



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



레스베라트롤에 의해 유도된 Sirt1이
켈로이드 발생에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

좌 승 준

레스베라트롤에 의해 유도된 Sirt1 이 켈로이드 발생에 미치는 영향

지도교수 이 동 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2025년 06월

연세대학교 대학원

의 학 과

좌 승 준

레스베라트롤에 의해 유도된 Sirt1 이
켈로이드 발생에 미치는 영향

좌승준의 석사 학위논문으로 인준함

심사위원장 송 승 용

심사위원 이 동 원

심사위원 오 상 호

연세대학교 대학원
의학과

2025년 06월



차 례

그림 차례	iii
국문 요약	v
제 1 장 서론	1
1.1 켈로이드 치료와 후생유전학적 접근의 배경	1
1.2. Sirtuin 단백질과 켈로이드 섬유화 조절 기전	1
1.3. 레스베라트롤의 생리적 특성과 연구 동향	2
1.4. 정상 섬유아세포와 켈로이드 섬유아세포의 비교	2
1.5. 연구의 목적 및 필요성	3
제 2 장 재료 및 방법	3
2.1. 세포주 및 배양 조건	3
2.2. 레스베라트롤 처리 및 세포 생존율 분석	4
2.3. Sirtuin family 발현 분석 (HDF 및 KF 세포)	4
2.4. TGF- β 및 레스베라트롤의 병용 처리 및 유전자 발현 분석	4
2.5. 단백질 발현 분석 (Western blot)	4
2.6. 통계 분석	5
제 3 장 결과	5
3.1. MTT assay를 통한 세포 생존율 분석	5
3.2. 실시간 정량 PCR 분석 (48 시간 후)	8
3.2.1 Collagen 1 유전자 발현 변화	8
3.2.2 α -SMA 유전자 발현 변화	10
3.2.3 SIRT1, SIRT3 및 SIRT3의 발현 변화	11
3.2.3.1 Sirt1 유전자 발현 변화	11
3.2.3.2 Sirt2 유전자 발현 변화	13
3.2.3.3 Sirt3 유전자 발현 변화	14
3.3. Western blot 분석을 통한 단백질 발현 비교	15
3.3.1 Collagen 1 단백질 발현 비교	17
3.3.2 α -SMA 단백질 발현 비교	19
3.3.3 SIRT1 단백질 발현 비교	21
3.4. MTT assay, qPCR, Western blot 실험 결과 요약	23
제 4 장 고찰	24
제 5 장 결론	25



참고문헌	27
영문 요약	29

그림 차례

<그림 1> HDF 에 레스베라트롤을 처리했을 때 MTT Assay 를 통한 세포 생존율 변화	6
<그림 2> 섬유화를 유도한 HDF 에 레스베라트롤을 처리했을 때 MTT Assay 를 통한 세포 생존율 변화	7
<그림 3> KF 에 레스베라트롤을 처리했을 때 MTT Assay 를 통한 세포 생존율 변화	8
<그림 4> HDF 에서 레스베라트롤 단독 및 TGF 병용 처리에 따른 Collagen1 유전자 발현 변화	9
<그림 5> KF 에서 레스베라트롤 단독 및 TGF 병용 처리에 따른 Collagen1 유전자 발현 변화	9
<그림 6> HDF 단독 또는 TGF- β 병용군에서 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 발현	10
<그림 7> KF 단독 또는 TGF 병용 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 발현	12
<그림 8> HDF 와 HDF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 mRNA 발현	12
<그림 9> KF 와 KF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 mRNA 발현	12
<그림 10> HDF 와 HDF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt2 mRNA 발현	13
<그림 11> KF 와 KF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 mRNA 발현	14
<그림 12> HDF 와 HDF+TGF 에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt3 mRNA 발현	14
<그림 13> KF 와 KF+TGF 에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt3 mRNA 발현	15
<그림 14> HDF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen 1, α -SMA, Sirt1 단백질 발현	16
<그림 15> KF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen 1, α -SMA, Sirt1 단백질 발현	17
<그림 16> HDF 에서 TGF- β 및 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen 1 단백질 발현 변화	18
<그림 17> KF 에서 TGF- β 및 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen 1 단백질 발현 변화	19
<그림 18> HDF 에서 TGF 및 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 단백질 발현 변화	20
<그림 19> KF 에서 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 단백질 발현 변화	21



<그림 20> HDF에서 TGF 및 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 단백질 발현 변화	22
<그림 21> KF에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 단백질 발현 변화	23

국 문 요 약

레스베라트롤에 의해 유도된 Sirt1^{o]} 켈로이드 발생에 미치는 영향

켈로이드는 상처 치유 과정에서 과도한 섬유조직 증식과 콜라겐 침착이 비정상적으로 진행되는 만성 섬유성 질환으로, 현재까지 효과적인 치료법이 제한적이며 재발률이 높은 것이 특징이다. 최근에는 켈로이드 병태생리에 후생유전학적 조절 기전이 관여할 가능성이 제기되고 있으며, 특히 Sirtuin 단백질 중 Sirt1은 TGF- β 매개 섬유화 반응의 조절 인자로 주목받고 있다.

본 연구에서는 Sirt1의 활성화 물질로 알려진 레스베라트롤을 활용하여, 정상 진피 섬유아세포(HDF)와 켈로이드 섬유아세포(KF)에서의 섬유화 관련 유전자 및 단백질 발현 변화를 분석하였다. HDF 및 KF에 TGF- β (10 ng/mL)와 레스베라트롤(20 μ M, 50 μ M)을 단독 또는 병용 처리한 후, 세포 생존율(MTT assay), 유전자 발현(real-time qPCR), 단백질 발현(Western blot)을 통해 Collagen 1, α -SMA, SIRT1의 변화를 평가하였다.

실험 결과, KF는 HDF에 비해 Collagen 1 및 α -SMA의 기저 발현이 높았고, SIRT1 발현은 낮았다. 레스베라트롤 처리에 따라 KF에서 SIRT1 발현은 농도 의존적으로 증가하였으며, 일부 조건에서는 Collagen 1 및 α -SMA 발현이 억제되는 양상이 관찰되었다. TGF- β 처리에 의해 유도된 섬유화 환경에서는, 레스베라트롤 병용 시 Sirt1 발현이 부분적으로 회복되었으나, 효과는 세포 종류 및 농도에 따라 상이하였다.

이러한 결과는 레스베라트롤이 Sirt1 경로를 통해 일부 섬유화 반응에 영향을 줄 수 있음을 시사하며, 향후 켈로이드 치료에 있어 후생유전학적 타겟 조절의 가능성을 제시한다. 다만 본 연구는 제한된 조건에서 수행된 기초 실험으로, 추가적인 기전 분석 및 생체 내 연구가 병행되어야 할 것이다.

핵심되는 말: 켈로이드, 섬유아세포, 레스베라트롤, Sirt1, 섬유화, TGF- β , 후생유전학

1. 서론

1.1. 켈로이드 치료와 후생유전학적 접근의 배경

후생유전학(Epigenetics)은 DNA 염기서열의 변화 없이 유전자 발현을 조절하는 기전을 연구하는 학문으로, 주로 DNA 메틸화, 히스톤 변형, 비암호화 RNA의 작용 등을 포함한다. 이러한 후생유전적 조절은 가역적이며 외부 환경이나 염증 자극에 민감하게 반응하는 특징을 가지며, 최근 다양한 만성 염증성 질환 및 섬유화 질환의 병태생리에 중요한 역할을 한다는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

켈로이드는 피부 손상 이후 과도한 섬유조직 증식과 콜라겐 침착이 특징인 병변으로, 일반적인 유전적 돌연변이 없이 특정 유전자의 과발현이 지속적으로 유지되는 현상이 관찰된다. 특히 TGF- β 신호전달 경로의 지속적 활성화, α -SMA 및 Collagen I의 기저 고발현 등은 켈로이드 섬유아세포의 비정상적인 유전자 발현 조절과 관련이 있으며, 이는 후생유전적 기전의 개입을 시사한다.

실제로 켈로이드 조직에서는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 활성 증가, DNA 메틸화 패턴 변화, miRNA 조절 이상 등이 보고되어 왔으며, 최근에는 Sirt1과 같은 Class III HDAC의 활성이 억제되어 있는 상태가 섬유화 유전자 발현의 비가역적 활성화와 관련이 있다는 연구도 보고되었다. 이러한 배경에서 후생유전학적 조절을 타겟으로 한 치료 전략은 켈로이드의 병태생리를 설명할 수 있는 새로운 접근 방식으로 주목받고 있다.

1.2. Sirtuin 단백질과 켈로이드 섬유화 조절 기전

Sirtuin 단백질(Sirtuins)은 NAD⁺ 의존성 탈아세틸화효소로, 인간에서는 Sirt1부터 Sirt7까지 7종이 존재하며, 이들은 세포 생존, 염증, 노화, 대사 조절 등 다양한 생리 기능에 관여한다. 특히 SIRT1은 대표적인 class III 히스톤 탈아세틸화효소로, 후생유전학적 조절을 통해 다양한 세포 내 신호전달 경로를 조절한다.

Sirt1은 TGF- β 신호전달의 중심 경로인 Smad 뿐 아니라 MAPK, PI3K/Akt 등을 포함하는 non-Smad pathway에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다. Sirt1은 Smad7의 발현을 촉진하고, Smad3의 탈아세틸화를 유도하여 전사 활성 억제 및 TGF- β 1 발현을 감소시키는 기전을 통해 섬유화를 억제한다. 또한 ERK, JNK, p38 MAPK 경로를 억제하고, PI3K/Akt 경로를 통해 세포 증식 및 생존에 영향을 주며, 전반적인 섬유화 반응을 제어하는 역할을 한다.

켈로이드 병변에서는 Sirt1의 발현이 저하되어 있으며, 이는 TGF- β /Smad 경로의 과활성화와 연관되어 콜라겐 및 α -SMA 발현의 증가로 이어진다. 이러한 변화는 KF가 기저 상태에서도 섬유화 유전자들이 고발현되는 비정상적 특징을 나타내는 원인 중 하나로 여겨진다. 또한 Sirt1은 산화 스트레스 조절, 자가포식(autophagy), 염증 반응 억제 등 후생유전학적 조절의 다양한 측면을 통해 켈로이

드 병태생리에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

이에 따라 Sirt1을 중심으로 한 Sirtuin 계열 단백질은 Smad 및 non-Smad 경로 모두를 조절하는 후생유전학적 중재 지점으로 주목받고 있으며, 이를 기반으로 한 켈로이드 치료 접근법은 새로운 치료 전략의 가능성을 제시한다.

1.3. 레스베라트롤의 생리적 특성과 연구 동향

레스베라트롤(3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene)은 천연 식물성 폴리페놀로, 주로 적포도 껍질, 땅콩, 블루베리 등에 존재하며 항산화 및 항염증 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 생리학적으로는 Sirtuin 계열 단백질, 특히 Sirt1을 활성화함으로써 세포 노화 억제, 에너지 대사 조절, 염증 반응 억제, 세포 생존성 향상 등 다양한 생물학적 효과를 유도한다. 이러한 특성으로 인해 레스베라트롤은 '칼로리 제한 모방제(caloric restriction mimetic)'로 분류되기도 하며, AMPK 활성화 및 NF- κ B 억제, mTOR 억제 등 다양한 신호전달 경로에 작용한다.

현재 레스베라트롤은 항노화, 항암, 심혈관 보호, 항섬유화, 신경보호 등 광범위한 분야에서 활발히 연구되고 있다. 피부과 및 미용 분야에서는 광노화 억제, 피부 탄력 증가 및 염증 완화 효과로 인해 기능성 화장품 성분으로 널리 사용되며, 항산화 보충제나 심혈관 건강기능식품으로도 상용화되어 있다. 최근에는 간섬유증, 폐섬유화, 피부 섬유화 등 섬유질 과증식 질환에서 레스베라트롤이 Sirt1 활성화를 통해 TGF- β 매개 섬유화 신호를 억제할 수 있음이 다양한 실험모델에서 입증되고 있다.

