



혈청호모시스테인 농도와 호모시스테인 유도성- 세포 세네센스에 대한 표고버섯분말의 영향

박영철¹ · 김민희¹ · 김종봉²

¹대구가톨릭대학교 바이오안전성센터, ²자연대학 의생명과학과

Effects of *Lentinus edodes*-powder on Serum Homocysteine Level and Homocysteine-induced Replicative Senescence

Yeong-Chul Park¹, Min-Hee Kim¹ and Jong-Bong Kim²

¹Center for Bio-Safety and ²Department of Medicinal Life Science, Catholic University of Daegu,
Gyeongbuk 712-702, Korea

Received July 24, 2007; Accepted December 4, 2007

Elevated blood levels of homocysteine (a sulfur-containing amino acid) have been linked to increased risk of cerebrovascular disease including Alzheimer's disease. A recent study suggests that elevated homocysteine levels may lead to replicative senescence *in vitro* called "permanent arrest of cell cycle" caused by oxidative stress. In this study, serum homocysteine level in rat was reduced by *Lentinus edodes*-powder diet, resulting in the reduced level of oxidative stress in rat brain. In addition, homocysteine-induced replicative senescence treated with or without *Lentinus edodes*-powder was analyzed by population doubling *in vitro*. The *Lentinus edodes*-powder induced an increased number of population doubling in primary neuron cell isolated from rat-cerebral cortex. This indicates that *Lentinus edodes*-powder would delay a homocysteine-induced aging of neuron cells in brain, showing a possible role in preventing cerebrovascular diseases including Alzheimer's disease.

Key words: *Lentinus edodes*, Homocysteine, Senescence, Neuron cell, Oxidative stress.

서 론

호모시스테인(homocysteine)은 생물학적 기능을 위해 체내 여러 거대분자 및 생화학적 반응에 필수적인 메틸기(methyl group)를 공여하는 메티오닌 대사 경로에서 생성되는 중간대사체이다. 그러나 호모시스테인이 1969년에 동맥경화의 병인론으로 처음으로 제시된 후 말초혈관, 심혈관 그리고 뇌혈관의 동맥경화를 유발하는데 있어서 주요 원인으로 확인되었다(McCully, 1969; Langman *et al.*, 1990). 혈중 호모시스테인 5 $\mu\text{mol/l}$ 은 콜레스테롤 20 mg/dl 정도의 상승과 같으며 혈관 질환의 위험도(odd ratio)가 1.6~1.8배 정도 상승한다(van den Bosch *et*

al., 2003). 특히 혈청 호모시스테인이 1 $\mu\text{mol/l}$ 증가하면 심혈관 질환율이 약 10% 증가할 정도로 독성이 강하다(Fortin *et al.*, 1995; Malinow *et al.*, 1995).

혈중 호모시스테인을 증가시키는 원인으로 가장 대표적인 것은 흡연과 음주 등 개인적 습관요인이다(Bleich *et al.*, 2005; Iso *et al.*, 2004; Schlienger, 2003; Sobczak *et al.*, 2004). 이들 요인에 의해서 혈중호모시스테인이 약 2~3배 정도 증가하는 것으로 알려졌다. 이러한 환경적인 요인과 더불어 최근엔 호모시스테인 증가가 노인성치매(알츠하이머병; Alzheimer's disease)의 원인으로 새롭게 추정되고 있다. 연구에 의하면 정상인의 농도가 4~10 $\mu\text{mol/l}$ 인 것에 반하여 호모시스테인의 농도가 14 $\mu\text{mol/l}$ 이상일 때 노인성치매를 가질 위험이 약 4.6배 높은 것으로 보고되고 있다(Malaguarnera *et al.*, 2004; Quadri *et al.*, 2004; van Wymelbeke *et al.*, 2004). 이러한 혈중호모시스테인의 독성에 대한 인식과 더불어 이의 제어

Correspondence to: Jong-Bong Kim, Department of Medicinal Life Science, Catholic University of Daegu, Hayang-eup, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-702, Korea
E-mail: jbkim@cu.ac.kr

에 대한 연구도 많이 이루어져 왔다.

호모시스테인은 메티오닌으로 전환되는 메틸화(methylation)와 cystathionine으로 전환되는 황화(transsulfuration) 과정을 통해 혈중 농도가 제어된다. 호모시스테인의 대사는 serine, betaine 등 아미노산을 비롯하여 비타민 B₁₂와 B₆ 그리고 엽산 등 다양한 조효소들에 의해 활성화된다(Allen et al., 1998; Finkelstein, 1998). 이는 단 하나의 물질로 혈중 호모시스테인 농도를 제어할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서 혈중 호모시스테인을 제어할 수 있는 가장 중요한 방법으로 아미노산과 비타민이 풍부한 추출물이 가장 바람직한 접근이다. 이러한 측면에서 표고버섯은 다른 어떤 약용식물보다 호모시스테인 대사 경로를 촉진시키는 serine, betaine이 다량 함유하며 미네랄이 풍부하여 호모시스테인을 제어할 수 있는 좋은 재료로 사료된다.

