

## 사람의 피부 섬유아세포 및 중간엽 줄기세포에서 항산화 활성의 반응에 대한 비교 분석

공지원<sup>a,b</sup> · 박력<sup>a,b</sup> · 박준우<sup>a,b</sup> · 이주영<sup>a,b</sup> · 최연주<sup>a,b</sup> · 문선하<sup>b</sup> · 김현지<sup>b</sup> · 전병균<sup>a,b,c,†</sup>

경상대학교 과학영재교육원<sup>a</sup>, 경상대학교 생물교육과<sup>b</sup>, 경상대학교 교육연구원<sup>c</sup>  
(2019년 5월 8일 접수; 2019년 6월 18일 수정; 2019년 6월 19일 채택)

### Comparative Analysis on Antioxidant Activity in Various Human Skin Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells

Ji-Weon Kong<sup>a,b</sup> · Ryeok Park<sup>a,b</sup> · Joon-Woo Park<sup>a,b</sup> · Joo-Yeong Lee<sup>a,b</sup> · Yeon-Joo Choi<sup>a,b</sup>  
Sun-Ha Moon<sup>b</sup> · Hyeon-Ji Kim<sup>b</sup> · Byeong-Gyun Jeon<sup>a,b,†</sup>

<sup>a</sup>Science Education Center for the Gifted, Gyeongsang National University

<sup>b</sup>Department of Biology Education, Gyeongsang National University

<sup>c</sup>Institute of Education, Gyeongsang National University

(Received May 8, 2019; Revised June 18, 2019; Accepted June 19, 2019)

**요약** : 본 연구는 사람의 다양한 세포주를 이용하여 활성산소종(과산화수소수)이 세포의 노화에 미치는 영향을 비교 조사하였다. 여러 농도의 과산화수소수에 세포주를 일주일 동안 배양하여 MTT 방법으로 과산화수소수에 대한 세포 성장의 반억제농도를 구하였다. 그 결과, 50대에서 유래하는 피부 섬유아세포와 10대의 노화 유도 피부 섬유아세포와 비교하여 10대에서 유래하는 피부 섬유아세포에서 과산화수소수에 대한 반억제농도의 값이 유의적으로 더 높았고, 10대의 피부 섬유아세포보다는 10대의 여러 조직 기원하는 성체줄기세포에서 반억제농도의 값이 유의적으로 더 높게 관찰되었다. 또한, 50 ppm 과산화수소수를 1주일 동안 처리한 후, 50대의 피부 섬유아세포에서 다른 세포주에 비해 세포 성장이 현저히 억제되었고, 노화 관련 베타-갈락토시다아제의 활성이 증가되는 것을 관찰하였다. 또한, 활성산소의 세포 독성을 중화시키는 두 유전자, 글루타티온 과산화효소(GPX)와 카탈라아제(CAT)의 발현을 각 세포주에서 조사하였을 때, CAT의 발현은 모든 세포주에서 대체로 낮았지만, GPX 유전자의 발현이 50대의 피부 섬유아세포보다 10대의 피부 섬유아세포와 성체줄기세포에서 현저히 높게 발현되는 것을 관찰하였다. 이상의 결과에서 활성산소는 세포 노화를 유도하고, GPX의 발현이 높은 10대의 피부 섬유아세포와 줄기세포보다는 50대의 피부 섬유아세포와 노화된 피부 섬유아세포에서 활성산소종에 대해 더 큰 민감성을 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

**주제어**: 사람, 세포성장, 세포노화, 항산화활성, 활성산소종

†Corresponding author  
(E-mail: bgjeon@gnu.ac.kr)

**Abstract** : The cellular senescence may be due to damage by the reactive oxygen species (ROS). This study has compared the antioxidant activity in the human cell lines of various origins, including 10S and 50S-derived normal skin fibroblasts, and 10S bone marrow, dental tissue and adipose-derived adult stem cells. After being exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values by cytotoxicity assay was significantly (P<0.05) lower in 50S-derived skin fibroblasts, than in 10S-derived skin fibroblasts and various adult stem cell lines. The cell population doubling time (PDT) and the cell frequency with high senescence associated- $\beta$ -galactose activity were remarkably increased in 50S-derived fibroblasts exposed to 50 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 7 days, than those of 10S-derived fibroblasts and various adult stem cell lines. Further, the expression level of antioxidant-related genes, glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT), was investigated in 10S and 50S-derived skin fibroblasts, and 10S-derived various adult stem cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression level of GPX was higher in most of cell lines, compared to CAT, and a significantly (P<0.05) higher expression level of GPX was observed in 10S-derived skin fibroblasts and adult stem cell lines, compared to 50S-derived skin fibroblasts. We concluded that old-aged skin fibroblasts seemed to be less resistant against ROS than young-aged skin fibroblasts and adult stem cells.

*Keywords* : Human, Cell growth, Cellular senescence, Antioxidant activity, Reactive oxygen species

## 1. 서론

사람의 평균 기대수명이 점점 늘어남에 따라 사람들은 질병에 걸리지 않고 오랫동안 건강하게 사는 것에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 사람들은 나이가 들면서 점점 신체의 구조와 기능이 저하되는 노화(senescence, aging)를 늦추어 좀 더 오랫동안 건강하게 살고자 하는 여러 가지 방안을 모색하고 있다. 한 개체의 노화 현상과 그 개체 안에서 각 세포의 노화(cellular senescence)가 서로 일치하지 않는 경우도 있지만, 세포의 노화는 일반적으로 개체의 노화를 유발한다. 이러한 세포 노화의 원인은 아직 불분명하다. 지금까지 제안된 세포 노화의 원인으로는 유전자 시계설, 신경내분비설, 핵산의 마모설, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 세포 손상 등이 있는데, 그중에서 활성산소종에 의한 산화 스트레스가 세포 노화의 주된 원인이라고 보고하고 제안하고 있다[1-3]. 이에 사람들은 세포 내에 생성된 활성산소종을 제거하여 세포 노화를 늦추기 위해 여러 종류의 과일이나 식물에서 추출한 비타민 C나 베타-카로틴 등을 포함한 여러 종류의 항산화 제품을 섭취하여 노화를 방지하고자 노력하고 있다[2, 4].

일반적으로 여러 생물체는 생물체의 고유한 특

성을 유지하기 위해서 에너지가 필요하고, 이에 생물체는 포도당과 같은 유기 분자에 산소를 사용한 산화 과정을 통해 세포에서 사용할 수 있는 에너지를 생산하게 된다. 이러한 세포 호흡(cellular respiration) 과정에서 몸으로 들어간 산소는 포도당을 완전 산화하여 많은 양의 에너지를 생성할 수 있다. 그러나 흡입된 산소는 여러 대사 과정에 이용되면서 산화력이 강한 물질인 활성산소종이 종종 생성된다[5]. 이런 활성산소종은 우리가 호흡하는 산소와는 완전히 다르게 높은 반응성을 가진 불안정한 상태에 있는 중간산물이다. 산화 혹은 대사 과정에서 산소가 전자를 한 개 더 소유하게 되면 과산화물 음이온(superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>)이 생성되고, 이 물질은 보통 세포 내 효소의 작용으로 반응성이 좀 더 약한 과산화수소(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 변하게 된다. 그러나 세포 내 과산화수소가 과다하게 축적되면, 이 과산화수소는 강한 반응성을 가지는 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical, OH<sup>-</sup>)로 바뀐다[6, 7]. 이렇게 몸속에 과다 축적된 하이드록시 라디칼을 포함한 활성산소종은 체내에서 DNA를 포함한 여러 분자들에 대해 산화 작용을 유도한다. 활성산소종에 의해 지질 분자를 산화되어 원형질막에 손상을 주어 세포의 기능이 저하되거나, 세포 속의 여러 아미노산이 산화되어

단백질의 기능 저하나 변성을 가져올 수 있다. 또한, DNA 및 RNA 등의 핵산을 손상시켜 핵산 염기의 변형과 유리, 인산에스테르 결합의 절단 등을 일으켜 돌연변이나 암의 원인이 되기도 하며, 생리적 기능을 저하시켜 각종 질병의 원인이 된다고 보고하고 있고[4, 7, 8], 활성산소종에 의한 산화 스트레스는 또한 세포의 자멸사(apoptosis)를 일으킨다고 보고하고 있다[6, 8].

