자외선에 의한 각막 섬유아세포노화와 안지오제닌의 항노화 역할

Ultraviolet B-induced Senescence Model Using Corneal Fibroblasts and the Anti-aging Effect of Angiogenin

성수민 · 이수진 · 이규원 · 김재찬

Su Min Sung, MD, Soo Jin Lee, Kyoo Won Lee, MD, PhD, Jae Chan Kim, MD, PhD

제일안과병원 안의학연구소

Cheil Eye Research Institute, Cheil Eye Hospital, Daegu, Korea

Purpose: To establish a corneal-fibroblast senescence model induced by ultraviolet B (UVB) exposure and to investigate the anti-senescence effect of angiogenin (ANG).

Methods: Fibroblasts were exposed to UVB (1 mJ/cm²) and then cultured with ANG-containing solution for 24 hours. The 24-hour culture procedure was repeated for three days after UVB irradiation. Cell viability was evaluated using the 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The degree of senescence was assessed using the ratio of senescence-associated (SA)-β-gal-stained cells to total cells. The expression of age-related factors and degree of DNA damage were assessed via Western blot. Samples were divided into a non-UVB group, a UVB group without ANG treatment, and a UVB group with ANG treatment after irradiation (UVB + ANG).

Results: Cell viability in the UVB + ANG group was 11% higher than that in the UVB group ($p < 0.05$). The UVB + ANG group exhibited a 10% lower degree of SA-β-gal staining compared with the UVB group ($p < 0.05$). Western blot analysis showed that there was reduced expression of p53, p21, p16, and RB in the UVB + ANG group compared with the UVB group. The expression of phosphorylated histone (γ-H2AX) and p38 in the UVB + ANG group was less than that in the UVB group.

Conclusions: Senescence in corneal fibroblasts is induced by UVB, and ANG may exert an anti-aging effect by regulating the cell cycle through p53, p21, p16, and RB and reducing DNA damage.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(9):1015-1022

Keywords: Angiogenin, Fibroblast, Senescence

■ Received: 2020. 1. 28.

■ Revised: 2020. 3. 7.

■ Accepted: 2020. 8. 19.

■ Address reprint requests to **Jae Chan Kim, MD, PhD**
Cheil Eye Hospital, #1 Ayang-ro, Dong-gu, Daegu 41196, Korea
Tel: 82-53-960-0214, Fax: 82-53-959-1758
E-mail: jck50ey@daum.net

* This study was presented as a poster at the 122th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2019.

* This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2017R1A2A2A05001128).

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

자외선(ultraviolet, UV) 노출은 군날개, 결질백내장, 안검의 기저세포암종, 편평세포암종, 광각막염(photokeratitis), 기후작은방울각막병(climatic droplet keratopathy)과 같은 여러 안질환과 관련이 있으며, 이 중 UVB는 UVA보다 에너지 강도가 높으며 짧은 280-315 nm의 광선으로 눈에 노출될 경우 대부분 각막에서 흡수된다.¹ UV는 세포노화(cellular senescence)를 유발하는 중요한 원인으로 알려져 있다.² 세포노화는 UV, 감마선 조사, 화학약물, 산화적 손상, 말단소립(telomere) 단축과 같은 내외적 스트레스에 의한 DNA 손상 반응에 의해 생기는 비가역적인 세포주기의 정지이며, 오래된 또는 손상 받은 세포의 복제를 억제하여

암을 방지한다.^{3,4} 세포노화는 주로 종양억제유전자(tumor suppressor gene)인 p53 및 p16의 활성화에 의해 세포주기를 억제해 G1기에 머무르게 한다고 알려져 있다.^{3,5} 장기간 손상을 받아 노화된 세포(senescent cell)가 조직에 축적되면 조직의 수복 및 재생 능력이 떨어져 항상성을 유지할 수 있는 능력이 감퇴된다.^{4,6}

