韓國營養學會誌 29(2) : 159~165, 1996

신생흰쥐 피부섬유아세포의 배양액에 지방산의 종류와 양을 변화시켰을 때 세포의 증식과 지질과산화물 생성에 미치는 영향

장 영 애 · 김 화 영

이화여자대학교 식품영양학과

The Effects of Fatty Acids Supplementation in Culture Medium on Proliferation 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 concentration and degree of unsaturation of fatty acids on cellular proliferation and lipid peroxide production, using primary skin fibroblasts from neonate rats Fibroblasts (CPD : 2.8-5.4).Cells were cultured either in control medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplement with 10% fetal bovine serum) or in media supplemented with various kinds (stearic, oleic, linoleic, arachidonic, linolenic, eicosapentaenoic acid) and amounts (5, 10, 25, 50, 100, 150μM) of fatty acids. Cellular proliferation ratio and lipid peroxide production were measured and morphological changes were observed. Cellular proliferation was inhibited and morphological changes were observed in cells grown in stearic acid containing media. Oleic, arachidonic, and eicosapentaenoic acid tend to stimulate cellular proliferation, and linolenic acid had no effects. Lipid peroxide concentrations in fibroblasts increased in proportion to the contents and unsaturation of fatty acids in media. Especially supplementation of arachidonic acid accelerated cellular lipid peroxidation. Free radicals may cause severe damage to biological molecules, so lipid peroxidation probably contributes cellular membrane damages. However there were little relationship between lipid peroxide production and cellular proliferation in this study. (*Korean J Nutrition* 29(2) : 159~165, 1996)

KEY WORDS : fibroblast · proliferation · fatty acids · lipid peroxides.

서 론

최근 노화현상과 수명을 결정짓는 요인에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다[1]. 노화는 생체가 직면하는 여러가지 환경인자의 영향을 받는데 이러한 환경인자중에는 식이인자도 포함된다. 그중에서도 지방의 과잉섭취는 노화를 촉진시키며 수명을 단축시킬수 있다고 보고되고 있고[2][3] 지방의 종류도 영향을 주어 지방의 불포화도가 증가하면 수명이 단축되었다는 보고도 있다[4]. 식이중의 포화지방산이나 cholesterol의 증가는 여러가지 순환기계질환을 초래할 수 있어 노화와 수명에 영향을 준다고 알려져 있다[5][6]. 최근 노화연구에 사람이나 실험동물보다도 연구에 소요되는 시간이 짧고 분자수준에서의 기전을 규명하는데 유용한 세포배양계가 많이 이용되고 있

채택일 : 1995년 12월 29일

다. 이때 세포가 생체내에서와 같이 증식할수 있도록 하기 위해서는 세포의 성장에 필요한 여러가지 성분들을 배양액에 첨가시켜 주어야 하는데 이러한 첨가물질을 변화시킴으로써 세포의 증식에 영향을 미치는 인자들을 연구할 수 있다. N-6계열의 다가불포화지방산들을 포함한 여러가지 지방성분들도 세포의 증식에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[7][8]. 다가불포화지방산들이 세포의 protein kinase C를 활성시키거나[9] 다가불포화지방산의 prostanoids 대사물들이 직접 세포의 증식을 촉진한다는 보고들이 있다[10]. 반면에 세포의 수명을 단축시켰다는 보고도 있는데 이러한 원인중의 한가지는 지질과산화물의 생성이 관여하는 것으로 생각된다[11][12]. 세포대사 결과로 생긴 free radical은 세포핵내 DNA에 손상을 초래하게 된다. 물론 체내에는 이러한 손상에 대처하기 위한 조절기전이 존재하지만[13][14] 이러한 DNA의 결함이 완벽히 복구되지 않으면 체내에 불완전한 DNA가 누적되고 이것이 노화와 이에 관련된 각종 퇴행성 질환의 주요한 원인이 될수 있다[15][16]. 한편 free radical들이 세포중의 불포화지방산과 반응하면 지질과산화물이 생성된다[17]. 나이가 증가할수록 free radical과의 반응물이 체내에 축적되어 과산화물의 양이 많아지고[16] "age pigments"라고도 알려진 lipofuscin이 조직에 축적된다[18]. 따라서 radical의 발생을 가속하는 조건은 생체의 수명에 영향을 미치게 된다. 그러나 다가불포화지방산들이 정상적인 세포의 증식과 수명에 미치는 영향에 관해서는 아직도 논란의 여지가 많다.