일반적으로 독성 물질에 의해 일어날 수 있는 세포의 생사를 판별하는 방법은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)과 같은 3개의 방향족 고리를 가진 이종원자고리화합물인 테트라졸륨(Tetrazolium salt)을 사용하여 흡광도를 측정하는 방법이 가장 널리 이용되고 있다[9-11]. 또한, 세포의 노화가 진행되면서 나타나는 가장 큰 특징 중의 하나는 세포 성장 속도의 지연 혹은 둔화이고, 이러한 세포 성장을 측정하는 방법은 세포의 수를 직접 측정하거나 측정한 세포수를 세포의 집단배가시간(cell population doubling time, PDT)으로 환산하는 방법이 있다[12-14]. 일반적으로 분화된 체세포는 점점 노화될수록 세포 성장의 속도가 점점 느려지지만, 노화가 일어나지 않는 배아 혹은 유도만능줄기세포 및 암세포 등은 계속 계대배양을 실시하여도 세포 성장의 지연 혹은 정지 현상이 나타나지 않으면서, 세포 노화가 잘 일어나지 않는다[15]. 더욱이 노화된 세포는 세포질 내에 존재하는 리소좀(lysosome)에 노화 관련 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase)를 과다 축적하고, 이 효소는 인돌 분자를 분해하여 세포가 파란색을 띠게 되므로 좀 더 간편하게 세포 노화를 측정하는 대표적인 표식자이다[13, 16, 17]. 이 방법은 현미경 하에서 세포를 관찰할 수 있으므로, 세포 노화에 의해 일어나는 세포의 형태적인 변화를 검증할 수 있다. 나아가, 활성산소에 노출된 세포나 세포 내 활성산소가 과대하게 축적되었을 때, 이런 활성산소에 반응하는 여러 단백질이 존재한다. 그 대표적인 세포 내 단백질이 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase, GPX) 및 카탈라아제(catalase, CAT)이다[18, 19]. 이 두 단백질은 높은 농도의 과산화수소를 독성이 없는 물로 전환시킨다. GPX 단백질은 주로 세포질에서, CAT 단백질은 주로 페록시좀(peroxisome) 세포 내 소기관에서 활성산소에 대해 반응을 한다고 알려져 있다[20, 21]. 이런 항산화 단백질의 세포 내 농

도는 활성산소에 대한 저항의 척도로 사용될 수 있을 것이다. 세포 내 단백질의 발현량을 측정하는 여러 방법이 있지만, 항산화 단백질의 전구체인 GPX 및 CAT 유전자의 mRNA 발현 정도를 좀 더 간단하게 검증하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 방법이 널리 활용되고 있다[20, 21].

이에 이 연구에서는 활성산소에 의한 세포 손상이 세포 노화를 유발할 것이고, 사람에서 세포의 연령이나 세포의 종류에 따라 활성산소에 대한 반응성을 검증하고자 하였다. 세포의 나이에 따른 세포의 활성산소에 대한 반응의 정도를 알아보기 위해 우선 청소년(10대) 및 어른(50대)에서 분리한 분화된 피부 섬유아세포(fibroblasts), 10대의 피부 섬유아세포를 오래 계대배양하여 인위적으로 세포 노화를 유도한 10대 피부 섬유아세포, 10대의 골수, 치아 및 지방 조직에서 유래하는 중간엽성 성체줄기세포(mesenchymal adult stem cells)에서 활성산소에 대한 독성 검사를 MTT 방법으로 조사하였다. 이에 따라 활성산소에 노출된 세포의 집단배가시간 분석과 세포의 형태적인 변화와 함께 노화 관련 베타-갈락토시다아제의 활성도를 측정하여 세포 노화의 정도를 검증하였다. 나아가, 다양한 연령과 세포의 종류마다 이러한 항산화 효과의 차이는 무엇인지 알아보고자 활성산소에 반응하는 두 단백질 즉, GPX와 CAT 유전자의 발현을 RT-PCR 방법으로 비교하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 세포의 준비와 배양

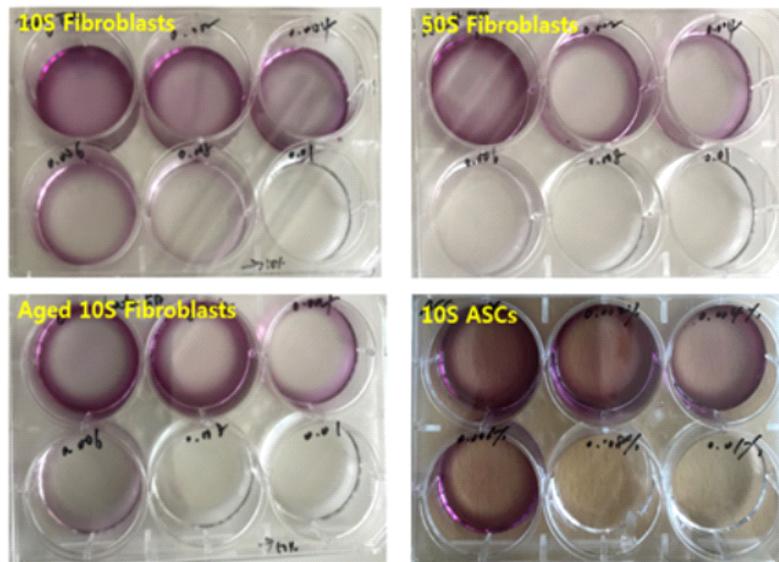
과산화수소수에 대한 세포의 반응성을 조사하기 위해 이 실험에 사용된 10대의 골수(10S BMSC), 치아(10S DSC) 및 지방(10S ASC) 조직 유래 중간엽성 성체줄기세포(mesenchymal adult stem cells)는 G대학교병원에 입원한 10대(청소년) 환자의 골수, 사랑니 및 지방 조직으로부터 환자의 승인 하에 각각 분리하였다(승인번호: GNUH IRB-2009-34). 또한, 병원에 내원한 10대(10s fibroblasts) 및 50대(50s fibroblasts)의 환자의 피부 조직에서 유래하는 섬유아세포(fibroblasts)를 분리하여 각각 배양하였다. 분리된 세포주들의 기본배양액은 Advanced Dulbecco's

Modified Eagle's Medium (A-DMEM, Gibco, USA) 세포배양액에 10% FBS (Gibco, USA)와 항생제를 첨가하여 사용하였고, 36.5°C의 5% CO<sub>2</sub> 항온배양기 내에서 각 세포주는 체외 배양되었다. 3~4일마다 기본배양액을 교환해 주면서 각 세포주들의 세포가 80% 이상 증식하게 되면 계대배양(sub-culture)을 실시하였다. 분리된 줄기세포의 줄기세포화학적 특징은 이전의 연구에서 분석하였고[22, 23], 다섯 번째 계대배양(5 계대배양 세포주)에 도달한 각각의 섬유아세포 및 줄기세포주를 이 실험에서 사용하였다. 또한, 세포 노화를 인위적으로 유도하기 위해 10대의 섬유아세포는 15 계대배양(aged 10S fibroblasts)까지 노화를 유도한 다음 5 계대배양 세포주와 서로 비교하였다.

