

韓國營養學誌 24(5) : 431~441, 1991
Korean J Nutrition 24(5) : 431~441, 1991

식이지방수준이 나이에 따른 흰쥐 섬유아세포의 노화과정 및 면역반응에 미치는 영향*

조 미 숙 · 김 화 영

이화여자대학교 가정과학대학 식품영양학과

Effects of Dietary Fat Level on the Aging Process of the Fibroblast Cells and Immune Function in Rats of Different Ages

Cho, Mi Sook · Kim, Wha Young

Department of Foods & Nutrition, Ewha Womans University

ABSTRACT

To investigate the influence of age and dietary fat level on the immune function and the growing potential of the fibroblast cells, male rats of 2 month, 6 month and 30 month of age were fed either 6% or 30% fat diet for 16 weeks. The weight of thymus decreased linearly with increasing age. And this age-dependent degeneration of thymus was delayed in rats fed low fat diets.

The blastogenesis of spleen lymphocytes to PHA, ConA, and PWM was decreased with increasing age, however, no effect of dietary fat level was observed. The age-related decline in ratios of PHA/ConA response may suggest that T suppressor cell activity increases with age. In cell culture system, lung fibroblast cells from 30M rats showed lower plating efficiency, longer doubling time, and shorter cumulative doubling potential than those from 2M or 6M animals. Also, the morphology of fibroblasts from 30M rats was tended to be rounded rather than flattened and more variable in size and being generally larger, whereas those from 2M and 6M rats were uniform in size and adhered tightly to the culture vessel in ordered arrays. Therefore fibroblast cell culture system tried in this study reflects the changes of cellular aging.

KEY WORDS : dietary fat · thymus degeneration · lymphocytes blastogenesis · cellular aging · doubling potential.

서 론

노인인구의 증가는 현재 전 세계적인 추세로

우리나라의 65세 이상의 노인인구는 1980년에는 전 인구의 3.6 %를 차지하고 있었으나, 2000년에는 6.2 %, 2020년에는 11 %에 이를 것으로 전망되며

*본 연구는 이화여자대학교 교수 연구기금에 의하여 이루어 졌음.

접수일자 : 1991년 10월 9일

채택일자 : 1991년 11월 1일

식이지방과 섬유아세포의 노화

따라서 노인의 건강문제와 함께 노화과정에 대한 관심이 고조되고 있다¹⁾. 노화과정이 진행됨에 따라 세포와 기관의 기능이 저하되고 면역능력이 감소된다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 노화에 따른 대사변화와 질병의 발생은 영양상태와 밀접한 관계가 있는데, 특히, 식이지방 수준은 비만증이나 뇌혈관계질병, 암과 같은 만성 퇴행성 질병 발생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 또한, 노화에 따라 나타나는 지방대사의 변화는 노화과정에서 나타나는 체내 대사변화의 기전을 설명할 수 있는 하나의 현상으로서 검토되어 왔다²⁾³⁾. 그러나, 식이지방수준이 노화과정 또는 수명을 변화시키는지에 대해서는 잘 알려지지 않았다.

나이가 들면서 나타나는 면역능력의 저하(immunosenescence)는 사춘기이후 혼선의 퇴화와 함께 시작되며 나이에 따른 면역기능 감소는 면역세포 자체의 변화와 상호작용의 변화, 그리고 면역계의 조절능력의 변화에 기인하는 것으로 보인다. 노화에 따른 면역기능의 감소는 T세포 매개성면역에서 뚜렷하며, 최근 이러한 면역기능의 감소가 노화이 주된 원인이라고 보는 견해도 있으나 현재까지 노화와 면역과의 관계는 원인과 결과가 불분명하다⁴⁾.

지금까지의 연구 결과는 열량과 지방섭취가 노화의 원인이 되는 면역기능이나 만성신장염 같은 퇴행성질병과 혈청지방수준 등에 영향을 미쳐서, 노화과정에 관여하는 것으로 보고 있다⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾. 그러나, 식이내 지방수준에 따라 체내에 미치는 지방의 영향은 다르며 특히, 체내대사변화에 미치는 영향은 나이가 증가함에 따라 다를 것으로 예상되나 현재 여기에 대한 연구는 많지 않은 형편이다. 또한 우리나라의 식이 섭취상황을 살펴보면 아직도 탄수화물의 섭취가 많고 단백질과 지방의 섭취는 적은 상태이지만, 경제수준과 식생활 패턴의 향상으로 인해 석사형태가 점차 서구화되는 추세이고, 일부계층에서는 지방의 과잉섭취도 나타나고 있으므로 지방수준이 노화과정에 따른 체내대사에 미치는 영향에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다. 현재까지 노화과정의 연구에서는 비교적 수명이 짧은 생쥐나 흰쥐를 이용한 동물실험이 주로 사

용되고 있으나, 이러한 동물실험도 실험기간이 너무 길어서 짧은 기간내에 노화과정을 연구할 수 있는 생체외에서의 연구방법이 필요하게 되었다. Cell culture system이 노화의 연구에 이용되기 시작한 것은 비교적 최근의 일로, 1961년 Hayflick과 Moorhead는 태아의 폐에서 분리한 섬유아세포(fibroblast cell)의 평균 증식수(doubling number)가 50인데 비해, 성인에서 분리한 섬유아세포는 20밖에 되지않아서 나이에 따라 증식수가 다른것을 관찰하였고, 이러한 세포의 증식능력의 차이는 세포의 노화를 나타내는 것이라고 보고하였다⁹⁾. Heyflick의 이러한 제안은 그후 여러학자들에 의해 증명되었으며 또한 생체외(invitro)에서 나타나는 노화과정을 반영하는 것으로 밝혀졌다¹⁰⁾. Schneider¹¹⁾, Röhme¹²⁾, Martin¹³⁾등은 섬유아세포를 공급한 공급자의 나이(donor age)와 생체외에서 나타나는 섬유아세포의 수명 사이에 역의 관계가 있음을 보고 하였는데, 짧은 사람의 피부세포는 노인의 세포에 비해 증식할 수 있는 세포가 많고, 섬유아세포의 이동율(migration rate)이 증가되었으며, 생체외에서의 수명이 길었다.

