피부 섬유모세포 노화에 따른 세포집락 크기의 분포

충남대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 미생물학교실†, 건양대학교 의과대학 미생물학교실‡

김준상* · 김재성* · 조문준* · 박정규† · 백태현‡

목 적 : 유방암 환자의 피부 섬유모세포를 이용한 *in vitro* 배양 실험을 통하여 16 세포집락 비율 분포의 변화를 관찰하여 16 세포집락 비율과 *in vitro* 세포 노화 및 섬유모세포 공여자의 *in vivo* 연령과의 연관성을 조사하고자 하였다.

대상 및 방법 : 유방암 수술을 받은 3명의 환자로부터 얻은 유방부위 피부를 본 실험대상으로 사용하였다. 각 환자의 유방부위 피부로부터 얻은 피부 섬유모세포 표본의 명칭을 C1, C2, C3a 및 C3b로 분류하였으며 각 표본 공여자의 연령은 C1이 44세, C2는 54세, 그리고 C3a 및 C3b는 동일한 공여자로서 연령은 55세였다. 피부 섬유모세포의 단일세포 부유액은 일차조직 배양법으로 얻었으며 100 개의 세포들을 100ml 의 조직배양 flask에 분주 후 37℃에서 2주 동안 배양하였다. 5개의 flask에서 배양한 피부 섬유모세포의 16 세포집락 비율을 알기 위하여 crystal violet으로 염색한 후 10 배율의 입체현미경을 이용하여 16개 세포 이상으로 구성된 세포집락수를 1개 이상으로 구성된 세포집락수로 나눈 수치를 16 세포집락 비율로 나타내었으며 각각 5개의 flask에서 얻어진 16 세포집락 비율 평균치를 각 계대배양에 대한 16 세포집락 비율로 나타내었다. C1, C2의 계대배양 횟수는 각각 12회, 17회 였으며 C3a와 C3b는 14회 계대배양 하였다.

결 과 : C1, C2, C3a 및 C3b 피부섬유모세포 모두에서 16 세포집락 비율이 계대배양 횟수의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 집단이배화증가에 따라 감소하였다. 그리고 계대배양 횟수가 증가함에 따라 집단이배화가 증가되는 것이 관찰되었으며 특히 C3a 섬유모세포의 상관계수가 0.954(P=0.0001)로서 가장 강한 상관관계가 있음을 보였다. 동일한 지점의 집단이배화에서 16 세포집락 비율이 고연령자인 C3a 공여자보다 저 연령자인 C1 공여자에서 더 높게 나타났다.

결 론 : 사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 계대배양 횟수의 증가에 따라 집단이배화는 증가되고, 세포 노화로 인해 16 세포집락 비율은 감소되는 것을 알 수 있었다. 또한 저연령의 피부 섬유모세포일수록 집단이배화 증가에 따른 16 세포집락 비율 감소가 고연령의 경우보다 완만하였다. 따라서 피부 섬유모세포 *in vitro* 배양에서 관찰되는 16 세포집락 비율은 *in vitro* 세포노화의 지표로서 유용하며 또한 피부 섬유모세포 공여자의 연령 평가에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

핵심용어 : 사람 피부 섬유모세포, *In vitro* 노화, 세포집락크기

1)

서 론

한 개의 세포가 육안적으로 관찰 가능한 세포집락으로 성장할 수 있는 것은 세포가 증식능을 갖고 있다는 좋은 증거가 될 수 있으며,[1] 세포 증식능의 감소는 포유동물의 *in vivo* 노화를 반영하는 중요한 면이 될 수 있다.[2]