## 2.2. 활성산소에 대한 세포성장의 반역제농도 값의 측정

이 실험에서 사용된 각 세포주에서 과산화수소에 대한 반역제농도(half maximal inhibitory

concentration, IC<sub>50</sub>) 값은 MTT 방법으로 측정하였다. 각 세포주를 분리하여 혈구계산기(hemocytometer)로 세포수를 세었고, 6-웰 세포배양 플라스크의 웰 당 1×10<sup>4</sup>개의 각 세포를 심은 다음, 각 웰에 0 ppm (무처리군, 대조군), 20 ppm (0.002%), 40 ppm (0.004%), 60 ppm (0.006%), 80 ppm (0.008%) 및 100 ppm (0.01%)의 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 포함하는 배양액을 첨가하여 1주일 동안 배양하였다. 각 웰의 배양액은 배양 후 3일째에 새로운 각각의 배양액으로 교체하였다. 1주일 후 각 배양액을 제거한 다음, D-PBS로 세척하였고, MTT 용액을 첨가한 후 다시 4시간 동안 배양하였다. 이후 다시 D-PBS로 세척하고, 각 웰에 DMSO를 200 μl 첨가하여 포마잔을 녹인 다음, 이를 회수하여 50 μl씩 96-웰 플레이트에 옮겼다(Fig. 1). 96-웰 플레이트의 각 플레이트에 있는 포마잔의 흡광도는 분광광도계를 사용하여 측정하였고, 그 흡광도를 이용하여 각 처리군은 비처리군(대조군)에 대한 상대적인 생존율을 계산하여 온라인 프로그램



H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration (ppm)	0	20	40	60	80	100
10S fibroblasts	100±5.65	98.9±5.53	78.1±5.33	42.8±0.92	7.3±0.71	0
50S fibroblasts	100±2.90	95.8±3.43	38.1±3.74	11.9±3.97	0.8±0.07	0
aged 10S fibroblasts	100±2.86	96.8±3.87	78.9±2.50	17.3±4.00	0.8±0.05	0
10S ACS	100±3.71	97.9±4.04	80.9±5.14	70.2±5.11	4.18±0.59	0

Fig. 1. MTT analysis in various human cell lines treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(<http://www.ic50.tk/>)으로 반억제농도(IC<sub>50</sub>) 값을 분석하였다.

### 2.3. 세포배가시간의 측정

과산화수소에 대한 세포의 성장 억제 효과를 검증하기 위해 각 세포주를 분리하여 혈구계산기로 세포수를 센 다음, 25T 세포배양 플라스크에 각각 1×10<sup>5</sup>개(처음 시작한 세포의 개수)의 섬유아세포 및 각 줄기세포를 심었다. 각각의 세포주는 과산화수소 무첨가 배양액(대조군)과 50 ppm 과산화수소 첨가 배양액(실험군)에서 1주 동안 배양하여 세포를 분리한 다음 세포의 개수(배양 후 세포의 개수)를 측정하였다. 세포의 배가시간을 구하기 위한 공식은 이전의 연구에서 인용하였다[11, 13].

### 2.4. 활성산소에 의한 세포 노화의 검증

과산화수소가 세포의 노화에 미치는 영향을 조사하기 위해 노화된 세포에서 선택적으로 발현되는 베타-갈락토시다아제의 활성을 측정하였다. 이 노화 분석은 세포 노화 관련 베타-갈락토시다아제 분석 키트(Cell Signaling Tech, USA)를 사용하였다. 먼저 25T 세포배양 플라스크에 각각 1×10<sup>5</sup>개의 섬유아세포 및 각 줄기세포를 심은 다음, 과산화수소 무첨가 배양액(대조군)과 50 ppm 과산화수소 첨가 배양액(실험군)에서 1주 동안 배양하였다. 1주일 후 D-PBS로 각각의 세포주를 세척하였고, 0.2% 글루타르알데히드를 사용하여 15분 동안 실온에서 고정한 다음, 다시 D-PBS를 사용하여 세척하였다. 이후 각 세포주는 37°C에서 노화 관련 베타-갈락토시다아제 염색액으로 하룻밤 동안 염색되었고, 이를 D-PBS로 세척한 후 푸른색으로 염색된 노화된 세포를 도립위상현미경(Nikon, Japan)로 관찰하였다.

### 2.5. 활성산소 관련 유전자의 발현 검증

역전사효소-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 활성산소의 활성을 감소시키는 단백질에 대한 유전자의 발현 양상을 검증하였다. 간단히 요약하면, 먼저 RNA 추출 전용 키트(RNeasy mini kit, Qiagen, USA)를 이용하여 섬유아세포 및 각각의 줄기세포에서 모든 RNA를 추출하였고, RNA 농도는 분광광도계로 측정하였다. 1 µg의 RNA는 cDNA 합성용 전용 키트(Omniscript RT kit, Qiagen, USA)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응을 유도하여 mRNA로부터 cDNA로의 합성을 하였다. 이렇게 합성된 cDNA는 PCR 키트(Maxime pre-mix PCR kit, iNtRON, Korea)를 사용하여 증폭되었다. PCR을 통한 cDNA의 증폭 조건은 94°C에서 5분 동안 처리한 다음, 95°C 30초, 60°C 1분 및 72°C 1분의 조건으로 35회 동안이었고 다시 72°C 10분 동안 처리하였다. 증폭된 cDNA의 검증은 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 실시하여 브롬화에티듐(ethidium bromide)로 염색한 다음, 자외선 하에서 관찰하였다. 증폭된 유전자의 강도는 GelQuant NET 프로그램(V.1.7.8)을 이용하여 측정하였다. 이 연구에 사용된 두 유전자는 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase, GPX) 및 카탈라아제(catalase, CAT)이었고, 각 유전자의 발현량은 항존유전자인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현과 비교하여 상대적인 값으로 환산하여 표시하였다. RT-PCR 방법에 사용된 그 유전자들의 프라이머의 서열은 Table 1과 같다.

### 2.6. 통계 분석 방법

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였다. 측정된 모든 값들은 SPSS(21.0) 통계프로그램으로 평균 및 표준오차를 구하였다. 이 값들이 통

Table 1. Primer sequence for RT-PCR

Genes	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
GPX	5'-CTTATCGAGAATGTGGCGTCCC-3' 5'-GCCACCAGGAAGCTTCTCAAAG-3'	387
CAT	5'-GGCAGCTATFTGAGAGCC-3' 5'-CTGACGTCCACCCCTGACT-3'	116
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	228

계적인 유의성을 가지는지를 검정하기 위하여 던컨 다중범위검정을 실시하였고, P의 값이 0.05 미만일 때 통계적인 차이가 있는 것으로 하였다.