또한 호모시스테인 감소 효능과 더불어 노인성치매의 주요 원인의 하나인 뇌신경세포의 노화에 대한 영향을 확인할 필요성이 있다. 개체 수준에서의 노화와는 달리 세포 수준에서 노화는 "복제 세네센스 현상(replicative senescence)"으로 정의된다. 복제 세네센스 현상이란 조직에서 분리된 세포가 일차세포배양(primary cell culture) 동안 특정 횟수만큼 population doubling(PD) 또는 분열을 한 후 비가역적으로 더 이상 증식을 하지 않는 세포 상태를 의미한다(Campisi, 1996; Counter et al., 1992; Dimri et al., 1995; Goldstein, 1990; Hastie et al., 1990). 세네센스 세포는 정상적인 세포보다 PD 횟수가 적은 것이 특징으로 세네센스 세포의 생물학적 지표로 이용되고 있다(Bierman, 1978). 뇌신경세포의 세네센스 촉진은 노화와 여러 질환의 원인으로 잘 알려진 프리라디칼(free radical) 또는 유해활성산소(reactive oxygen species; ROS)에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 기인한다는 것이 가장 대표적인 기전이다(Chen et al., 1995; Furumoto et al., 1998; Gredilla et al., 2001). 특히 호모시스테인에 의한 노인성치매는 산화적 스트레스와 β -amyloid 생성에 의한 신경세포의 노화와 피사를 유도하는 것으로 추정되고 있다(Mursu et al., 2005; Perna et al., 2003). 따라서 호모시스테인에 의한 산화적 스트레스가 세포의 세네센스 촉진에 대한 영향과 표고버섯에 의한 항세네센스 효능을 통해 뇌신경세포의 노화지연을 검증할 수 있다.

본 연구에서는 표고버섯분말을 이용하여 호모시스테인-유도성 뇌신경세포 노화의 지연에 대한 효능을 확인하는 것이다. 이를 위해 생체 내에서 표고버섯에 의한 혈청호모시스테인 농도에 따른 영향의 확인을 우선적으로 하였다. 특히 뇌조직의 노화와 손상의 원인인 산화적 스트레

스의 변화에 대한 측정이 이루어졌다. 또한 노화 지연에 대한 실험을 위해 출생과 동시에 분리된 랫드의 뇌신경세포를 분리, 배양을 통해 호모시스테인의 변화량과 뇌신경세포의 PD에 대한 실험을 하였다.

재료 및 방법

In vivo 및 in vitro 실험의 전반적 절차. 호모시스테인-유도성 뇌세포의 노화에 대한 표고버섯분말의 지연 효과를 확인하기 위해 (주)오리엔트에서 구입한 8주령(200 ± 20 g) SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 실험쥐이용하여 in vivo에서 혈청호모시스테인 농도변화에 대한 실험이 우선적으로 이루어졌다. 동물사육은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~30회/h, 조명시간 12 hrs(08:00 점등~20:00 소등) 그리고 조도 150~300 Lux로 설정된 대구가톨릭대학교 바이오안전성센터의 SPF 실험동물실에서 수행되었다. 특히 농도변화에 대한 실험은 호모시스테인 또는 호모시스테인-유도물질 투여없이 표고버섯분말 식이군과 대조군의 차이를 확인하는 것으로 이루어졌다. 혈청호모시스테인의 변화에 의한 뇌조직의 산화적 스트레스의 정도도 확인하였다. 뇌세포 노화의 지표인 PD 측정은 in vivo 상태에서는 불가능하기 때문에 출생 3일된 실험쥐의 뇌세포를 적출, 계대배양을 통해 이루어졌으며 호모시스테인 측정 등

Table 1. Experimental flowchart of in vivo and in vitro. In vivo 실험에서는 군당 SD 6마리가 이용되었으며 in vivo는 표고버섯분말, in vitro에서는 표고버섯열추출물이 투여되었다

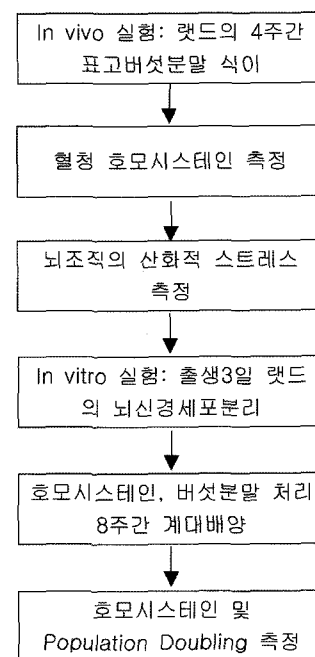


Table 2. Composition of *Lentinus edodes*-powder (per 100 g)

수분	단백질	지방	탄수화물	회분	칼슘	인	철	비타민
15.8 g	12.5 g	1.6 g	65.5 g	4.6 g	16 mg	240 mg	3.9 mg	11.50 mg

의 시험절차는 Table 1과 같다.

실험쥐의 표고버섯분말 식이 및 in vitro 투여. 본 실험에서 사용한 표고버섯분말(*Lentinus edodes*-powder)은 경기도 가평군 설악면에 있는 요나농산으로부터 획득하였다. 실험쥐 투여 표고버섯분말은 건조한 다음 분쇄기를 이용해 80Mesh의 체로 걸러서 얻었다. 건표고는 표고버섯이 포함하고 있는 단백질, 각종 아미노산, 비타민, 무기질 등의 손실과 파괴를 막기 위하여 건열기를 이용하지 않고 자연적인 햇빛으로 통해 수확되었다. 본 실험에 이용된 표고버섯의 분석성적표는 Table 2와 같다. 식이는 방사선 멸균된 (주)뿌리나의 일반사료에 분말 10%를 첨가하여 4주 동안 자유롭게 섭취시켰다. 대조군과 표고버섯분말 식이군당 6마리 실험쥐가 이용되었다. 출생 3일된 실험쥐의 뇌세포를 이용한 in vitro 실험에서는 미생물오염을 예방하기 위해 표고버섯분말의 열수추출하여 배양액에 투여하였다. 따라서 in vivo와 in vitro 실험에서 투여된 표고버섯분말은 실험방법의 차이에 기인에 의해 성분의 다소 차이가 있을 수 있고 두 성분의 차이를 분석하기에는 다소 어려운 점이 있어 수행을 하지 못하였다.

호모시스테인 농도 측정. 심장에서 채혈한 혈액은 37°C에서 30분 동안 응고시킨 다음 16,000×g에서 2분간 원심 침전하여 혈청을 분리하고 -20°C 냉동고에 보관하면서 분석에 사용하였다. 또한 in vitro에서의 호모시스테인 측정은 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에서 이루어졌다. 호모시스테인 측정은 (주)녹십자의 임상분석센터에 의뢰하여 Direct Chemiluminescent를 이용한 Competitive Immunoassay 방법을 이용하여 이루어졌다.