대부분의 세포주는 제한된 세대수 동안 변형되지 않는 형태로 증식되다가 어떤 시점 이후부터는 소멸되거나 또는 지속적인 세포주로 나타나게 되는데, 대부분의 정상세포들은 지속적인 세포주로 변형되지 않는다.[3] 조직배양시 세포들은 배양환경에 적응하고 지수적 증식을 하는 성장기를 거쳐 유한한 횟수의 이배화(doublings) 과정 후에 점차 분열율이 감소하며 성장인자의 유도증식에 대하여 반응을 보이지 않게 된다.[4] 정상인의 섬유모세포들은 정배수체(euploid)로 유지되며 50에서 100 집단이배화(population doublings) 후 분열이 중단되는 것으로 알려져 있다.[5,8] 또한 인체 신경교세포와 병아리 섬유모세포들도 유사한 과정을 나타내는 것으로 보고되고 있으며,[9,10] 인체의 몇몇 다른 세포 종류에서도 *in vitro*에서 제한된 수명을 보여주고 있다.[7,8]

생체노화의 주요 지표인 세포 증식능의 감소를 측정하기 위한 방법으로서 인체실험은 윤리적인 문제점과 실제적인 제한점 때문에 *in vitro* 실험이 주로 진행되어 왔다. 배양된 사람 이배체 태아 폐 섬유모세포인 WI-38이 *in vitro*에서 제한된 증식능을 보이기 때문에 실험모델로서 광범위하게 연구되어 왔다.[6] 특히 사람 이배체 섬유모세포(human diploid fibroblast)와 유사한 세포들은

이 논문은 1999년 5월 10일 접수하여 1999년 6월 8일 채택되었음.책임 저자 : 김준상, 충남대학교병원 치료방사선과
Tel : 042)220-7860 Fax : 042)256-7621

배양과정 중에서 세포 증식능을 상실하게 되며 제한된 수명을 갖는 것으로 알려져 있으며,[5,6] 이러한 이유로 세포의 노화에 대한 *in vitro* 연구에 있어서 이상적인 세포로 생각되고 있다.[13,14]

Smith 등[2]은 WI-38세포주에 대한 연구에서 한 개의 세포로부터 유래되는 세포집락 크기 분포(colony size distribution)가 사람 이배체 세포배양에 있어 전체적인 증식능에 대한 좋은 지표가 될 수 있으며 세포집락의 크기와 세포의 전체적인 증식능 간에 대한 밀접한 관련이 있다고 보고하였다. 또한 16개 또는 그 이상의 세포로 구성된 집락(이하 16 세포집락)의 비율 분포가 *in vitro* 집단이배화(population doublings)의 정확한 지표가 될 수 있으며, 서로 다른 연령의 사람 피부 섬유모세포를 배양 후 16 세포집락 비율을 관찰한 결과 *in vivo* 사람 세포노화에 대한 좋은 지표가 될 수 있다고 보고하였다.[2]

따라서 본 연구는 유방암 환자의 피부 섬유모세포를 이용한 *in vitro* 배양 실험을 통하여 16 세포집락 비율 분포의 변화를 관찰하여 16 세포집락 비율과 *in vitro* 세포 노화 및 섬유모세포 공여자의 *in vivo* 연령과의 연관성을 조사하고자 하였다.

Table 1. Percentage of Colonies with 16 or more Cells and Population Doublings vs. Passage Number in C1 Human Skin Fibroblast *in vitro* Culture

	Passage number					r* (p)
	0	3	6	9	12	
PDs†	0	3.95	10.08	14.06	16.51	0.985 (0.002)
CSP	87.8	92.1	88.0	80.0	76.5	0.889 (0.044)

*: Correlation coefficient, †: Population doublings
‡: Colony size(percentage of colonies with 16 or more cells)

대상 및 방법

1. 실험대상

유방암 수술을 받은 3명의 환자로부터 얻은 유방부위 피부를 본 실험대상으로 사용하였다. 각 환자의 유방부위 피부로부터 얻은 피부 섬유모세포 표본의 명칭을 C1, C2, C3a 및 C3b로 분류하였으며 각 표본 공여자의 연령은 C1이 44세, C2는 54세, 그리고 C3a 및 C3b는 동일한 공여자로서 연령은 55세였다.