세포배양계를 이용하여 배양액의 지방함량의 변화는 신생흰쥐의 피부에서 분리한 섬유아세포의 증식능력과 수명에 영향을 미칠수 있음이 관찰되었으므로[19] 본 연구에서는 불포화도가 다른 지방산을 여러농도로 배양액에 첨가하여 세포의 증식과 지질과산화물의 생성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양방법 및 배양액조성

생후 1일된 흰쥐의 피부조직에서 섬유아세포를 분리하고 배양하는 것은 장영애와 김화영의 논문[19]에 제시된 방법을 이용하였다. 즉, 섬유아세포의 일차배양은 Harley등의 방법[20]을 변형하여 실시하였고 형태관찰은 세포를 분주한 지 24시간 배양한 다음 Giemsa로 염색하여 phase-contrast microscope(Olympus : IMT-2)에 부착된 사진기로 촬영하여 관찰하였다[19][20]. 세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM ; Gibco)에 항생제(penicilline 100units/ml, streptomycin 10μg/ml, amphotericin B 25ng/ml)와 10μM의 $NaHCO_3$ 및 10μM의 HEPES를 첨가한 후 pH를 7.4로 조정하고 열로 불활성화된 fetal bovine serum(FBS ; Gibco)을 10% 첨가하여 사용하였다. 여기에 불포화도가 다른 지방산의 첨가가 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 알아보고자 배양액에 지방산의 종류와 양을 달리 첨가하여 섬유아세포를 배양하였다. 사용한 지방산은 포화지방산으로는 stearic acid(18 : 0 : Sigma)를 단일불포화지방산으로는 oleic acid(18 : 1, n-9 : Sigma)를, n-6계열의 불포화지방산으로는 linoleic acid(18 : 2, n-6 : Sigma)와 arachidonic acid(20 : 4, n-6 : Sigma)를 n-3계열의 불포화지방산으로는 linolenic acid(18 : 3, n-3 : Sigma)와 eicosapentaenoic acid(20 : 5, n-3 : Sigma)였다. 각 지방산들은 99% absolute ethanol에 녹여서 5, 10, 25, 50, 100, 150μM의 농도로 배양액에 첨가하되 첨가되는 ethanol의 양은 배양액의 1%(v/v)가 되도록 조정하였다. Absolute ethanol만을 첨가한 것을 대조군으로 하여 각각의 지방산을 첨가했을 때의 세포의 증식정도를 대조군과 비교하였다. 이러한 다가불포화지방산들을 공기중에서 쉽게 산화하므로 배양액을 24시간마다 교환하여 주었다.

2. 세포의 증식율 및 부착효율

세포의 증식율은 누적집단배증량 (cumulative population doublings : CPD)이 2.8~5.4로 세포의 증식력이 왕성한 시기의 섬유아세포를 이용하였다[19]. 각 배양용기당 약 5.8×10^5개의 세포를 분주하여 주고, 배양한지 24시간후에 배양용기에 부착된 세포수는 phase-contrast microscope로 직접 세었다. 또한 세포의 형태관찰은 현미경에 부착된 사진기로 촬영하여 관찰하였다. 세포의 부착효율 측정에 사용되지 않은 다른 용기의 세포들은 대조군의 증식이 confluency에 도달되었을 때를 기준으로 배양을 종결하고 배양액을 제거한 후 1% trypsin-10mM EDTA 용액으로 처리하여 hematocytometer를 이용하여 최종 세포수를 세었다. 세포의 증식율은 최종의 세포수를 분주한지 24시간후에 부착된 세포수로 나누어 구하였다. 대조군과의 비교는 대조군의 증식율을 1로 하였을 때 각 지방산을 첨가했을 때의 증식율을 대조군의 증식율에 대한 비율로 표시하였다.