산화적 스트레스 측정

지질과산화(lipid peroxidation): 지질과산화 정도는 Thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS) 반응을 통해 확인하였다. 세포 lysis 후 homogenization을 하여 20분 동안 4°C에서 3000×g으로 원심분리하였다. 상등액을 10% trichloroacetic acid (TCA)로 침전시킨 후 5분 동안 4°C에서 4000 rpm으로 원심분리시킨다. 상층을 동일한 양의 0.67% TBA으로 15분 동안 100°C에서 반응시키며 어두운 실온에서 냉각시켰다. Fluorescence Perkin Elmer spectrofluorimeter (ex. = 515 nm; em. = 553 nm)을 이용하여 측정하였다. TBARS양은 Malondial-

dehyde standard curve을 이용하여 계산하였다.

단백질 카보닐기(Protein carbonyl content): 세포질 분획을 Levine *et al.*(1999)의 방법에 따라 측정하였다. 상층액의 Aliquots를 vacuum을 이용하여 건조시킨 후 2 M HCl(10 mM dinitrophenylhydrazine 함유)으로 다시 현탁시켰다. 20% TCA precipitation의 단백질을 guanidine solution(6 M guanidine, 20 mM potassium phosphate, pH 2.3)으로 37°C에서 녹였다. 불용성 물질을 원심분리시켜 제거한 후, 375 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. Molar extinction coefficient인 22,000 M⁻¹cm⁻¹를 이용하여 계산하였다.

일차뇌신경세포의 분리와 배양. 일차뇌신경세포(Primary neuron cell) 배양은 (주)오리엔트에서 구입한 암수 SD의 교배를 통해 얻은 출생 3일된 실험쥐의 대뇌피질로부터 획득하였다. Cortice를 분리 후, 잘게 절단하여 minimal essential medium(MEM with 30 mM glucose, 2 mM glutamine, DNase I, trypsin)으로 희석시켰다. 분쇄된 조직을 나일론 망사에 거르고 효소의 불활성을 위해 horse serum을 첨가하였다. 세척 후, 세포는 표준 MEM(30 mM glucose, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicilin, 10 ng/ml streptomycin을 포함)에 담은 후, 5% horse serum을 첨가하였다. 10⁵ cells/ml를 25T Flask에 분양하고 3 passage를 지난 후 실험에 이용되었다. 세포 유지는 triplicate를 동일한 배양액으로 계대를 통해 이루어졌다.

뇌신경세포에 대한 호모시스테인 투여. 호모시스테인은 배양액에 20 μM을 투여하였으며 계대배양 후에도 이 농도를 유지하였다. 열수추출된 표고버섯분말은 배양액에서 약 1% 유지되도록 배양시 추출액 120 μl를 처리하였다. 세포계대배양은 약 1주일 간격으로 약 8주 동안 이루어졌다.

Population doubling 횟수 계산. 누적 PD 횟수에 대한 계산은 Martens 등(2000)에 의한 방법을 이용하였으며 그 공식은 다음과 같다.

$$PD = \log_2 (D/D_0)$$

D = the density of cells at harvesting,

D₀ = the density of cells at seeding

통계처리. 대조군과 실험군간의 유의성은 SPSS 12.0 K 프로그램의 Fisher's test와 ANOVA test 방법을 이용하였다.

결 과

혈청호모시스테인 농도. 본 실험에서 혈청호모시스테인 증가를 유도하거나 호모시스테인 자체를 투여하지 않고 정상적인 생체내에서 호모시스테인 농도에 대한 약 4주간 표고버섯분말 식이의 영향을 확인하였다. 표고버섯분말을 식이지 않은 일반 실험쥐의 대조군은 $5.63 \pm 0.9 \mu\text{mol/l}$, 표고버섯분말식이군은 $4.36 \pm 0.9 \mu\text{mol/l}$ 로 버섯식이에 의해 약 30% 정도의 혈청호모시스테인 농도가 감소하였다(Fig. 1).

뇌조직의 산화적 스트레스. 약 4주간의 표고버섯분말 식이를 시킨 후, 뇌조직을 적출하여 산화적 스트레스의 지표인 지질과산화와 단백질 카보닐기 정도를 확인하였다.

지질과산화. 대조군에서 지질과산화 정도를 나타내는 TBARS의 양은 $3.85 \pm 0.46 \text{ nmol/mg protein}$ 이었으며 표고버섯분말식이군은 $2.74 \pm 0.33 \text{ nmol/mg protein}$ 이었다. 표고버섯분말에 의해 약 36%의 지질과산화 정도가 뇌조직에서 유의하게 감소되었다(Fig. 2).

단백질 카보닐기의 함량. 대조군에서 단백질 산화 정도를 나타내는 카보닐기함량은 $0.068 \pm 0.025 \text{ nmol/mg protein}$ 이었으며 표고버섯분말식이군은 $0.039 \pm 0.011 \text{ nmol/mg}$ 이었다. 표고버섯분말에 의해 단백질 산화 정도

가 약 70%가 뇌조직에서 유의하게 감소되었다(Fig. 3).

일차배양뇌신경세포에 투여된 호모시스테인의 농도변화.

