988; 58: 270-277.
 25. Giro MG, Oikalinen H, Sephel GC, et al: Demonstration of elastin gene expression and reduced tropoelastin production by cells from a patient with atrophoderma. *J Clin Invest* 1985; 75: 672-678.
 26. Kornberg RL, Hendler S, Oikalnien AI, et al: Elastoderma. *N Engl J Med* 1985; 312: 771-782.
 27. Michael JF, David RO, Helena K, et al: Isolation and characterization of human elastin cDNAs, and age-associated variation in elastin gene expression in cultured skin fibroblasts. *Lab Invest* 1988; 58: 270-277.
 28. Sephel GC, Davidson JM: Elastin production in human skin fibroblast cultures and its decline with age. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 279-285.
 29. Lavker RM: Structural alteration in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 1979; 73: 59-66.
 30. Mitchell RE: Chronic solar dermatoses. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 203-211.
 31. Kornberg RL, Hendler S, Matsuoka LY, et al: Disease of elastin accumulation within the skin. *N Engl J Med* 1985; 312: 771-774.
 32. Kligman LH, Akin FJ, Klingman AM: Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreen. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 181-189.
 33. Kligman LH, Akin FJ, Klingman AM: Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet radiation induced dermal damage. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 98-102.
 34. Braverman IM, Fonferko E: Studies in cutaneous aging. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 434-439.
 35. Kligman AM, Zeng P, Lavker RM: The anatomy and pathogenesis of wrinkles. *Br J Dermatol* 1985; 113: 37-44.

= Abstract =

Analysis of Elastin mRNA in Skin Fibroblast Cultures

Young Wook Ryoo, MD; Kyu Suk Lee, MD

*Department of Dermatology, Keimyung University,
School of Medicine, Taegu, Korea*

The expression of elastin gene is examined by skin fibroblast cultures and placental tissues using Northern and slot-blot hybridization. Total RNA from 3-6 passaged fibroblasts cultures was isolated.

In Northern blot analysis, elastin, fibronectin and β -actin mRNA transcripts from cultured keloid and normal skin fibroblast and placenta, demonstrated the specificity of hybridization with elastin, frbronectin and β -actinl. Elastin cDNA prlbe hybridized mRNA with sizes of 3.5kb. The molecular size of fibronectin and β -actin mRNA revealed 8.0kb and 2.0kb, respectively. Therefore, it showed no difference of size of mRNAs among keloid and normal skin fibroblst and placenta tissues.

In slot blot analysis, the levels of elastin in keloid is higher 1.46 fold than controln skin fibroblast. And determination of elastin/type I collagen ratio revealed 0.067 in control skin fibroblast and 0.031 in keloid.

This results indicate that elastin gene expression in keloid is increased compared to control skin fibroblst and placenta.

Key Ward: Elastin, Gene expression