최근 동물 연구에서 노화 세포의 세포자멸(apoptosis)을 유도하여 노화 관련 표현형, 만성 질환, 노인 증후군을 막거나 완화할 수 있다고 보고되었으며, 노화방지 요법이 세포에 가역적 변화를 일으킬 수 있음이 보고된 바 있다.⁷⁻⁹ 이에 따라 여러 가지 항노화 요법이나 항노화 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.^{7,10-13} 이 중 angiogenin (ANG)은 14-kD의 ribonuclease (RNase) 5로, 종양 세포 조절 배지에서 처음 신생혈관형성 유도인자로 확인되었으며 혈관 항상성을 유지하고 세포 증식, 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{14,15} ANG은 최근 연구에서 신경보호, 항염증 작용 및 세포 생존 촉진에도 기여를 하는 것으로 보고되었다.¹⁶⁻¹⁸ 또한 암, 신경퇴행질환 등의 만성 질환에서 ANG의 세포생존 촉진을 통한 치료제로서의 가능성이 제시된 연구들이 진행되었다.¹⁹⁻²¹

기존의 연구에서 강한 UV에 노출된 각막에서 세포자멸이 유발된다고 보고된 바 있다.²² 하지만 약한 UV에 반복적으로 노출된 각막 섬유아세포에서 어떤 변화가 유발되는지에 대한 연구는 알려진 바 없다. 또한 ANG을 각막 섬유아세포에 처리를 하였을 때 염증 반응을 감소시키고 각막 섬유아세포의 세포주기를 조절한다는 연구 결과가 보고되었다.^{23,24} 하지만 노화와 관련하여 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 약한 에너지의 UVB (1 mJ/cm²)에 반복적으로 노출시켰을 때 각막 섬유아세포에서 세포노화가 나타나는지 확인하고 ANG에 의한 항노화 기전을 알아보고자 한다.

대상과 방법

세포배양

섬유아세포(primary human keratocytes cells, aka corneal fibroblasts)는 ScienCell Research Laboratories로부터 구매 후 5% CO₂를 함유한 37°C 배양기에서 2% 우태아혈청(fetal bovine serum, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), Fibroblast Growth Supplement (ScienCell Research Laboratories) 및 antibiotic solution (penicillin, streptomycin, 100 units/mL, ScienCell Research Laboratories)을 포함한 Fibroblast Medium (ScienCell Research Laboratories)으로 배양하였다. 보통 일차배양세포(primary culture cell)인

경우 계대 배양을 할수록 세포의 노화가 진행되고 10계대 이상이 되면 배양되고 있는 세포가 senescence-associated (SA)-β-gal 양성인 세포가 나타난다.²⁵ 본 실험은 세포노화와 관련된 실험으로 SA-β-gal 염색을 통하여 노화 정도를 확인하므로 SA-β-gal 양성세포가 없는 계대에서 실험을 진행하고자 모든 실험은 3계대에서 7계대 사이의 세포를 이용하였다.

약물처리

UVB에 반복적인 노출이 섬유아세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 배양접시에 일차 배양한 각막 섬유아세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 뒤, 배지를 흡입 제거하고 2% 우태아혈청이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco; Life technologies, Carlsbad, CA, USA) 배양액으로 4시간 배양하였다. 이후 총 1 mJ/cm²의 UVB (UV-1000; DongSeo Science Co., Ltd., Seoul, Korea)를 조사한 다음, 2% 우태아혈청이 첨가된 새로운 DMEM으로 교환하였다. 그 후 ANG (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 2 ug/mL을 비처리 또는 처리한 후 24시간 배양, 다시 UVB를 조사 후 ANG를 처리하는 과정을 3일간 반복하였다. 실험군은 UVB를 조사하지 않은 non-UVB군과 UV 조사 후 ANG 약물 처리를 하지 않은 UVB군, UVB 조사 후 ANG 약물 처리를 한 UVB + ANG군으로 나누었다.

세포생존율 측정

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 screening test로 이용되고 있는 발색검사법의 일종인 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) assay를 이용하였다. MTT assay는 96 well plate에 세포를 분주, UVB를 처리한 세포의 배지에 MTT 시약을 각 well당 20 μL씩 투여한 후 2시간 동안 정치 배양한 배양액을 제거한 다음 dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich)를 각 well당 100 μL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 spectrophotometer (Spectramax™ 340PC384 microplate photometer; Spectra Max Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 UVB군과 UVB + ANG군의 값을 각각 non-UVB군의 값으로 나눈 비를 백분율로 나타냈다.