그러나 레스베라트롤은 낮은 생체이용률(bioavailability)과 고농도 처리 시 세포 독성 가능성 등의 한계를 갖고 있어, 이를 개선하기 위한 나노 제형, 리포좀 제형, 프로드럭(prodrug) 개발이 병행되고 있다. 따라서 레스베라트롤의 약리학적 특성과 작용기전에 대한 기초연구는 향후 임상 적용의 기반을 마련하는 데 필수적이다.

1.4. 정상 섬유아세포와 켈로이드 섬유아세포의 비교

일반 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast, 이하 HDF)와 켈로이드 섬유아세포(Keloid Fibroblast, 이하 KF)는 형태적으로 유사하나, 분자생물학적 특성과 기능에서 명확한 차이를 보인다. KF는 섬유화 반응을 유도하는 주요 인자인 TGF- β 에 대해 과민하게 반응하며, 콜라겐과 α -SMA 발현이 HDF에 비해 현저히 증가한다. 특히 KF는 기저 상태에서도 α -SMA가 고발현되어 있으며, 이는 마이오파이브로블라스트(myofibroblast)-유사 상태로 지속적으로 활성화되어 있는 것을 의미한다.

또한 KF는 Collagen type I 및 III의 동시 과발현, MMP(matrix metalloproteinases) 억제 및 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinases)의 과발현으로 인해 세포외기질(ECM)의 분해가 억제되고, 결과적으로 ECM의 비정상적 축적을 유도하여 켈로이드 병변을 형성한다. KF는 세포 사멸에 대한 저항성도 높으며, Sirt1 경로가 억제된 상태로 존재해 레스베라트롤과 같은 Sirtuin 활

성제에 대해 HDF보다 더욱 민감하게 반응할 수 있다.

이러한 차이점들은 KF가 단순한 과증식 세포가 아니라 병리학적으로 특화된 섬유아세포임을 시사하며, 항섬유화 약물의 반응성 차이를 설명하는 근거가 된다.

1.5. 연구의 목적 및 필요성

켈로이드는 조직 손상 이후 과도한 섬유조직 증식과 콜라겐 축적이 지속되는 만성 섬유성 질환으로, 현재까지 명확한 치료법이 확립되어 있지 않으며 재발률이 높아 임상적 난제를 안고 있다. 기존의 치료 접근은 주로 외과적 절제, 스테로이드 주사, 레이저 치료 등에 집중되어 있으나, 병리학적 원인을 근본적으로 해결하지 못하고 있는 실정이다.

최근 연구에서는 KF의 유전자 발현 이상이 DNA 염기서열의 변이가 아닌 후생유전학적 조절 이상에 기인한다는 점에 주목하고 있다. 특히 TGF- β /Smad 경로의 과활성화, α -SMA 및 Collagen I의 기저 고발현 현상은 후생유전학적 세포 기억(cellular memory)에 의해 지속된다는 보고가 늘고 있으며, Sirtuin 단백질, 특히 Sirt1의 기능 저하가 이러한 병리적 유전자 발현 조절에 깊이 관여하고 있음이 알려지고 있다.

Sirt1은 TGF- β /Smad 경로는 물론 MAPK, PI3K/Akt 등의 non-Smad 경로에도 작용하여 섬유화 유전자 발현을 억제하는 후생유전학적 조절자로, 켈로이드의 병태생리와 직접적으로 연관되어 있다. 따라서 Sirt1을 표적하는 후생유전학적 치료 전략은 켈로이드의 병인 기전을 조절할 수 있는 유망한 접근법으로 평가된다.

레스베라트롤은 Sirt1을 활성화시키는 대표적인 천연 물질로, 항섬유화, 항염증, 항산화 작용을 갖고 있으며 다양한 조직 섬유화 모델에서 TGF- β 경로 억제 효과가 입증되었다. 그러나 KF를 대상으로 한 레스베라트롤의 유전자 발현 조절 효과에 대한 연구는 아직 미흡한 상황이다.

이에 본 연구는 HDF와 KF를 비교 모델로 사용하여, 레스베라트롤이 Sirt1을 중심으로 하는 후생유전학적 기전을 통해 Collagen1, α -SMA, SIRT1 유전자 발현에 미치는 영향을 분석함으로써, 향후 켈로이드 치료의 후생유전학적 타겟팅 가능성을 제시하는 것을 그 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주 및 배양 조건

본 연구에서는 HDF와 KF를 실험 재료로 사용하였다. 모든 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받았으며,

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), penicillin (30 U/mL), streptomycin (300 µg/mL)을 첨가한 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건의 습윤 인큐베이터에서 배양하였다. 실험에는 문현 고찰 상 실험에 병용적으로 사용되는 passage 3를 선택하였다.

2.2 레스베라트롤 처리 및 세포 생존율 분석

HDF 및 KF 세포에 TGF-β (10 ng/mL)와 레스베라트롤을 농도별 (10, 20, 50 µM)로 48시간 처리한 후, MTT assay를 시행하여 세포의 생존율을 평가하였다. HDF에 TGF-β 처리를 한 것은 HDF에 섬유화를 유도한 상태를 의미하며, 다양한 섬유아세포 상태에서 레스베라트롤에 의한 세포 생존율 변화를 비교하기 위한 것이다.

2.3 Sirtuin family 발현 분석 (HDF 및 KF 세포)

레스베라트롤을 농도별 (10, 20, 50 µM)로 처리한 후, qPCR을 통해 Sirt1, Sirt2, Sirt3의 mRNA 발현을 분석하였다. Sirt1~7 중에서 Sirt1~3만을 포함한 이유는 문현고찰을 통해 켈로이드와의 관련성을 유추하여 결정하였다. Sirt1은 레스베라트롤의 길항제로 알려져 있으며, Sirt2,3는 세포 주기 제어와 tumorigenesis 가능성에 대한 실험 논문이 다수 발표되었다. Sirt4는 글루타민 대사, Sirt5는 인간에서 생리학적 중요성이 아직 연구 중이고, Sirt6는 노화 관련, Sirt7은 Sirt2의 상동체이므로 실험 대상에서 제외하였다.

2.4 TGF-β 및 레스베라트롤의 병용 처리 및 유전자 발현 분석

HDF 및 KF 세포에 TGF-β (10 ng/mL)를 단독 처리하거나, TGF-β 와 레스베라트롤 (10, 20, 50 µM)을 병용 처리한 후 48시간 배양하였다. 이후 real time qPCR을 통해 collagen type I, α-SMA, Sirt1, Sirt2, Sirt3의 mRNA 발현을 분석하였다.

2.5 단백질 발현 분석 (Western blot)

HDF 및 KF 세포에 TGF-β (10 ng/mL)를 단독 처리하거나, TGF-β 와 레스베라트롤 (20, 50 µM)을 병용 처리한 후 단백질을 추출하여 단백질 발현 분석을

수행하였다. Collagen type I, α -SMA, Sirt1 단백질의 발현을 확인하였다.

2.6 통계 분석

모든 실험은 3회 이상 반복하여 수행하였으며, 결과는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SEM)로 표현하였다. 그룹 간 비교는 Bonferroni's multiple comparison test를 통해 분석하였으며, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

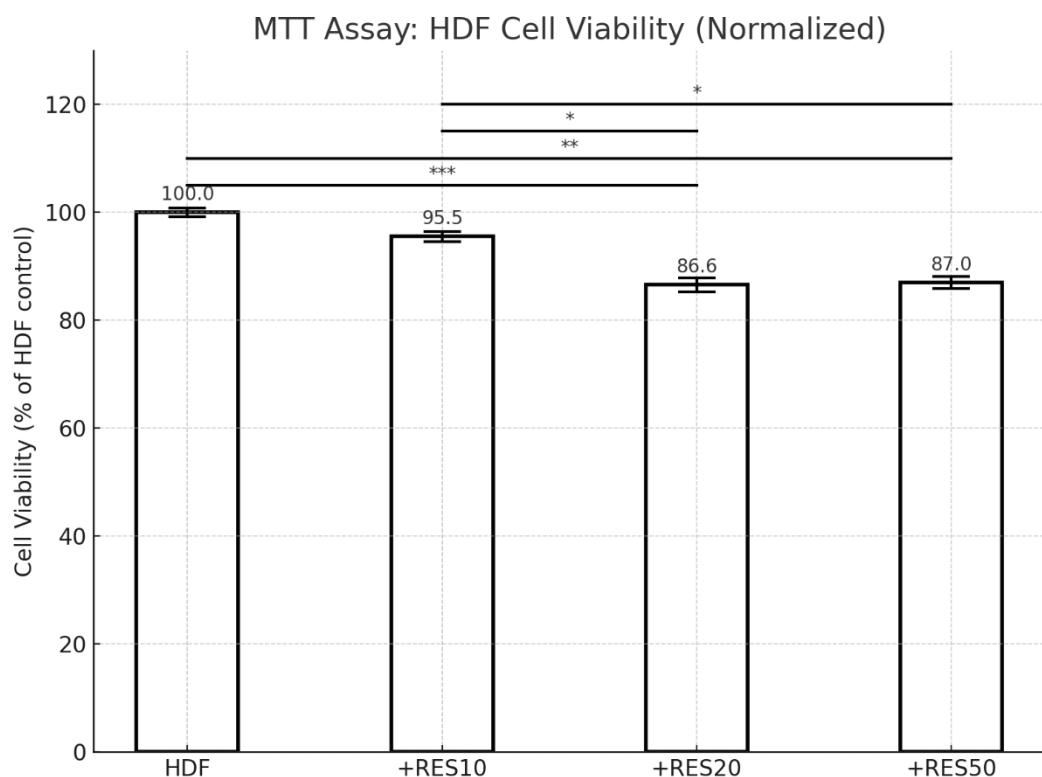
3. 결과

3.1 MTT assay를 통한 세포 생존율 분석

HDF와 섬유화를 유도한 HDF(HDF+TGF- β), 그리고 KF에 레스베라트롤을 각각 처리했을 때 세포 생존율을 보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 각 조건의 생존율은 HDF only, KF only 조건을 기준(100%)으로 정규화하여 비교하였다(그림 1,2,3).

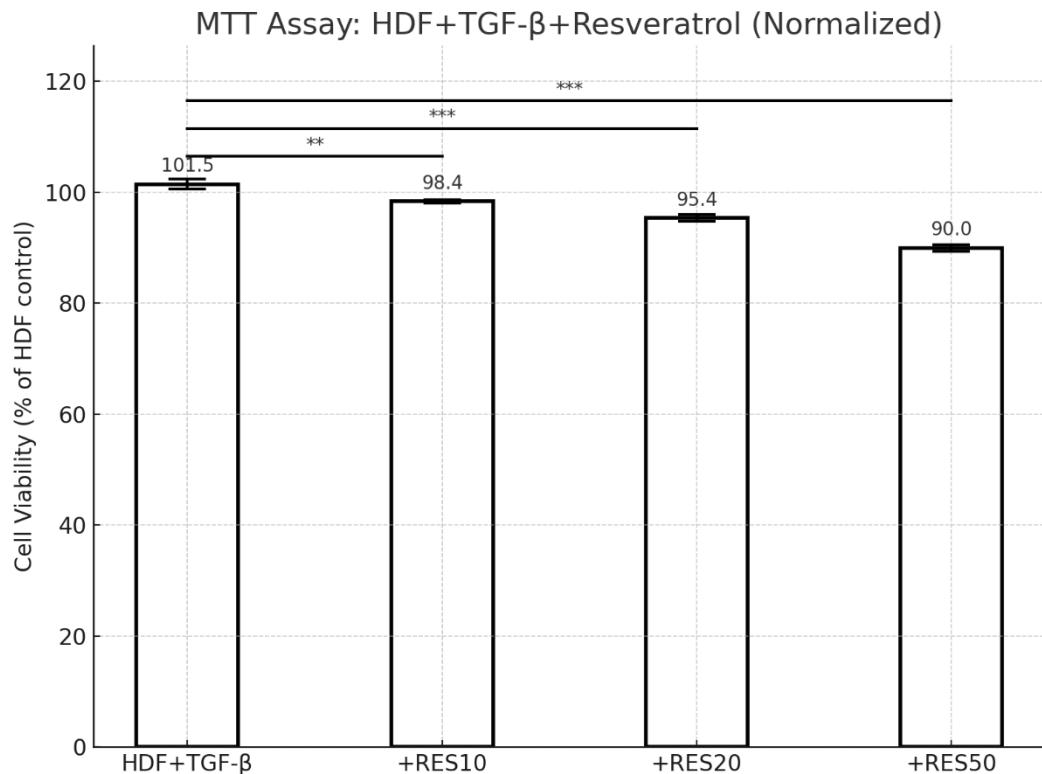
이하의 내용에서 Type I Collagen은 Collagen 1, TGF- β 는 TGF, 레스베라트롤 10 μ M을 RES10, 레스베라트롤 20 μ M을 RES20, 레스베라트롤 50 μ M을 RES50으로 약칭하여 표기하였다.