출생 3일된 실험쥐 SD로부터 획득한 뇌신경세포를 호모시스테인과 표고버섯분말을 처리하여 약 8 주간 계대배양하였다. 배양액에 투여된 호모시스테인의 농도를 측정하여 표고버섯분말의 효능을 확인하였다. 호모시스테인 투여군은 $1.1 \pm 0.14 \mu\text{mol/l}$, 호모시스테인을 처리하지 않은 대조군은 $0.095 \pm 0.071 \mu\text{mol/l}$ 이었다. 그러나 표고버섯분말을 처리한 군에서 호모시스테인이 전혀 검출되지

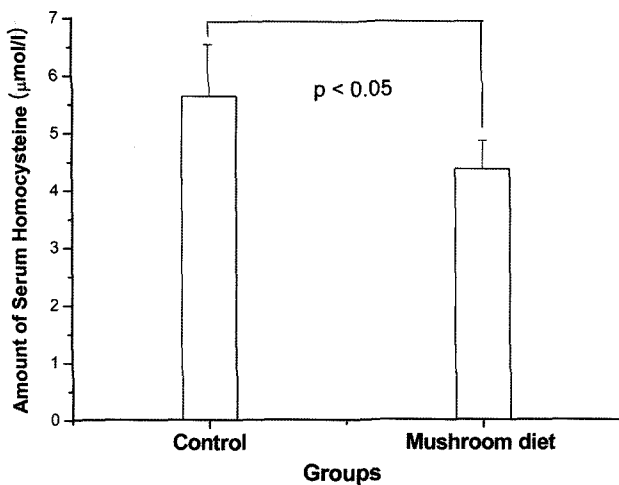


Fig. 1. Serum homocysteine concentrations (mean ± SD). Homocysteine concentrations were measured in blood after *Lentinus edodes*-powder diet for 4 weeks. There was a significant difference in amount of serum homocysteine between two groups (6 rats per group).

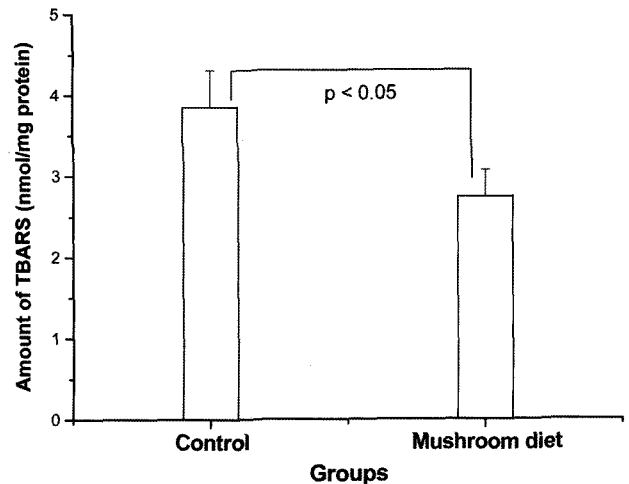


Fig. 2. Level of lipid peroxidation in rat-brain tissues (mean ± SD). Level of lipid peroxidation was measured after *Lentinus edodes*-powder diet for 4 weeks. There was a significant difference between two groups (6 rats per group).

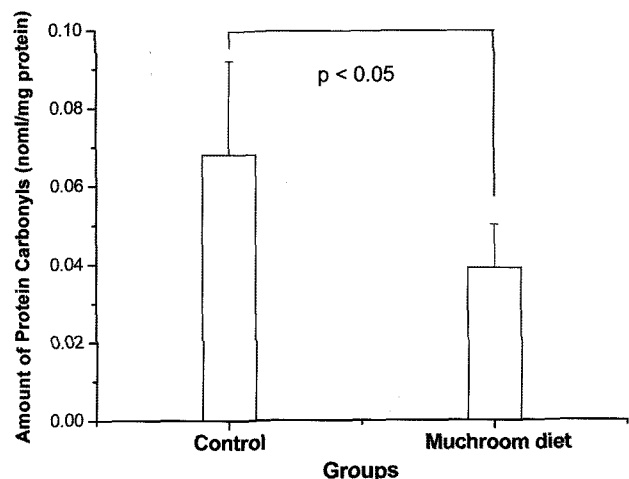


Fig. 3. Amount of protein carbonyls in rat-brain tissues (mean ± SD). Amount of protein carbonyls was measured after *Lentinus edodes*-powder diet for 4 weeks. There was a significant difference between two groups (6 rats per group).

Table 3. Homocysteine concentrations in neuron cells (mean ± SD). The neuron cells were isolated from cerebral cortex of 3 day-old rats. There was no homocysteine in any cells treated with *Lentinus edodes*-powder (ND: not detected)

군	대조군	호모시스테인 투여군	호모시스테인-버섯 투여군	버섯투여군
호모시스테인 농도(μmol/l)	0.095 ± 0.071	1.1 ± 0.14	ND	ND

않았다(Table 3).

일차배양뇌신경세포의 Population doubling. 일차뇌 신경세포에 호모시스테인과 표고버섯분말 추출액을 처리한 후 계대배양을 통해 계산된 세포의 군별 PD 횟수를 Fig. 4에 나타냈다. 각 군별 배양은 triplicate로 이루어졌으며 계대는 약 1주일마다 이루어졌다. 약 8주간의 7번 계대배양 후 PD 횟수는 대조군은 25.41 ± 0.11, 호모시스테인 투여군은 24.08 ± 0.11, 호모시스테인과 표고버섯추출물 투여군은 25.07 ± 0.31, 표고버섯추출물 투여군은 26.49 ± 0.21 PD 횟수가 확인되었다. 호모시스테인에 의해 뇌신경세포의 PD 횟수가 유의하게($p < 0.05$) 감소했으나 호모시스테인과 표고버섯추출물 투여군과 대조군간의 PD 횟수는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 또한 표고버섯추출물 투여된 대조군의 PD 횟수는 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

결론 및 고찰

우선적으로 본 실험에서는 *in vivo*에서 표고버섯분말 투여에 의한 혈청호모시스테인 농도변화를 확인하였다.