### 3. 결과

#### 3.1. 각 세포주에서 과산화수소에 대한 반역제 농도 값의 측정

정상 체세포인 10대에서 분리한 피부 유래 정상 섬유아세포(10S fibroblasts), 50대에서 분리한 피부 섬유아세포(50S fibroblasts) 및 10대의 섬유를 오래 계대배양하여 노화를 유도한 10대의 피부 섬유아세포(aged 10S fibroblasts)를 0, 20, 40, 60, 80 및 100 ppm의 과산화수소가 포함된 배양액에서 1주일 동안 배양하여 MTT 방법으로 과산화수소에 대한 각 세포의 생존율을 Fig. 2와 같이 측정되었다. 과산화수소의 농도가 증가할수록 세포의 생존율이 점차 감소되었고, 100 ppm의 과산화수소가 포함된 배양액에서 거의 모든 세포가 사멸되는 것을 관찰하였다.

또한, 10대의 골수(10S BMSC), 사랑니(10S DSC) 및 지방 조직(10S ACSC)에서 유래하는 중간엽성 성체줄기세포를 0, 20, 40, 60, 80 및

100 ppm의 과산화수소가 포함된 배양액에서 1주일동안 배양하여 역시 MTT 방법으로 과산화수소에 대한 각 세포의 생존율을 Fig. 3과 같이 측정되었다. 섬유아세포에서 관찰된 것처럼 과산화수소의 농도가 증가할수록 세포의 생존율은 현저히 감소하였다.

MTT 분석으로 과산화수소에 대한 상대적인 세포 성장 생존율을 기초하여 각 섬유아세포와 중간엽성 성체줄기세포에서 세포 성장의 반역제 농도 값(IC<sub>50</sub>)을 결정하였다(Fig. 4). 10대 섬유아세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 49.5±2.10 ppm, 50대 섬유아세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 36.2±2.41 ppm 그리고 10대 노화 섬유아세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 48.7±3.50 ppm이었으며, 3개의 세포주 중 IC<sub>50</sub> 값이 10대 섬유아세포에서 유의적으로(P<0.05) 가장 높았으며, 50대 섬유아세포에서 유의적으로(P<0.05) 가장 낮았다. 또한, 10대의 다양한 각 조직에서 유래하는 성체줄기세포에서 세포 성장의 반역제 농도 값(IC<sub>50</sub>)을 결정하였다. 10대 골수줄기세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 71.4±2.52 ppm, 치아줄기세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 68.5±2.28 ppm 그리고 지방줄기세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 65.1±2.48 ppm을 나타내었다. 이로써 과산화수소에 대한 10대 섬유아세포 및 10대 노화 섬유아세포의 생존율이 50대 섬유아세

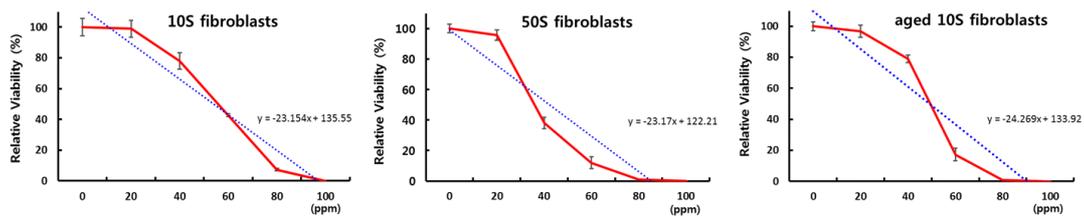


Fig. 2. Analysis of cell viability by MTT assay in 10S (A), 50S (B) and aged 10S (C) fibroblasts treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

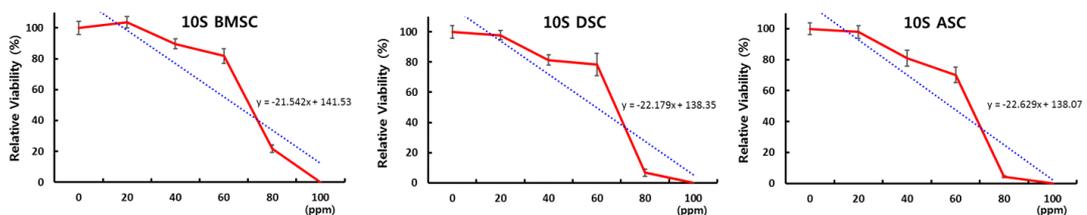


Fig. 3. Analysis of cell viability by MTT assay in 10S bone marrow (10S BMSC, A), third molar (10S DSC, B) and adipose (10S, ASC, C) tissue-derived mesenchymal stem cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

포의 생존율보다 높은 것으로 보아, 10대 세포의 활성산소에 대한 저항력이 50대의 세포보다 높은 것을 알 수 있었고, 10대의 각 조직에서 유래하는 중간엽성 성체줄기세포 사이에서 IC<sub>50</sub> 값은 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 정상 체세포인 섬유아세포보다는 유의적으로(P<0.05) 높은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 줄기세포는 섬유아세포보다 활성산소에 대한 저항력이 높은 것을 알 수 있었다.

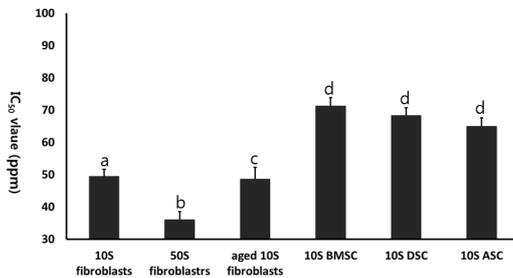


Fig. 4. Determination of mean IC<sub>50</sub> values by MTT assay in 10S fibroblasts, 50S fibroblasts, aged 10S fibroblasts, 10S BMSC, DSC and ASC treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. a, b, c and d indicate significant (P<0.05) difference among each cell lines, respectively.

이 연구에서, 50대에서 분리한 섬유아세포보다는 10대에서 분리한 섬유아세포에서 과산화수소에 대한 저항성이 증가하였고, 나아가 10대에서 분화가 완성된 섬유아세포보다는 여러 조직 기원의 줄기세포에서 과산화수소에 대한 저항성이 더 증가하였다. 한 연구에서 동물의 수명과 관련하여 동물의 수명이 긴 동물보다 동물의 수명이 짧을수록 세포분열 능력이 짧다고 한다[24]. 평균적으로 사람은 평균 수명이 70년 정도이고, 생쥐 등을 포함한 설치류는 3년 정도이다. 사람과 쥐에서 분리한 섬유아세포의 평균 세포분열 횟수는 사람의 섬유아세포가 쥐의 섬유아세포보다 훨씬 길고, 세포 노화 단계에 늦게 도달한다고 한다. 또한, 동물의 연령이 증가하면서 그 동물의 남아있는 세포의 잔여 세포분열 횟수는 감소한다고 하여, 정상적인 체세포가 세포분열을 많이 하지 않고 세포가 젊을수록 세포 노화가 잘 일어나지 않는다는 것을 암시한다. 더 나아가, 사

람에서 줄기세포의 감소가 노화의 원인이라고 지적하고 있다[25]. 이 연구에서 시상하부에 존재하는 신경줄기세포의 수가 나이에 따라 점차 줄어들면서 노화가 촉진된다고 하고 있다. 이 신경줄기세포의 가속 속도는 여러 단계에서 조절될 수 있지만, 줄기세포는 분화된 체세포보다 더 젊은 세포이고, 이 젊은 세포의 소실은 노화를 촉진한다고 하여, 한 개체 내에 존재하는 줄기세포가 노화에 좀 더 저항적이라는 것을 말해 준다.