본 연구에서는 나이단계가 다른 동물(2개월, 6개월, 30개월)을 대상으로 비교-차이 연구방법(comparative-descriptive study)을 이용하여, 식이내 지방수준이 흰쥐의 체내기능에 미치는 영향이 나이와 노화에 따라 다른가를 면역기능과 세포의 증식능력을 중심으로 연구하였다.

실험재료 및 방법

실험동물 및 식이 본 연구에서는 나이가 2, 6, 30개월인 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 사용하였다. Todhunter는 쥐와 사람의 수명을 비교했을 때, 쥐의 3년은 사람의 약 90년에 해당된다고 하였으며, 쥐들의 10일은 사람의 1년과 같다고 하였다¹⁴⁾. 따라서, 본 실험에 사용한 2개월, 6개월 및 30개월된 쥐들은 각각 사람의 약 5~6세, 15~18세, 75~85세에 해당되어 어린나이와 성적으로 성숙한 나이, 그리고 늙은 나이단계에 있는 쥐들이었다.

실험 시작시의 평균체중은 2개월된 어린쥐(2M)

와 6개월된 성숙한쥐(6M), 그리고 30개월된 늙은쥐(30M)가 각각 $200.4 \pm 2.7\text{g}$, $291.7 \pm 4.0\text{g}$, $541.4 \pm 10.3\text{g}$ 이었다. 실험동물은 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 각 나이에서 30%의 지방을 함유한 고지방식이군(H : high fat)과 6%의 지방을 함유한 저지방식이군(L : low fat)으로 나누었으며, 총 6군(H-2M, H-6M, H-30M, L-2M, L-6M, L-30M)으로 분류하여 실험식이로 16주간 사육하였다. 지방급원은 우지(Seoul Hinz)와 옥수수기름(해표)을 2:1의 비율로 섞어서 사용하였다(Table 1).

실험동물은 한마리씩 분리하여 사육했고 물과 식이는 제한없이 공급했다.

실험방법 16주의 사육기간후 쥐들을 단두에 의해 희생시킨뒤 무균적으로 폐와 비장을 떼어 세포배양실험과 면역실험에 사용하였고 혼선과 비장의 무게를 측정하였다.

면역기능 실험 비장(spleen)은 무균적으로 적출한뒤 즉시 RPMI 1640(gibco co., Grand Island N.Y. : 200mM glutamine, 10mM Hepes, 100 units/ml Penicilline, 100mcg/ml Streptomycin, 0.25 mcg/ml fungizone 함유) 용액에서 지방조직을 제거하고 세척하였다. scapel을 이용하여 분산된 비장세포는 원심분리를 통해 수집되었다. 분리된 세포는 10% fetal bovine serum (Hyclone Co.)을 함유한 RPMI배양액내에 세포의 농도가 $2.5 \times 10^4 / \text{ml}$ 가 되도록 하여 96 well round bottom microtiter plate(Falcon)의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. Mitogen으로 PHA(phytohaemagglutinin, Gibco), PWM(Pokeweed mitogen), ConA(Concanavalin A)를 $10\text{ug}/10\text{ul}$ 씩 각 well에 첨가했으며 control well에는 mitogen을 첨가하지 않았다. Microtiter plate는 37°C humidified CO_2 incubator(Flow Lab, McLean : 5% CO_2)에서 3일간 배양후 각 well 당 0.5uCi methyl- ^3H -thymidine(specific activity 20 uCi/nmole, New England Nuclear)을 첨가한뒤 다시 9시간 동안 배양하였다. 이렇게 처리한 세포는 multiple automated cell harvester(Titertek, Flow Lab)을 이용하여 glass filter paper에 여과

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	High fat	Low fat
Corn Starch	478	718
Casein	160	160
Beef Tallow	200	40
Corn Oil	100	20
Cellulose	10	10
Salt Mixture ¹⁾	40	40
Vitamin Mixture ²⁾	10	10
Choline Chloride	2	2

1), 2) AIN(American Institute of Nutrition) formula¹⁵⁾ vitamin mix.(mg/kg mixture) ; Thiamin. HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine. HCl 700, Nicotinic acid 3,000, D-calcium Pantothenate 1,600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Cyano cobalamin 1, Retinyl palmitate 400,000 IU vitamin A activity, α -Tocopheryl Acetate 5,000 IU vitamin E activity, Cholecalciferol 2.5, Menaquinone 5.0, Sucrose, finely powdered to make 1,000g.

salt mix.(g/kg mixture) ; Calcium Phosphate, Di-basic 500.0, Sodium Chloride 74.0, Pltassium citrate, Monohydrate 220.0, Potassium Sulfate 52.0, Magnesium Oxide 24.0, Manganous Carbonate 3.5, Ferric Citrate 6.0, Zinc Carbonate 1.6, Cupric Carbonate 0.3, Potassium Iodate 0.01, Sodium Selenite 0.01, Chromium Potassium Sulfate 0.55, Sucrose, finely powdered to make 1,000g

건조후 건조된 disc를 counting vial에 넣고 scintillation cocktail(LKB scientific ; Optiphase Hisafe II)을 첨가하여 Liquid scintillation counter(LKB : 1214 Lackbeta)로 세포 내에서 ^3H -thymidine uptake를 측정하였다. 모든 sample은 3회 반복하여 분석하였으며 방사능 uptake 정도는 cpm(count per minute)으로 나타냈고, mitogen에 의한 세포의 증식도는 stimulation index로 구하였다.