HDF에 레스베라트롤을 단독으로 처리한 군에서도 RES10 = 95.5%, RES20 = 86.6%, RES50 = 87.0%로, 고농도 처리 시 HDF 대비 유의한 세포 생존율 감소가 관찰되었다(그림 1).



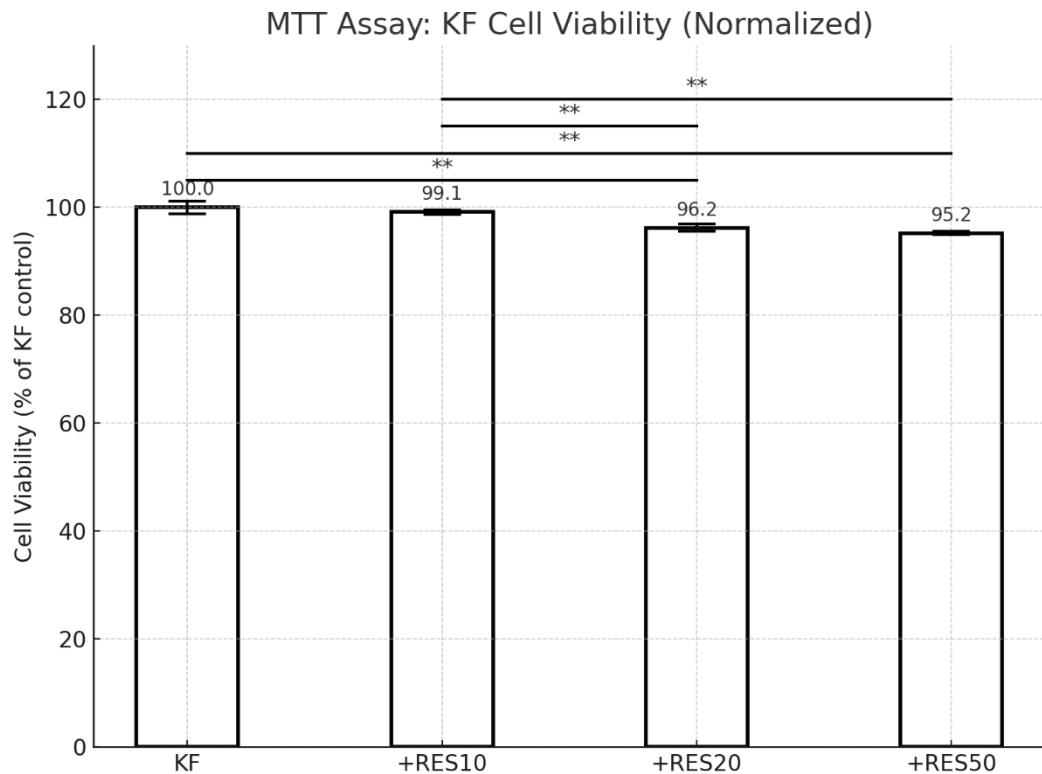
<그림 1> HDF에 레스베라트롤을 처리했을 때 MTT Assay를 통한 세포 생존율 변화. HDF 세포에 레스베라트롤을 농도 별로 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. HDF의 생존율을 기준(100%)으로 하여 상대 값을 계산하였다. HDF에 RES20, RES50을 처리하였을 때 세포 생존율의 유의미한 감소를 보였다. (*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001)

HDF+TGF에서의 세포 생존율은 101.5%로, HDF와 유사한 수준을 보였다. 이 상태에서 레스베라트롤을 처리하였을 때 RES10 = 98.4%, RES20 = 95.4%, RES50 = 90.0%로, 농도 증가에 따라 세포 생존율이 유의미하게 감소하는 경향을 보였다(그림 2).



<그림 2> 섬유화를 유도한 HDF에 레스베라트롤을 처리했을 때 MTT Assay를 통한 세포 생존율 변화. HDF 세포에 TGF를 처리하여 섬유화를 유도하고, 레스베라트롤을 농도 별로 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. HDF의 생존율을 기준(100%)으로 하여 상대 값을 계산하였다. (**:p < 0.01, ***: p<0.001)

KF에서 레스베라트롤 농도 증가가 세포 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다(그림 3). RES10에서 99.1%, RES20에서 96.2%, RES50에서 95.2%로 나타났으며, HDF보다 상대적으로 생존율 감소 폭은 적었지만, 레스베라트롤의 농도에 의존적으로 세포 생존율의 유의한 차이를 나타냈다.



<그림 3> KF에 레스베라트롤을 처리했을 때 MTT Assay를 통한 세포 생존율 변화. KF에 레스베라트롤을 농도 별로 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. KF의 생존율을 기준(100%)으로 하여 상대 값을 계산하였다(**:p < 0.01).

위 실험을 통해 레스베라트롤은 HDF, 섬유화가 유도된 HDF, KF 모두에서 농도 의존적으로 세포 생존율을 감소시키는 경향을 보였다.

3.2 실시간 정량 PCR 분석 (48시간 후)

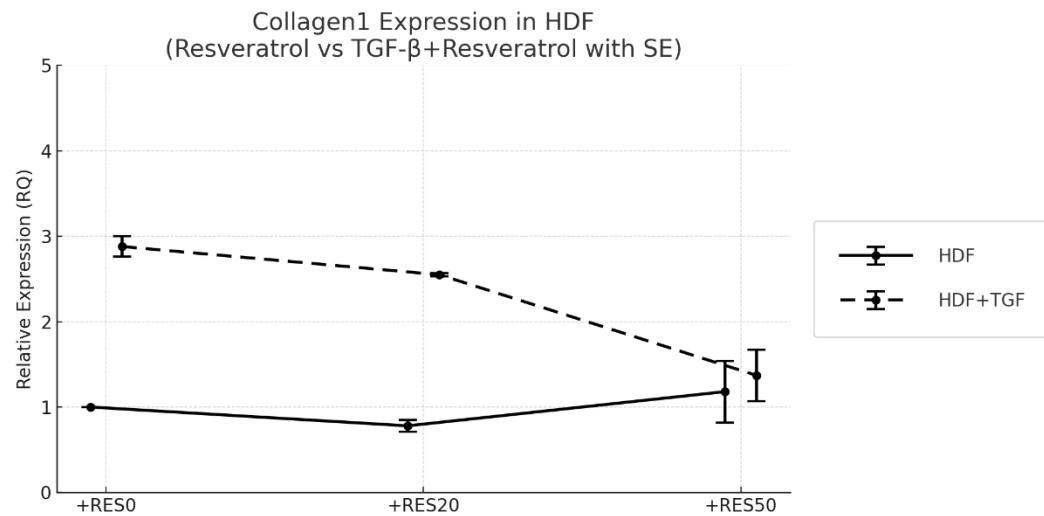
레스베라트롤이 섬유아세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하고자 Collagen 1, α -SMA, Sirt1/2/3의 mRNA 발현을 real-time qPCR로 분석하였다. 분석 대상은 HDF, HDF+ TGF, KF, KF+TGF 네 개의 군으로, 각각에 대해 레스베라트롤 20 μ M, 50 μ M을 처리하였다.

3.2.1 Collagen 1 유전자 발현 변화

Collagen1 유전자의 발현은 HDF와 KF에서 레스베라트롤 단독 처리(RES20, RES50) 및 TGF 병용 처리(TGF+RES20, TGF+RES50) 조건에 따라 조건별로 변화하였다(그림 4,5).

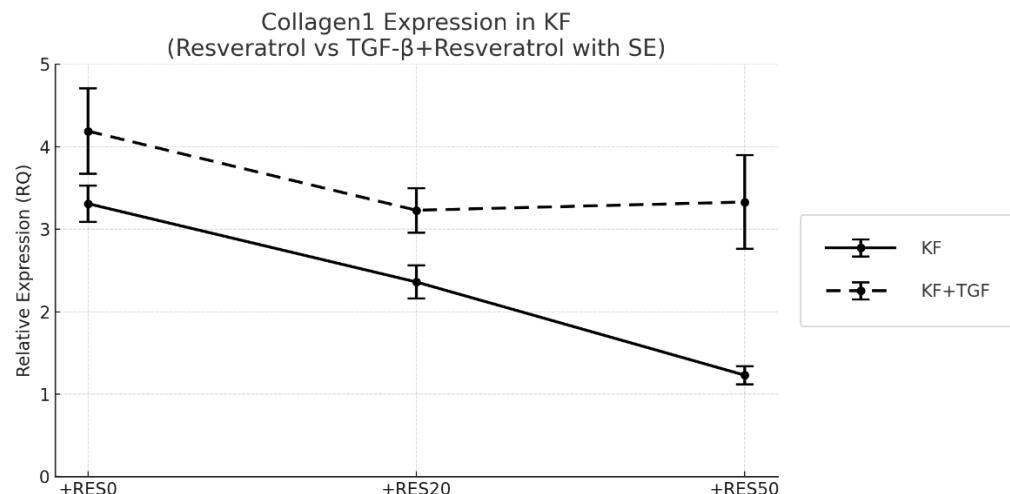
HDF에서는 HDF only 조건에서 RQ=1.00, +RES20에서 RQ=0.78, +RES50에

서 RQ=1.18로 나타났으며, HDF+TGF 조건에서 RQ=2.88, +RES20에서 RQ=2.55, +RES50에서 RQ=1.37이었다. (그림 4)



<그림 4> HDF에서 레스베라트롤 단독 및 TGF 병용 처리에 따른 Collagen 1 유전자 발현 변화. HDF, HDF+TGF에 대해 RES20, RES50 처리한 후 48시간 배양하였다. 이후 real-time qPCR을 통해 Collagen1 유전자 발현량을 측정하였으며, HDF+RES0 조건을 기준으로 정규화된 상대 발현값(RQ)을 나타낸다.

KF에서는 KF only에서 RQ=3.31, +RES20에서 RQ=2.38, +RES50에서 RQ=1.23, KF+TGF 군에서는 RQ=4.19, +RES20에서 RQ=3.23, +RES50에서 RQ=3.33으로 측정되었다(그림 5).