### 3.2. 각 세포주에서 세포 배가시간의 측정

MTT 방법으로 IC<sub>50</sub> 값을 결정한 후, 과산화수소수를 포함하지 않은 배양액(Untreated control)과 50 ppm의 과산화수소수를 포함한 배양액(Treatment)에서 각 세포주를 1주일 동안 노출시킨 세포의 배가시간을 조사하여 활성산소가 세포의 성장에 미치는 효과를 조사하였다(Fig. 5). 대조군의 10대 섬유아세포(10S fibroblasts), 50대 섬유아세포(50S fibroblasts) 및 10대의 노화 섬유아세포(aged 10S fibroblasts)의 세포배가시간은 각각 46.4±7.45 시간, 50.6±8.90 시간 및 54.2±3.25 시간이었다. 그러나, 실험군의 10대 섬유아세포(10S fibroblasts), 50대 섬유아세포(50S fibroblasts) 및 10대의 노화 섬유아세포(aged 10S fibroblasts)의 세포배가시간은 각각 54.1±3.78 시간, 74.2±6.21 시간 및 75.0±5.56 시간을 나타내어 과산화수소수 처리 후 모든 섬유아세포에서 세포배가시간이 유의적으로(P<0.05) 늘어나 세포 노화로 인해 세포 생장의 지연이 진행되었음을 알 수 있었다. 또한, 10대의 골수줄기세포(10S BMSC), 치아줄기세포(10S DSC) 및 지방줄기세포(10S ASC)에서 대조군의 세포 배가시간은 38.8±4.67, 42.5±3.41 및 39.9±3.33 시간으로 측정되었다. 50 ppm의 과산화수소수를 포함한 실험군의 배양액에서 각 줄기세포주의 세포배가시간은 42.1±2.11, 45.5±2.89 및 45.9±3.63 시간을 나타내었고, 각 성체줄기세포는 실험군의 조건에서 세포배가시간이 조금 상승되었으나 유의적인 차이가 없어 성체줄기세포는 섬유아세포보다 활성산소에 대한 저항성을 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 이 실험에서 성체줄기세포는 각 섬유아세포보다 세포배가시간이 짧아 세포분열의 속도가 더 빠르다는 것을 알 수 있었다. 이전의 연구에서도 세포가 손상이 일어나거나 노화가 진행되면 세포의 성장 속도는 상당히 지연됨으로써 세포배가시간

이 점점 늘어나는 것을 보고하고 있다[12-14].

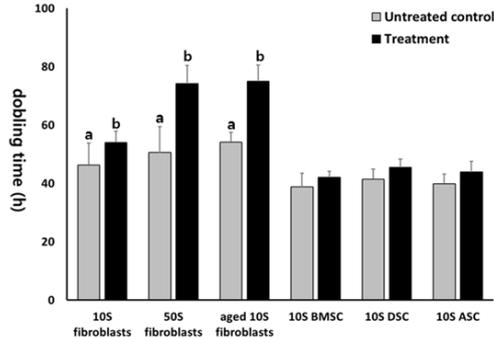


Fig. 5. A. Analysis of population doubling time (PDT) in 10S fibroblasts, 50S fibroblasts, aged 10S fibroblasts, 10S BMSC, DSC and ASC treated with  $H_2O_2$ . a and b indicate significant ( $P < 0.05$ ) difference between untreated control (■) and treatment (■), respectively.

### 3.3. 과산화수소수에 노출된 세포에서 노화 관련 베타-갈락토시다아제의 활성

각 섬유아세포 및 성체줄기세포를 50 ppm의 과산화수소수가 포함된 배양액에서 1주일 동안 배양하여 세포의 노화 관련 베타-갈락토시다아제의 활성을 조사하여 활성산소가 세포 노화에 미치는 영향을 조사하였다. 베타-갈락토시다아제 시약으로 파란색으로 염색된 세포는 노화가 된 것임을 의미한다(Fig. 6). 과산화수소수에 노출된 대부분의 세포주에서 파란색을 띠는 세포가 늘어나는 것을 관찰하였고, 특히 줄기세포보다는 섬유아세포에서 또한, 10대의 섬유아세포보다는 노화된 섬유아세포에서 파란색을 띠는 세포의 빈도와 강도가 늘어났고, 세포의 형태도 점점 커지면서 형태학적으로도 부정형의 모양으로 변하여, 과산화수소수에 의해 세포 손상이 많이 일어나고 있음을 관찰하였다.

이상의 결과에서, 여러 종류의 세포에 활성산소종(과산화수소수)은 세포 성장의 분석과 함께 베타-갈락토시다아제의 발현을 비교 조사함으로써 세포 노화를 촉진한다는 것을 알 수 있었고, 높은 세대에서 분리된 세포나 오래 계대배양하여 노화된 세포가 활성산소에 대해 더 민감하게 반응하였다. 베타-갈락토시다아제의 발현을 조사함

으로써 손상되거나 노화된 세포를 검증하는 방법은 여러 연구에서도 응용되었다[9, 11, 12]. 이 연구에서도 베타-갈락토시다아제의 발현을 과산화수소수에 노출된 여러 세포주에서 관찰할 수 있었고, 10대의 섬유아세포와 성체줄기세포보다 50대나 노화를 유도한 10대의 섬유아세포에서 좀 더 현저하게 발현되는 것을 관찰하였다. 특히 노화된 섬유아세포에서 과산화수소수에 노출 후 세포가 편평해지면서 세포의 크기가 증가하는 것이 쉽게 관찰되어 세포의 형태학적인 변화가 뚜렷하게 나타났다. 세포가 점점 커지는 것은 역시 노화된 세포에서 나타나는 특징 중의 하나이므로 [12], 노화가 진행된 세포는 쉽게 활성산소종에 손상을 받는다는 것을 알 수 있었다.

일반적인 분화된 체세포가 무한히 세포분열을 하게 된다면, 세포분열을 위해 계속해서 DNA 복제를 하게 되면서 DNA의 돌연변이가 점점 축적된다. 이러한 돌연변이의 축적은 암이나 여러 질병의 원인이 된다. 그러므로 일반적인 체세포에서는 이런 돌연변이가 축적되지 않게 세포는 한정된 수명을 가지고 있고, 점점 세포 노화(cellular aging, senescence) 과정에 접어들면서 세포자멸사(apoptosis) 단계에 접어들게 된다. 이러한 세포의 노화 및 사멸과정은 말단소립(telomere)의 소실과 관련되어 있다고 보고되고 있다[26]. 일반적으로 선형의 DNA를 가지는 진핵생물 세포의 DNA 사슬 말단에는 단백질로 번역되지 않는 단순한 염기서열이 반복적으로 나타나는 특정 DNA 부분을 가지고 있다. 이 DNA 염기 서열을 말단소립(telomere)이라고 하는데, 이 반복서열은 선형의 DNA를 보호하는데 필수적인 영역이다. 하지만, 이 선형의 말단소립 서열은 세포가 세포분열을 위해 DNA 복제를 하는 동안 선형 DNA의 불안정한 DNA 복제 기작에 의하여 점차 조금씩 짧아지게 된다. 이 말단소립의 소실이 거의 일어나게 되면 세포는 세포의 분열 속도가 느려지면서 세포 노화 단계에 접어들게 되고, 결국 세포는 예정자멸사가 일어난다[27]. 이러한 복제 노화(replicative senescence) 현상은 분화된 체세포에서 흔히 일어나면서 정상적인 체세포는 한정된 세포 수명을 가지게 된다. 그러나 이 말단소립을 복원시키는 효소, 즉 말단소립복원효소(telomerase)에 의해 말단소립은 복원 혹은 유지될 수 있어, 높은 말단소립복원효소를 나타내는 암세포 혹은 배아줄기세포는 복제 노화가 일어나지 않고, 무한의 세포 수명을 갖는다[24, 26]. 그