Stimulation index =

$$\frac{\text{mitogen을 넣은 sample의 cpm}}{\text{mitogen을 넣지 않은 sample의 cpm}}$$

세포배양 실험 세포배양 배지와 buffer용액으로는 DMEM(Dulbecco's modified Eagles Medium)과 HBSS(Hank's balanced salt solution)를 사용하였고, 배지와 buffer powder는 Water-I으로 정

식이지방과 섬유아세포의 노화

수된 물에 완전히 녹인후 NaHCO_3 를 첨가한뒤, 0.22um poresize의 membrane filter로 여과하여 사용하였다. 배지에는 10%의 fetal bovine serum과 antibiotics(penicillin 100 units/ml, streptomycin 100mcg/ml, fungizone 0.25 mcg/ml)을 첨가하였고 pH는 7.4로 조정하였다.

폐의 섬유아세포(lung fibroblast cells)의 분리 본 실험에서는 Freshney와 Mollenhaur등의 방법을 변형하여 폐조직에서 섬유아세포를 분리하였다¹⁶⁾, ¹⁷⁾. 폐는 무균적으로 꺼낸 즉시, 37°C의 HBSS내에서 지방과 혈관을 제거한뒤 1~2회 세척하고 1~2mm³에 이르도록 잘게 조각내어 1000g에서 5분간 원심분리 하였다. 가라앉은 세포는 효소처리과정을 통하여 single cell로 분리하였다. Collagenase(10 mg/ml : 200units/ml)를 처리한 세포는 37°C 수조 내에서 흔들면서 30~40분 간격으로 가라앉은 세포를 모았고 이것은 다시 0.25% trypsin-EDTA 용액을 더해 2분간 방치한후 원심분리 하여 single fibroblast cell을 얻었다.

일차배양(Primary culture) 세포분리과정을 통해 분리된 fibroblast cell은 collagen이 입혀진 250 cm² cell culture flask에 옮겨져 배양액을 더하여 CO₂ incubator(Flow lab ; 5% CO₂, 95% air, humidified) 내에서 배양하였다. 24시간이 지난후 배지를 뽑아내고 HBSS로 세척한후 새로운 배양액을 더해주었다. 그후 2~3일에 한번씩 배지를 교체하였고, culture flask내의 세포가 충분히 증식하여 단층의 sheet(monolayer)를 형성한 confluence상태에 이르렀을때 subculture하였다. Confluence에 이른 기간은 2개월된 쥐와 6개월된 쥐는 7~10일, 30개월된 쥐는 14~20일 이었다.

계대배양(Subculture) 완전히 세포가 자란 flask는 배지를 뽑아내고, Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ free HBSS로 세척한후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 세포가 바닥에 나타나기 시작할때 효소를 제거하고 37°C CO₂ incubator에서 세포가 바닥에서 완전히 분리될때 까지 방치하였다. 떨어진 세포는

배양액으로 재부유하여 세포수를 측정하였으며, 1:4로 분리 계대하였다(제 1 계대배양 : first passage).

제 1 계대배양의 7일에 배양접시에 confluence를 형성한 세포들 가운데 일부는 trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 제 2 계대배양을 하여 계속 생체 외에서의 수명(life span)을 관찰하였고, 나머지는 섬유아세포의 증식능력을 측정하는데 사용했으며, 모든 실험은 3회 반복하였다.

섬유아세포(fibroblast cell)의 증식능력 및 수명의 측정 제 1 계대배양의 7일에 배양접시를 trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 세포는 3×10⁴/ml로 세포수를 조정한 뒤에 3개의 60mm 배양접시에 배양하였다.

세포의 부착능력 실험 0일에 넣은 세포수에 대한 24시간의 접시바닥에 부착된 세포수의 비율을 알아보기위해 Milo등의 방법을 이용하였다¹⁸⁾.

$$\text{부착효율} = \frac{\text{실험 } 24\text{시간 후의 부착세포수}}{\text{실험 } 0\text{일에 넣은 세포수}} \times 100$$

배양일에 따른 세포수 및 평균집단 배증시간 (population doubling time) 배양 3일과 5일 사이에 측정한 세포수로 PD time을 다음 공식에 의해 계산하였다¹⁹⁾

$$\text{PD time} = 48\text{시간}/(\log N_2 - \log N_1)/\log 2$$

N₁ : 배양 3일의 세포수

N₂ : 배양 5일의 세포수

생체외 세포의 수명측정 : Hayflick과 Moorhead의 방법에 따라 세포를 분리계대배양 한 후 3주일이 지나도 단층의 sheet를 형성하지 않을때를 phase out으로 간주하였고, 그때까지의 세포군의 증식을 다음 공식에 의해 구하였다²⁰⁾.

$$\text{Cumulative population doubling(CPD)}$$

$$= (\log N_c - \log N_1)/\log 2$$

N_c : confluence 형성시의 세포수

N₁ : 처음 분주한 세포수

광학현미경을 통한 세포의 증식상태 관찰 제 2 계대배양에서 얻은 세포를 $3 \times 10^4/\text{ml}$ 넣은 후 실험 2일에 배지를 제거하고, HBSS로 세척한 뒤 접시 바닥에 부착된 세포들을 Giemsa stain으로 염색하였다. 염색된 세포배양접시는 광학현미경하에서 180배로 활영하여 증식상태를 비교하였다.