<그림 5> KF에서 레스베라트롤 단독 및 TGF 병용 처리에 따른 Collagen1 유전자 발현 변화. KF, KF+TGF에 대해 RES20, RES50 처리한 후 48시간 배양하였

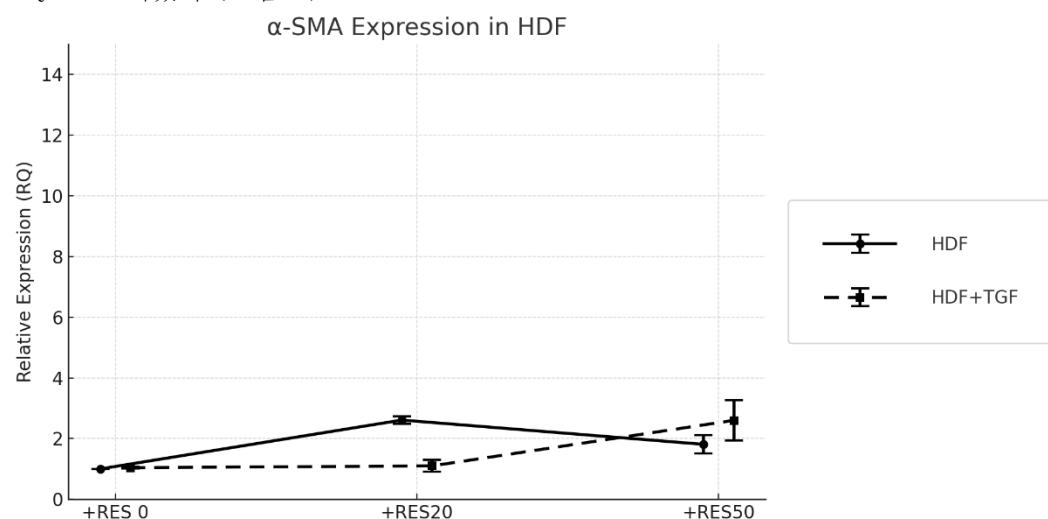
다. 이후 real-time qPCR을 통해 Collagen1 유전자 발현량을 측정하였으며, 앞선 그래프의 HDF+RES0 조건을 기준으로 정규화된 상대 발현값(RQ)을 나타낸다.

HDF 단독군을 제외한 세 군에서 Collagen1 유전자의 발현이 레스베라트롤의 농도 의존적으로 감소하였다.

3.2.2 α -SMA 유전자 발현 변화

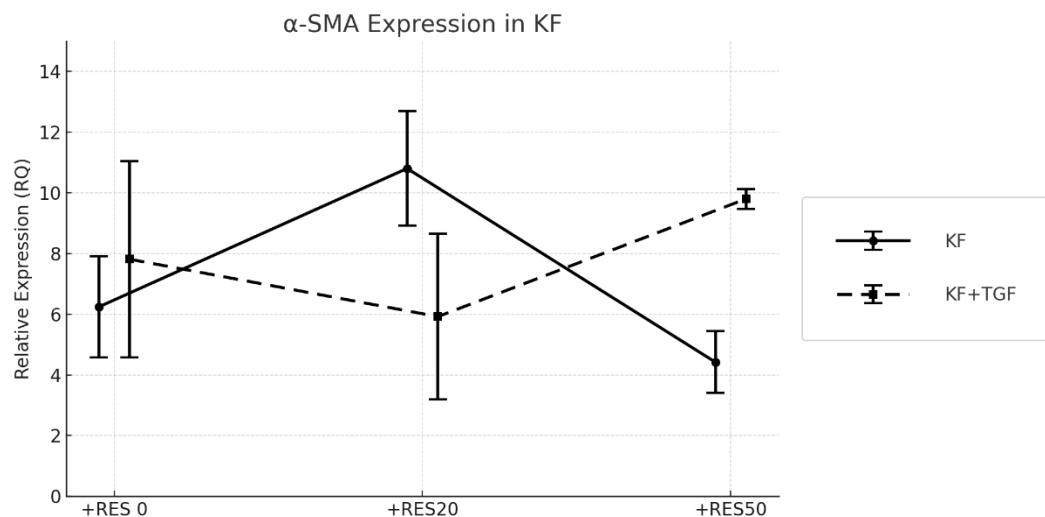
α -SMA 유전자의 발현은 HDF와 KF에서 Resveratrol 단독 처리 및 TGF 병용 처리(TGF+RES) 조건에 따라 상이한 양상을 나타냈다(그림 6,7).

HDF에서는 RQ=1.08, +RES20에서 RQ=2.61, +RES50에서 RQ=1.81로 확인되었다. HDF+TGF 조건에서 RQ=1.13, +RES20에서 RQ=1.13, +RES50에서 RQ=2.60이었다.(그림 6)



<그림 6> HDF 단독 또는 TGF- β 병용군에서 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 발현. HDF, HDF+TGF 군에서 레스베라트롤을 농도별로 처리 후 α -SMA mRNA 발현을 qPCR로 분석하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 표시하였다. +RES50 지점에서는 겹침 방지를 위해 마커 위치를 좌우로 분리하였다.

KF에서는 RQ=6.22, +R20에서 RQ=10.80, +R50에서 RQ=4.42로 나타났으며, KF+TGF군에서는 RQ=7.81, +RES20에서 RQ=5.92, +RES50에서 RQ=9.80으로 측정되었다(그림 7).



<그림 7> KF 단독 또는 TGF 병용 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 발현. KF와 KF+TGF 군에서 레스베라트롤을 농도별로 처리한 후 α -SMA mRNA 발현을 qPCR로 분석하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 나타내었다. 여러 바의 겹침 방지를 위해 마커 위치를 좌우로 분리하였다.

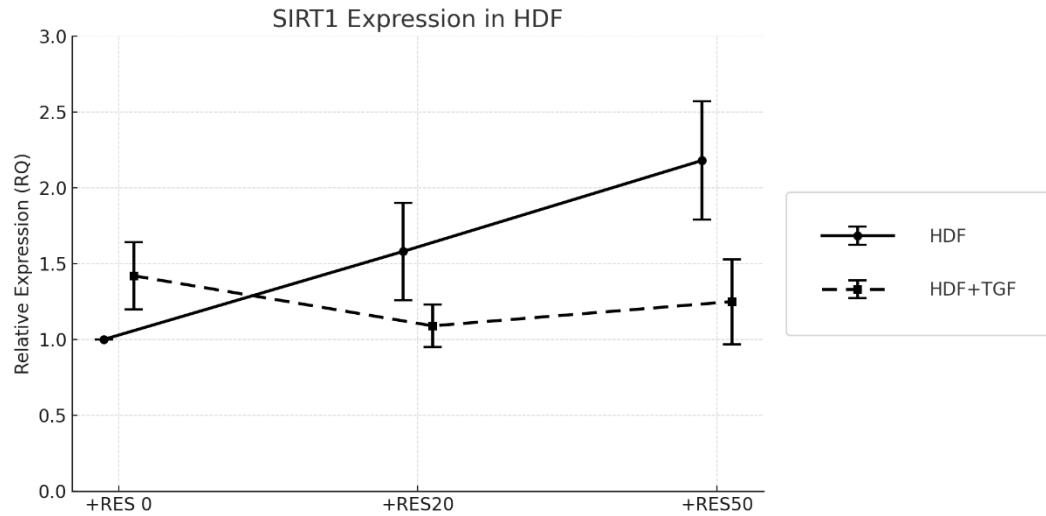
실험 결과 HDF+TGF와 KF군에서 α -SMA 유전자의 발현은 레스베라트롤의 농도 의존적으로 감소하였다.

3.2.3 Sirt1, Sirt2 및 Sirt3의 발현 변화

Sirtuin 계열 유전자인 Sirt1, Sirt2 및 Sirt3에 레스베라트롤을 농도별로 처리하여 그 발현 양상을 세포 유형(HDF vs KF)과 TGF 병용 여부에 따라 살펴보았다 (그림 8~13).

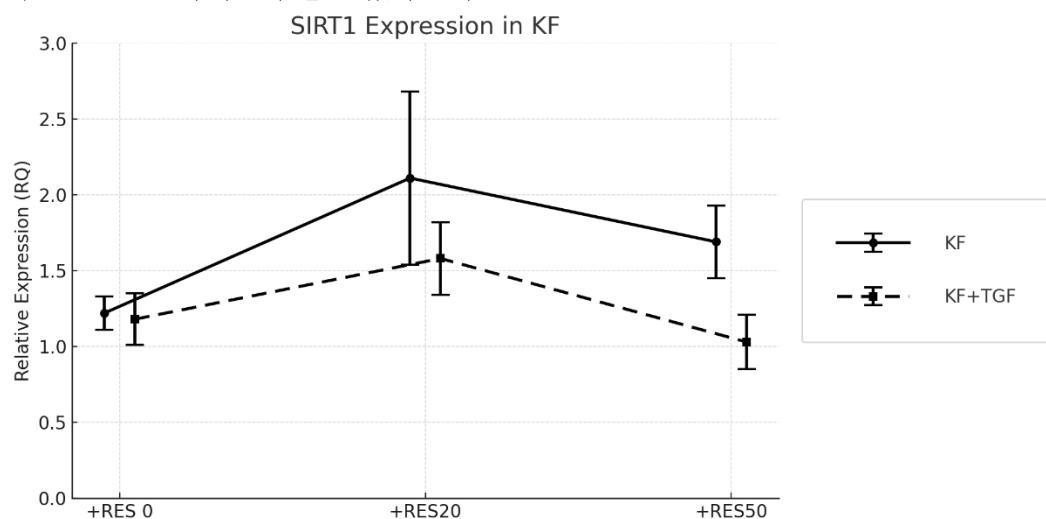
3.2.3.1 Sirt1 유전자 발현 변화

Sirt1 유전자 발현은 HDF와 KF 모두에서 레스베라트롤 단독 처리 시 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다. HDF에서 RQ=1.00, HDF+R20에서 RQ=1.58, HDF+R50에서 RQ=2.18로, Sirt1 mRNA의 발현은 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 +RES50 조건에서 가장 높은 발현 수준을 나타냈다. 반면, HDF+TGF 군에서는 RQ=1.46, +RES20에서 RQ=1.09, +RES50에서 RQ=1.25로 오히려 Sirt1 발현량이 단독 처리군에 비해 억제되는 경향을 보였다(그림 8).



<그림 8> HDF와 HDF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 mRNA 발현. 레스베라트롤 단독 처리 시 농도 의존적인 발현 증가가 관찰되었으며, 특히 +RES50에서 가장 높은 발현 수준을 보였다. 반면 HDF+TGF 군에서는 발현 증가가 억제되었다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 나타내었다.

KF에서는 RQ=1.22, +RES20에서 RQ=2.11, +RES50에서 RQ=1.69로, HDF와 비교했을 때 농도에 따른 경향성에서 차이를 보였으나 발현량 자체는 baseline에 비해 상승하는 동일한 양상을 보였다. KF+TGF 군에서는 RQ=1.18, +RES20에서 RQ=1.58, +RES50에서 RQ=1.03으로 측정되었다. 즉, KF에 섬유화를 더욱 유도한 상황에서도 저농도의 레스베라트롤을 처리하였을 때 Sirt1의 발현이 증가함을 관찰하였다. 단, 고농도 레스베라트롤을 처리하였을 때에는 오히려 Sirt1의 발현이 baseline보다 감소함을 보였다(그림 9).



<그림 9> KF와 KF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 mRNA 발현. KF에서도 레스베라트롤 처리에 따라 Sirt1 발현이 상승하였고, +RES20에서 최고치를 기록하였다. 그러나 TGF- β 병용군에서는 발현 증가 폭이 제한적이었으며, +RES50에서 발현 수준이 다시 감소하는 양상을 보였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 나타내었다.

3.2.3.2 SIRT2 유전자 발현 변화

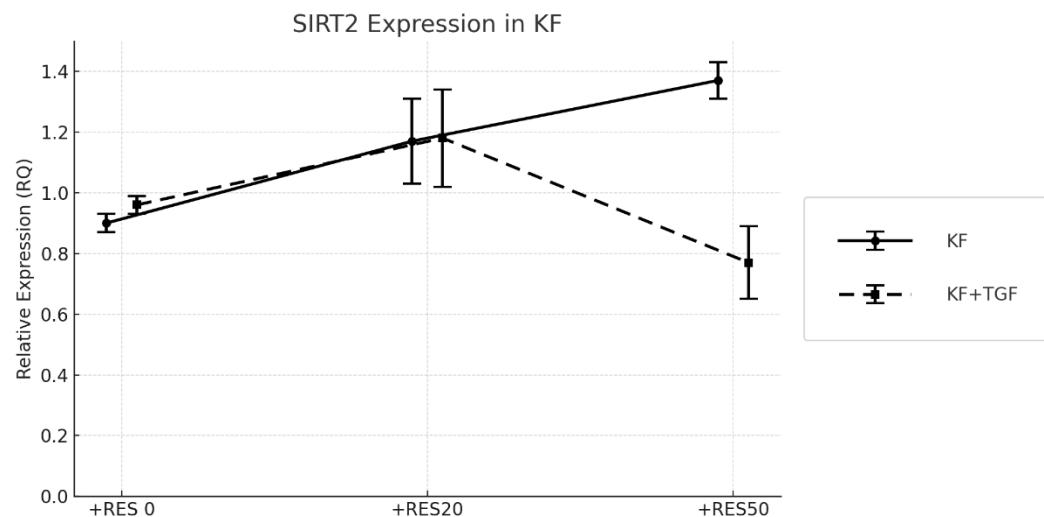
Sirt2 유전자의 발현은 HDF와 KF에서 각각 레스베라트롤 단독 처리 및 TGF 병용 처리 조건에 따라 변화하였다(그림 10,11).