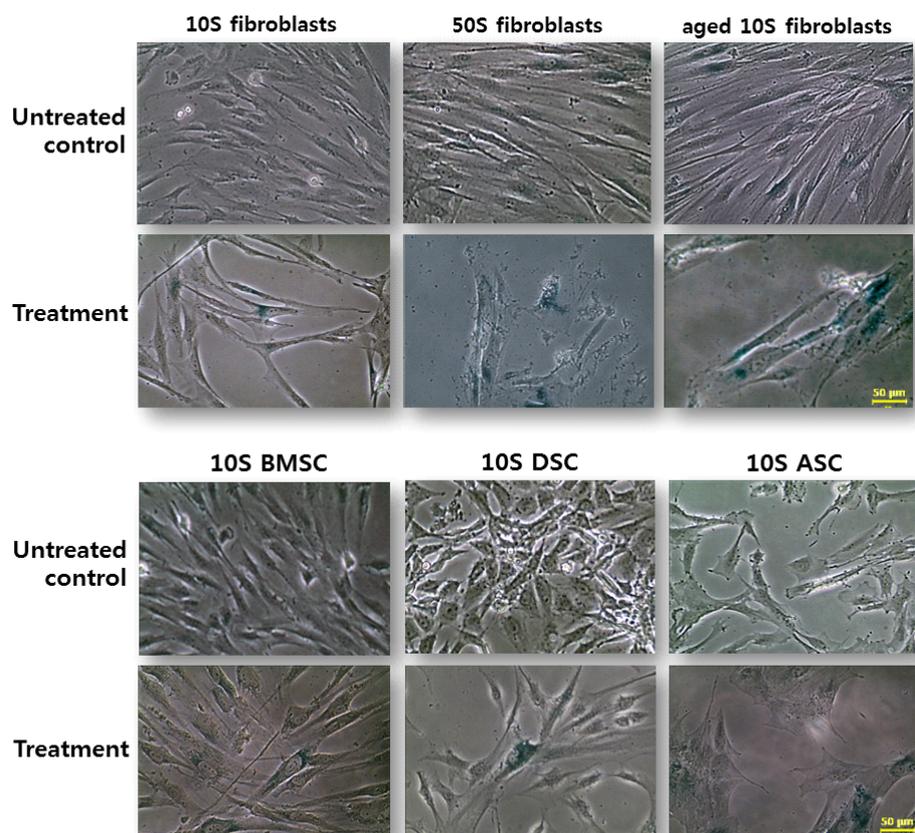


Fig. 6. Morphological alterations and senescence-associated- $\beta$ -galactosidase activity in 10S fibroblasts, 50S fibroblasts, aged 10S fibroblasts, 10S BMSC, DSC and ASC treated with  $H_2O_2$  under inverted microscope ( $\times 200$ ). The cells with high  $\beta$ -galactosidase activity were stained to blue color. Scale bars: 50  $\mu$ m.

러나 유한한 수명을 갖는 정상적인 체세포에서 이러한 복제 노화가 일어나기 전에 자외선 같은 자극에 의해 스트레스로 유도된 조기 세포 노화 (stress-induced premature senescence)가 일어날 수 있다[28]. 또한, 스트레스로 유도되는 조기 세포 노화는 과산화수소수 같은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 산화 스트레스를 유발하여 세포 노화를 유도한다고도 알려져 있다[6]. 높은 반응성을 가진 활성산소종은 세포 내에 존재하는 다양한 거대분자인 단백질, 핵산이나 지질 분자 등을 공격하여 거대분자의 공유결합을 방해함으로써 거대분자의 변형이나 절단을 유도한다고 알려져 있으며, 이로 인해 산화 스트레스로 유도된 세포의 조기 노화가 유발된다고

한다[6, 8, 17]. 현재의 연구에서도 대략 50 ppm 정도의 매우 낮은 농도로 과산화수소수를 세포배양액에 첨가하였을 때, 여러 세포주의 세포 성장은 현저히 감소하였음을 관찰하였다. 이것은 아마도 과산화수소수에 의한 세포 노화와 세포의 손상으로부터 기인한다고 생각된다. 특히 과산화수소수의 농도가 증가할수록 세포의 성장이 점점 느려졌지만, 일정 농도의 과산화수소수에서 세포의 성장이 급격하게 줄어들었다. 이는 세포는 일정한 농도의 과산화수소수를 중화 혹은 제거할 수 있으나, 일정 농도를 넘어서면 과산화수소수를 중화시킬 수 있는 세포의 한계치를 벗어나 세포의 성장이 갑자기 줄어드는 것으로 생각된다.

**3.4. 세포에서 활성산소의 반응과 관련된 유전자의 발현 검증**

각 섬유아세포 및 성체줄기세포에서 활성산소의 반응과 관련된 글루타티온 과산화효소 (glutathione peroxidase, GPX) 및 카탈라아제 (catalase, CAT)의 항산화 단백질의 전구체인 mRNA의 발현을 RT-PCR 방법으로 조사되었다. 두 유전자의 발현율은 항존유전자인 GAPDH의 발현량과 비교하여 계산되었다(Fig. 7). 정상 체세포인 10대 섬유아세포(10S fibroblasts), 50대 섬유아세포(50S fibroblasts) 및 10대 노화 섬유아세포(aged 10S fibroblasts)에서 CAT의 발현율은 GAPDH의 발현량과 비교하여 각각 10±4.5, 5±3.8 및 9±4.6% 수준이었고, 10대의 골수 (10S BMSC), 치아(10S DSC) 그리고 지방(10S ASC) 조직에서 유래하는 성체줄기세포에서 CAT의 발현율은 각각 13±6.6, 17±5.4 및 23±4.8%를 나타내어, 섬유아세포보다 성체줄기

세포에서 유의적으로(P<0.05) 더 높은 CAT의 발현율을 관찰하였다. 또한, 10대 섬유아세포, 50대 섬유아세포 및 10대 노화 섬유아세포에서 GPX의 발현율은 GAPDH의 발현량과 비교하여 각각 51±3.3, 25±4.5 및 27±6.8% 수준이었고, 10대의 골수, 치아 그리고 지방 조직에서 유래한 성체줄기세포에서는 GPX의 발현율은 각각 133±11.1, 125±10.6 및 123±12.6%를 나타내어, 역시 성체줄기세포에서 유의적으로(P<0.05) 좀 더 높은 GPX의 발현율을 관찰하였다(그림 10). 이상의 결과로 보아, 모든 세포주에서 CAT의 발현은 GAPDH에 비해 대체로 매우 낮은 수준이었으나, GPX의 발현율은 CAT의 발현율에 비해 현저히 증가하는 경향을 보였고, 특히 10대의 성체줄기세포주들에서 GPX의 발현율은 GAPDH에 비해 130% 정도로 증가하는 것을 관찰하였다.