자료의 처리 실험분석 결과는 각 실험군간의 평균치와 표준오차를 계산하였고, 각 실험군의 평균치간의 유의성을 $\alpha=0.05$ 수준에서 Schéffe test에 의해 검정하였다. 또한 각 변수에 따라서 나이와 식이지방의 차이를 $\alpha=0.05$ 수준에서 2요인 분산 분석으로 분석하였다.

실험 결과

1. 면역기관 및 면역반응에 미치는 영향

실험 전기간 동안 2개월 된 어린쥐와 6개월 된 성숙한쥐는 체중이 꾸준히 증가 되었으며, 30개월 된 늙은쥐는 체중변화가 거의 없었다. 각 실험군의 식이섭취량은 나이와 식이지방수준에 의한 차이가 나타나지 않았다. 면역기관인 비장과 흉선의 무게는 Table 2와 같았다. 비장무게는 식이

지방 수준과 나이에 따른 차이가 나타나지 않았으나, 흉선의 무게는 나이가 증가 할수록 뚜렷한 감소를 보여서 2개월된 어린쥐, 6개월된, 성숙한쥐, 30개월된 늙은쥐의 순으로 낮아지면서 유의적인 차이가 있었다. 같은 나이에서는 저지방식이군보다 고지방식이군에서 낮은 경향을 보였다. 이러한 경향은 체중에 대한 흉선무게의 비에서 더욱 분명하게 나타나서, 고지방식이를 섭취한 늙은쥐(H-30M)가 가장 낮은 값을 보였고, 저지방식이를 섭취한 어린쥐(L-2M)가 가장 높은 값을 보여 유의적인 차이가 있었다. 본 실험에서 PHA와 Con A, PWM를 이용하여 비장세포의 분열증식효과를 측정하여 세포가 mitogen에 의한 자극을 받지 않은 대조군과 mitogen에 의한 세포증식비를 구하여 stimulation index를 계산한 결과(Table 3), PHA의 stimulation index는 나이에 따른 차이가 나타나서 2개월된 어린쥐에서 가장 높았으며, 나이가 증가 할수록 감소하는 경향을 보였다. 또한, 유의적인 차이는 아니었으나, 저지방식이 군에서 높은 경향이었다. Con A에 의한 stimulation index도 PHA에서와 같은 경향으로 2개월 된 어린쥐에서 가장 높았고, 나이가 증가할수록 감소하였다. PHA, Con A와는 달리 PWM의 stimulation index는

Table 2. Weight of Spleen and Thymus¹⁾²⁾

Group ⁴⁾	Spleen		Thymus	
	g	mg/g body wt.	g	mg/g body wt.
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
H - 2M	1.11± 0.31	24.00± 6.57	0.245± 0.045	4.65± 0.58 ^{ab}
H - 6M	0.70± 0.17	14.01± 3.19	0.129± 0.051	2.64± 0.95 ^{ab}
H - 30M	1.24± 0.23	22.00± 2.71	0.061± 0.002	0.99± 0.10 ^b
L - 2M	0.72± 0.05	17.65± 1.30	0.271± 0.045	6.39± 0.94 ^a
L - 6M	1.25± 0.42	28.36± 8.06	0.215± 0.015	4.78± 0.49 ^{ab}
L - 30M	1.10± 0.28	19.29± 4.16	0.086± 0.026	1.47± 0.40 ^b
Age effect ³⁾	NS	NS	p<0.05	p<0.05
Dietary effect	NS	NS	NS	p<0.05

1),2) Values are mean ± SE for 6-8 rats. Means within a row not sharing a common superscript letter are significantly different based on Schéffe test($\alpha=0.05$).

3) Statistical significance is calculated from group means based on 2-way ANOVA

4) H - 2M ; 30 % fat diet-2 months old, L - 2M ; 6 % fat diet-6 months old,
H - 6M ; 30 % fat diet-6 months old, L - 6M ; 6 % fat diet-6 months old,
H - 30M ; 30 % fat diet-30 months old, L - 30M ; 6 % fat diet-30 months old,

식이 지방과 섬유아세포의 노화

Table 3. Mitogen stimulation index & ratio of PHA/Con A¹⁾

Group	Stimulation Index			PHA/ConA
	PHA/control	Con A/control	PWM/control	
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
H - 2M	23.40± 4.21	73.96± 19.01	13.16± 6.36	0.047± 0.13
H - 6M	9.23± 2.95	57.23± 27.66	6.90± 1.92	0.047± 0.32
H - 30M	5.55± 2.75	32.96± 18.23	2.40± 0.64	0.219± 0.05
L - 2M	41.32± 13.76	89.05± 24.37	4.80± 1.25	0.570± 0.18
L - 6M	13.22± 4.71	46.94± 15.57	5.08± 1.04	0.638± 0.39
L - 30M	6.61± 3.11	38.77± 21.17	2.61± 0.74	0.349± 0.05
Age effect ²⁾	NS	NS	NS	NS
Dietary effect	p<0.05	p<0.05	NS	NS

1) Values are mean ± SE for 6–8 rats. One way analysis of variance was applied to compare values in each column. No significant differences were found among the mean values at P>0.05 by Scheffé test.