각막 섬유아세포의 노화

노화된 세포에서 특징적으로 발현되는 β-galactosidase의 활성을 측정하기 위해 상용의 senescence-associated β-galactosidase kit (SA-β-gal, Cell Signaling Technology;

Danvers, MA, USA)을 이용하였다.²⁶ 배지를 흡입 제거한 후 염류용액으로 세척한 후 고정한 다음 SA-β-gal 염색액을 넣어 16시간 동안 배양하였다. 이때 노화된 세포는 β-galactosidase를 발현하여 푸른색을 나타내므로 광학현미경으로 β-galactosidase 양성인 푸르게 염색된 노화된 세포수와 전체 세포 수를 세어서 노화된 세포의 정도를 백분율로 표시하였다.

Western blot analysis

UVB가 처리된 섬유아세포를 PRO-PREPT™ (iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)로 용해한 뒤 얼음 위에서 30분 동안 incubation한 다음 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액을 얻었다. bicinchoninic acid assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)법으로 단백질 농도를 측정하고 후 30 μg의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 뒤 nitrocellulose membrane (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)에 옮겼다. Membrane을 상온에서 5% 탈지분유를 포함한 1X TBST (50 mMNaCl, 20 mMTris, 0.005% Tween 20)로 blocking한 후, 4°C에서 항체 p53, p21, p16, cyclin-dependent kinase (CDK)2, retinoblastoma protein (RB protein), p38, 인산화된 히스톤 단백질(γ-H2AX, 1:1000, Cell Signaling Technology)과 β-actin (1:2000, Sigma Aldrich)을 overnight으로 반응시켰다. 세척 후, membrane을 horseradish peroxidase가 붙은 항 mouse immunoglobulin G (IgG) 항체 또는 항 rabbit IgG 항체(1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 반응시킨 뒤, chemiluminescence Western Blotting detection kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)를 실시하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3회 반복하여 시행하여 평균값을 사용하였다. 모든 실험에서 UVB + ANG군의 대조군은 ANG 약물 처리를 하지 않은 UVB군으로 하였다. Non-UVB군, UVB군과 UVB + ANG군의 비교는 일원변량분석(the one-way analysis of variance)을 사용하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

UVB가 각막 섬유아세포의 생존에 미치는 영향

본 연구에서 각막 섬유아세포에 1, 5, 7, 10, 20, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사하여 24시간 후 UVB의 노출 정도에 따른

세포생존율을 MTT assay를 통해 확인해본 결과, 각각 $96.56 \pm 2.76\%$, $67.02 \pm 2.52\%$, $46.30 \pm 4.10\%$, $44.39 \pm 2.68\%$, $30.77 \pm 2.28\%$, $28.82 \pm 1.17\%$ 로 나타나 5 mJ/cm² 이상에서는 세포생존율이 약 40% 이상 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 본 연구는 UVB에 의한 세포노화에 대한 연구로 세포자멸을 일으키는 것이 아닌, 세포의 성장을 억제하는 스트레스를 주기 위해 1 mJ/cm²의 UVB를 3일간 반복 조사하여 실험을 진행하였다. 실험 결과, 각막 섬유아세포에 1 mJ/cm²의 UVB를 조사했을 때 UVB군의 세포생존율은 $76.54 \pm 2.57\%$ 로, non-UVB군의 세포생존율 $103.06 \pm 1.48\%$ 에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.005$). UVB + ANG군

Figure 1. Cell viability of corneal fibroblasts was measured by 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. (A) Cell viability after 24 hours according to the degree of exposure of ultraviolet B (UVB). Doses ranged from 1 to 40 mJ/cm². UVB of 1 mJ/cm² was found to be subcytotoxic. (B) When corneal fibroblasts were irradiated with UVB (1 mJ/cm²) repeatedly for three days, cell viability decreased significantly compared to non-UVB group. Treatment with angiogenin (ANG) significantly increased cell viability in UVB-irradiated corneal fibroblasts (* $p < 0.05$, † $p < 0.005$, one-way analysis of variance).