HDF에서는 단독 처리군에서 HDF only 조건을 기준($RQ=1.00$)으로 하였을 때, HDF+RES20에서 $RQ=1.06$, HDF+RES50에서 $RQ=1.20$ 으로 발현이 증가하여 SIRT1과 같은 경향을 보였다. 병용 처리군에서는 HDF+TGF에서 $RQ=0.98$, HDF+TGF+RES20에서 $RQ=1.06$, HDF+TGF+RES50에서 $RQ=0.85$ 로, RES20에서 다소 증가하였으나 RES50에서는 억제되는 양상을 보였다(그림 9).



<그림 10> HDF와 HDF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt2 mRNA 발현. 레스베라트롤 단독 처리 시 농도 의존적인 발현 증가가 관찰되었으며, 특히 +RES50에서 가장 높은 발현 수준을 보였다. 반면 HDF+TGF 군에서는 발현 증가가 억제되었다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 나타내었다.

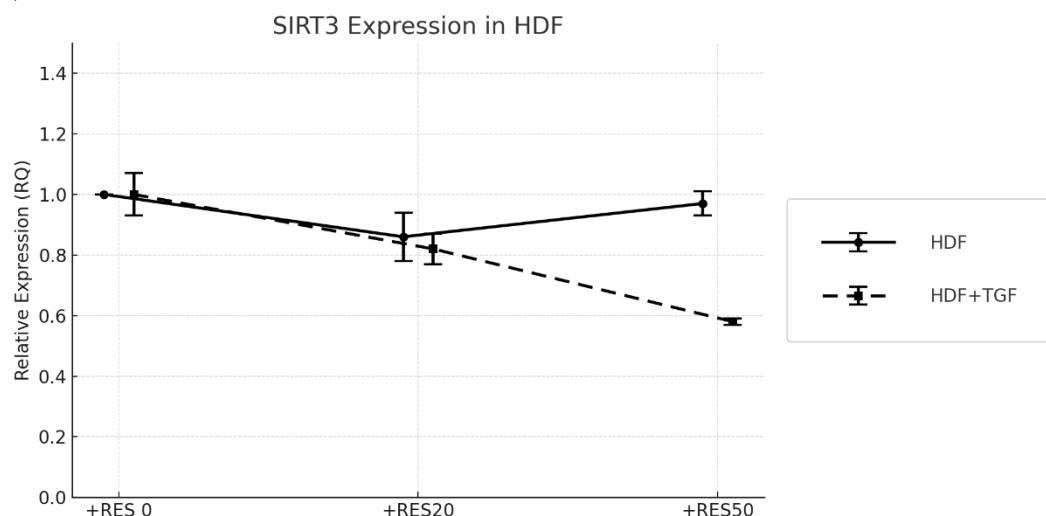
KF에서는 단독 처리군에서 KF only에서 $RQ=0.90$, KF+RES20에서 $RQ=1.17$, KF+RES50에서 $RQ=1.37$ 로, 농도 증가에 따라 발현이 상승하였다. 병용 처리군에서는 KF+TGF에서 $RQ=0.96$, KF+TGF+RES20에서 $RQ=1.18$, KF+TGF+RES50에서 $RQ=0.77$ 로 측정되어, RES20에서는 증가하였으나 RES50에서는 발현이 감소하였다. 이는 Sirt1의 변화 양상과 비슷한 경향성을 보였다(그림 11).



<그림 11> KF와 KF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 mRNA 발현. KF에서도 레스베라트롤 처리에 따라 Sirt1 발현이 상승하였고, +RES20에서 최고치를 기록하였다. 그러나 TGF 병용군에서는 발현 증가 폭이 제한적이었으며, +RES50에서 발현 수준이 다시 감소하는 양상을 보였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 나타내었다.

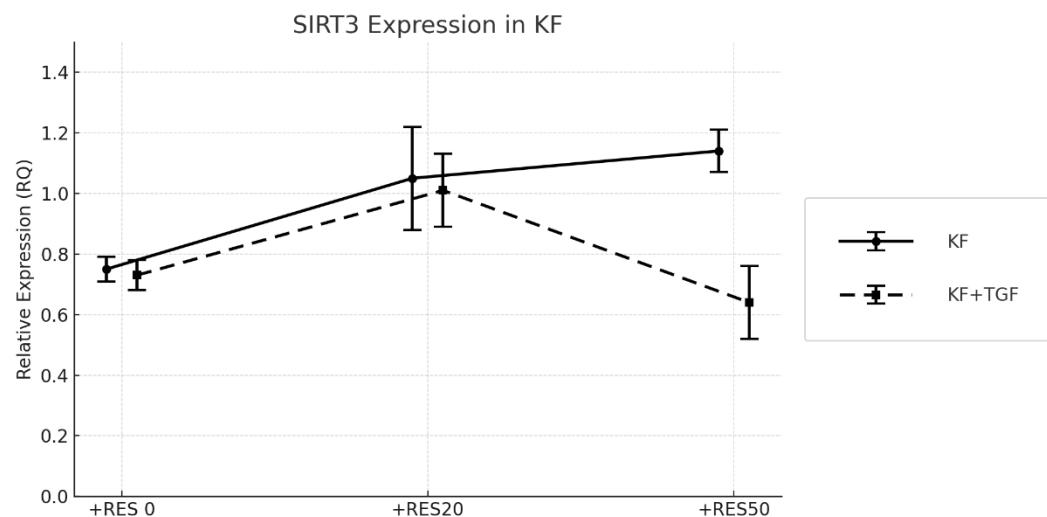
3.2.3.3 Sirt3 유전자 발현 변화

Sirt3의 경우, HDF에서는 $+RES20 = 0.86$, $+RES50 = 0.97$ 로 SIRT1과 반대되는 경향성을 보였고, HDF+TGF 처리군에서는 $+RES20 = 0.82$, $+RES50 = 0.58$ 로, Sirt1과 같은 경향성을 보였고 농도 의존성으로 발현의 감소를 보였다(그림 12).



<그림 12> HDF와 HDF+TGF에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt3 mRNA 발현. 레스베라트롤을 단독 처리에 따라 SIRT3 발현은 증가하는 경향을 보였으며, 반면 KF+TGF 군에서는 Sirt3 발현이 전반적으로 억제되는 양상을 보였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 표시하였다. 겹치는 오차막대 구간은 시각적 구분을 위해 마커를 좌우로 오프셋하였다.

KF에서는 단독 처리군에서 KF only = 0.75, +RES20 = 1.05, +RES50 = 1.14로 발현이 증가하여 Sirt1과 비슷하게 증가하는 양상을 보였고 특히 고농도에서 더욱 발현이 증가하는 양상을 보였다. KF+TGF 처리군에서는 KF+TGF = 0.73, +RES20 = 1.01, +RES50 = 0.64로, Sirt1과 같은 경향성을 보였다(그림 13).

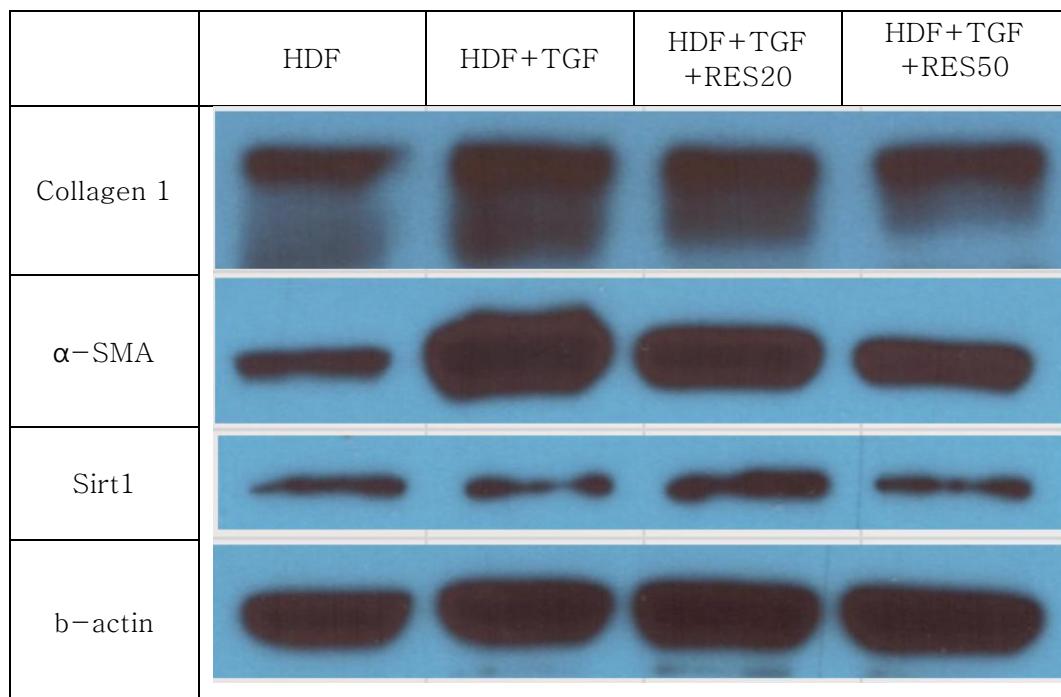


<그림 13> KF와 KF+TGF에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt3 mRNA 발현. 레스베라트롤 처리에 따라 KF에서도 Sirt3 발현은 점진적으로 증가하였으며, +RES50 조건에서 가장 높은 발현을 보였다. KF+TGF 군에서는 발현 증가 폭이 감소하거나 일부 조건에서는 억제되는 경향이 확인되었다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE, n=4)로 표시하였다. 겹치는 오차막대 구간은 시각적 구분을 위해 마커를 좌우로 오프셋하였다.

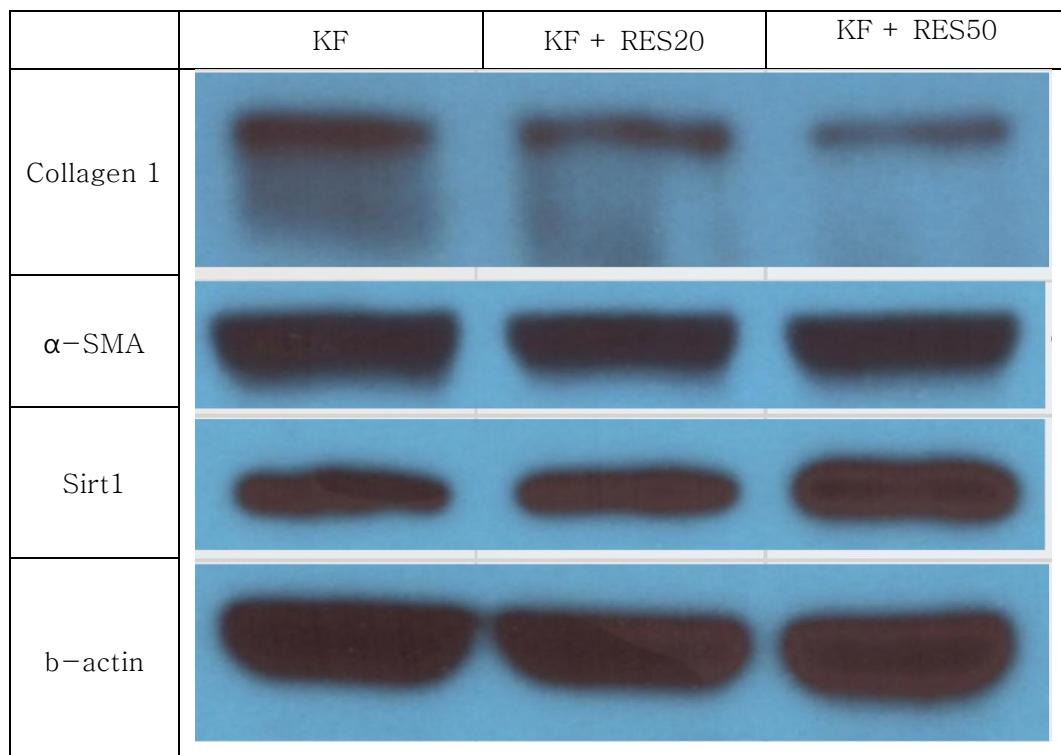
이와 같이, Sirt2와 Sirt3 유전자는 세포 유형 및 처리 조건에 따라 Sirt1과 비슷한 경향성을 보였으나 특정 세포 유형 및 처리 조건에서는 반대되는 반응을 보이기도 하였다.