2) Two way ANOVA was applied to test age and dietary effects.

나이와 식이 지방수준에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그러나, 고지방, 저지방식이군 모두에서 30개월된 늙은쥐가 낮은 값을 보였다. 그러므로, PHA, Con A, PWM의 stimulation index는 식이지방수준에 상관없이 30개월된 늙은쥐 (H-30M, L-30M)에서 낮은 값을 보였다. T세포 subpopulation의 변화를 알아보기위해 계산한 PHA/Con A의 비율은 고지방식이군에 비해 저지방식이군에서 높은 경향이었고, 30개월된 늙은쥐에서 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다.

2. 섬유아세포(fibroblast cells)의 증식 및 수명에 미치는 영향

Table 4에서 보는 바와 같이 배양 24시간 후에 측정한 흰쥐의 폐 섬유아세포의 부착효율은 나이

가 어릴수록 증가하는 경향을 보여서 2개월된 어린쥐에서 가장 높았다. Confluence를 이루었을 때의 세포수는 2개월된 어린쥐와 6개월된 성숙한 쥐에 비해 30개월된 늙은쥐에서 가장 낮아서, 30개월된 늙은쥐(30M)는 성장기의 쥐(2M, 6M)에 비해 세포수가 15~49% 수준이었다. 그러나, 식이지방수준은 섬유아세포의 부착능력이나 세포수에 영향을 미치지 못하였다. 48시간 동안 증식된 세포수를 이용하여 섬유아세포의 증식속도를 측정한 결과, 집단배증시간은 고지방식이군에서는 나이가 증가할 수록 PD time이 길어지는 경향이 있으나, 저지방식이군에서는 이러한 경향이 없었으며 2개월된 어린쥐와 6개월된 성숙한 쥐에서는 고지방식이군에 비해 저지방식이군에서 PD time이 길어지는 경향이었다.

Table 4. Growing potential and life span of lung fibroblast cells in vitro¹⁾

Group	% cell attached	Number at Confluence ($\times 10^4$ Cell)	Population doubling time (hr)	in vitro Life Span (cpd)
H - 2M	102.10	123.50	66.7	3.52
H - 6M	91.67	98.50	86.6	6.40
H - 30M	71.99	48.29	128.0	1.39
L - 2M	114.62	107.80	124.5	5.62
L - 6M	85.00	156.50	104.8	6.92
L - 30M	83.30	23.64	122.5	2.32

1) Values are means for four pooled samples.

$3 \times 10^4/\text{ml}$ 의 세포를 넣은 후 1일, 3일, 5일 후에 세포수의 변화를 보면, 실험 1일에는 모든 군에서 세포수의 저하가 나타나서 '초기감소(initial drop)' 현상이 관찰되었으며 3일, 5일의 세포수는 30개월된 늙은 쥐(30M)에 비해 2개월된 어린 쥐(2M)에서 높은 경향이었다 (Fig. 1). 6개월된 성숙한 쥐는 저지방식이군(L-6M)에 비해 고지방식이군(H-6M)에서 세포수가 많은 경향이었다. 세포 배양계에서 세포가 더 이상 자라지 않는 phase out이 될 때 까지의 CPD로 측정한 섬유아세포의 생체외 수명(*in vitro life span*)은 2개월된 어린 쥐와 6개월된 성숙한 쥐에 비해 30개월된 늙은 쥐(30M)에서 가장 낮았으나 식이지방수준이나 나이에 따른 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

3. 광학현미경을 통한 관찰

Fig. 2에 나타난 것처럼 어린 쥐와 성숙한 쥐는 각 세포가 활발히 증식하고 있는 상태로, 각 세포가 섬유아세포의 특징적인 형태인 위성(satellite)과 같은 형태를 보이며 세포의 크기가 일정한 반면 30개월된 늙은 쥐는 증식상태가 좋지 않음을 알 수 있다. 그러나, 식이지방수준에 따른 증식상태 혹은 세포 형태의 차이는 없었다. A-F를 보면, 2개월된 어린 쥐와 6개월된 성숙한 쥐의 섬유아세포는 세포의 형태가 분명한 것에 비해 30개월된 늙은 쥐의 세포는 핵과 cytosol, 세포 사이의 경계가 불분명했다. 또한, 늙은 쥐의 섬유아세포는 세포의 밀도가 낮고, 형태가 불분명 했으며, 세포의 크기가 커지는 경향을 보였다.

고찰 및 결론

1. 면역기능에 미치는 영향

Fernandes와 Good은 사춘기 이후 시작되는 흉선의 퇴화속도와 노화과정이 직접 관련이 있으며 흉선의 기능에 영향을 주는 것이 바로 수명을 결정하는 요인이라고 하였다²¹⁾. 본 실험에서도 나이에 따른 흉선이 퇴화현상이 나타났으며, 이러한 흉선의 퇴화는 식이지방에 의한 영향을 받아서 저지방식이군에 비해 고지방식이군에서 흉선의

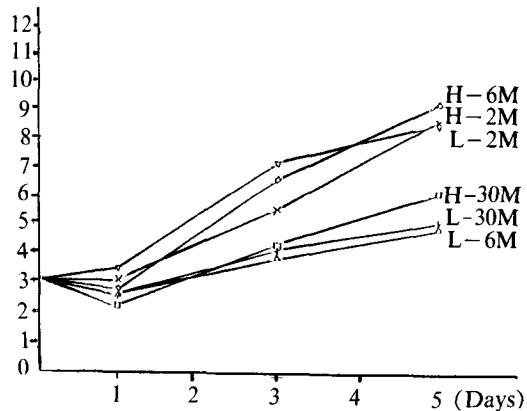


Fig. 1. Cell number on day 1, 3, 5 after seeding $3 \times 10^4/\text{ml}$ cells at 16 weeks.