의 세포생존율은 $87.72 \pm 0.43\%$ 로 UVB군에 비해 세포생존율이 11% 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Fig. 1B).

UVB가 각막 섬유아세포의 노화에 미치는 영향

각막 섬유아세포의 노화 정도를 SA- β -gal 염색을 통해 확인하였으며 노화된 섬유아세포는 푸르게 염색되었다. non-UVB군의 세포노화 정도는 $0.95 \pm 0.03\%$ 였으며, UVB 조사 후 UVB군의 세포노화 정도는 $36.33 \pm 1.20\%$ 로 non-UVB군에 비해 유의하게 높았다($p < 0.005$). UVB + ANG군의 세포노화 정도는 $26.00 \pm 1.73\%$ 로 UVB군보다 10% 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 2).

ANG이 각막 섬유아세포의 노화인자의 발현에 미치는 영향

각막 섬유아세포에서의 노화 관련인자의 발현을 Western

blot을 통해 확인해본 결과, p53 및 p21의 발현은 non-UVB군에 비해 UVB군, UVB + ANG군에서 모두 증가하였고, ANG을 처리하였을 경우 증가 정도가 감소하였다. 그러나 CDK2의 발현은 non-UVB군, UVB군, UVB + ANG군 간 유의한 차이가 없었다(Fig. 3A). p16 및 RB의 발현은 non-UVB군에 비해 UVB군, UVB + ANG군에서 모두 증가하였고, UVB + ANG군은 UVB군에 비해 증가 정도가 낮았다(Fig. 3B).

ANG에 의한 각막 섬유아세포의 DNA 보호 효과

ANG의 DNA 보호 효과를 확인하기 위하여 DNA 손상 표지자인 γ -H2AX와 p38의 발현을 Western blot을 통해 확인하였다. 각막 섬유아세포에서 γ -H2AX의 발현은 non-UVB군에 비해 UVB군, UVB + ANG군에서 모두 증가하였으며, UVB + ANG군이 UVB군에 비해 γ -H2AX 발현의 증가

Figure 2. Senescence detection by senescence-associated (SA) β -galactosidase staining. Photographs of SA- β -gal positive senescent corneal fibroblasts (blue color) after being exposed to ultraviolet B (UVB) (1 mJ/cm^2) irradiation are shown. The degree of SA- β -gal staining of corneal fibroblasts was higher in UVB and UVB + angiogenin (ANG) group compared to non-UVB group. The degree of SA- β -gal staining of corneal fibroblasts treated with ANG after UVB irradiation was lower than that of the group without ANG treatment (All Scale bars = $100 \mu\text{m}$) ($^*p < 0.05$, $^{\dagger}p < 0.005$, one-way analysis of variance).

정도가 감소하였다. 또한 p38의 발현은 non-UVB군에 비해 UVB군, UVB + ANG군 모두 증가하였으며, UVB + ANG군이 UVB군에 비해 p38 발현의 증가 정도가 감소하였다. 이는 ANG 처리 후 각막 섬유아세포에서 DNA 손상 정도가 감소되었음을 나타낸다(Fig. 4).

고 찰

본 연구는 각막 섬유아세포에서의 UVB 노출에 의한 세포노화 모델과 이에 ANG이 가지는 항노화 기전에 대해서 알아본 연구이다. 이전의 피부 섬유아세포 연구에서 UVB를 여러 번 조사하여 세포노화 모델을 만든 연구들이 있다.²⁷⁻²⁹ 이를 참조하여 세포자멸을 일으키는 것이 아닌, 세포의 성장을 억제하는 UVB 조사량을 찾기 위해 각막 섬유아세포에 1, 5, 7, 10, 20, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사한 뒤 24시간 후 UVB의 노출 정도에 따른 세포생존율을 확인해본 결과, 각각 96.56 ± 2.76%, 67.02 ± 2.52%, 46.30 ± 4.10%, 44.39 ± 2.68%, 30.77 ± 2.28%, 28.82 ± 1.17%로 나타났으며, 이에 따라 본 연구는 1 mJ/cm²의 UVB를 3일간 반복 조사하여 실험을 진행하였다.

