

## 배양액내 지방함량의 변화가 신생흰쥐 피부섬유아세포의 노화와 지질과산화물 생성에 미치는 영향

장 영 애 · 김 화 영

이화여자대학교 식품영양학과

### The Effect of Lipid Concentration in Culture Medium on Senescence and Lipid Peroxides Production of Fibroblast from Neonate Rats

Jang, Young Ai · Kim, Wha Young

Department of Foods & Nutrition Ewha Womans University, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of lipid on cellular senescence, lipid peroxide production, and morphological changes. For this study we used primary skin fibroblasts from neonate rats grown in media various lipid contents. Fibroblasts were cultured until they lost their proliferation potential either in control medium(Dulbecco's modified Eagle's medium supplement with 10% fetal bovine serum) or in media supplemented with various concentrations of lipid-cholesterol rich component from bovine serum. Cumulative population doublings(CPD, as an index of cellular life span), and cellular thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, as an index of lipid peroxide) concentrations were measured and morphological changes were observed. CPD were shortened with increasing lipid concentration in media : 28.12 for cells grown in control medium and 13.42, 11.42, and 6.19 for those grown in 0.1%, 1% and 5% lipid rich components containing media, respectively. Cellular proliferation ratios were tend to accelerate in cells grown in 0.1% and 1% lipid rich components containing media, but those grown in 5% lipid rich components containing media were delayed and they were degenerated soon. TBARS concentrations were increased with increasing concentration of lipid in media. Morphological changes were observed in cells grown in control medium by cellular senescence. Especially lipid droplets were observed in cells grown in 5% lipid rich components containing media. Therefore it seems that lipid contents in media had an effect on cellular proliferation and cellular life span, possibly via lipid peroxide production. (*Korean J Nutrition* 29(1) : 97~103, 1996)

**KEY WORDS** : fibroblast · primary cell culture · lipids · cellular senescence · lipid peroxide · cumulative population doublings(CPD).

#### 서 론

최근 노화 과정에 대한 관심이 증대하면서 노화 현상  
채택일 : 1995년 12월 29일

이나 수명을 결정짓는 요인에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 노화에 관한 연구를 하기 위한 연구 모델로 사람보다 수명이 짧은 동물을 대상으로 한 실험들이 행해지고 있으나 이것도 비교적 시간이 많이 걸리고 분자 수준에서의 기전을 규명할 수 없다는 제한점을 가지고

있다. Hayflick 등<sup>1)</sup>이 태아의 폐에서 분리한 섬유아세포의 평균증식수가 50인데 비해 성인에게서 분리한 섬유아세포의 평균증식수는 20밖에 되지 않아 세포는 생체 외에서 제한된 수명을 지니며 세포를 제공한 생체의 연령을 반영한다는 것을 관찰하고 이러한 세포 증식력의 변화가 세포의 노화를 나타내는 것이라고 제안한 이래 노화 연구에 세포배양계가 이용되고 있다.

Cristofalo 등<sup>2)</sup>은 세포배양계에서 세포가 분열을 거듭하게 되면 "세포노화(cellular senescence)"의 현상을 나타낸다고 하였다. 이것은 세포가 노화될수록 세포들 중에서 DNA를 합성하고 분열할 수 있는 세포수의 비율이 감소하고 상대적으로 G<sub>1</sub>기에 머무르는 세포의 수가 많아지기 때문이고 따라서 DNA의 합성을 방해하는 요인들을 밝혀내는 것이 필요하다고 설명하였다<sup>3)</sup>. 또한 Bayreuther 등<sup>4)</sup>은 세포배양계에서 세포가 분열을 계속하게 되면 일련의 형태변화를 나타낸다고 보고하였다. 즉 세포 분열 초기에는 작은 방추형이다가 작은 상피세포의 모양으로 변하고 세포의 분열횟수가 증가하게 되면 점차 큰 상피세포의 모양을 나타낸다고 하였으며 이러한 형태변화도 세포노화 과정에서 나타나는 유전자의 발현 변화에 기인하는 것으로 보겠다. 따라서 이러한 특징적인 형태의 변화가 세포의 노화에 대한 지표가 될 수 있고 이러한 형태변화를 가속시키는 조건들은 세포의 수명에 영향을 줄 수 있다고 생각된다.