무게가 더 저하되었다. 이러한 결과는 고지방식이가 성숙한 이후 계속되는 흉선의 퇴화를 촉진 시킴으로써 노화에 따른 면역기능 저하와 수명에 영향을 미칠 수 있음을 시사해주는 것으로 보인다. 한편, 흉선과 함께 면역기능을 담당하는 기관인 비장은 나이와 식이지방수준에 따른 변화가 없어서 흉선과는 다른 반응을 보였다.

나이에 따른 흉선의 퇴화는 T세포 매개성 면역 능력을 나타내는 mitogen stimulation index에서도 나타났다. 즉, PHA와 ConA에 대한 stimulation index가 나이가 들수록 저하되었으며, 같은 나이에서는 고지방식이군에서 낮은 경향을 보여서, 나이가 증가함에 따라 T세포의 증식반응이 저하되며, 또한 고지방식이가 흰쥐의 면역능력을 저하시킬 수 있음을 나타냈다.

T세포의 기능은 T helper 혹은 T suppressor 세포의 여러 가지 subpopulation의 상호 조절작용에 의해 이루어 지는데, 노화에 따른 T세포의 기능 저하는 이러한 T세포의 subpopulation에 따라 다르게 나타나는 것으로 보고되고 있다²²⁾. 따라서 이러한 T세포 subpopulation에 미치는 고지방식이의 영향은 PHA/ConA의 비율로 조사하였다. 식물성 mitogen은 면역세포막의 특정부위에 대한 특이성(specifity)을 갖고 있는 물질로 면역세포를 자극하여 DNA합성을 유도하며 증식반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 식물성 mitogen 가운데

식이지방과 섬유아세포의 노화

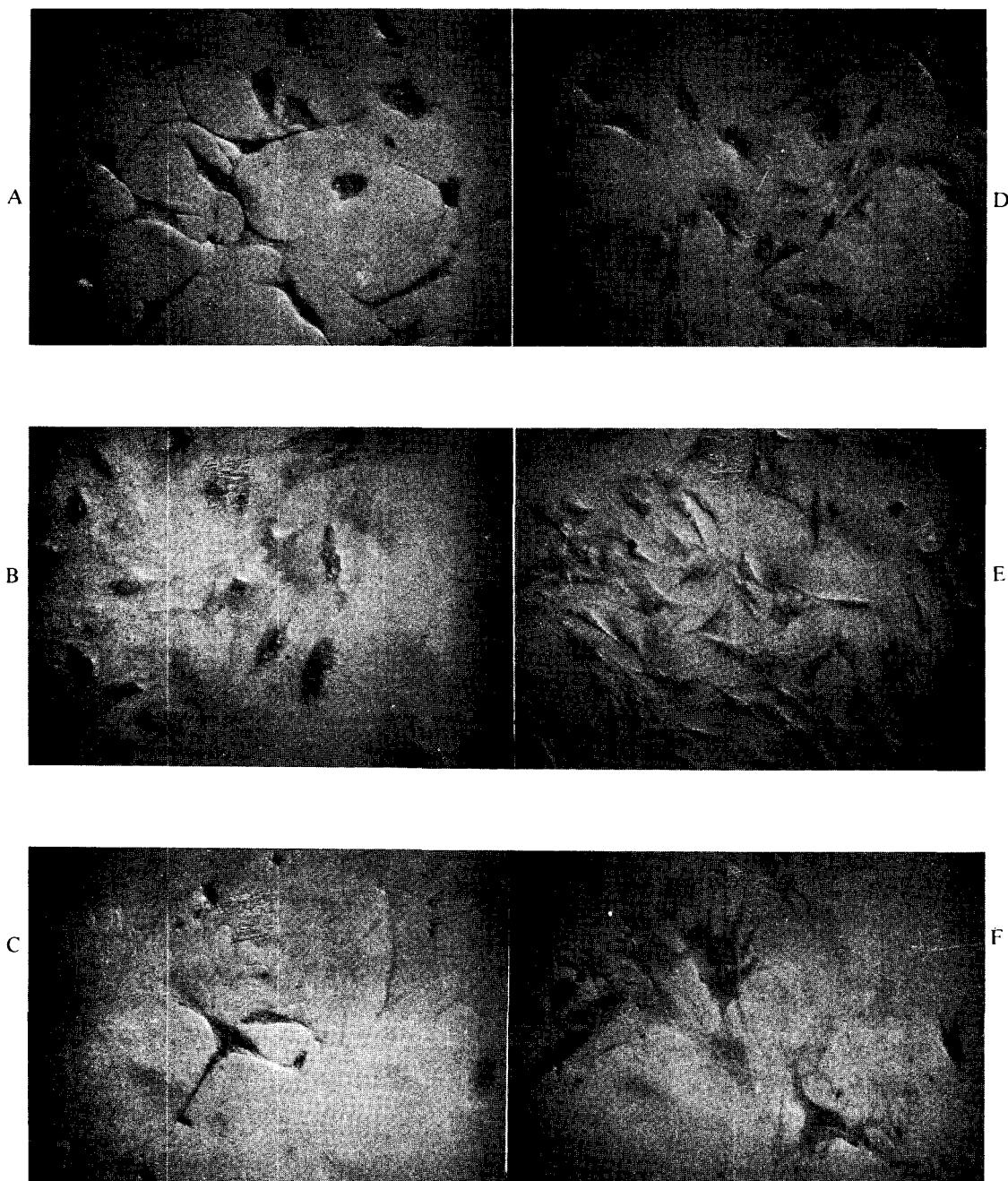


Fig. 2. Morphology of primary lung fibroblasts from 3, 6 and 30 month old rats.