본 연구 결과에 따르면, 각막 섬유아세포의 생존능력은 non-UVB군에 비해 UVB군은 76.54 ± 2.57%로 감소하였으며, UVB + ANG군은 87.72 ± 0.43%로 감소하여 UVB군에 비해 11% 높았다($p < 0.005$, $p < 0.05$). 또한 SA-β-gal 염색 정도는 non-UVB군에 비해 UVB군은 35% 증가하였으며, UVB + ANG군은 UVB군에 비해 10% 낮았다($p < 0.005$, $p < 0.05$). 이에 따라 기존의 연구에서 강한 UV가 세포자멸을 일으켰던 것과는 달리, 약한 UVB의 반복적인 노출은 각막 섬유아세포의 노화를 유발하는 것으로 생각되며, 여기에 ANG

은 항노화 작용을 하는 것으로 생각된다.

노화된 세포는 주로 p53/p21 경로와 p16/RB 경로의 활성화를 통해 세포주기를 억제한다.^{3,5} p53은 p21을 활성화시키고, p21은 cyclinE/CDK2의 활성을 저해하여 RB의 인산화를 억제한다.^{3,5} p16은 p21과 독립적으로 cyclinD/CDK4, 6의 활성을 저해함으로써 RB의 인산화를 억제한다.^{3,5} RB는 G1기에서 S기로 진행되는 것을 조절하는 세포주기 조절인자로, 인산화되지 않은 RB는 E2F 전사인자 기능을 차단하여 세포주기가 S기로 진행하지 못하고 G1기에 머무르게 한다.^{3,5,30} 이전 암세포의 연구에서 ANG은 p53을 억제하여 세포자멸을 막아 세포의 생존에 매개하는 것으로 보고된 바 있다.³¹ 이러한 ANG이 각막 섬유아세포에서 가지는 세포주기 조절 기전을 알아보기 위해 Western blot으로 세포주기 조절인자들의 발현 변화를 확인해본 결과, 노화

Figure 4. DNA protective effect of angiogenin (ANG) assessed by Western blot. Expressions of γ-H2AX and p38 were significantly increased after ultraviolet B (UVB) (1 mJ/cm²) irradiation in corneal fibroblasts. However when ANG was treated, expressions of γ-H2AX and p38 were less than that of the group without ANG treatment after UVB irradiation.

Figure 3. Expressions of senescence factors assessed by Western blot. (A) Expressions of p53 and p21 were increased after ultraviolet B (UVB) (1 mJ/cm²) irradiation and decreased after angiogenin (ANG) treatment. No significant difference in cyclin-dependent kinase (CDK)2 was observed. (B) Expressions of p16 and RB were increased after UVB irradiation and decreased after ANG treatment.

세포에서 발현이 증가되는 p53, p21, p16, RB가 UVB 조사 후 발현이 증가되었음을 확인할 수 있었다. ANG 처리는 p53 및 p21의 발현을 감소시켰지만 CDK2의 발현에는 유의한 변화가 없었다. 한편 ANG 처리 후 p16 및 RB의 발현은 감소한 것으로 나타났다. 이에 따라 ANG은 세포주기가 G1기에서 S기로 진입하는 것을 억제하는 p53, p21, p16, RB를 조절하여 항노화 기전에 관여하는 것으로 생각된다. p21은 cyclinE/CDK2 뿐만 아니라, cyclinD/CDK4, 6과 cyclinA/CDK2, cyclinB/CDK1 등 다양한 복합체의 활성을 저해하여 세포주기 진행을 정지시킨다.^{32,33} 본 연구 결과 CDK2의 발현에는 변화가 없었지만 다른 p21과 관련된 인자들에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