세포배양계는 생체의 여러가지 조건을 반영함과 동시에 특정한 인자만을 변화시켜 관찰할 수 있으므로 세포 수준에서 특정한 인자의 영향을 조사하기 위해서는 가장 적합한 모델로 생각된다. 조미숙과 김화영<sup>5)</sup>은 나이가 다른 흰쥐를 지방 함량이 다른 식이로 사육한 후 폐 섬유아세포를 분리하여 세포배양계에서 세포의 증식능력을 비교하였다. 그 결과 세포를 제공한 흰쥐의 연령이 증가할수록 폐 섬유아세포의 증식능력이 감소하여 노화와 영양과의 관계를 연구하는데 세포배양계가 이용될 수 있음을 시사하였다.

노화과정에 영향을 미치는 영양소 중 지방의 영향이 많이 논의되어 왔다. 지방을 많이 섭취하는 사람들은 여러가지 퇴행성 질병의 유병율이 높고 수명이 짧은 것이 보고되고 있다<sup>6)</sup>. 생체는 나이가 증가하면 지질과산화물의 생성이 증가하고 이것이 노화를 초래하는 한가지 원인으로 지적되고 있다<sup>7,8)</sup>. 세포배양계에서도 지방의 첨가량이 증가할수록 지질과산화물이 증가하였고 이러한 과산화물의 증가는 세포의 수명이나 증식력에 영향을 준다고 알려져 있다<sup>9,10)</sup>. 따라서 본 연구는 세포배양계를 이용하여 식이성분중 지방이 세포의 증식력이나 수명에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시도되었다. 신생 흰쥐에서

분리한 섬유아세포를 지방의 농도가 다른 배양액에서 더 이상 증식하지 않을 때까지 배양하여 세포의 수명을 측정하였으며 각 계대배양 단계별로 지질과산화물의 생성량을 측정하고 형태 변화를 관찰하여 배양액내 지방함량의 변화가 세포의 수명에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양액 및 지방첨가원

배양액은 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco)에 항생제(penicilline 100units/ml, streptomycin 10μg/ml, amphotericin B 25ng/ml)와 10μM의 NaHCO<sub>3</sub> 및 10μM의 HEPES(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic acid; Gibco)를 첨가한 후 pH를 7.4로 조정하고 0.22μm pore size membrane filter(Millipore)를 통과시켜 멸균하여 냉장보관하였다. 여기에 열로 불활성화된 fetal bovine serum(FBS; Gibco)을 10% 첨가하여 사용직전에 37℃로 배양 사용하였다. 배양액내의 지방첨가원은 배양액용 지방성분(lipids-cholesterol rich: water soluble media supplement, from adult bovine serum; Sigma)으로 하였으며 실험군은 배양액에 배양액용 지방성분을 0.1%, 1%, 5%씩 첨가하여(v/v) 대조군과 비교하였다. 배양액용 지방성분의 조성은 Table 1에 제시하였다.