$$\text{proliferation ratio}=\frac{\text{experimental}(N_C/N_A)}{\text{control}(N_C/N_A)}$$

(N_C : cell no. at confluence

N_A : attached cell no. at 24hr after seeding)

세포의 부착효율은 Griffiths[21]등의 방법을 이용하여 처음 분주해 준 세포수와 24시간후에 배양용기에 부착된 세포수로부터 부착효율(attachment efficiency)을 계산하였다.

$$\text{attachment efficiency} = \frac{\text{attached cell no. 24 hour after seeding}}{\text{seeding cell no.}} \times 100$$

3. 세포내 지질과산화물 양의 측정

세포내 지질과산화물양의 지표로는 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)의 양을 측정하였다. 세포의 증식율을 비교하기 위해 사용되었던 세포들을 세포의 수를 측정한 후 20% FBS와 10% DMSO (dimetylsulfoxide)가 포함된 냉동용 배양액에 부유시켜 −70℃에서 냉동보관하였다. TBARS를 측정하기 직전에 세포들을 37℃ 수조에서 급속히 녹인후 원심분리하여 냉동용배양액을 제거하고 증류수를 첨가하여 세포막을 터뜨린 후 Yagi[22]의 방법을 변형시켜 luminiscence spectrometer(LS 50 : Perkin-Elmer)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 측정하였다.

4. 자료처리

섬유아세포의 증식율을 관찰한 실험에서는 absolute ethanol만을 첨가해준 대조군의 증식율에 대해 지방산을 첨가한 각 실험군의 증식율의 비율을 평균과 표준오차로 표시하였다. 세포의 부착효율과 세포내 지질과산화물의 양을 측정한 실험결과는 각 실험조건당 duplication 한 값을 평균하여 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 지방산의 종류와 양이 세포의 증식에 미치는 영향

누적집단배증량(CPD)이 2.8~5.4로 세포의 성장이 활발한 시기의 세포를 이용하여 같은 CPD의 세포를 약 5.8×10^5개씩 분주하여 주고 지방산의 종류와 양을 달리한 배양액에서 배양하여 대조군의 증식율과 비교한 결과를 Table 1에 수록하였다. 배양액내에 stearic acid를 5~25μM 정도로 첨가했을 때는 대조군에 비해 0.81~0.97의 증식율을 나타내었고 50μM이상을 첨가했을 때는 세포가 모두 죽는 유해한 효과를 보여 불포화지방산에 비해 포화지방산은 세포의 증식을 저해하는 것으로 나타났다. Oleic acid를 10μM, 50μM, 100μM씩 첨가해 준 경우는 대조군 증식율의 1.27~1.44배로 증식자극효과를 나타냈으나 150μM을 첨가해준 경우에는 배양 24시간후에 배양용기에 부착되었던 세포수보다도 감소되어 음(−)의 증식율을 보였다. Linoleic acid를 10μM이나 50μM 첨가한 경우는 대조군에 비해 더 낮은 증식율을 보였으나 100μM을 첨가한 경우는 대조군의 1.27정도로 높아졌다. Linolenic acid는 10μM, 50μM, 100μM씩을 첨가해 주었을때 대조군의 0.9~1.18 정도로 대조군과 비슷한 증식정도를 보였다. Arachidonic acid는 10μM, 50μM, 100μM씩을 첨가해 주었을 때 대조군의 1.26~1.40배로 증식하여 증식자극효과를 보였으나 150μM을 첨가해준 경우에는 증식율은 음의 값을 나타내었다. Eicosapentaenoic acid는 10μM, 25μM을 첨가했을 때는 대조군과 비슷한 증식율을 보였고 50μM, 100μM, 150μM씩을 첨가해 주었을때는 각각 대조군에 비해 1.48, 1.93, 1.29배의 증식을 보였다. 따라서 전체적으로 oleic acid와 arachidonic acid는 증식자극효과를 나타냈고 eicosapentaenoic acid는 50μM이상 첨가해준 경우에 증식자극효과를 보였다. 그러나 150μM 정도의 고농도로 첨가해준 경우에는 증식율이 저하되었다. 반면 linoleic acid와 linolenic acid는 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Bradyopadhyay등[23]은 배양액에 linoleic acid metabolite를 첨가했을 때 생쥐의 유선 상피세포가 epidermal growth factor의 자극에 대해 더 많이 증식했다고 보고했고 Imagawa등[24]은 혈청이 첨가되지 않은 배양액내에서도 다가불포화지방산을 포함한 phospholipid들이 세포증식을 자극했다고 보고했다. 이들 연구자들은 다가불포화지방산들이 세포의 protein kinase C를 활성시키거나[9] 다가불포화지방산의 prostanoids