(2 days after seeding : $\times 180$)

A : H-2M, B : H-6M, C : H-30M, D : L-2M, E : L-6M, F : L-30M

PHA(phytohaemagglutinin)와 ConA(concanacalin A)는 사람과 쥐의 T세포를 자극하는데, PHA와 ConA가 자극하는 T세포의 subpopulation에는 차이가 있어서, PHA는 helper T세포를 우선으로 자극하며, IL2와 같은 lymphokine의 생성과 interferon 분비를 유도하며, 반면 ConA는 suppressor T세포를 먼저 자극하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 본 실험에서 30개월된 늙은쥐는 2개월된 어린쥐나 6개월된 성숙한 쥐에 비해 PHA/ConA의 비가 감소하는 경향을 보였는데, 이것은 노화에 따라 미성숙한 T세포 혹은 helper T세포의 비율이 증가되어서 T세포의 subpopulation의 비가 변화될 수 있음을 시사해 준다. 이것은 T suppressor 세포의 증가가 노화에 따라 나타나는 자가 면역의 증가동 면역반응의 변화의 원인이 된다는 이론을 뒷받침하고 있다고 보겠다.

2. 섬유아세포(Fibroblast cell) 증식에 미치는 영향

모든 정상세포(normal cell)는 체내(in vivo)에서나 체외(in vitro)에서 제한된 증식능력을 갖고 있으며, 노화에 따라 이러한 세포의 증식능력이 저하된다는 것은 잘 알려진 사실이다. 나이가 증가함에 따라 증식능력이 저하되는 세포로는 대표적으로 폐와 피부의 섬유아세포가 있는데, 폐에서 분리한 세포는 피부에서 분리한 세포에 비해 증식률이 더 빠르고, confluence 형성시의 세포수가 많으며 수명이 긴 것으로 알려져 있으므로²⁴⁾, 본 실험에서는 흰쥐의 폐에서 섬유아세포의 primary culture를 얻은 후 세포의 증식능력과 수명을 조사하였다. 섬유아세포의 부착효율과 confluence를 형성했을 때의 세포수, 평균 집단배증시간(population doubling time), 배양일에 따른 세포수 등은 섬유아세포의 증식능력을 나타내는 지표인데 30개월된 늙은 쥐는 성장기의 쥐들에 비해 세포의 부착효율이 약 30% 가량 저하되었고, confluence를 이루었을 때의 세포수도 감소하는 경향을 보여서 나이에 따른 세포의 변화를 나타내었다.

Schneider는 늙은 사람의 섬유아세포 배양에서 나타나는 가장 일반적인 차이는 confluence시에

감소되는 세포수라고 하였고, 이러한 현상은 노화에 따라 세포와 세포사이의 접촉(contact)에 대한 예민성이 증가되기 때문이라고 보고한 바 있다²⁵⁾.

본 실험에서 늙은쥐의 섬유아세포는 배양일이 증가하면서 나타나는 세포의 증식능력이 어린쥐에 비해 낮았으며, PD time도 늙은쥐에서 고지방식 이군의 경우 48%나 증가하여 증식하는데 걸리는 시간이 길어져 증식증력(doubling potential)이 저하됨을 보여주었다. 이러한 결과는 생체외 세포 배양계에서 공급자의 나이(donor age)가 증가함에 따라 세포가 증식하는데 필요한 latent period(lag phase)가 길어졌으며, 노화된 세포가 분열하는 과정에서 interdivision time이 길어지고, 증식할 수 있는 세포의 수가 감소되며, 반면 분열하지 않는 세포의 비율은 증가되어 결국 증식능력(growing potential)이 저하된다는 보고와 일치한다²⁶⁾.

세포가 노화함에 따라 증식능력(doubling potential)이 저하되는 이유로는 개개의 세포 하나하나가 분열하는 능력이 저하됨과 동시에 세포집단 내에서 증식능력이 큰 세포의 비율이 감소되기 때문으로 보고있으며, 또한, 늙은 세포는 여러 호르몬에 대한 반응성이 낮아져서, 분열·증식능력이 저하되는 것으로 보인다.

생체외(in vitro)에서 세포의 수명을 나타내는 누적집단배증수(CPD)는 30개월된 늙은쥐에서 가장 낮았으며, 2개월된 어린쥐와 6개월된 성숙한 쥐 사이에는 차이가 나타나지 않았다. 본 실험에서 30개월된 늙은쥐와 2개월 혹은 6개월된 쥐의 CPD사이에 현저한 차이는 나타나지 않았는데, 이것은 본 실험에 사용한 2개월된 쥐와 6개월된 쥐가 이미 세포의 증식속도가 느려진 나이이기 때문으로 보인다. 세포의 증식속도가 빠른 시기는 태아와 신생아 시기로 제한되어 있어서 사람의 경우 태아와 신생아를 제외하고는 체외에서 세포 수명(in vitro life span)과 donor age 사이의 관계는 매우 적어진다고 보고되고 있다. 그러나, 본 실험에서 늙은쥐와 성장기 쥐들 사이에 나타난 차이는 실제로 $2^2 \sim 2^4$ 이라는 점을 고려하면, 나이에 따른 생체외에서의 수명의 차이가 반영된 것이라고 생