노화된 세포의 세포주기 정지는 DNA 손상 반응에 의해 생기는 스트레스 반응으로 알려졌다.³⁴ γ -H2AX 단백질은 노화된 세포에서 DNA의 안정화 및 수복에 관여하며, 세포의 DNA의 손상 정도를 확인할 수 있는 표지자로 알려져 있다.^{34,35} p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로는 DNA 손상에 의한 급성 세포 스트레스에 반응하여 인산화에 의해 활성화되며, 세포노화기전에서 p53 및 p16 경로를 활성화시켜 세포주기 억제를 유도하는 데 중요한 역할을 한다.^{36,37} 본 연구 결과, γ -H2AX 및 p38의 발현은 non-UVB군에 비해 UVB군, UVB + ANG군에서 증가하였으며, UVB군에 비해 UVB + ANG군에서 저해하였다. 이는 ANG을 처리하였을 때 각막 섬유아세포에서 자외선에 의한 DNA 손상 정도가 감소되었으며, DNA 손상에 의한 p38 의존적 급성 세포 스트레스 반응 또한 저해된 것으로 볼 수 있다. 이에 따라 ANG은 DNA를 손상으로부터 보호하여 항노화 기전에 관여하는 것으로 생각된다.

자외선에 노출된 후 군날개가 생긴 환자의 각막을 연구한 결과, UV에 노출된 후 인터루킨-6 (interleukin-6, IL-6) 및 IL-8 단백질의 발현이 증가하였고, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현이 증가하였으며, 여기에 MAPK 경로가 포함되었다고 보고된 바 있다.^{38,39} 노화된 세포는 인터루킨, 사이토카인, 성장인자, 단백질분해효소 등 다양한 인자들을 포함한 senescence-associated secretory phenotype (SASP)를 분비하여 인근 세포의 기능과 구조에 영향을 미치고 노화를 유발한다.^{40,41} p38 MAPK 경로의 활성화는 직접적인 DNA 손상 또는 종양유전자 라스 단백질(Ras)에 의해 노화가 유도된 세포에서 이러한 SASP의 발달에도 필요한 것으로 보고되었다.³⁷ 본 연구의 한계점은 이와 같은 노화관련 만성 염증과 관련된 여러 IL-6, IL-8, MMP-1 등의 인터루킨, 사이토카인, 단백질분해효소를 포함한 SASP의 변화에 대해서는 연구하지 못하였다는 것이다.⁴⁰ 향후 p53/p21 및 p16/RB 경로 이외의 다른 노화기전에 관여하는 것으로 알

려져 있는 경로들에 대해서도 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로 요약하면, UVB 노출은 각막 섬유아세포에서 세포노화를 유도할 수 있으며 ANG은 각막 섬유아세포에서 p53, p21, p16, RB를 통해 세포생존을 조절하고, DNA 손상 정도를 감소시켜 궁극적으로 항노화 효과를 가지는 것으로 생각된다. 향후 ANG을 이용하여 각막에서뿐만 아니라 다른 만성 노화관련 질환에서도 항노화 작용 및 세포 생존 촉진을 통한 치료제로서 도움을 줄 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Yam JC, Kwok AK. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol* 2014;34:383-400.
- 2) Moon KC, Yang JP, Lee JS, et al. Effects of ultraviolet irradiation on cellular senescence in keratinocytes versus fibroblasts. *J Craniofac Surg* 2019;30:270-5.
- 3) Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* 2018;128:1238-46.
- 4) de Magalhães JP, Passos JF. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev* 2018;170:2-9.
- 5) Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014;509:439-46.
- 6) Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 2015;21:1424-35.
- 7) Kirkland JL, Tchkonian T, Zhu Y, et al. The clinical potential of senolytic drugs. *J Am Geriatr Soc* 2017;65:2297-301.
- 8) Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 2018;24:1246-56.
- 9) Tchkonian T, Zhu Y, van Deursen J, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2013;123:966-72.
- 10) Newman JC, Milman S, Hashmi SK, et al. Strategies and challenges in clinical trials targeting human aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016;71:1424-34.
- 11) Minois N. Molecular basis of the 'anti-aging' effect of spermidine and other natural polyamines - a mini-review. *Gerontology* 2014;60:319-26.
- 12) Chang J, Wang Y, Shao L, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 2016;22:78-83.
- 13) Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell* 2017;169:132-47.e16.
- 14) Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985;24:5480-6.
- 15) Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016;48:399-410.
- 16) Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40:619-24.
- 17) Park J, Kim JT, Lee SJ, Kim JC. The anti-inflammatory effects of angiogenin in an endotoxin induced uveitis in rats. *Int J Mol Sci* 2020;21:413.