Table 1. Proliferation ratio of fibroblast cultured in DMEM containing various kinds and amount of fatty acids, compared with control[1]

Amount(μM) / Fatty acid	5	10	25	50	100	150
Stearic	0.97±0.08	0.81±0.06	0.94±0.07	–	–	–
Oleic	–[2]	1.29±0.10	0.88±0.04	1.27±0.14	1.44±0.06	−0.20±0.01
Linoleic	–	0.70±0.05	–	0.81±0.08	1.27±0.08	–
Linolenic	–	0.95±0.05	–	1.18±0.09	0.89±0.07	–
Arachidonic	–	1.26±0.11	0.83±0.08	1.28±0.16	1.39±0.12	−0.56±0.01
Eicosapentaenoic	–	0.95±0.03	0.91±0.07	1.45±0.09	1.93±0.11	1.29±0.18

1) mean±SE(n=3) 2) not observed

대사물들이 직접 상피세포의 증식을 촉진한 것으로 설명하고 있다[10]. 섬유아세포들도 여러 growth factor와 함께 prostaglandin등을 첨가해 주거나[25] 혈청의 LDL을 첨가했을때[26] 세포의 성장이 촉진되었다고 알려져있다. 본 연구에서 arachidonic acid나 eicosapentaenoic acid의 첨가시 세포의 증식자극효과를 나타낸 것은 부분적으로는 이들의 대사물인 prostaglandin의 작용으로 볼수 있을 것이다. 단일불포화지방산이나 다가불포화지방산을 첨가해 주었을 때 세포의 증식에 미치는 영향은 연구자마다 다양하여 세포의 증식억제효과[27][28][29] 혹은 증식자극효과를 나타낸다는 보고들이 있다[23][24][30]. 이것은 사용된 세포의 종류나 나이, 배양조건, 첨가한 지방산의 양이나 첨가방법등이 다양했기 때문인 것으로 보인다. 본 연구에서 탄소사슬의 길이가 20이상되는 다가불포화지방산과 단일불포화지방산의 첨가는 증식자극효과를 나타내는 경향이었고 포화지방산의 첨가는 증식저해효과를 보였다.

Table 2에 나타낸 바와 같이 세포의 부착효율은 지방산의 종류나 양에 따른 일정한 경향을 보이지는 않았으나 대체로 지방산을 첨가해 주었을 때 대조군에 비해 부착효율이 감소하는 경향이었다. 포화지방산의 경우는 부착효율도 낮고 배양시간이 길어짐에 따라 부착되었던 세포들도 증식하지 못하고 죽게되는 반면 탄소사슬의 길이가 20이상되는 다가불포화지방산과 단일불포화지방산을 첨가해 준 경우에는 처음 부착효율은 저하하지만 일단 부착된 세포들은 대조군에 비해 더 빠르게 증식함을 알 수 있었다.