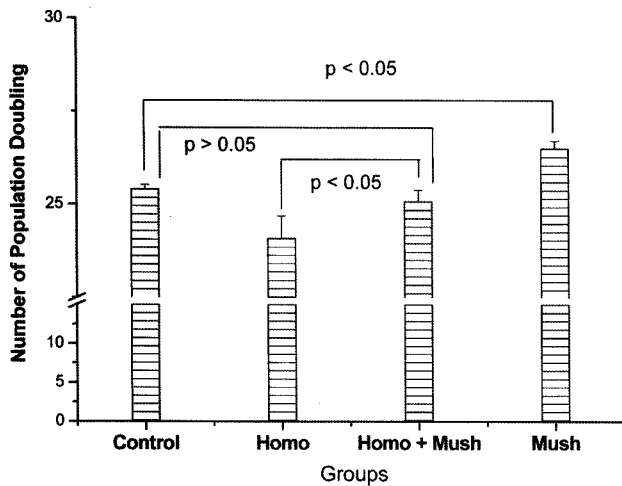


Fig. 4. Number of population doubling (mean ± SD). The neuron cells isolated from 3 day old-rat barin were cultured (triplicate per group) for 8 weeks. Homo: group treated with homocysteine, Homo + Mush: group treated with homocysteine and *Lentinus edodes*-powder, Mush: group treated with *Lentinus edodes*-powder.

실험쥐의 혈청호모시스테인 농도가 대조군의 5.63 ± 0.9 μmol/l, 표고버섯분말군의 4.36 ± 0.9 μmol/l으로 표고버섯분말 식이에 의해 약 30% 정도의 1.27 μmol/l 혈청호모시스테인 농도가 감소하였다. 고혈청호모시스테인은 심혈관질환, 말초혈관질환 뿐만 아니라 뇌혈관질환의 독립적 위험요인으로 확인되고 있다(Fortin *et al.*, 1995; Malinow *et al.*, 1998). 이와 관련하여 최근 연구에 의하면 정상인의 농도가 8~10 μmol/l인 것에 반하여 호모시스테인의 농도가 14 μmol/l 이상일 때 즉 약 50% 증가하면 노인성치매를 가질 위험이 약 4.6배 높을 것으로 추정하고 있다(Gallucci *et al.*, 2004; Prasad, 1999). 특히 혈청호모시스테인 농도는 나이와 비례하여 증가하며 혈관성 뇌신경세포의 퇴행에 의한 노인성치매에 대한 생물학적 지표(biomaker)로 이용되고 있다(Michael, 2004).

호모시스테인에 의한 이러한 질환의 원인은 직접적으로 표적세포에 작용에 의한 것으로도 설명이 되고 있으나 대사과정에서의 산화적 스트레스로도 최근 연구에 의해 설명되고 있다. 호모시스테인 대사는 세포내에서 산화환원전위(redox potential)에 의해 조절된다. Fig. 5에서처럼 호모시스테인 대사 또는 제거를 위해 관련되는 여러 효소는 이러한 산화적 환경(oxidative status)에 의해 활성이 된다(Mosharov *et al.*, 2000; Zou and Banerjee, 2005). 특히 methionine synthase는 산화적 환경에서 활성이

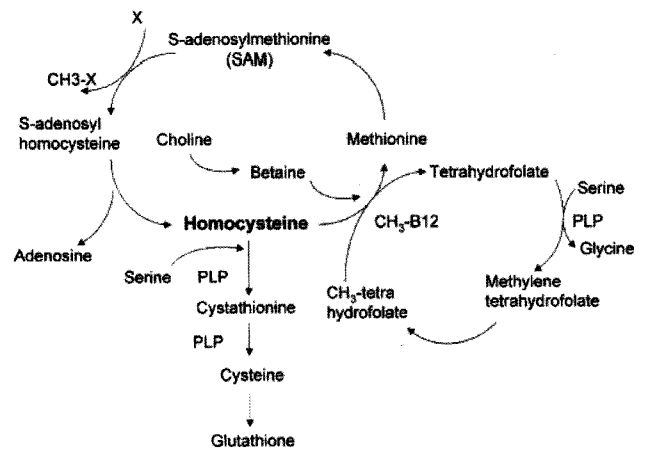


Fig. 5. Metabolic pathways of homocysteine. Homocysteine is an intermediate in the synthesis of cysteine from methionine. A deficiency of vitamin B₁₂, folic acid, and/or vitamin B₆ can block this pathway, causing build-up of toxic levels of homocysteine.

증가되어 호모시스테인을 cysteine이나 glutathione으로 전환(transsulfuration pathway)시켜 제거한다. 이러한 transsulfuration pathway가 방해된다면 호모시스테인 자체는 자동산화(autooxidation)를 통해 산화환원 항상성(redox homeostasis)을 저해하여 세포내 산화적 스트레스를 유도하게 된다(Vityisky et al., 2004). 연구에 의하면 transsulfuration pathway에서 중요한 역할을 하는 methionine synthase의 활성이 낮으면 또한 ROS 생성을 증가시키는 것으로 확인되었다(Baydas et al., 2005). 이러한 산화적 스트레스는 뇌신경세포에 대한 호모시스테인 독성의 중요한 기전의 하나로 오늘날 고려되고 있다(Rasek et al., 2005; Selley, 2004). 특히 호모시스테인은 산화적 스트레스를 유발하여 노인성치매의 주요 원인 물질인 β -amyloid의 뇌신경세포에 대한 독성을 증가시키는 것으로 알려졌다(Ho et al., 2001).

호모시스테인에 의한 산화적 스트레스와 관련하여 본 연구에서는 *in vivo*에서 뇌조직을 적출하여 산화 정도를 측정하였다. 대조군의 산화적 스트레스의 지표인 지질과 산화와 단백질 카보닐기 정도가 표고버섯식이에 의해 각각 약 36%와 약 70% 감소하였다. 앞서 언급하였듯, 4주간의 표고버섯분말 식이에 의해 실험쥐에 있어서 혈청호모시스테인이 약 30% 감소하였다. 그러나 본 실험을 통해 확인된 표고버섯분말 투여에 의해 감소한 혈청호모시스테인 농도와 뇌조직에 있어서 산화적 스트레스의 감소가 표고버섯분말 투여에 의한 것으로 추정되지만 직접적으로 호모시스테인 감소에 의한 뇌조직의 산화적 스트레스로 판단하기에는 어렵다.