세포 내에 활성산소종을 제거할 수 있는 대표

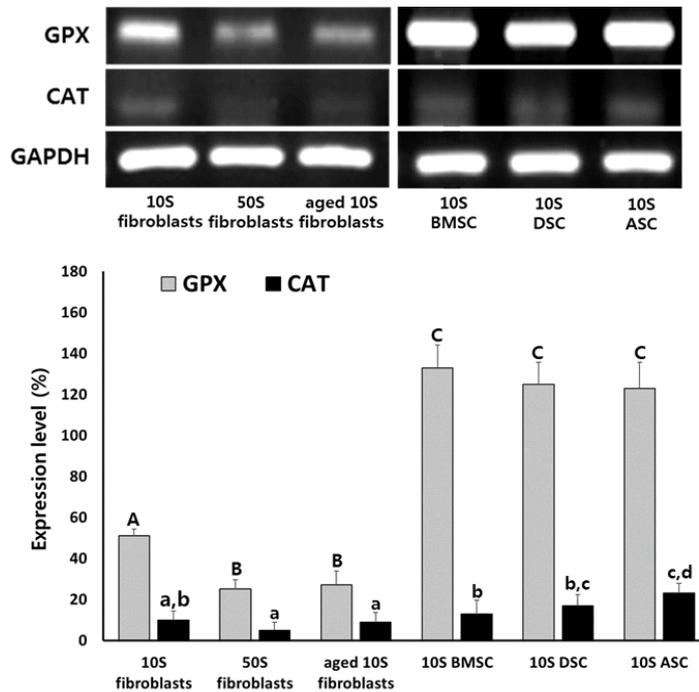


Fig. 7. Expression level of GPX (■) and CAT (■) transcripts analyzed by RT-PCR in 10S fibroblasts, 50S fibroblasts, aged 10S fibroblasts, 10S BMSC, DSC and ASC. A, B and C indicate significant (P<0.05) difference on GPX transcript among cell lines, respectively. a, b, c and d indicate significant (P<0.05) difference on CAT transcript among cell lines, respectively.

적인 단백질은 이른바 항산화 단백질로 불리는 슈퍼옥사이드 디뮤타아제(SOD, superoxide dimutase), 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase, GPX) 및 카탈라아제(catalase, CAT) 등이 있다[18, 28]. 이러한 항산화 단백질은 세포 내 높은 농도의 활성산소를 독성이 없는 물로 전환시킨다. 이 연구에서 슈퍼옥사이드 디뮤타아제의 활성은 조사하지 않았지만, 현재의 연구에서 사용된 모든 세포주에서 CAT의 발현은 항존유전자, GAPDH에 비해 10% 수준으로 대체로 낮게 발현되었다. 그러나 GPX의 발현은 10대의 성체 줄기세포주에서 GAPDH에 비해 더 높게 발현되어 거의 130% 정도 증가되어 있는 것을 관찰하였다. CAT 항산화 단백질은 주로 페록시좀(peroxisome) 세포 내 소기관에서 활성산소를 제거하며, GPX 단백질은 주로 세포질에서 생성된 활성산소를 제거하는 데 도움을 준다[18, 28]. 활성산소종은 대사 과정이 일어나는 세포 내의 어떤 부분이라도 생성될 수 있으므로, 세포질의 모든 부분에 존재하는 GPX 항산화 단백질은 세포 내의 거의 전 부분에 존재하는 활성산소종을 좀 더 효율적으로 제거한다고 할 수 있다. 이러한 이유로 활성산소종을 제거하는 데는 GPX 항산화 단백질이 세포 내에서 CAT 항산화 단백질보다 더 많이 필요할 것이라 생각된다. 나아가 현재의 연구에서 10대의 섬유아세포는 50대의 섬유아세포나 오래 계대배양한 노화 10대 섬유아세포에 비하여 GPX의 발현이 증가하였고, 특히 10대의 섬유아세포보다 10대의 성체줄기세포주들에서 GPX의 발현은 더 증가한 것을 관찰하였다. 선행 연구에서도 성체줄기세포 특히, 중간엽줄기세포는 좀 더 효율적으로 활성산소종을 제거할 수 있다고 제안하고 있다[29]. 또 다른 선행 연구에서 생쥐의 신경줄기세포(endogenous neural stem cells)에서 항산화 단백질은 짝풀립 단백질 2(uncoupling protein 2)와 함께 GPX 항산화 단백질이 중요하며, 이러한 두 유전자의 높은 발현이 신경줄기세포에서 활성산소종을 줄여주는데 중요한 단백질이라고 보고하고 있다[30]. 또한, 스트레스에 의한 세포 노화가 진행되거나 연령이 증가할수록 노화를 유도하는 유전자를 외에 대부분의 유전자 발현은 현저히 감소한다고 보고하고 있다[31]. 이런 세포의 대사 혹은 활성산소종에 관련된 유전자 발현의 감소는 세포의 노화 정도에 따라 활성산소종에 대한 반응성의 차이를 유발할 것이라고 생각된다.

#### 4. 결론

이 연구는 10대와 50대의 사람에서 피부 유래 섬유아세포를 분리하였고, 10대에서 유래한 섬유아세포를 계대배양을 실시하여 인위적인 세포 노화를 유도하였다. 또한, 10대의 골수, 치아 및 지방 조직 유래 중간엽성 성체줄기세포를 분리하여 배양한 다음, 사람에서 기원하는 여러 종류의 정상 체세포주 및 성체줄기세포가 활성산소의 한 종류인 과산화수소수에 노출되었을 때, 활성산소에 대한 각 세포주의 반역제농도를 조사하였고, 활성산소가 세포의 성장 억제와 세포 노화를 유도하는지 각 세포주에서 비교 조사하였다. 나아가, 활성산소에 대한 각 세포주의 항산화 활성 차이를 유발하는 것이 무엇인지 조사하였고, 이에 대한 실험 결과는 다음과 같다.

첫째; 각 세포주의 IC<sub>50</sub> 값은 10대, 50대 및 노화 유도 10대 섬유아세포에서 각각 49.5±2.10 ppm, 36.2±2.41 ppm 및 48.7±3.50 ppm을 나타내었다. 또한, 10대의 골수, 치아 및 지방줄기세포에서 IC<sub>50</sub> 값은 각각 71.4±2.52 ppm, 68.5±2.28 ppm 및 65.1±2.48 ppm을 나타내었다.

둘째; 과산화수소수를 포함하지 않은 배양액(대조군)과 50 ppm의 과산화수소수를 포함한 배양액(실험군) 조건에서 10대, 50대 및 노화 유도 10대 섬유아세포의 세포배가시간은 각각 46.4±7.45와 54.1±3.78 시간, 50.6±8.90과 74.2±6.21 시간 및 54.2±3.25와 75.0±5.56 시간이었으며, 대조군과 실험군의 조건에서 10대의 골수, 치아 및 지방줄기세포의 세포배가시간은 각각 38.8±4.67과 42.1±2.11 시간, 42.5±3.41과 45.5±2.89 시간 및 39.9±3.33과 45.9±3.63 시간이었다. 또한, 대조군에 비해 실험군의 세포에서 베타-갈락토시다아제의 발현이 현저히 증가되었다.

셋째; 각 섬유아세포 및 성체줄기세포에서 항산화 반응과 관련된 CAT와 GPX의 발현율은 10대, 50대 및 노화 유도 10대 섬유아세포에서 각각 10±4.5와 51±3.3%, 5±3.8과 25±4.5% 및 9±4.6과 27±6.8% 수준이었고, 10대의 골수, 치아 및 지방줄기세포에서 각각 13±6.6과 133±11.1%, 17±5.4와 125±10.6% 및 23±4.8과 123±12.6%를 나타내었다.