### 2. 피부 섬유아세포(skin fibroblasts)의 일차배양 및 계대배양

섬유아세포의 일차배양(primary culture)은 Harley<sup>11)</sup>등의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 생후 1일된

**Table 1.** Composition of lipid-cholesterol rich media supplement<sup>1)</sup>

Total cholesterol	11.4 ± 0.6mg/ml
% HDL cholesterol	96.8 ± 1.6
Total phospholipids	11.3 ± 0.8mg/ml
% phosphatidyl choline	64.9 ± 15.2
% lysophosphatidyl choline	9.7 ± 7.4
% sphingomyelin	25.4 ± 7.9
Total fatty acids	12.5 ± 0.8mg/ml
% linoleic	51.0 ± 3.9
% arachidonic	2.4 ± 0.9
% polyunsaturated	59.4 ± 2.3
Total protein	23.0 ± 1.9mg/ml

1) from Sigma product number : L 4646

Lipids-cholesterol rich, from adult bovine serum. A water soluble media supplement containing lipoprotein, cholesterol, phospholipids and fatty acids for serum-free, or reduced serum, media. Isolated from adult bovine serum by adsorption chromatography.

한배의 신생 흰쥐들을 diethyl ether로 마취하여 희생시킨후 clean bench(Flow Lab. : Gelaire) 내에서 무균적으로 피부조직을 절제하였다. 이것을 Hank's Basal Salt Solution(Gibco)으로 2회 세척하고 조직의 크기가 2~3mm<sup>2</sup> 정도가 되도록 잘게 자른후 정교한 핀셋을 이용하여 60mm plastic culture dish(Nunc.) 바닥에 골고루 부착시켰다. 이때 용기는 0.05% collagen(Gibco)용액으로 미리 처리하여 일차배양시 조직에서 분리해낸 세포들이 잘 부착할 수 있도록 하였다. 이런 상태로 37°C CO<sub>2</sub> incubator(Flow Lab. : 5% CO<sub>2</sub>/95% air, humidified)안에서 6~8시간정도 배양하여 조직이 용기바닥에 안정하게 부착이 되면 배양액을 보충하여 주고 CO<sub>2</sub> incubator안에서 계속 배양하였다. 이후 1~2일 간격으로 배양액을 교환하여 주고 세포가 충분히 많은 수가 되면 0.25% trypsin-1mM EDTA 용액으로 처리하여 세포를 분리하였다. 조직으로부터 분리시킨 세포를 배양액에 부유시켜 37°C incubator에서 재배양하였고 3~4일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 세포가 배양용기내에 꽉 차게 자라도록(confluence) 하였다. 배양용기내에 섬유아세포가 꽉 차게 자라면 0.25% trypsin-1mM EDTA 0.4ml로 10분간 처리해 세포들을 용기바닥에 분리시킨후 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 세고 1 : 2로 분리 계대배양하였다(제1 계대배양 : passage 1) 동일한 방법으로 계대배양을 반복하여 계대배양을 실시한 횟수를 passage number로 나타냈으며 세포가 더 이상 증식하지 않을 때까지 배양을 계속하였다.

### 3. 세포 수명의 측정

세포의 수명은 누적집단배증량(cumulative population doublings : CPD)으로 나타내었다. CPD는 Cristofalo<sup>12)</sup>의 방법을 이용하여 계대배양시 분주한 세포수와 confluence에 도달했을 때 측정된 세포수로부터 집단배증수(population doublings : PD)를 계산한 후 매 계대배양시마다 계산된 PD를 누적하여 구하였다. PD와 CPD는 다음의 공식에 의해 구하였다.

$$PD = \log_2(N_c/N_s)$$

(N<sub>c</sub> : cell no. at confluence, N<sub>s</sub> : cell no. at seeding)

$$CPD = \sum PD$$

계대배양후 3주가 경과한 후에도 세포수가 더 이상 증가하지 않거나 감소하게 되는 시점을 phase out으로 간주하고 이 시점까지 계대배양을 계속하여 세포의 최종 CPD를 세포의 수명으로 나타냈다. 매 계대배양시마다 confluence를 이룬 세포의 수가 다르므로 1 : 2로 분리 계대배양했을 때 계산된 PD는 계대배양을 실시한 횟수

인 passage number와는 차이가 있었다.