2. 실험방법

1) 일차 조직배양법(primary explant technique)

유방암 환자로부터 얻은 피부조직을 냉 PBS(phosphate buffered saline)에 옮겨 수회 세척한 후 피부 지방층을 제거하고 칼로 약 1mm 입방체로 잘게 정리하였다. 6 well plate에 각 well 당 5 10개의 피부 조각들을 넣은 후 gentamicin, fungazole, 20% fetal calf serum을 포함하는 α-MEM 배지를 0.5 1ml 씩 분주한 후 6 well plate를 37℃에서 배양하면서 피부조직 조각들이 well 바닥에 부착될 때까지 배지를 피부 조각의 상한선까지 보충해 주면서 배양하였다. 피부 조각들이 well 바닥에 부착된 후 배지의 용량을 점차로 5ml로 만들었고 피부 조각 세포들이 분열하여 바닥의 50% 정도 퍼질 때까지 배지를 계속 보충하였고 바닥의 50% 정도 퍼질 때를 세포들이 계대된 것으로 간주하였다.

2) 계대배양(passaging cells)

일차 조직배양에서 피부조각의 세포들이 분열하여 well 바닥의 50%정도 퍼진 후에 배양 well로부터 피펫을 사용하여 남아있는 배지를 제거한 후 남아있는 혈청을 제거하기 위하여 Puck's saline으로 세포들을 세척하였다. 1ml의 trypsin를 첨가한 후 15분간 배양하고 현미경으로 단일 세포들로 분리되었는지 여부를 확인하였다. 만일 세포들이 완전히 단일세포들로 분리되지 않았으면 강한 pipetting으로 단일세포로 분리시켰으며 그후 well에 있는 trypsin을 제거하기 위하여 4 ml의 α-MEM 배지를 넣어 세포들을 세척하여 단일 세포 부유액(single cell suspension)을 만들었다. Hemocytometer를 이용하여 단일세포 부유액의 세포수를 측정하였으며 5개의 100 ml flask에 각각 100개의 세포를 분주하고 37℃에서 2주간 배양하였다.

3) 16 세포집락 비율 측정과 집단이배화(ΔPD)의 계산

본 연구에서는 세포 배양으로 관찰된 총 세포집락들 중 16개 이상의 세포로 구성된 세포집락들의 비율을 세포집락 크기로 정의하여 표현하였다.

5개의 flask에서 배양한 피부 섬유모세포의 16 세포집락 비율을 알기 위하여 crystal violet으로 염색한 후 10 배율의 입체현미경(stereo microscope)을 이용하여 16개 세포 이상으로 구성된 세포집락수를 1개 이상으로 구성된 세포집락수로 나눈 수치를 16 세포집락 비율로 나타내었으며 각각 5개의 flask에서 얻어진 16 세포집락 비율 평균치를 각 계대배양에 대한 16 세포집락 비율로 나타내었다.

$$16\text{ 세포집락 비율}(\%) = \frac{16\text{개 세포 이상 세포집락수}}{1\text{ 개 세포 이상 세포집락수}} \times 100$$

집단이배화 (population doublings)의 계산은 다음과 같이 계산하였다.

$$\Delta PD = \frac{\log N - \log N0}{\log 2}$$

N : N0 수의 세포 접종 후 배양에서 얻어진 세포수,
N0 : 접종세포수

4) 표본 피부 섬유모세포의 계대배양 및 16 세포집락 관찰 횟수

C1 피부 섬유모세포는 12회 계대배양하여 0, 3, 6, 9, 12 계대배양에서 16 세포집락 비율을 계산하였고, C2 섬유모세포는 17회 계대배양하여 16회에서 16 세포집락 비율을 계산하였다. C3a와 C3b 섬유모세포는 동일한 환자의 섬유모세포로서 C3a는 14회 계대배양하여 13회의 16 세포집락 비율을 계산하였고 C3b는 14회 계대배양하였으며 0, 2, 7, 10, 14 계대배양마다 16 세포집락 비율을 계산하였다.