이러한 관련성을 좀 더 명확하게 이해하기 위해서는 호모시스테인 생성과 뇌로 어떻게 이동되는가에 대한 이해가 필요하다. 혈액의 호모시스테인이 뇌로의 이동은 아직까지 완전히 이해되고 있지는 않지만 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)을 통해 뇌신경세포의 수용체에 의한 능동수송에 의존하는 것으로 알려졌다(Zeise et al., 1988). 특히 호모시스테인은 이러한 수송시스템에 의존하여 혈액에서 뇌신경세포에 이동도 하지만 뇌세포 자체에서도 호모시스테인이 생성되는 것으로 확인되었다(Ho et al., 2003). 뇌와 뇌척수액에서의 호모시스테인 농도가 여러 뇌신경성 질환에서 증가되는 것으로 확인되었고 이러한 증가는 혈액의 호모시스테인 농도와 비례적으로 증가한다(Eto et al., 2002). 그러나 이들 연구에 의하면 혈액 호모시스테인 농도가 뇌 및 뇌척수액에서의 농도보다 약 20~100배 정도 높다. 비록 호모시스테인이 뇌에서 자체적으로 생성이 가능하나 혈액의 호모시스테인 농도에 대한 조절이 뇌에서의 호모시스테인 농도 조절과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 표고버섯분말

식이에 의한 혈청호모시스테인 감소와 뇌조직의 산화적 스트레스는 표고버섯의 혈청호모시스테인 농도 조절 및 항산화적 효능에 의한 것으로 추정된다.

호모시스테인이 신경퇴화성 질환 및 신경세포 노화와 관련이 있다는 것은 잘 알려진 사실이다. 특히 혈청호모시스테인 농도가 나이와 비례하여 증가된다는 것은 노화성 뇌신경퇴화에 기인하는 노인성치매에서 확인할 수 있다(McCaddon et al., 2001; Ravaglia et al., 2005; Seshadri et al., 2002). 일반적으로 뇌신경세포의 퇴화란 결국 뇌신경세포의 상해 및 세포 노화 축진을 통해 그 기능이 감소하거나 상실하는 것을 의미한다. 이와 관련하여 본 연구에서는 뇌세포노화와 관련된 세포복제 세네센스 현상과 호모시스테인 농도 그리고 이들에 대한 표고버섯의 영향을 뇌세포의 PD를 통해 확인하였다.

본 연구에서는 호모시스테인에 의한 뇌세포의 세네센스 현상과 표고버섯 분말 투여를 통해 뇌세포 노화 지연 효과를 PD로 확인하였다. 이러한 PD 횡수를 확인하기 위해서는 무엇보다도 태아 상태의 뇌조직을 획득하여 실험이 이루어지는 것이 바람직하나 본 연구에서는 출생 3일 되는 실험쥐의 대뇌피질에서 획득한 뇌조직을 이용하여 PD를 확인하였다. 호모시스테인 처리에 의해 뇌세포의 PD 횡수가 유의하게 감소하였으나 표고버섯 투여로 대조군과 유사한 PD 횡수가 확인되었다. 또한 호모시스테인을 투여하지 않은 대조군에 표고버섯을 투여한 결과 PD 횡수가 유의하게 증가하였다. 이는 표고버섯이 호모시스테인에 의한 뇌신경세포 PD 감소를 억제할 뿐만 아니라 정상적인 세포의 PD 횡수를 증가를 유도하는 것으로 추측된다. 호모시스테인과 관련하여 PD 및 세포 세네네센스 현상에 대한 연구는 최근에 시작되어 극히 미미한 편이다. 연구에 의하면 호모시스테인에 의해 혈관내피세포(endothelial cell)의 세네센스가 촉진되는 것으로 확인되었다(Dong et al., 2005). 특히 최근에는 혈관내피세포의 세네센스 촉진뿐만 아니라 내피세포의 전구세포(progenitor cell)에 대한 생장을 억제하는 것으로 호모시스테인에 의한 동맥경화증 등 혈관성질환의 원인으로 설명되고 있다(Zhu et al., 2006). *In vitro* 시험에서 이러한 호모시스테인에 의한 혈관내피세포의 세네센스 축진은 결국 복제 능력 즉 PD 횡수를 감소시키는 것으로 *in vivo*에서 세포 노화를 촉진시키는 간접적 증거로 볼 수 있다. 호모시스테인에 의한 세포 세네센스 축진은 혈관내피세포의 경우에는 텔로머라제(telomerase)의 활성 감소로 설명되고 있다(Zhu et al., 2006). 그러나 생체의 다양한 종류의 세포 중에서 텔로머라제 활성이 없는 세포가 대부분이기 때문에 호모시스테인에 의한 텔로머라제 활성 감소로 모든 세포의 세네센스 기전으로 설명하기에는 부족하다. 호모시