3.3 Western blot 분석을 통한 단백질 발현 비교

레스베라트롤이 섬유화 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, HDF+TGF 군과 KF에 +RES20, +RES50을 처리한 후 collagen 1, α -SMA, Sirt1 단백질에 대한 western blot을 수행한 모습이다(그림 14,15).



<그림 14> HDF+TGF 군에서 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen 1, α -SMA, Sirt1 단백질 발현. HDF+TGF 처리군에서는 Collagen I 및 α -SMA 발현이 뚜렷하게 증가하였으나 Sirt1 발현은 억제되었다. 레스베라트롤을 병용 처리한 조건에서는 농도 의존적으로 Sirt1 발현이 회복되는 양상을 보였고, 동시에 Collagen I 및 α -SMA 발현이 감소하는 경향을 나타냈다. β -actin은 loading control로 사용되었다.

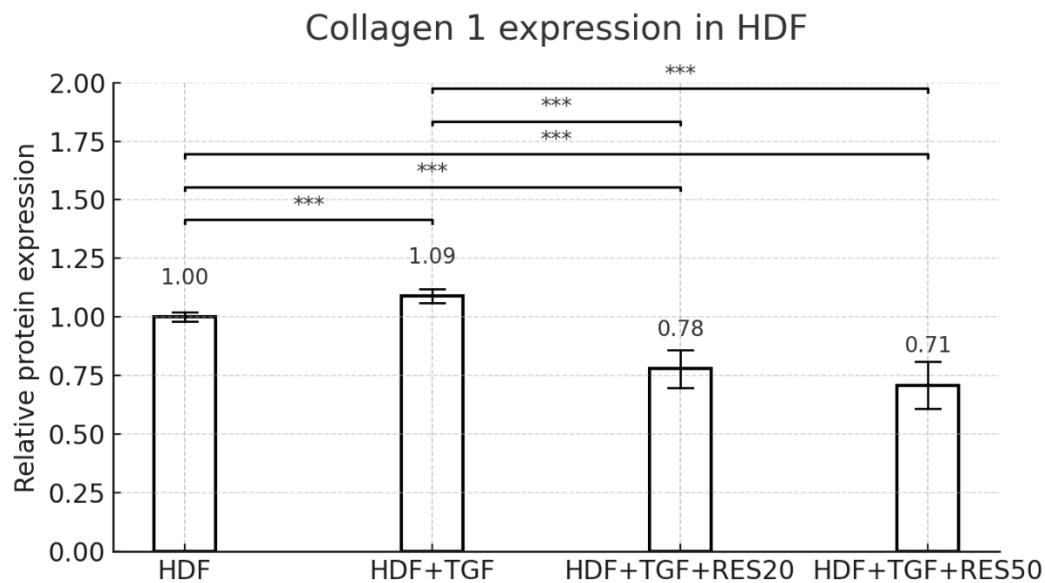


<그림 15> KF에서 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen I, α -SMA, Sirt1 단백질 발현. Collagen I과 α -SMA는 KF only에서 강하게 발현되었으며, 레스베라트롤 처리 농도가 증가함에 따라 발현이 점진적으로 감소하였다. 반면, Sirt1은 KF only에서 낮은 수준으로 발현되었으나 레스베라트롤 처리에 따라 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. β -actin은 loading control로 사용되었다.

3.3.1 Collagen 1 단백질 발현 비교

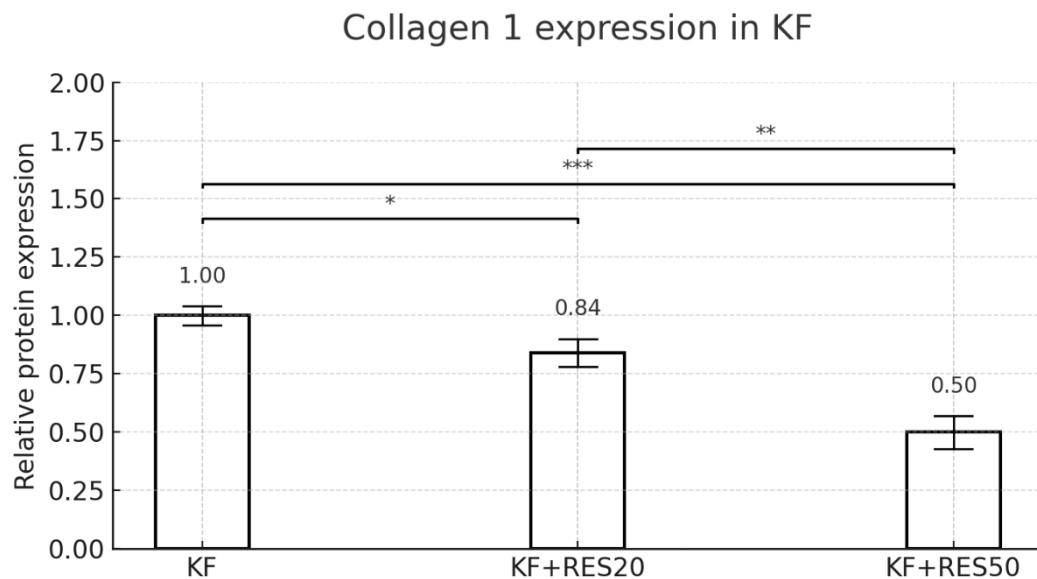
레스베라트롤이 Collagen 1 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, HDF 및 KF 세포를 대상으로 TGF 단독 또는 레스베라트롤 병용 처리 후 Western blot 을 수행하였다(그림 16,17).

HDF에서는 TGF 처리 시 Collagen 1 단백질 발현이 1.09배 증가하였으며, 레스베라트롤 병용 처리군에서는 +RES20이 0.78배, +RES50이 0.71배로 농도 의존적으로 발현이 감소하는 양상을 보였다. 통계적으로도 RES20과 RES50군을 제외한 모든 군에서 유의하였다(그림 16).



<그림 16> HDF에서 TGF 및 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen 1 단백질 발현 변화. 각 조건은 대조군(HDF only)을 기준으로 상대 정량화되었으며, 막대는 평균값을 나타내고, error bar는 표준편차를 표시한다. TGF 처리 시 Collagen 1 발현이 유의하게 증가하였으며, 레스베라트롤 병용 처리군에서는 농도 의존적으로 발현이 감소하였다. (***: $p < 0.001$)

KF의 경우, 기저 상태에서 Collagen 1 단백질 발현은 1.00으로 설정되었으며, RES20 처리군에서는 0.84배, RES50 처리군에서는 0.50배로 감소하였다. 통계 분석 결과, KF only군과 RES20군 간에는 유의한 차이가 없었으나, RES50군과의 비교에서는 유의하게 발현이 감소하였다. 또한 RES20군과 RES50군 간에도 유의한 차이가 관찰되었다(그림 17).



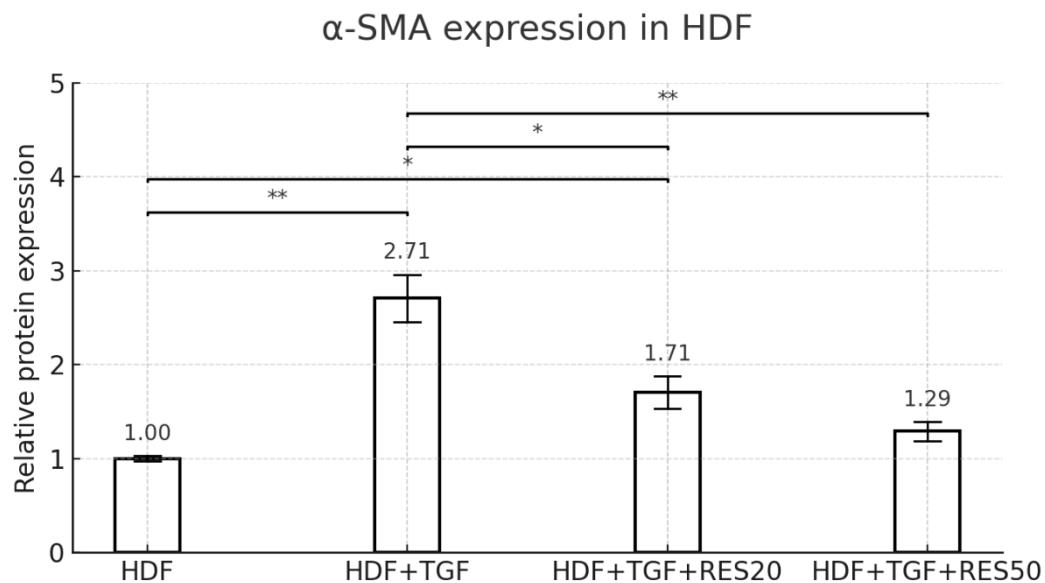
<그림 17> KF에서 레스베라트롤 처리에 따른 Collagen I 단백질 발현 변화. KF + RES20 및 KF + RES50 처리군 모두에서 Collagen 1의 발현은 대조군에 비해 감소하였으며, 특히 RES50 처리군에서는 유의한 감소가 관찰되었다. KF + RES20과 KF + RES50 간 비교에서도 통계적으로 유의한 차이가 확인되었다(**: p < 0.01, ***: p < 0.001).

이러한 결과는 레스베라트롤이 Collagen 1 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제하며, 특히 고농도 처리 시 KF에서 더 뚜렷한 억제 효과를 나타냄을 시사한다.

3.3.2 α -SMA 단백질 발현 비교

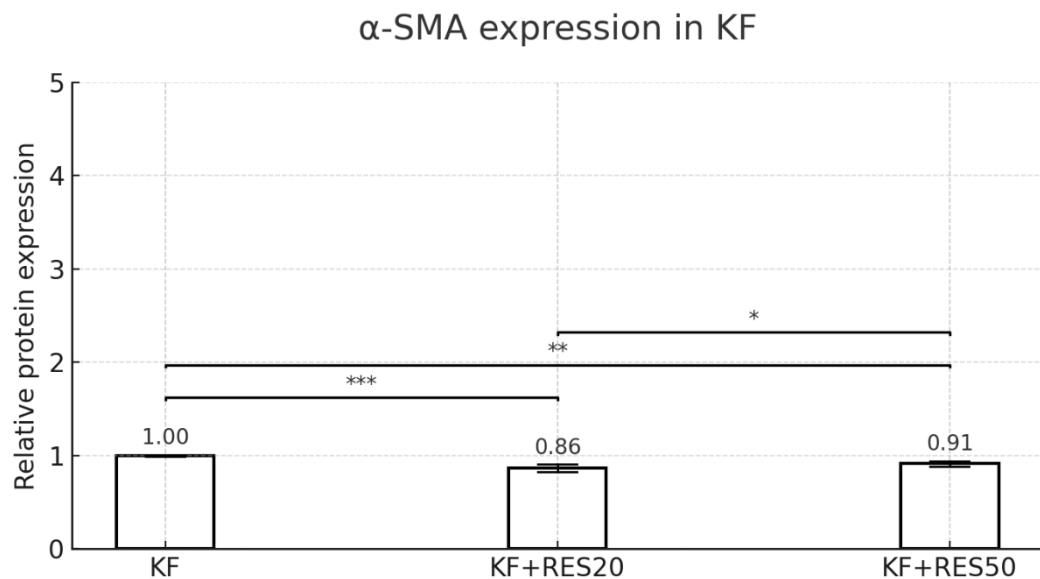
α -SMA 단백질의 발현 변화를 확인하기 위해, HDF 및 KF 세포에 대해 TGF 및 레스베라트롤을 다양한 조건으로 처리한 후 Western blot 분석을 수행하였다 (그림 18,19).