3. 통계 분석

in vitro 세포배양실험에서 계대배양과 16 세포집락 비율과의 상호관계 그리고 16 세포집락 비율과 집단이배화의 상호관계에 대한 통계처리를 PC-SAS 통계프로그램의 상관분석(correlation analysis)을 이용하여 분석하였으며 상관계수(correlation coefficient, r)가 0.8 1이면 강한 상관관계, 0.5 0.8이면 중등도의 상관관계가 있는 것으로 판단하였으며 상관계수에 대한 유의성은 P 값이 0.05 이하일 때 유의한 것으로 분석하였다.

결 과

1. 계대배양 횟수에 따른 16 세포집락 비율의 변화

C1 피부 섬유모세포의 경우 12번째까지 계대배양 중 5회의 16 세포집락 비율을 관찰한 결과 16 세포집락 비율이 계대배양 횟수의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다(Table 1).

C2 피부 섬유모세포의 경우 17번째까지 계대배양 횟수를 증가시키며 16 세포집락 비율을 16회 관찰한 결과 계대배양 횟수의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으나 약한 상관관계를 나타내었다(Table 2).

또한 동일한 공여자였던 피부 섬유모세포 C3a와 C3b 표본의 계대배양 횟수에 따른 16 세포집락 비율을 관찰한 결과로서 두 표본 모두에서 계대배양 횟수의 증가에 따라 16 세포 집락비율이 감소함을 관찰할 수 있었다(Table 3, 4).

2. 계대배양 횟수에 따른 집단이배화의 변화

사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양실험에서 세포의 계대배양 횟수에 따른 집단이배화를 관찰한 결과 세 종류의 C1, C2, C3a 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 계대배양 횟수가 증가함에 따라 집단이배화가 증가되는 것이 관찰되었다(Table 1 3).

3. 집단이배화와 16 세포집락 비율 간의 관계

C1, C2, C3a 피부 섬유모세포 모두 집단이배화가 증가될수록 16 세포집락 비율이 감소되었으며 C3a 섬유모세포의 상관계수가 0.954(P=0.0001)로서 가장 강한 상관관계가 있었고, C1 섬유모세포는 상관계수가 0.832(P=0.08)로 높았으나 중등도의

Table 2. Percentage of Colonies with 16 or More Cells and Population Doublings vs. Passage Number in C2 Human Skin Fibroblast *in vitro* Culture

	Passage number																		r* (P)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
PDs†	0	2.96	5.17	8.18	11.42	13.77	16.21	18.14	20.92	22.96	25.52	27.51	29.37	32.03	33.44	35.62	37.86	39.8	0.998 (0.001)
CS‡	70.8	75.2	38.4	61.4	66.8	ND§	80.1	81.6	71.4	71.7	55.6	65.5	64.0	68.3	64.4	51.1	56.15	41.45	0.343 (0.343)

*: Correlation coefficient, †: Population doublings, ‡: Colony size (percentage of colonies with 16 or more cells), §: not done

Table 3. Percentage of Colonies with 16 or more Cells and Population Doublings vs. Passage Number in C3a Human Skin Fibroblast *in vitro* Culture

	Passage number															r* (P)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
PDs†	0	2.45	4.34	7.78	10.92	13.28	15.31	17.13	19.28	20.39	21.91	2.511	23.36	24.53	24.5	0.998 (0.001)
CS‡	82.7	84.6	87.6	84.4	67.2	ND§	61.2	50.2	38.2	32.7	28.8	12.7	10.7	8.73	6.3	0.343 (0.343)

*: Correlation coefficient, †: Population doublings, ‡: Colony size (percentage of colonies with 16 or more cells), §: not done

유의성을 나타내었다. C2 섬유모세포는 0.311의 상관계수를 나타내어 가장 약한 상관성을 나타내었다(Fig. 1).