- 18) Li S, Hu GF. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol* 2012;227: 2822-6.
- 19) Steidinger TU, Standaert DG, Yacoubian TA. A neuroprotective role for angiogenin in models of parkinson's disease. *J Neurochem* 2011;116:334-41.
- 20) Kishikawa H, Wu D, Hu GF. Targeting angiogenin in therapy of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12: 1229-42.
- 21) Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, et al. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 14519-24.
- 22) Cullen AP. Photokeratitis and other phototoxic effects on the cornea and conjunctiva. *Int J Toxicol* 2002;21:455-64.
- 23) Lee SH, Kim KW, Min KM, et al. Angiogenin reduces immune inflammation via inhibition of TANK-binding kinase 1 expression in human corneal fibroblast cells. *Mediators Inflamm* 2014;2014:861435.
- 24) Lee SH, Kim KW, Joo K, Kim JC. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmol* 2016;16:57.
- 25) Theerakitthanakul K, Khruethong J, Kruatong J, et al. Senescence process in primary Wilms' tumor cell culture induced by p53 independent p21 expression. *J Cancer* 2016;7:1867-76.
- 26) Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-7.
- 27) Cavinato M, Koziel R, Romani N, et al. UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017;72:632-9.
- 28) Cavinato M, Jansen-Dürr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp Gerontol* 2017;94:78-82.
- 29) Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, et al. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1331-9.
- 30) Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2000;2:291-9.
- 31) Sadagopan S, Veetil MV, Chakraborty S, et al. Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. *Oncogene* 2012;31:4835-47.
- 32) Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:639-49.
- 33) Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-4.
- 34) d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2008;8:512-22.
- 35) Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 2008;22:305-9.
- 36) Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1358-75.
- 37) Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 2011;30:1536-48.
- 38) Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-elicited induction of MMP-1 expression in human ocular surface epithelial cells is mediated through the ERK1/2 MAPK-dependent pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4705-14.
- 39) Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3430-7.
- 40) Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* 2009;9:81-94.
- 41) Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010;5:99-118.

= 국문초록 =

자외선에 의한 각막 섬유아세포노화와 안지오제닌의 항노화 역할

목적: 각막 섬유아세포의 ultraviolet (UV) B에 의한 노화모델을 확립하고 angiogenin (ANG)의 항노화 역할에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 섬유아세포를 UVB (1 mJ/cm²)에 노출 후 ANG 포함 배지로 24시간 배양했으며, 자외선 조사 후 배양하는 과정을 3일간 반복하였다. 세포생존능력은 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 평가하였으며, 세포 노화 정도는 전체 세포 수 중 senescence-associated (SA)-β-gal 염색된 세포 수의 비를 구하여 확인하였다. 노화관련 인자의 발현 및 DNA 손상 정도는 Western blot을 통해 확인하였다. 실험은 non-UVB군, UVB 조사 후 ANG 처리를 하지 않은 UVB군, ANG 처리한 UVB + ANG군으로 나누어 비교하였다.

결과: UVB + ANG군은 UVB군에 비해 세포생존능력이 11% 유의하게 높았으며, 세포노화 정도는 10% 유의하게 낮았다($p < 0.05$, $p < 0.05$). 노화관련 인자의 발현은 UVB + ANG군이 UVB군에 비해 p53, p21, p16, RB의 발현이 감소하였다. 인산화된 히스톤 단백질 (γ-H2AX)과 p38의 발현은 UVB + ANG군이 UVB군에 비해 적게 나타났다.

결론: UVB는 각막 섬유아세포에서 세포노화를 유발하며, ANG은 p53, p21, p16, RB를 통해 세포주기를 조절하고 DNA 손상을 감소시켜 항노화 효과를 가지는 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2020;61(9):1015-1022〉

성수민 / Su Min Sung

제일안과병원 안의학연구소
Cheil Eye Research Institute,
Cheil Eye Hospital