### 4. 형태 관찰

섬유아세포의 증식상태 및 미생물 등에 의한 오염여부는 매일 phase-contrast microscope(Olympus : IMT-2)로 관찰하였다. 섬유아세포의 형태관찰은 분주한 후 24시간후에 배양용기에 부착된 세포를 1% glutaldehyde 용액으로 전고정(prefix) 한 후 ethanol로 탈수, 고정시켜 Giemsa stain으로 염색하여<sup>13)</sup> phase-contrast microscope로 세포수를 세고 촬영하여 관찰하였다.

### 5. 세포내 지질과산화물 양의 측정

세포내 지질과산화물량의 지표로는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 양을 측정하였다. 세포내 TBARS의 양은 각 계대배양시마다 일정량의 세포들을 10% DMSO(dimethylsulfoxide)와 20% FBS가 포함된 배양액에 부유시켜 -70°C에서 냉동보관했다가 실험직전에 세포들을 37°C 수조에서 급속히 녹인 후 원심분리하여 냉동용배양액을 제거하고 증류수를 첨가하여 세포막을 터뜨려 세포내의 성분을 용출시킨 후 Yagi<sup>14)</sup>의 방법을 변형시켜 luminiscence spectrometer(LS 50 : Perkin-Elmer)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 측정하였다.

### 6. 자료처리

섬유아세포의 증식과 수명을 관찰한 실험에서는 실험조건당 평균값을 표시하였고 지질과산화물의 생성량을 측정된 실험결과는 각 실험조건당 2회 반복하여 10<sup>4</sup>개 세포당의 양으로 환산한 값을 평균하여 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 세포의 수명

생후 1일된 신생 흰쥐의 피부조직에서 일차배양하여 얻은 섬유아세포를 지방함량이 다른 배양액에서 배양하여 세포가 더 이상 증식하지 않을 때까지 계속 계대배양했을 때 섬유아세포의 계대배양별 CPD는 Table 2에 제시하였다. 세포 수명의 지표로 사용된 CPD는 계대배양 횟수에 따라 비교했을 때 대조군이 28.12로 가장 길었다. 그 다음은 배양액에 첨가된 배양액용 지방의 양이 0.1%에서 5%로 증가할수록 세포의 수명이 짧아져 0.1% 첨가군(0.1% L)은 13.42, 1% 첨가군(1% L)군은 11.42였으며, 5% 첨가군(5% L)이 6.19로 가장 낮았다. 세포의 증식력을 비교하기 위해 계대배양에 따른 섬유아세포의 증식정도를 배양일수(day of culture)에 따른

CPD로 비교한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 0.1% L군과 1% L군은 배양초기에 대조군에 비해 더 빠른 속도로 증식하는 경향이어서 낮은 농도의 지방첨가가 배양초기에는 세포의 증식속도를 촉진한 것으로 나타났다. 그러나 수명의 지표인 CPD는 대조군에 비해 단축되었고 대조군이 196일만에 phase out에 도달한 것에 비해 각각 110일, 72일만에 phase out에 도달하였다. 반면에 5% L군의 경우는 다른 군에 비해 증식속도가 가장 늦었고 배양후 52일 이후부터는 성장을 멈추었다. 그러므로 세포의 증식을 자극하는 지방첨가량은 적절한 농도가 있어 첨가된 배양액용 지방의 양이 1%이하인 경우에는 지방의 양이 증가할수록 배양초기에 세포의 증식을 자극하였으나 5% 이상인 경우는 세포의 수명도 단축시키고 증식속도를 지연시켜 세포의 증식에 치명적인 영향을 나타냈다.

정상적인 세포는 종마다 차이는 있으나 수명이 유한한데 쥐나 헬스터의 경우는 20~30회정도 분열한다고 알려져 있다<sup>15)</sup>. 본 연구에서 대조군의 CPD도 이러한 범위 내에 있었으므로 본 연구에서 사용한 섬유아세포는 세포의 수명을 연구하는데 적합한 모델이었던 것으로 사료된다. 이때 세포의 증식은 배양조건에 영향을 받는데 배양액용 지방을 첨가하여 세포의 증식속도를 변화시켰을 때 정상적인 세포의 수명이 도달하지 못하고 phase out되어 지방의 첨가는 세포의 분열할 수 있는 능력을 변화시키는 것으로 생각된다.