HDF에 TGF를 처리한 군에서 α -SMA 단백질 발현은 대조군(HDF only) 대비 약 2.7배로 유의하게 증가하였다. 반면, 레스베라트롤을 병용 처리한 조건에서는 α -SMA 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. +RES20에서는 TGF 단독군 대비 발현이 유의하게 감소하였으며, +RES50에서는 더욱 강한 억제 효과를 보였다. 또한, 대조군(HDF only)과 병용군 간 직접 비교에서도 α -SMA 발현의 유의한 변화가 확인되었다(그림 18).



<그림 18> HDF에서 TGF 및 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 단백질 발현 변화. TGF 단독 처리 시 α -SMA 발현이 유의하게 증가하였으며, 레스베라트롤 병용 처리 시 농도 의존적으로 발현이 감소하였다. 특히 +RES20, +RES50 병용 군은 TGF 단독군에 비해 유의한 억제 효과를 보였다(*: p<0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001).

KF 세포에서는 기저 α -SMA 발현량을 1.00으로 설정하였고, 레스베라트롤 처리에 따라 KF+RES20군은 0.86, KF+RES50군은 0.91로 발현이 감소하였다. 통계적으로 KF only군과 KF+RES20, KF+RES50군 간에는 각각 p = 0.0014, p = 0.0228로 유의한 감소가 관찰되었으며, KF+RES20과 KF+RES50군 간에는 유의한 차이가 없었다(그림 19).



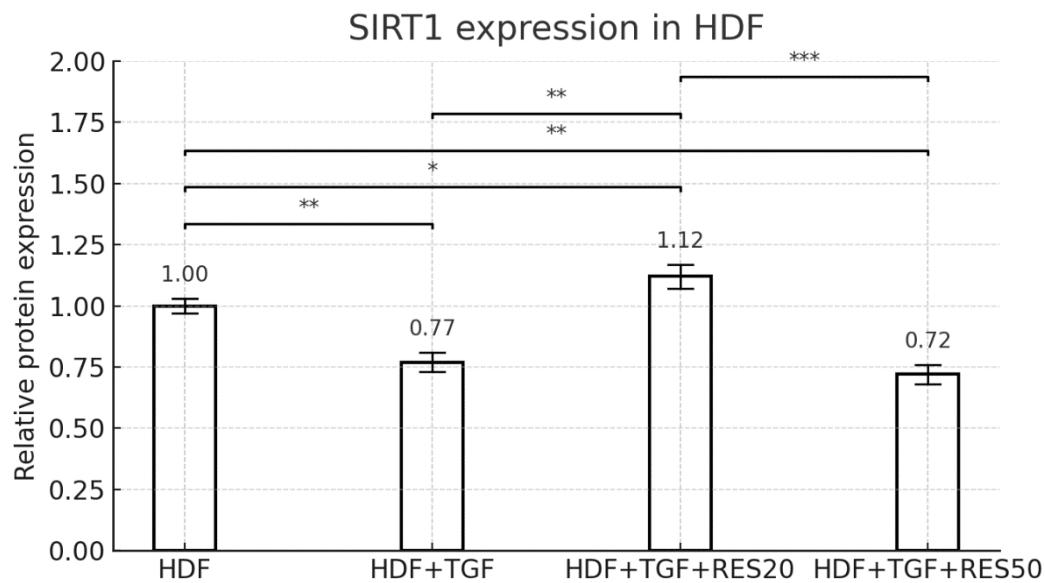
<그림 19> KF에서 레스베라트롤 처리에 따른 α -SMA 단백질 발현 변화.
 KF+RES20 및 KF+RES50 처리군 모두에서 α -SMA 발현이 유의하게 감소하였다(*: p<0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001).

이러한 결과는 레스베라트롤이 α -SMA 단백질 발현을 억제함으로써 TGF 매개 섬유화 반응을 조절할 수 있음을 시사하며, 특히 병리적 특성을 지닌 KF에서도 α -SMA 발현 억제 효과가 유효함을 보여준다.

3.3.3 SIRT1 단백질 발현 비교

레스베라트롤이 Sirt1 단백질 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해, HDF 및 KF 세포에 TGF (10 ng/mL) 및 레스베라트롤(20 μ M, 50 μ M)을 단독 또는 병용 처리한 후 Western blot 분석을 수행하였다(그림 20,21).

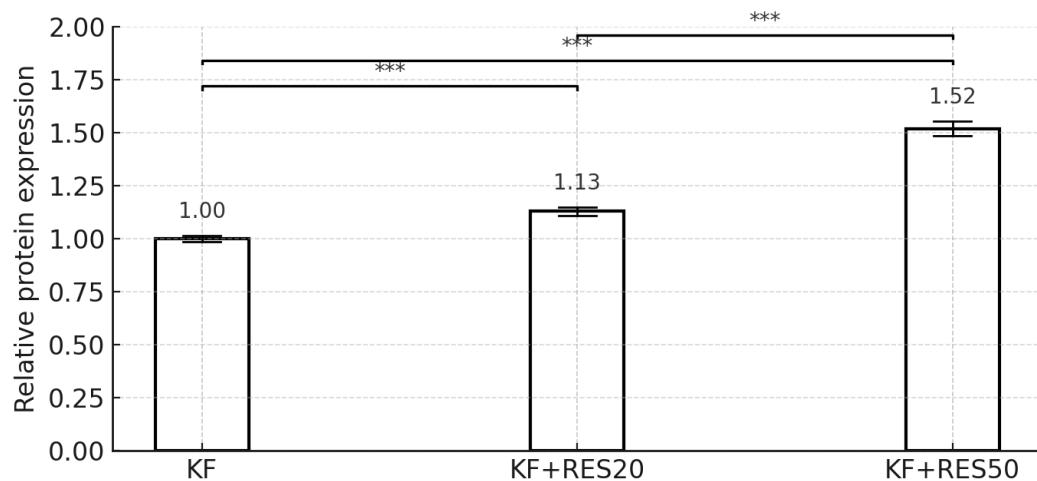
HDF에서는 TGF 처리 시 Sirt1 단백질 발현이 0.77배로 감소하였으며, 레스베라트롤 병용 처리군 중 20 μ M에서는 1.12배로 발현이 회복되었으나, 50 μ M에서는 0.72배로 다시 감소하였다. 통계 분석 결과, HDF only군과 HDF+TGF, HDF+TGF+RES20군, HDF+TGF+RES50군 간 비교에서 모두 유의한 차이가 있었으며(HDF only vs HDF+TGF: p < 0.01, HDF only vs HDF+TGF+RES20: p < 0.05, HDF only vs HDF+TGF+RES50: p < 0.01), HDF+TGF와 HDF+TGF+RES20군 간에도 유의한 차이가 확인되었다(p < 0.01). 그러나 H+TGF- β 군과 H+T+R50군 간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. HDF+TGF+RES20군과 HDF+TGF+RES50군 간에는 유의한 차이가 있었으며(p < 0.001), 이는 레스베라트롤 농도에 따른 Sirt1 발현 반응의 차이를 시사한다(그림 20)



<그림 20> HDF에서 TGF 및 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 단백질 발현 변화. TGF 단독 처리 시 Sirt1 발현은 유의하게 감소하였으며, 레스베라트롤 병용군에서는 발현이 회복되거나 증가하는 경향을 보였다. 특히 HDF+TGF+RES20 조건에서는 TGF 단독군 대비 $**p < 0.01$ 수준의 유의한 증가가 관찰되었으며, RES20과 RES50 간에도 $***p < 0.001$ 수준의 차이를 보였다.

KF에서는 기저 상태에서의 Sirt1 발현량을 1.00으로 기준하였을 때, RES20 및 RES50 처리에 따라 각각 1.13배, 1.52배로 유의하게 증가하였다. 통계적으로 KF only군과 KF+RES20군 간에는 $p = 0.0013$, KF+RES50군 간에는 $p < 0.001$ 수준에서 유의한 증가가 확인되었으며, KF+RES20군과 RES50군 간에도 $p < 0.001$ 로 유의한 차이를 보였다(그림 21).

SIRT1 expression in KF



<그림 21> KF에서 레스베라트롤 처리에 따른 Sirt1 단백질 발현 변화. SIRT1 발현은 Resveratrol 처리에 따라 농도 의존적으로 증가하였으며, KF vs RES20 비교에서 *** $p < 0.001$, KF vs RES50에서 *** $p < 0.001$ 수준의 통계적으로 유의한 증가가 확인되었다. 또한 RES20과 RES50 간에도 ** $p < 0.01$ 수준의 유의한 차이가 관찰되었다.

이러한 결과는 레스베라트롤이 Sirt1 발현을 유의하게 증가시킬 수 있으며, 특히 KF에서 농도 의존적인 효과를 나타낸다. 또한 TGF에 의해 억제된 Sirt1 발현을 레스베라트롤이 회복시킬 수 있음을 보여주며, Sirt1 경로의 후생유전학적 조절 기전이 케로이드 섬유화 억제에 기여할 수 있음을 뒷받침한다.

3.4 MTT assay, qPCR, Western blot 실험 결과 요약

본 연구에서는 레스베라트롤이 HDF 및 KF에 미치는 생물학적 효과를 평가하기 위하여 MTT assay, 정량적 real-time PCR(qPCR), Western blot 분석을 실시하였다.

MTT assay 결과, 고농도($20 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$)의 레스베라트롤 처리 시 HDF와 KF 모두에서 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 HDF에서는 농도 의존적인 생존율 억제가 유의하게 나타났다. KF는 HDF에 비해 전반적인 생존율 저하가 완만하게 나타났으나, 레스베라트롤 단독 처리군에서도 유의한 감소를 보였다.

qPCR 분석에서는 KF가 HDF보다 Collagen 1 및 α -SMA의 기저 발현이 높았고, TGF 처리에 따라 두 유전자 모두에서 발현이 크게 증가하였다. 레스베라트롤은 KF에서 단독 처리 시 두 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 KF+RES50 조건에서 강력한 억제 효과가 관찰되었다. 그러나 HDF+TGF 병용 조

건에서는 이러한 억제 경향이 일관되게 나타나지 않았다. Sirt1 발현은 TGF에 의해 억제되었으나, 레스베라트를 단독 처리군에서는 농도 의존적으로 증가하였고, KF+RES50 조건에서 가장 높은 발현을 보였다. Sirt2와 Sirt3는 전반적으로 레스베라트를 처리 시 발현이 증가하는 경향을 보였으나, TGF 병용 고농도 조건에서는 Sirt3의 발현은 억제되는 양상이 관찰되었다.

Western blot 분석 결과 또한 qPCR 결과와 유사한 경향을 보였으며, KF에서 고농도 레스베라트를 처리 시 α -SMA 및 Collagen 1 단백질 발현이 현저히 감소하였다. Sirt1 단백질은 KF에서 레스베라트를 처리 농도에 따라 증가하였으며, TGF에 의해 억제된 발현 또한 부분적으로 회복되는 양상이 관찰되었다.

4. 고찰

본 연구에서는 레스베라트롤이 HDF 및 KF의 섬유화 반응에 미치는 영향을 분석하고, 이 과정에서 Sirtuin 계열 단백질, 특히 Sirt1이 어떤 역할을 하는지 규명하고자 하였다. 이를 위해 MTT assay에 의한 세포 생존율 평가, qPCR과 Western blot을 통한 유전자 및 단백질 발현 분석을 단계적으로 수행하였다.