Table 2. Attachment efficiency of fibroblast cultured in DMEM containing various kinds and amount of fatty acids, compared with control[1] (%)

Amount(μM) / Fatty acid	5	10	25	50	100	150
Stearic	84.6	89.2	85.6	77.6	–	–
Oleic	–[2]	81.7	102.9	86.7	96.6	111.6
Linoleic	–	85.6	–	95.4	79.2	–
Linolenic	–	97.0	–	94.3	89.3	–
Arachidonic	–	88.1	85.8	87.3	90.5	78.2
Eicosapentaenoic	–	96.6	86.5	93.5	67.2	77.6

1) Value are means of duplication 2) not observed

배양후 24시간후 염색하여 현미경으로 관찰한 세포의 형태는 Fig. 1에 수록하였다. Stearic acid를 첨가해준 경우를(Fig. 1-A) 제외하면 지방산의 첨가로 인한 세포형태의 차이는 없었고 전형적인 섬유아세포의 방추체 혹은 작은 상피세포형태를 보였다(Fig. 1-B, C, D, E, F). 50μM의 stearic acid를 첨가해 준 경우에 세포는 적고 퇴화해 가는 형태로 변했으며 세포내에 지방구 같은 입자가 관찰되었다. 이러한 입자는 장영애와 김화영의 논문에서 지방함량이 높은 배지에서 배양된 세포의 내부에서 관찰되었던 것과 유사한 것이었다. 이는 조여원과 조병희[31]가 stearic acid는 Hep-G2 세포에서 중성지방의 합성에 가장 큰 영향을 나타냈으나 분비는 가장 적은 효과를 나타냈다는 결과를 고려하면 배양액에 첨가해준 지방산이 주로 중성지방합성에 사용되어 세포내부에 지방구 같은 입자를 만든 것으로 생각된다.

2. 지질과산화물 생성에 미치는 영향

세포내에 생성된 TBARS의 양은 첨가한 지방산의 종류와 양에 따라 차이를 나타냈다. Table 3에서 보는 바와 같이 첨가해 준 6가지 지방산 모두에서 첨가량이 증가할수록 TBARS의 생성량이 증가하였다. 그러나 그 증가하는 양상은 지방산의 종류에 따라 다른 경향을 나타내었다. Stearic acid를 5~10μM 첨가해준 경우는 대조군보다 11~22%정도 TBARS가 덜 생겼고 그 이상을 첨가해 주어도 대조군과 비슷한 정도였다. Oleic acid를 10μM 첨가해준 경우에는 TBARS양이 대조군의 56% 정도였으나 150μM로 첨가량을 증가시킨 경우에는 대조군에 비해 4배 이상 증가하여 단일불포화지방산도 고농도로 첨가하면 지질과산화물의 생성량이 증가함을 보였다. 첨가한 지방산의 불포화도가 증가할수록 TBARS의 양은 증가하는 경향으로 stearic acid나 oleic acid에 비해 다가불포화지방산을 첨가해준 경우에 TBARS의 양이 더 많았다. 또 지방산의 첨가량이 증가할수록 TBARS의 양이 더 많았는데 특히 arachidonic acid는 첨가량이

Table 3. Thiobarbituric acid reactive substances concentration percentage of firoblasts cultured in DMEM containing various kinds and amount of fatty acids, compared with control[1] (%)

Amount(μM) / Fatty acid	5	10	25	50	100	150
Stearic	78.0	88.7	100.6	115.4	–	–
Oleic	–[2]	56.2	144.1	83.8	132.1	429.3
Linoleic	–	146.7	–	235.8	392.0	–
Linolenic	–	90.6	–	191.7	808.7	–
Arachidonic	–	142.7	474.5	702.4	2520.8	7224.6
Eicosapentaenoic	–	136.0	186.7	327.7	788.5	1298.5