2. 형태변화

Fig. 2에는 계대배양에 따른 대조군 세포의 형태변화

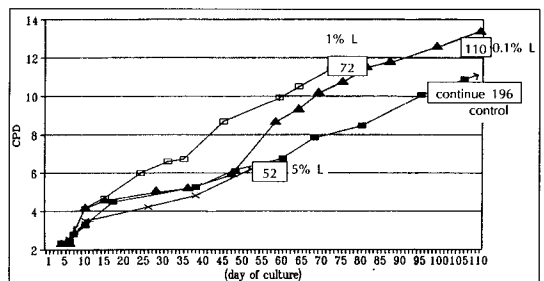
**Table 2.** Cumulative population doublings of fibroblasts cultured in DMEM containing various amount of lipids<sup>1)</sup>(by passage number)

passage no.	control	0.1% L <sup>2)</sup>	1% L	5% L
1	2.35	2.35	2.35	2.35
3	3.27	4.22	4.12	3.50
5	5.25	5.10	5.99	4.83
7	6.78	5.97	6.73	6.19
9	8.47	9.37	9.92	(6)
11	10.89	10.79	11.42	
13	13.03	11.83	(11)	
15	16.20	13.42		
17	19.28	(15)		
19	21.13			
21	21.40			
23	23.29			
25	26.71			
27	28.12			
(final pass. no.)	(26)			

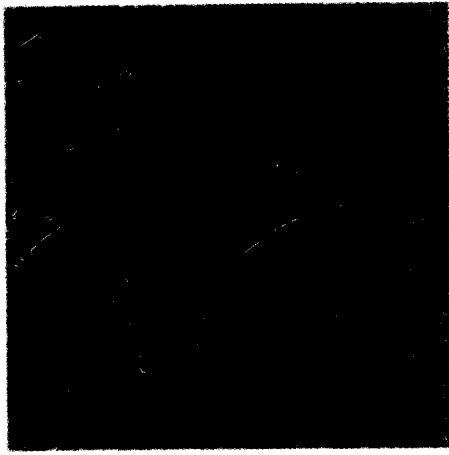
1) means of observations

2) Lipid-cholesterol rich medias supplements from bovine serum was added to DMEM at the final concentrations of 0.1, 1, 5%