MTT assay에서는 레스베라트롤이 HDF 및 KF 모두에서 농도 의존적으로 세포 생존율을 억제하는 경향을 보였다. 특히 HDF에서는 고농도 레스베라트롤(RES50) 처리 시 생존율이 유의하게 감소하였으며, KF에서는 감소폭이 비교적 완만하였지만 RES20 및 RES50 조건 모두에서 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 이는 KF가 병리적 특성에도 불구하고 레스베라트롤의 세포 억제 효과에 민감하게 반응함을 시사한다.

qPCR 분석 결과, KF는 HDF에 비해 Collagen 1 및 α -SMA의 기저 발현이 높았으며, TGF- β 자극에 따라 두 유전자의 발현이 더욱 증가하였다. 레스베라트롤 단독 처리 및 TGF- β 병용 처리 조건에서 이들 유전자의 발현은 전반적으로 농도 의존적으로 억제되었고, 특히 KF+RES50 조건에서 가장 뚜렷한 억제 효과가 나타났다. 이는 레스베라트롤이 섬유화 유전자 발현을 효과적으로 억제함을 의미하며, 병적 섬유아세포에 대한 선택적 작용 가능성을 제시한다.

Sirt1 발현은 KF에서 상대적으로 낮게 나타났으며, 레스베라트롤 처리에 따라 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 KF에서는 고농도(RES50)에서도 발현이 유의하게 증가한 반면, HDF에서는 TGF- β 병용 조건에서 오히려 발현이 감소하거나 회복되지 않는 양상이 관찰되었다. 이는 고농도 레스베라트롤이 HDF에서 세포 독성 또는 Sirt1 단백질의 번역 저해나 불안정성을 유발할 수 있음을 시사한다. 또한 일부 조건에서는 TGF- β 에 의해 억제된 Sirt1 발현이 레스베라트롤에 의해 부분적으로 회복되는 결과도 관찰되었는데, 이는 레스베라트롤이 후생유전학적 조절자로 작용할 수 있는 가능성을 뒷받침한다.

Sirt2 및 Sirt3 유전자 역시 레스베라트롤 단독 처리 조건에서는 발현 증가를 보였으나, TGF- β 병용 고농도 처리에서는 일부 조건에서 발현 억제 양상이 관찰되었다. 이는 Sirt1과 유사한 반응 양상을 보이면서도 세포 유형과 처리 조건에 따라 상이한 조절 기전을 가질 수 있음을 의미하며, 향후 후속 연구를 통해 이들의 섬유

화 조절 역할을 정밀히 분석할 필요가 있다.

Western blot에서는 qPCR 결과와 전반적으로 유사한 경향이 나타났다. KF에서 고농도 레스베라트를 처리 시 Collagen 1과 α -SMA 단백질 발현이 유의하게 감소하였고, Sirt1 단백질은 농도 증가에 따라 KF에서 유의하게 증가하였다. HDF에서는 TGF- β 처리에 의해 Collagen 1 및 α -SMA 단백질 발현이 증가하였으나, 레스베라트를 병용 처리 시 발현이 감소하였으며, Sirt1 단백질 발현은 RES20에서 일시적으로 회복되었으나 RES50에서는 다시 억제되는 양상을 보였다.

한편, 일부 실험 조건에서는 mRNA 발현과 단백질 발현 간의 차이가 관찰되었다. 예를 들어, α -SMA는 qPCR 상에서 발현 감소가 확인되었으나 western blot에서는 감소폭이 작거나 통계적으로 유의하지 않은 경우도 있었다. 이는 α -SMA가 세포골격 단백질로서 반감기가 길고, 처리 시간(48시간) 내에 단백질 분해가 충분히 일어나지 않았을 가능성을 반영한다. 또한, 고농도 레스베라트를 조건에서는 세포 스트레스 또는 유전자 번역 효율 저하 등의 유전자 전사 후, 혹은 유전자 번역 후 조절 기전이 단백질 수준에 영향을 미쳤을 가능성이 있다. 향후 연구에서는 이러한 시차적 반응을 정량적으로 평가하기 위한 시간 의존성 분석이 병행되어야 할 것이다.

종합하면, 본 연구는 레스베라트롤이 Sirt1 및 Sirtuin family의 발현을 조절함으로써 TGF- β 매개 섬유화 반응을 억제할 수 있다는 가설을 뒷받침할 수 있으며, 특히 KF에서 보다 뚜렷한 억제 효과를 확인하였다. 이는 후생유전학적 조절 기전을 기반으로 한 켈로이드 치료 전략의 타당성을 제시하며, 향후 Smad 및 non-Smad 신호 경로에 대한 추가 기전 연구와 함께 Sirt1 억제제(예: EX-527, Sirtinol 등)를 이용한 기전 검증 실험이 필요할 것으로 사료된다.

5. 결론

본 연구에서는 KF와 HDF를 대상으로, 레스베라트롤이 Sirt1 발현을 포함한 섬유화 관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 세포 생존율, 유전자 발현, 단백질 발현 측정을 통해 Collagen 1, α -SMA, Sirt1의 변화를 비교하였다.

실험 결과, KF는 HDF에 비해 Collagen 1 및 α -SMA의 기저 발현이 높고, Sirt1 발현은 낮게 나타났다. 레스베라트롤 처리 후 KF에서 Sirt1 발현은 증가하였으며, 일부 조건에서는 Collagen 1 및 α -SMA 발현이 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 변화는 레스베라트롤이 일부 실험 조건에서 섬유화 관련 유전자의 발현 조절에 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

또한, TGF- β 처리에 의해 유도된 섬유화 환경에서, 레스베라트롤 병용 처리 시 Sirt1 발현이 회복되는 양상이 관찰되었으나, 이러한 효과는 세포 종류 및 처리 농도에 따라 상이하였다. 고농도 레스베라트롤에서는 HDF에서 Sirt1 발현이 오히려 감소하거나 생존율이 저하되는 결과도 관찰되어, 처리 농도에 따른 세포 반응의 다양성도 확인되었다.



본 연구 결과는 레스베라트롤이 시험관 내 환경에서 KF의 섬유화 관련 유전자 발현에 영향을 줄 수 있는 가능성을 보여주며, Sirt1이 이 과정에 일부 기여할 수 있음을 시사한다. 다만, 본 연구는 제한된 세포주와 조건에서 수행된 기초 실험으로, 결과 해석 및 일반화에는 신중함이 필요하다. 향후 Smad 및 non-Smad 신호 경로의 세부 기전 분석과 함께 SIRT1 억제제 사용을 통한 기전 검증 실험이 필요하며, 다양한 기전 분석 및 생체 내 연구를 통해 레스베라트롤과 Sirt1의 상호작용에 대한 보다 구체적인 규명이 이루어질 필요가 있다.

참고 문헌

1. Seung Jun Jwa, Jongmin Won, Young Chul Suh, Won Jai Lee. 2013. "Extraleisional cryotherapy combined with intralesional triamcinolone injections after keloid excision." *Archives of Aesthetic Plastic Surgery* 29(1), 8-13.
2. Lexin Liu, Qizhe Sun, Frank Davis, Jianhua Mao, Hailin Zhao, Daqing Ma. 2022. "Epithelial-mesenchymal transition in organ fibrosis development: current understanding and treatment strategies." *Burns & Trauma* 10
3. Zerr, Pawel, Alexis, A., Schulz, R., Distler, A., Schett, G., Gay, S., Distler, J.H.. 2016. "Sirt1 regulates canonical TGF- β signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis." *Annals of the rheumatic diseases* 75(1), 226-233.
4. Ikeda, Kanae, Urushibata, Osamu, Takahashi, Takuya, Yamada-Noma, Shizuka, Okada, Koji, Fujimoto, Moritake, Imokawa, Genji. 2013. "Resveratrol inhibits fibrogenesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts." *Wound Repair and Regeneration* 21(4), 616-623.
5. Borra, Margie T., Brian C. Smith, and John M. Denu. 2005, "Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol." *Journal of Biological Chemistry* 280(17), 17187-17195.
6. Bai, Xiao-Zhi, Zhang, Yi, Zhang, Lihua, Li, Xiaoyan, Liu, Yuling, Zhang, Weiguo, Wang, Xiaoju, Yin, Gang, Dong, Lin, Hu, Dapeng. 2016, "Identification of sirtuin 1 as a promising therapeutic target for hypertrophic scars." *British journal of pharmacology* 173(10), 1589-1601.
7. García-Vizcaíno, E.M., Liarte, S., Alonso-Romero, J.L. Ramírez-Bosca, A., Noguera, R., Bañón-aneus, E., Guillén, I., Mestre, C., Zaragoza, C., Ramírez, A., Bosch, R. J.. 2017, Sirt1 interaction with active Smad2 modulates transforming growth factor- β regulated transcription. *Cell Commun Signal* 15, 50.
8. Liu, Y., Wang, L., Zhang, D., & Lv, Y. 2013. SIRT1 regulates TGF- β signaling and promotes fibrogenesis in lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(6), 690-698.
9. Nagai, H., & Matsumoto, Y. 2007. Keloid and hypertrophic scar: Neurogenic inflammation hypotheses. *Medical Hypotheses*, 68(3), 586-590.
10. Park, J. Y., Kim, H. S., & Lee, Y. J. 2019. Epigenetic regulation in fibrosis: Molecular targets and therapeutic strategies. *Journal of Molecular Medicine*, 97(12), 1491-1502.
11. Rosenbloom, J., Castro, S. V., & Jimenez, S. A. 2013. Fibrotic diseases: Cellular and molecular mechanisms. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(3), 170-180.
12. Shih, B., Bayat, A., & McGrath, D. A. 2010. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair and Regeneration*, 18(2), 139-153.



13. Zhang, X., Wang, J., & Xing, Y. 2018. Resveratrol attenuates TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses fibrosis by activating SIRT1. *International Immunopharmacology*, 55, 282-288.
14. Zhao, X., Kwan, J. Y. Y., Yip, K., Liu, P., & Liu, K. 2016. SIRT1 functions as a negative regulator of TGF- β signaling through deacetylation of Smad3. *Cell Research*, 26(7), 850-865.

ABSTRACT

The effect of Sirt1 induced by resveratrol on keloid development

Keloids are characterized by excessive collagen deposition and persistent fibroblast activation during wound healing. Despite various therapeutic attempts, effective and lasting treatment options remain limited. Recent studies have suggested that epigenetic regulation, particularly through the Sirtuin family proteins such as SIRT1, may influence fibrotic signaling pathways, including TGF- β -mediated responses.

This study aimed to investigate the effects of Resveratrol, a known SIRT1 activator, on fibrotic gene expression in normal human dermal fibroblasts (HDF) and keloid fibroblasts (KF), focusing on its potential to modulate SIRT1 expression and associated fibrotic markers.

HDF and KF were treated with TGF- β (10 ng/mL) and Resveratrol (20 μ M, 50 μ M), either alone or in combination. Cell viability was assessed using the MTT assay. Expression levels of Collagen 1, α -SMA, and SIRT1 were analyzed by real-time qPCR and Western blotting.

KF exhibited higher basal expression of Collagen 1 and α -SMA, and lower SIRT1 levels compared to HDF. Resveratrol treatment increased SIRT1 expression in a dose-dependent manner, particularly in KF, and partially suppressed fibrotic gene expression under certain conditions. However, the effects varied depending on cell type and treatment concentration. High-dose Resveratrol also led to a significant reduction in cell viability.

These findings suggest that Resveratrol may influence fibrotic responses in keloid fibroblasts by modulating SIRT1 expression. While preliminary, this study provides supportive evidence for the potential role of epigenetic modulation in keloid treatment. Further mechanistic and in vivo studies are needed to clarify these interactions and therapeutic implications.

Key words: (10 단어 이내)

Keloid, Fibroblast, Resveratrol, SIRT1, Fibrosis, TGF- β , Epigenetics