스테인에 의한 세네센스 기전에 대한 설명은 아니지만 일반적인 세네센스 기전은 항암유전자 생성물인 p53 또는 RB 단백질의 과도발현으로 특정세포에서 세네센스 기전으로 설명되고 있다(Serrano *et al.*, 1997; Sugre *et al.*, 1999). 특히 흥미로운 점은 이들 단백질들이 세포내 산화환원전위차를 조절한다는 점이다(Johnson *et al.*, 1996; Polyak *et al.*, 1997). 앞서 언급하였듯, 이러한 점은 trans-sulfuration pathway의 방해로 호모시스테인 생성에 의한 산화환원 항상성 저해와 연관하여 이해 할 수도 있다. 그러나 세포배양에서 세포주기를 제한하는 세네센스 현상의 가장 중요한 원인으로는 텔로미어 단축(telomere shortening)으로 설명되고 있다. Harley *et al.*(1990)에 의하여 세포의 PD 횡수에 따라 텔로미어 길이가 짧아지는 것이 사람 섬유아세포의 *in vitro* 시스템에서 확인되었다. 또한 텔로미어 길이에 의해 세포의 잠재적 복제 능력을 예견할 수 있을 뿐만 아니라 연령 증가와 더불어 길이가 짧아지는 것이 확인되었다(Allsopp *et al.*, 1996). 이는 텔로미어 길이가 세포 PD 횡수와 반비례하며 세포의 세네센스와 개체 노화의 관련성을 보여주는 중요한 도구임을 설명해 준다. 이러한 텔로미어 특정길이가 세포의 세네센스를 유도하는 중요한 신호 역할을 하는데 산화적 스트레스가 텔로미어와 작용하여 길이 단축을 촉진시킨다. 산화적 스트레스에 의한 세네센스에 대한 연구는 텔로미어 단축의 관점에서 다소 이루어졌다. 연구 결과에 의하면 H₂O₂, tert-butyl-hydroperoxide와 고산소 환경 등에 의해 섬유아세포의 텔로미어가 약 5~10배 정도 빠르게 단축이 이루어지며 조숙한 세네센스를 유도하는 것이 확인되었다(Vaziri *et al.*, 1997; von Zglinicki *et al.*, 2000; von Zglinicki *et al.*, 1995). 따라서 세포분열에 의해 감소하는 텔로미어는 산화적 스트레스에 의한 손상을 통해 더욱 단축되어 세포의 조숙한 세네센스 현상 유도하는 것으로 해석된다.

이러한 사실을 바탕으로 호모시스테인에 의한 세네센스 촉진은 산화적 스트레스 유도과 밀접한 관련성이 있을 것으로 추정된다. 특히 호모시스테인-유도성 산화적 스트레스는 혈관세포를 비롯하여 뇌신경세포의 상해를 유도하게 하여 다양한 질환의 원인으로 확인되었다(Perna, 2003). 따라서 호모시스테인에 의한 산화적 스트레스는 텔로미어에 대한 영향을 통해 세포의 세네센스를 유도하며 결과적으로 뇌신경세포의 퇴화 및 노화를 유도하여 노인성치매를 비롯한 다양한 질환을 유발할 것으로 추정된다. 세포 세네센스의 생물학적 지표인 PD만 포함된 본 연구에서는 향후 텔로미어 길이, *in vitro*에서의 산화적 스트레스 정도 그리고 세네센스 세포 확인을 위한 β -galactosidase 염색 등에 대한 실험을 추가적으로 수행하여 호모시스테인에 의한 세

포 세네센스 현상을 좀 더 명확하게 할 필요성 있다.

그러나 표고버섯분말에 의한 PD 횡수 증가는 호모시스테인에 의한 뇌신경세포 노화를 지연시키며 정상적인 세포 또한 노화를 억제시키는 가능성이 있는 것으로 사료된다. 이와 같이 표고버섯의 호모시스테인 제어를 통한 뇌신경세포의 항노화 효능은 다양하고 풍부한 아미노산과 비타민 함유에 기인하는 것으로 사료된다. Fig. 5에서처럼 호모시스테인의 대사는 serine, betaine 등 다양한 아미노산을 비롯하여 비타민 B₁₂와 B₆ 그리고 엽산 등 다양한 조효소들에 의해 활성화된다. 이는 단 하나의 물질로 혈중 호모시스테인 농도를 제어할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서 호모시스테인을 제어할 수 있는 가장 중요한 방법으로 호모시스테인 대사와 관련된 아미노산과 비타민 등 여러 물질을 풍부하게 함유한 표고버섯을 비롯하여 버섯류가 적절한 것으로 사료된다. 특히 호모시스테인에 의한 뇌신경세포의 노화는 본 연구 및 여러 연구에서 확인된 산화적 스트레스가 중요한 원인으로 고려됨으로 호모시스테인 제거와 동시에 항산화적 기능을 가진 것을 통해 예방이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 산학연 컨소시엄 연구개발비 지원을 받아 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Allen, R.H., Stabler, S.P. and Lindenbaum, J. (1998). Relevance of vitamins, homocysteine and other metabolites in neuropsychiatric disorders. *Eur. J. Pediatr.*, **157**, 122-126.
- Allsopp, R.C. (1996). Models of initiation of replicative senescence by loss of telomeric DNA. *Gerontol.*, **31**, 235-243.
- Baydas, G., Ozer, M., Yasar, A., Tuzcu, M. and Koz, S.T. (2005). Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. *Brain Res.*, **1046**, 187-194.
- Bierman, E.L. (1978). The effect of donor age on the *in vitro* lifespan of cultured human arterial smooth-muscle cells. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **14**, 951-955.
- Bleich, S.M., Carl, K., Bayerlein, K., Reulbach, U., Biermann, T., Hillemacher, T. and Bonsch, D. (2005). Evidence of increased homocysteine levels in alcoholism, the Franco-Italian alcoholism research studies (FARS). *J. Alcohol Clin. Exp. Res.*, **29**, 334-336.
- Campisi, J. (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell*, **23**, 497-500.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J. and Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **9**, 4337-4341.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G.,