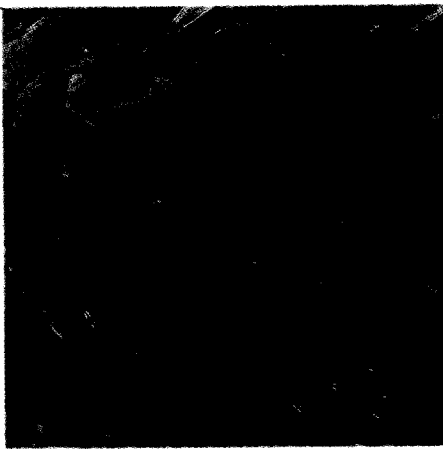
를 나타내었다. Fig. 2-A는 신생원주의 피부 섬유아세포의 일차배양을 실시했을 때의 형태로 용기에 부착시킨 피부조직에서 길고 가느다란 막대기 같은 형태의 섬유아세포들이 뻗어나와 용기바닥에 퍼져가며 자라고 이외에도 여러 다른 세포들이 같이 존재함을 볼 수 있었다. 제 1 계대배양후에는 일차배양후에 존재하던 섬유아세포 이외의 세포들은 관찰되지 않고 섬유아세포만 남게 되었으며 전형적인 작은 방추형의 형태를 보였다. 세포의 크기는 작고 수가 많으며 세포질에 비해 핵의 크기가 큰 균일한 모양이었다(Fig. 2-B). 계대배양이 계속되면서 세포의 크기가 커지고 세포질의 넓이가 넓어진 형태로 변화했으며 넓적하고 불규칙한 형태로 지속되었다가 제 25 계대배양 이후에는 세포의 형태가 급격하게 변화하며 퇴화하였다(Fig. 2-C). 이러한 일련의 형태변화는 Bayreuther<sup>등</sup><sup>4)</sup>이 섬유아세포의 분열 횟수에 따라 관찰한 결과와 일치하는 것이었다. Fig. 3은 0.1% L(Fig. 3-A), 1% L(Fig. 3-B) 및 5% L(Fig. 3-C)에서 제 6 계대배양시의 형태를 비교한 것으로 0.1% L군과 1% L군도 대조군과 유사한 일련의 형태변화를 나타냈으나 세포의 크기가 넓은 상피세포형의 형태에서 곧 퇴화하였다(Fig. 3-A, 3-B). 지방함량이 가장 많았던 배양액에서 자란 5% L군은 계대배양 횟수에 따른 특징적인 형태변화가 정확히 구분되지 않았고 큰 상피세포의 형태를 나타낸 이후의 세포들은 빠르게 퇴화되었다. 또 3 계대배양이후부터 세포내부에 다른 세포들에서는 잘 관찰되지 않았던 많은 지방구 같은 입자들이 생겼고 계대배양이 진행됨에 따라 입자의 크기가 더 커지는 양상으로 퇴화되기 직전의 제 6 계대배양(Fig. 5-C)에서는 그 지방구 같은 입자들의 크기가 가장 컸고 수도 많았다. 세포내부에 생성된 지방구들은 정상배양액에서 다시 배양하면 세포의 중성지방의 함량은 다시 감소하고 지방구들이 사라진다고 하였는데<sup>9)</sup> 본 연구에서는 지방이 첨가된 배양액내에서 계속적으로 배양하여 지방이 세포의 형태변화 및 수명에 미치는 영향이 더 현저했다.



**Fig. 1.** CPDs of fibroblasts cultured in DMEM containing various lipid contents (by day of culture)



A



B



C

Fig. 2. Morphological changes of fibroblasts cultured in DMEM containign 10% FBS. (A : primary culture, B : passage 4, C : passage 25 1 day after seeding, X400).



A A



B



C

Fig. 3. Morphology of fibroblasts cultured in DMEM containing 10% FBS and 0.1%(A), 1%(B), 5%(C) lipids, at passage 6. 1 day after seeding, X400.

### 3. 세포내 지질과산화물의 함량

생체는 나이가 증가함에 따라 지질과산화물의 생성이 증가하고<sup>7)</sup> 세포배양계에서도 지질과산화물이 증가하면

세포의 수명이나 증식에 영향을 준다고 알려져 있다<sup>7)10)</sup>. 본 연구의 결과에서도 배양액용지방의 첨가량이 증가할 수록 대조군에 비해 전체적으로 지질과산화물의 생성이

증가한 경향을 보였다(Table 3). 그러나 각 계대배양별로 볼때는 지질과산화물 생성량과 세포의 증식간에는 일정한 경향은 없었으므로 지질과산화물의 함량이 증가한 것이 세포의 증식에 즉시 영향을 주지 않았으나 이것이 장기화되면 세포의 수명에 영향을 줄수 있다고 생각된다. 지질과산화물은 주로 불포화지방산으로부터 생성되는데<sup>17)</sup> 배양액용 지방중에는 불포화지방의 함량이 많아서(약 7.425mg/ml)(Table 1) 배양액에 첨가된 지방함량이 증가할수록 지질과산화물의 생성이 많아진 것으로 보인다.