4. C3a와 C3b 피부 섬유모세포의 배양결과

그림에서 동일한 공여자인 C3a와 C3b 섬유모세포의 집단이배화와 16 세포집락 비율 간의 관계를 관찰한 결과 집단이배화가 증가될수록 16 세포집락 비율이 거의 동일하게 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 2).

Table 4. Percentage of Colonies with 16 or more Cells and Population Doublings vs. Passage Number in C3b Human Skin Fibroblast *in vitro* Culture

	Passage number						r* (p)
	0	2	5	7	10	14	
PDs†	0	4.34	13.28	17.13	21.91	26.56	0.985 (0.002)
CSP	82.7	90.0	ND	50.2	21.7	9.8	0.889 (0.044)

*: Correlation coefficient, †: Population doublings
‡: Colony size(percentage of colonies with 16 or more cells)

5. 16 세포집락 비율과 *in vivo* 연령과의 관계

Fig. 1 과 같이 저연령자인 C1과 고연령자인 C3a의 경우 집단이배화 증가에 따른 16 세포집락 비율의 감소 정도는 차이가 있었으며, C3a 공여자의 경우 16 세포집락 비율 감소가 더 경사진 직선 회귀 양상을 보였고 집단이배화가 약 30 정도로 나타났다. 반면 C1 공여자의 직선회귀는 C3a보다 완만한 경사를 보였으며 집단이배화가 50 이상으로 나타났다.

그러나 C2공여자의 연령은 54세로 C3a와 비슷한 연령의 공여자였지만 C1 공여자와의 집단이배화 증가에 따른 16 세포집락 비율의 감소 간에 큰 차이가 없었다.

동일한 지점의 집단이배화에서 16 세포집락 비율이 고연령자인 C3a 공여자보다 저연령자인 C1 공여자에서 더 높게 나타났다.

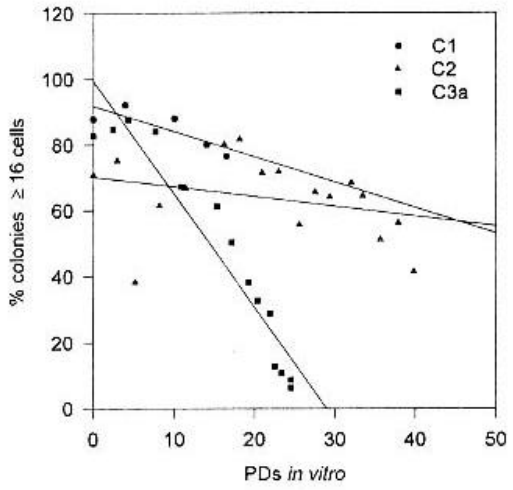

Fig. 1. Percentage of colonies with 16 or more cells vs. number of in vitro population doublings (PDs) in C1, C2, C3a skin fibroblast culture. Skin sample donor was 44, 54, 55 years old, respectively. Single cell suspension of skin fibroblast sample was prepared with primary explant technique. 100 cells were plated into 100 ml tissue culture flask and cultured for two weeks. The number of cells in each colony was determined with stereo microscope at ×10 magnification. The percentage of colonies with 16 or more cells= (the number of colonies with 16 or more cells/ the number of colonies with 1 or more cells) × 100.