식이지방과 섬유아세포의 노화

각할수 있다. 한편, 식이지방수준은 세포의 수명이나 증식능력변화에 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

광학현미경을 통해 세포를 관찰한 결과도 이러한 나이에 따른 차이가 나타나서 30개월된 늙은 쥐의 섬유아세포는 2개월, 6개월된 쥐의 세포에 비해 세포의 밀도가 낮았으며, 세포 한개의 크기가 커졌고, 넓적한 모양을 나타낸 반면, 어린세포는 활발히 증식하는 뾰족한 모양이고, 세포의 크기가 작으면서 조밀하였다. 노화된 세포는 일반적으로 어린세포에 비해 크기가 커지며, 다향세포로 형태가 변하고, 모양이 매우 다양하며 용기 바닥에 단단히 부착되지 않고 둥근 모양으로 변하는 것으로 알려져 있으며, Kirkwood는 이러한 세포의 형태변화가 세포내 핵의 크기 증가나 lysosome수 증가와 같은 organelle 변화가 함께 나타난다고 하였다²⁷⁾. 본 실험에서도 늙은쥐의 세포는 그 모양이나 증식능력에 있어서 어린 쥐의 세포와는 많은 차이를 보였다. 그러나, 이 흰쥐들이 섭취하였던 식이지방의 차이에 의한 변화는 나타나지 않았다. 폐의 섬유아세포의 생체외 배양결과로 보아, 생체외의 1차 세포 배양계는 체내의 노화와 수명을 반영해 주는 것으로 보인다.

Literature cited

- 1) 공세권·유호신 : 한국인의 노령화에 관한 고찰. 인구문제론집, 25(12) : 50-59, 1984
- 2) Story JA, Aging and lipid metabolism. In : Nutrition in gerontology Ordy JM, Harman D, Alfin RB ed Raven Press NY, 1985
- 3) Kasim S, Cholesterol changes with aging : their nature and significance. *Geriatrics* 42 : 73-82, 1987
- 4) Walford RL, Immunological theory of aging : Current status. *Fed Proc* 33 : 2020-2027, 1974
- 5) Payette H, Rola-Pleszynski M, Ghadirian P, Nutrition factors in relation to cellular and regulatory immune variables in a free-living elderly population. *Am J Clin Nutr* 52 : 927-932, 1990
- 6) Locniskar M, Nauss KM, Newberne PM, The effect of quality and quantity of dietary fat on the immune system. *J Nutr* 113 : 951-956, 1983
- 7) Chandra RK, Nutrition and immunity : Lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 53 : 1087-1101, 1991
- 8) Ericson KL, Adams DA, McNeill CJ, Dietary lipid modulation of immune responsiveness. *Lipids* 18 : 468-474, 1983
- 9) Hayflick L, Moorhead PS, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-621, 1961
- 10) Witkowksi JA, Cell aging in vitro : A historical perspective. *Exp Gerontol* 22 : 231-248, 1987
- 11) Schneider EL, Mitsuiks Y, The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 3584-3588, 1976
- 12) Röhme D, Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life span of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 5009-5013, 1981
- 13) Martin GM, Sprague CJ, Epstein CJ, Replicative life span of cultivated human cells : Effect of donor's age, tissue & genotype. *Lab Invest* 23 : 86-92, 1970
- 14) Todhunter EN, Rats in nutrition research. *Chemistry* 52 : 8-11, 1979
- 15) The American Institute of Nutrition, Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107 : 1340-1348, 1977
- 16) Freshney RI, Culture of animal cells : A manual of basic technique 2nd ed Alan R Liss Inc. NY 1987
- 17) Mollenhauer J, Bayreuther K, Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation* 32 : 165-172, 1986
- 18) Milo GE, Malarkey WB, Powell JW, et al. Effects of steroid hormones in fetal bovine serum on plating and cloning of human cells in vitro. *In vitro* 12 : 23, 1976
- 19) Kovacs CJ, Fleishmajer R, Properties of scleroderma fibroblasts in culture. *J Invest Dermatol* 63 :

조미숙 · 김화영

- 45-56, 1974
- 20) Beserga R, Cell growth and division. IRL Press, 1989
 - 21) Fernandes G, Good RA, Response to autoimmune disease and disease of aging to dietary restriction In : Immunological aspects of aging Segre D, Smith L. ed pp207-233 Marcel Dekker NY, 1987
 - 22) Weksler ME, Siskind GW, The cellular basis of immune senescence In : Monographs in developmental biology. Sauer K ed Vol 17 pp110-121, 1984
 - 23) Bellanti JA, Immunology : Basic process. 2nd ed pp132-133 WB Saunders Company, 1984
 - 24) Cristofalo J, Stanulis-praeger BM, Cellular senescence in vitro In : Advances in cell culture. Marzemorsch K ed Vol 12 pp1-53 Academic Press NY, 1982
 - 25) Schneider EL, Cell replication and aging : in vitro and in vivo studies. *Fed Proc* 38 :1857-1861, 1979
 - 26) Smith IR, A hypothesis for in vitro cellular senescence of human diploid fibroblast and somatic cell hybrid In : Monogr Devel Biol 17 : 193-200 Krager Basel, 1984
 - 27) Kirkwood TBL, In vitro aging of animal cells In : Cell ageing and cell death. Davis I, Sigee DC ed pp55-72 Cambridge University, 1984