이 연구의 결과를 종합해볼 때, 세포 연령과 노화가 진행될수록 활성산소에 대한 저항성이 점

점 줄어드는 것을 관찰하였고, 여러 세포주 사이에서 활성산소에 대한 반응성의 차이는 세포 내 GPX 유전자의 발현율과 밀접하게 관련되는 것을 알 수 있었다. 이에, 비타민이나 베타-카로틴 등의 여러 항산화 보조제는 항산화 효과뿐만 아니라 GPX 항산화 단백질의 효율을 높이는 데 도움을 주어 세포 노화를 막을 것으로 판단된다.

## References

1. B. G. Childs, M. Durik, D. J. Baker, J. M. van Deursen, "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy", *Nat. Med.*, Vol. 21, pp. 1424-1435, (2015).
2. D. Fusco, G. Colloca, M. R. Lo Monaco, M. Cesari, "Effects of antioxidant supplementation on the aging process", *Clin. Interv. Aging*, Vol. 2, pp. 377-387, (2007).
3. D. Pierpaola, M. Tijana, C. Andrea, L. Angela, D. Domenico, "ROS, Cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, Vol. 2016, pp. 3565127, (2016).
4. A. Pole, M. Dimri, G. P. Dimri, "Oxidative stress, cellular senescence and ageing", *AIMS Molecular Science*, Vol. 3, pp. 300-324, (2016).
5. E. J. Na, H. H. Jang, G. R. Kim, "Review of recent studies and research analysis for anti-oxidant and anti-aging materials", *Asian J. Beauty Cosmetol.*, Vol. 14, pp. 481-491, (2016).
6. Q. M. Chen, "Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 908, pp. 111-125, (2000).
7. S. E. Ryu, "Do Reactive Oxygen Species Cause Aging?", *Hanyang Med. Rev.*, Vol. 33, pp. 75-76, (2012).
8. S. W. Kang, "Role of Reactive Oxygen Species in Cell Death Pathways", *Hanyang Med. Rev.*, Vol. 33, pp. 77-82, (2013).
9. H. I. Kim, S. H. Moon, W. C. Lee, H. J. Lee, S. B. Shivakumar, S. H. Lee, B. W. Park, G. J. Rho, B. G. Jeon, "Inhibition of cell growth by cellular differentiation into adipocyte-like cells in dexamethasone sensitive cancer cell lines", *Anim. Cells Syst.*, Vol. 22, pp. 178-188, (2018).
10. Y. D. Kim, S. J. Jang, E. J. Lim, J. S. Ha, S. B. Shivakumar, G. J. Jeong, G. J. Rho, B. G. Jeon, "Induction of telomere shortening and cellular apoptosis by sodium meta-arsenite in human cancer cell lines", *Anim. Cell Sys.*, Vol. 21, pp. 241-254, (2017).
11. Y. W. Kim, Y. C. Moon, W. J. Lee, S. H. Cho, G. E. Ha, B. G. Jeon, "Cytotoxic effects of sodium benzoate, food preservative in various cultured mammalian cell lines", *J. Sci. Edu. Gift.*, Vol. 10, pp. 121-133, (2018).
12. B. G. Jeon, D. O. Kwack, G. J. Rho, "Variation of telomerase activity and morphology in porcine mesenchymal stem cells and fibroblasts during prolonged in vitro culture", *Anim. Biotechnol.*, Vol. 22, pp. 197-210, (2011).
13. E. J. Lim, H. J. Kim, M. J. Kim, S. H. Lee, B. G. Jeon, "Comparative analysis on anti-aging, anti-adipogenesis, and anti-tumor effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate", *J. Life Sci.*, Vol. 28, pp. 1201-1211, (2018).
14. F. Rodier, J. Campisi, "Four faces of cellular senescence", *J. Cell Biol.*, Vol. 192, pp. 547-656, (2011).
15. C. M. Koch, K. Reck, K. Shao, Q. Lin, S. Joussen, P. Ziegler, G. Walenda, W. Drescher, B. Opalka, T. May, T. Brümmendorf, M. Zenke, T. Saric, W. Wagner, "Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes", *Genome Res.*, Vol. 23, pp. 248-259, (2013).

16. G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, pp. 9363-9367, (1995).
17. J. W. Kim, S. H. Kim, J. H. Lee, "Effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on the senescence of trabecular meshwork cells", *J. Korean Ophthalmol. Soc*, Vol. 49, pp. 1665-1670, (2008).
18. S. Y. Lee, H. R. Wi, M. S. Lee, "Comparison of the antioxidant effects of diallyl sulfide, capsaicin, gingerol and sulforaphane in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed HepG2 cells", *Korean J. Nutr*, Vol. 44, pp. 488-497, (2011).
19. J. M. Matés, F. Sánchez-Jiménez, "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes", *Front. Biosci*, Vol. 4, pp. D339-345, (1995).
20. H. J. Choi, S. H. Kim, H. T. Oh, M. J. Chung, C. B. Cui, S. S. Ham, "Effects of Adenophora triphylla ethylacetate extract on mRNA levels of antioxidant enzymes in human HepG2 cells", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*, Vol. 37, pp. 1238~1243, (2008).
21. T. W. Joo, S. H. Hong, S. Y. Park, G. Y. Kim, J. W. Jhoo JW, "Antioxidant effects of eriodictyol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*, Vol. 45, pp. 510-517, (2016).
22. B. G. Jeon, S. J. Jang, J. S. Park, R. B. Subbarao, G. J. Jeong, B. W. Park, G. J. Rho, "Differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from human dental tissues into non-mesodermal lineage", *Anim. Cell Syst*, Vol. 19, pp. 321-331, (2015).
23. B. G. Jeon, B. M. Kumar, E. J. Kang, S. A. Ock, S. L. Lee, D. O. Kwack, J. H. Byun, B. W. Park, G. J. Rho, "Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins", *Cell Tissue Res*, Vol. 345, pp. 149-161, (2011).
24. R. T. Calado, B. Dumitriu, "Telomere dynamics in mice and humans", *Semin. Hematol*, Vol. 50, pp. 165-174, (2013).
25. Y. Zhang, M. S. Kim, B. Jia, J. Yan, J. P. Zuniga-Hertz, C. Han, D. Cai, "Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs", *Nature*, Vol. 548, pp. 52-57, (2017).
26. E. Strozyk, D. Kulms, "The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence", *Int. J. Mol. Sci*, Vol. 14, pp. 15260-15285, (2013).
27. J. L. Kirkland, T. Tchkonja, "Cellular senescence: a translational perspective", *EBio. Medicine*, Vol. 21, pp. 21-28, (2017).
28. O. M. Ighodaro, O. A. Akinloye, "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid", *Alexandria Journal of Medicine*, Vol. 54, pp. 287-293, (2017).
29. A. Valle-Prieto, P. A. Conget, "Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress", *Stem Cells Dev*, Vol. 19, pp. 1885-1893, (2010).
30. L. Madhavan, V. Ourednik, J. Ourednik, "Increased "vigilance" of antioxidant mechanisms in neural stem cells potentiates their capability to resist oxidative stress", *Stem Cells*, Vol. 24, pp. 2110-2119, (2006).
31. K. I. Kim, "Biology of aging: medical perspective", *J. Korean Med. Assoc*, Vol. 50, pp. 216-220, (2007).