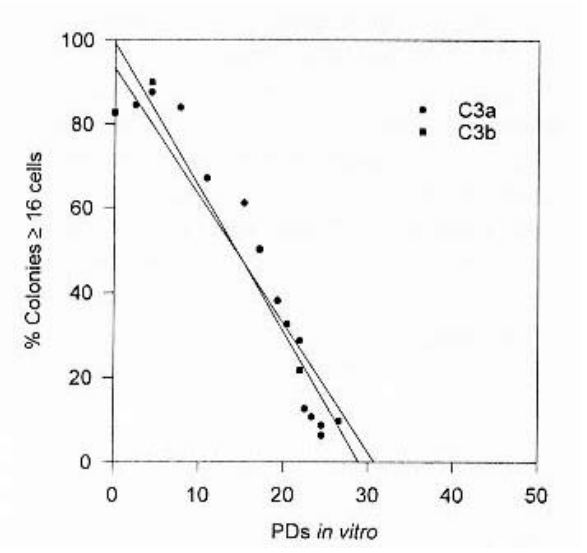

Fig. 2. Percentage of colonies with 16 or more cells vs. number of in vitro population doublings (PDs) in C3a and C3b skin fibroblast culture. C3a and C3b cells were isolated from the same person. Single cell suspension of skin fibroblast sample was prepared with primary explant technique. 100 cells were plated into 100 ml tissue culture flask and cultured for two weeks. The number of cells in each colony was determined with stereo microscope at ×10 magnification. The percentage of colonies with 16 or more cells=(the number of colonies with 16 or more cells/ the number of colonies with 1 or more cells) × 100.

고 찰

사람 피부 및 폐 섬유모세포의 정상적인 분화과정은 3개의 유사분열 세포형(mitotic fibroblast, MF) 형태와 3개의 유사분열 후 세포형태(postmitotic fibroblast, PMF)가 연속적으로 나타나게 되면서 최종 세포분화과정인 MF I - MF II - MF III - PMF IV - PMF V - PMF VI 순서에 따라 분화하게 된다.[11,12] PMF VI 는 최종적으로 분화된 섬유모세포로서 결국 apoptosis 과정에서 PMF VIIa로 죽게되며, 섬유모세포의 형태적 그리고 생화학적 다단계 분화과정은 내부적인 요인과 전자기적 또는 이온화 방사선 등과 같은 외부적인 요인에 의해 가속화 되는 것으로 알려져 있다.[11,12] 체외이식 조직배양(explant culture)에서 연구된 일차 피부 섬유모세포의 집단들에는 8개 종류의 형태학적으로 서로 다른 섬유모세포로 구성되어 있는 것으로 알려져있으며, 일차집락 배양(primary clone culture) 에서도 5종의 다른 집락형태가 있는 것으로 알려져 있다.[11,12] 현재까지 섬유모세포 집단은 동질성의 비분화된 세포로 되어있는 것으로 여겨져 왔고, 이들 세포로 시행되었던 연구 결과들의 대부분이 재현되지 않았다. 따라서 섬유모세포의 생물학적인 연구에서 재현 가능한 결과를 얻기 위하여 일정한 형태의 섬유모세포들로 구성된 세포집단으로 연구를 해야 하는 것으로 지적되고 있다.[11,12]

사람 이배체 섬유모세포(human diploid fibroblast, HDF)들은 배양 초기에는 활발한 증식을 하다가 어느 한계점에 이르면 세포증식능이 소멸되고 그로 인해 *in vitro*에서 제한된 수명을 갖는 것으로 잘 알려져 있으며[5,6,19] 최근의 연구들로 부터 특이 유전자가 *in vitro* 세포노화에 작용할 것이라고 보고되고 있다.[17,18]

in vitro 세포배양에서 세포의 노화상태를 나타내는 지표들에 대한 다양한 연구들로서 세포집락수 크기의 분포, 세포의 형태, 집단이배화의 비율, DNA 합성능 및 노화에 관계된 유전자에 대한 실험 결과들이 보고되고 있다.[2,4,17,22]

Emmy 등[13]은 사람 이배체 섬유모세포의 *in vitro* 세포 노화과정에 있어 분화의 표식자로서 histone 변이물들인 H2A.1/ H2A.2의 비율이 축적 집단이배화(cumulative population doublings)에 대한 함수로서 직선적인 관계로 감소하는 것을 관찰하였고, West 등[4]에 따르면 젊은 섬유모세포들은 28 집단이배화 후에 방추형의 모양을 갖고 있으며 10%의 fetal calf 혈청에서 활발히 증식하는 반면에 68 집단이배화 이후의 세포들은 노화되어 적합한 성장배지에서도 증식이 중단되고 변형된 형태의 세포모양을 나타낸다고 보고하였다.