각군에서 계대배양수에 따라 지질과산화물양이 크게 변화하지 않은 이유중의 한가지는 과산화반응을 억제하는 항산화효소의 작용에 기인한다고 생각된다. 생체에서는 연령이 증가함에 따라 항산화효소의 활성이 감소되어 처리하지 못한 free radical등이 지질과산화물의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다<sup>17)18)</sup>. 그러나 Hayflick등<sup>19)</sup>은 섬유아세포의 SOD(superoxide dismutase), catalase의 활성이 세포의 나이가 증가하여도 감소하지 않

았으며, Mbemba등<sup>20)</sup>은 GSH-px(glutathione peroxidase)만이 계대배양초기에 약간 감소되었다고 보고하여 세포수준에서 항산화효소의 활성은 세포의 나이가 증가하여도 크게 변하지 않는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 계대배양수가 증가하여도 지질과산화물의 생성량이 증가하지는 않았던 것을 부분적으로 설명할수 있다. 한편 Monti등<sup>21)</sup>은 세포의 나이가 적을때는 세포 대사작용의 결과 생성된 oxygen free radical에 의해 세포의 증식이 별로 변화되지 않으나 나이가 많을 때는 세포의 증식이 저하되었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 지질과산화물의 양이 세포의 나이가 증가하는 것에 비례하여 증가하지는 않았으나 세포의 수명을 단축시키는 것에 영향을 주었다고 생각된다.

체내의 정상적인 대사 결과 생성된 oxidant들(NO, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl등)이 노화의 주요한 원인이 되며<sup>22)</sup> 동물의 경우 성장울과 수명사이에는 역관계가 존재한다고 알려져 있다<sup>23)24)</sup>. 그런데 대사가 빨리되면 이런 oxidant들의 생성이 더 증가할수 있으므로<sup>25)</sup> 본 연구에서 배양액용지방을 0.1%~1% 첨가한 경우에 초기에 증식속도가 빨라졌으나 수명이 짧아진 한 가지 요인이 될수 있다고 생각한다.

**Table 3.** Concentration of thiobarbituric acid reactive substances in DMEM containing various amount of lipids ( $\mu\text{M}/10^4$  cells)

passage no.	control	0.1% L	1% L	5% L
1	0.20 <sup>1)</sup>	0.20	0.20	0.20
2	- <sup>2)</sup>	0.18	0.43	3.01
3	-	0.46	0.69	1.95
4	0.66	1.06	1.43	18.56
5	1.00	2.11	1.46	18.65
6	1.02	3.88	2.59	2.54
7	0.89	3.31	-	
8	0.92	0.58	4.04	
9	0.86	0.68	3.76	
10	0.17	0.73	1.57	
11	0.55	0.92	5.27	
12	-	2.42		
13	-	0.81		
14	0.27	0.81		
15	0.20	-		
16	0.09			
17	0.15			
18	0.20			
19	0.94			
20	1.35			
21	0.93			
22	2.19			
23	3.98			
24	1.09			
25	0.66			
26	1.24			
Mean	0.75	1.30	1.95	7.49

1) observed value 2) not observed

요 약

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 1) 신생 흰쥐의 피부조직에서 배양한 섬유아세포의 CPD는 29.12이고 배양액에 배양액용 지방성분의 첨가량이 0.1%, 1%, 5%로 증가함에 따라 각각의 CPD는 13.42, 11.42, 6.19으로 단축되었다.
- 2) 배양액의 지방성분이 증가함에 따라 세포내 지질과산화물의 생성량이 증가하는 경향을 보였다.
- 3) CPD가 증가함에 따라 노화에 따른 형태변화를 나타냈고 배양액에 지방함량이 증가할수록 이러한 형태변화가 빠르게 나타났다.