- Greider, C.W., Narley, C.B. and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*, **11**, 1921-1929.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. and Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 9363-9367.
- Dong, F., Zhang, X., Li, S.Y., Zhang, Z., Ren, Q., Culver, B. and Ren, J. (2005). Possible involvement of NADPH oxidase and JNK in homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc. Toxicol.*, **5**, 9-20.
- Finkelstein, J.D. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.*, **157**, 40-44.
- Fortin, L.J. and Genest, J. Jr. (1995). Measurement of homocysteine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin. Biochem.*, **28**, 155-162.
- Furumoto, K., Inoue, E., Nagao, N., Hiyama, E. and Miwa, N. (1998). Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci.*, **63**, 935-948.
- Eto, K.T., Asada, K., Arima, T., Makifuchi, H. and Kimura. (2002). Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1485-1488.
- Gallucci, M., Zanardo, A., De Valentin, L. and Vianello, A. (2004). Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.*, **9**, 195-200.
- Goldstein, S.E. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, 1129-1132.
- Gredilla, R., Barja, G. and Lopez-Torres, M. (2001). Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. *Free Radic. Res.*, **35**, 417-425.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. *Nature*, **345**, 458-460.
- Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. and Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, **346**, 866-868.
- Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E. and Shea, T.B. (2001). Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.*, **78**, 249-253.
- Ho, P.I., Ashline, D., Dhitavat, S., Ortiz, D., Collins, S.C., Shea, T.B. and Rogers, E. (2003). Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol.*, **14**, 32-42.
- Iso, H., Moriyama, Y., Sato, S., Kitamura, A., Tanigawa, T., Yamagishi, K., Imano, H., Ohira, T., Okamura, T., Naito, Y. and Shimamoto, T. (2004). Serum total homocysteine concentrations and risk of stroke and its subtypes in Japanese. *Circulation*, **24**, 304-318.
- Johnson, T.M., Yu, X.Z., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A. and Finkel, T. (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11848-11852.
- Langman, L.J. and Cole, D.E. (1999). Homocysteine: cholesterol of the 90s? *Clin. Chim. Acta.*, **286**, 63-80.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskowitz, J., Mosoni, L. and Stadtman, E.R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing. Dev.*, **15**, 323-332.
- Malaguamera, M., Ferri, R., Bella, R., Alagona, G., Carnemolla, A. and Pennisi, G. (2004). Homocysteine, vitamin B12 and folate in vascular dementia and in Alzheimer disease. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **42**, 1032-1035.
- Malinow, M.R., Levenson, J., Giral, P., Nieto, F.J., Razavian, M., Segond, P. and Simon, A. (1998). Role of blood pressure, uric acid, and hemorheological parameters on plasmahomocyst(e)ine concentration. *Atherosclerosis*, **24**, 175-183.
- Martens, U.M., Chavez, E.A., Poon, S.S., Schmoor, C. and Lansdorp, P.M. (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res.*, **10**, 291-299.
- McCaddon, A., Hudson, P., Davies, G., Hughes, A., Williams, J.H. and Wilkinson, C. (2001). Homocysteine and cognitive decline in healthy elderly. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **12**, 309-313.
- McCully, K.S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **56**, 111-128.
- Michael, C. (2004). Irizary Biomarkers of Alzheimer Disease in Plasma. *euroRX*, **1**, 226-234.
- Mosharov, E., Cranford, M.R. and Banerjee, R. (2000). The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the trans-sulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*, **24**, 13005-13011.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Nummi, T., Alfthan, G., Virtanen, J.K., Rissanen, T.H., Happonen, P., Nyyssonen, K., Kaikkonen, J., Salonen, R. and Salonen, J.T. (2005). The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total-homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 527-534.
- Polyak, K.Y., Xia, J.L., Zweier, K.W., Kinzler, B. and Vogelstein. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, **389**, 300-305.
- Perna, A.F. (2003). Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids*, **23**, 409-417.
- Prasad, K. (1999). Homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease. *Int. J. Angiol.*, **8**, 76-86.
- Quadri, P., Fragiaco, C., Pezzati, R., Zanda, E., Forloni, G., Tettamanti, M. and Lucca, U. (2004). Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 114-122.
- Racek, J., Rusnakova, H., Trefil, L. and Siala, K.K. (2005). The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. *Physiol. Res.*, **54**, 87-95.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Martelli, M., Servadei, L., Brunetti, N., Porcellini, E. and Licastro, F. (2005). Homocys-

- teine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **82**, 636-643.
- Schlienger, J.L. (2003). Homocysteine and alcohol consumption. An ambiguous relationship and a new paradox. *Presse Med.*, **15**, 262-267.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W. and Wolf, P.A. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, **14**, 476-483.
- Selley, M.L. (2004). Homocysteine increases the production of asymmetric dimethylarginine in cultured neurons. *Neurosci. Res.*, **77**, 90-93.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **7**, 593-602.
- Sobczak, A., Wardas, W., Zielinska-Danch, W. and Pawlicki, K. (2004). The influence of smoking on plasma homocysteine and cysteine levels in passive, and active smokers. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **42**, 408-414.
- Sugrue, M.M., Wang, Y., Rideout, H.J., Chalmers-Redman, R.M. and Tatton, W.G. (1999). Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 123-130.
- van den Bosch, M.A., Bloemenkamp, D.G., Mali, W.P., Kemmeren, J.M., Tanis, B.C., Algra, A., Rosendaal, F.R. and van der Graaf, Y. (2003). Hyperhomocysteinemia and risk for peripheral arterial occlusive disease in young women. *J. Vasc. Surg.*, **38**, 772-778.
- van Wymelbeke, V., Guedon, A., Maniere, D., Manckoundia, P. and Pfitzenmeyer, P.A. (2004). 6-month follow-up of nutritional status in institutionalized patients with Alzheimer's disease. *J. Nutr. Health. Aging*, **8**, 505-508.
- Vaziri, H. and Benchimol, S. (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.*, **31**, 295-301.
- Vitvitsky, V., Dayal, S., Stabler, S., Zhou, Y., Wang, H., Lentz, S.R. and Banerjee, R. (2004). Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **287**, 39-46.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W. and Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.*, **220**, 186-193.
- von Zglinicki, T., Pilger, R. and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, **1**, 64-74.
- Zeise, M.L., Knöpfel, T. and Zieglgänsberger, W. (1988). (+/-)-beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to L-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system. *Brain Res.*, **8**, 373-376.
- Zhu, J.H., Chen, J.Z., Wang, X.X., Xie, X.D., Sun, J. and Zhang, F.R. (2006). Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **40**, 648-652.
- Zou, C.G. and Banerjee, R. (2005). Homocysteine and redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 547-559.