1) Value are means of duplication 2) not observed

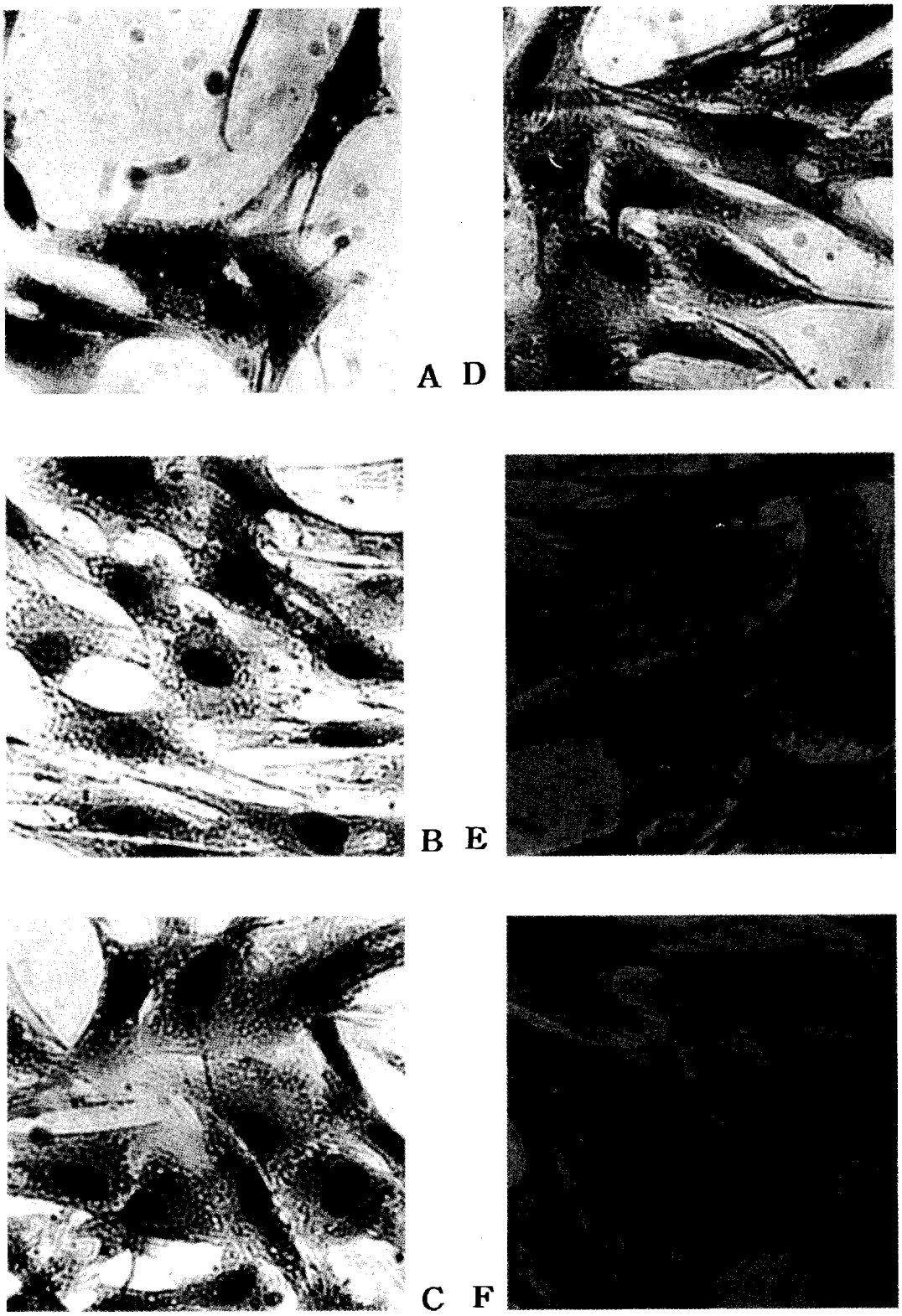

Fig. 1. Morphology of fibroblasts cultured in DMEM containing various kind of fatty acids(A : 50μM stearic, B : 100μM oleic, C : 100μM linoleic, D : 100μM linolenic, E : 100μM arachidonic, F : 100μM eicosapentaenoic aicd, 1 day after seeding, ×400).

증가함에 따라 TBARS 양이 많아져서 150μM를 첨가해 준 경우에는 대조군 보다 70배 정도가 더 생성되었다. 그러나 첨가해 준 지방산 중에서 불포화도가 가장 높았던 eicosapentaenoic acid는 arachidonic acid보다는 TBARS양이 적어서 150μM을 첨가해준 경우에 대조군에 비해 13배 정도였다.