Literature cited

- 1) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-636, 1965
- 2) Cristofalo VJ, Pignolo RJ, Rotenberg MO. Molecular changed with in vitro cellular senescence. *Ann NY Acad Sci* 663 : 187-194, 1992
- 3) Gretchen HS. Inhibitiotors of DNA synthesis in senescent and quiescent human diploid fibroblasts. In : Wang E, Warner HR eds. Growth control during cell aging. CRC press pp137-147, 1989

- 4) Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann Kalbeiz M, Franz PI. Human skin fibroblasts in vitro differentiation along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 5112-5116, 1988
- 5) 조미숙 · 김화영. 식이지방이 나이에 따른 흰쥐 섬유아세포의 노화과정 및 면역반응에 미치는 영향. *한국영양학회지* 24(5) : 431-441, 1991
- 6) French GR, Ingram RH, Uram AJ, Barrow GP, Surf RW. The influence of dietary fat and carbohydrate on growth and longevity in rats. *J Nutr* 51 : 329, 1953
- 7) Yagi K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In : Yagi K ed. *Lipid peroxides in biology and medicine*. Academic Press Inc. New York pp223, 1982
- 8) Waner HR. Overview, mechanisms of antioxidant action on life span. *Toxicol Industrial Health* 9 : 151-161, 1993
- 9) Lynch RD. Utilization of polyunsaturated fatty acids by human diploid cells aging in vitro. *Lipids* 15(6) : 412-420, 1980
- 10) Niki E, Yamamoto Y, Komura E, Sato K. Membrane damage due to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 53 : 210S-215S, 1991
- 11) Harley CB. Aging of cultured Human skin fibroblasts. In : Pollard JW, Walker JM eds. *Animal cell culture*. IRL press inc pp25-32, 1989
- 12) Cristofalo VJ, Phillips PD. Cell culture of human diploid fibroblasts in serum-containing medium and serum-free chemically defined medium. In : Baserga R ed. *Cell growth and division*. IRL press pp121-131, 1989
- 13) Baserga R. Measuring parameters of growth. In : Baserga R ed. *Cell growth and division*. IRL press inc pp1-19, 1989
- 14) Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In : *Methods in enzymology*. Academic press Vol 105 pp328-331, 1984
- 15) Bruce SA. Finite proliferative capacity of Syrian hamster fetal and adult fibroblasts in vitro : A model system for the analysis of the cellular basis of aging. In : Wang E, Warner HR eds. *Growth control during cell aging*. CRC press pp203-219, 1989
- 16) Carini R, Parola M, Dianzani MU, Albano E. Lipid peroxidation and hepatocyte death investigation of a possible mechanism of oxidative cell injury. *Ann NY Acad Sci* 663 : 444-446, 1992
- 17) Shindo Y, Akiyama J, Yamazaki Y, Saito K, Takase Y. Changes in enzyme activities in skin fibroblasts derived from persons of various ages. *Exp Gerontol* 26 : 29-35, 1991
- 18) Niki E, Yamamoto Y, Komura E, Sato K. Membrane damage due to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 53 : 210S-215S, 1991
- 19) Hayflick L. Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Age Dev* 14 : 59-79, 1980
- 20) Mbemba F, Houbion A, Raes M, Remacle J. Subcellular localization and modification with aging of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 838 : 211-220, 1985
- 21) Monti D, Troland L, Grassilli E, Agnesini C, Tropea F, Barbieri D, Capri M, Cristofalo EA, Salvioli S, Ronchetti I, Bellomo G, Cossarizza A, Franceschi C. Cell proliferation and cell death in immunosenescence. *Ann NY Acad Sci* 663 : 250-261, 1992
- 22) Cutler RG. Peroxide-producing potential of tissues : Inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4798-4802, 1985
- 23) 김숙희 · 김화영. 노화 pp39-57, 1995
- 24) Goodlich CL. Body weight increment and length of life : The effect of genetic constitution and dietary protein. *J Gerontol* 33(2) : 184-190, 1978
- 25) Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci* 663 : 85-96, 1992