그러나 본 연구에서는 지질과산화물의 양과 세포의 증식율 간에는 일관된 관계를 나타내지 않아서 단기간동안에는 지질과산화물의 생성량과 세포의 증식율과는 관련이 없는 것으로 나타났다. 지질과산화물이 세포의 증식을 억제하는 데 관여하는지를 규명하기 위하여 Lindsey등[32]은 항산화제로 vitamin E 와 그 유도체들을 첨가하여 지질과산화물의 생성을 억제하였을 때 지질과산화물과 세포의 증식과의 관계를 보았는데 항산화제의 첨가량이 증가할수록 지질과산화물의 양은 감소하였으나 낮은 농도로 항산화제를 첨가한 경우에 세포증식의 효과가 더 높아서 지질과산화물의 생성량과 세포의 증식과의 관계는 명확하지 않다고 보고하였다. 본 연구에서 배양액에 불포화지방산의 양이 증가하는 것에 비례하여 지질과산화물의 생성이 증가하였으므로 좀더 장기간 세포의 증식 및 수명을 관찰하여 보는 것이 필요하다고 사료된다.

동물의 경우 성장율과 수명사이에는 역관계가 존재하며[1)15)33)] 또 체내의 정상적인 대사 결과 생성된 oxidant들(NO, O_2^-, H_2O_2, HOCl등)이 노화의 주요한 원인이 될수 있다고 보고되고 있다[34)35)]. 이러한 결과는 세포에도 적용될 수 있을 것으로 생각된다. 즉, 본 연구결과와 같이 지방산의 첨가로 인한 세포증식자극 효과로 세포의 대사율을 증가시키게 되면 그 결과 이러한 oxidant들의 생성이 더 증가할수 있으므로[36)37)] 장기간 배양했을 때는 세포의 수명에 영향을 미칠수도 있을 것으로 생각된다.

결론 및 요약

세포배양계를 이용하여 불포화도가 다른 지방산을 여러농도로 배양액에 첨가하여 섬유아세포의 증식율과 지질과산화물의 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 다음과 같다.

1) 탄소사슬의 길이가 20이상되는 다가불포화지방산과 단일불포화지방산의 첨가는 세포의 증식자극효과를 나타내는 경향이었고 포화지방산의 첨가는 증식저해효과를 보였다. Linoleic acid나 linolenic acid는 세포의 증식에 특정한 영향을 나타내지 않았다.

2) 배양액에 첨가한 지방산의 불포화도가 증가할수록 지질과산화물의 양은 증가하는 경향이었고, 지방산의 첨가량이 증가할수록 지질과산화물의 양이 더 많았다.

3) 단기적으로는 섬유아세포의 증식과 세포내 지질과산화물의 양 사이에 일관성은 없는 것으로 나타났다.

Literature Cited

1) 김숙희 · 김화영. 노화 : 3장 노화이론. 민음사 pp77-112, 1995

2) 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

3) Yu BP. Food restriction research : past and present status. *Rev Biol Res Aging* 4 : 349-371, 1990

4) Harman D. Free radical theory of aging : Effect of the amount and degree of unsaturation of dietary fat on mortality rate. *J Gerontol* 26(4) : 451-457, 1971

5) Dwyer J. Overview : Dietary approaches for reducing cardiovascular risks. *J Nutr* 125(3S) : 656S-665S, 1995

6) Normen EM. On the association of body cholesterol pool size with age, HDL cholesterol and plasma total cholesterol concentration in humans. *Atherosclerosis* 67 : 163-172, 1987

7) Bailey JM, Dunbar LM. Essential fatty acid requirements of cells in tissue culture : A review. *Exp Mol Pathol* 18 : 142-161, 1973

8) Lynch RD. Utilization of polyunsaturated fatty acids by human diploid cells aging in vitro. *Lipids* 15(6) : 412-420, 1980

9) Craven PA, DeRubertis FR. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation by unsaturated fatty acids. *Gastroenterol* 95 : 676-685, 1988

10) Rudland PS, Davies ACT, Taso SW. Rat mammary preadipocytes in culture produce a trophic agent for mammary epithlia : prostaglandin E_2. *J Cell Physiol* 120 : 364, 1984

11) Niki E, Yamamoto Y, Komura E, Sato K. Membrane damage due to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 53 : 210S-215S, 1991

12) 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 USA* 663 : 444-446, 1992

13) Breimer L. Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species. *Free Radical Res Comm* 1 : 159-171, 1991

14) Halliwell B, Aruoma OI. eds. DNA and free radicals. Chichester : Ellis-Harwood, 1993

15) Halliwell B. Free radicals and antioxidants : A personal view. *Nutr Rev* (8) : 253-265, 1994

16) Kaasgaard SG, Holmer G, Hoy CE, Behrens WA, Beare-Rogers JL. Effects of dietary linseed oil and marine oil on

lipid peroxidation in monkey liver in vivo and in vitro. *Lipids* 27(10) : 740-745, 1992

17) 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

18) 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

19) Wolf G. Lipofuscin, the age pigment. *Nutr Rev* 7 : 205S, 1993

20) 장영애 · 김화영. 배양액내 지방함량의 변화가 신생흰쥐 피부섬유아세포의 노화와 지질과산화물 생성에 미치는 영향. 한국영양학회지 29(1) : 97-103, 1996

21) Harley CB. Aging of cultured Human skin fibroblasts. In : Pollard JW, Walker JM eds. Animal cell culture. Humana Press inc. pp25-32, 1990

22) Griffiths B. Scaling-up of animal cell cultures. In : Freshney RI ed. Animal Cell culture : Apractical approach. IRL Press. pp33-70, 1986

23) Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In : Methods in enzymology. Academic press Vol 105 pp328-331, 1984

24) Bandyopadhyay GK, Imagawa W, Wallace D, Nandi S. Linoleate metabolites enhance the in vitro proliferative response of mouse mammary epithelial cells to epidermal growth factor. *J Biol Chem* 262 : 2750-2756, 1987

25) Imagawa W, Bandyopadhyay GK, Wallace D, Nandi S. Phospholipids containing polyunsaturated fatty acyl groups are mitogenic for normal mouse mammary epithelial cells in serum-free primary cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 4122-4126, 1989

26) Bettger WJ, Boyce ST, Walthall BJ, Ham RG. Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblasts in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with epidermal growth factor, insulin and dexamethasone. *Proc Natl Acad Sci* USA 78 : 5589-5592, 1981

27) Spain MJ, Wosu LO, Kalant N. Multiple effects of serum low density lipoprotein on cultured human fibroblasts. *Can J Biochem* 57 : 684-691, 1979

28) Spector AA, Kiser RE, Denning GM, Koh SWM, DeBault LE. Modification of the fatty acid composition of cultured human fibroblasts. *J Lipid Res* 20 : 536-547, 1979

29) Fine A, Goldstein RH. The effect of PGE_2 on the activation of quiescent lung fibroblasts. *Prostaglandins* 33 : 903-913, 1987

30) Hori T, Yamanaka Y, Hayakawa M, Shibamoto S, Oku N, Ito F. Growth inhibition of human fibroblasts by epidermal growth factors in the presence of arachidonic acid. *Biochem Biophysics Res Comm* 169(3) : 957-965, 1990

31) Buckmann DK, Chapkin RS, Erickson KL. Modulation of mouse mammary tumor growth and linoleate enhanced metastasis by oleate. *J Nutr* 120 : 148-157, 1990

32) Choue RW, Cho BH. Effect of individual fatty acids on synthesis and secretion of apolipoprotein and lipoprotein in Hep-G2 cells. *Kor J Nutr* 27(9) : 910-923, 1994

33) Lindsey JA, Zhang H, Kaseki H, Morisaki N, Sato T, Cornwell DG. Fatty acid metabolism and cell proliferation. VII. Antioxidant effects of tocopherols and their quinones. *Lipids* 20 : 151-157, 1985

34) Goodlich CL. Body weight increment and length of life : The effect of genetic constitution and dietary protein. *J Gerontol* 33(2) : 184-190, 1978

35) Cutler RG. Peroxide-producing potential of tissues : Inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4798-4802, 1985

36) Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG. Antioxidants and immune response in aged persons : overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 62 : 1462S-76S, 1995

37) Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci* 663 : 85-96, 1992

38) Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging : A unifying hypothesis. *Exp Gerontol* 25 : 499-522, 1990