Pendergrass 등[17]은 세포 노화의 생물리학적인 표식자에 대한 연구에서 사람 이배체 유사섬유모세포 배양실험을 통하여 세포크기와 DNA polymerase alpha의 활성도 그리고 증식 활성도 간의 관계를 연구한 결과 계대배양수가 증가할수록 세포 크기가 증가됨을 관찰하였고 세포 크기가 세포 노화의 유용한 생물리학적인 표식자가 될 수 있음을 보고하였다.

Peter 등[22]은 세포 노화 표식자로서 유전자에 대한 연구 결과 노화된 섬유모세포에서 노화연관유전자(SAG)의 발현이 3배 증가하였으며 이 유전자가 섬유모세포의 노화 과정중에 성장 잠재력에 대한 정확한 표식자가 될 수 있음을 보고하였다.

Yamamoto 등[19]은 세포 노화과정의 세포표면 표식자로서 세포표면의 총 음전하량이 세포 노화과정 중에 현저히 감소되는 것을 관찰하였으며, Dimri 등[20]은 세포노화 표식자에대한 연구에서 배양된 섬유모세포가 노화될 때 pH 6에서 β- galactosidase를 분비한다는 것을 보고하였다. 최근 연구들에서는 사람 이배체 섬유모세포의 노화과정과 연관되어 세포 분자적인 변화로서 p53 단백질의 양과 활성도를 측정하여 세포의 노화정도를 조사하는 연구들이 진행되고 있다.[21,22]

Smith 등[2]은 사람 피부 섬유모세포와 태아 폐 섬유모세포인 WI-38세포주의 *in vitro* 배양실험에서 *in vitro* 세포의 노화정도를 세포집락수 크기 분포로써 예상할 수 있음을 보고하였는데, 저연령자(GRC74)의 피부 섬유모세포 배양으로부터 얻어진 대부분의 세포들은 256개 이상의 세포들로 구성된 세포집락을 만들었고 고연령자로부터 얻어진 세포들은 단지 2%만이 256개 이상의 세포들로 구성된 세포집락으로 증식하는 것을 관찰하였다. 이러한 저연령자와 고연령자의 피부섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 10 집단이배화 후에 관찰된 세포집락크기의 분포차이는 태아폐 섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 관찰되었던 변화와 거의 동일하였다. 본 연구는 사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양시 세포 노화에 따른 16 세포집락 비율 변화를 분석하기위한 것으로서 실험 결과 피부 섬유모세포의 계대배양 횟수가 증가될수록 그리고 집단이배화가 증가될수록 16 세포집락 비율이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

Smith 등[2]의 태아 폐 섬유모세포인 WI-38세포주 배양실험에서 16 세포이상의 세포집락들 비율이 *in vitro* 잔여 생존기간의 우수한 지표가 됨을 보고하였는데, *in vitro* 집단이배화가 서로 다른 28세의 저연령자와 82세의 고연령자의 피부 섬유모세포 배양에서 세포집락크기 분포와 잔여 집단이배화(population doubling remaining, PDR)간에 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. 또한 저연령자와 고연령자의 섬유모세포 그리고 태아 폐 섬유모세포인 WI-38세포주의 세 가지 배양 실험에서 16 세포 이상의 세포집락 비율을 집단이배화 함수로서 비교했을 때 세 부류간에 평행한 회귀 직선이 얻어지는 것을 관찰하였으며, *in vitro*에서 동일한 수준의 집단이배화를 갖는 경우에서 16 세포집락 비율은 태아 폐 섬유모세포 WI-38세포주가 가장 높았고 고연령자의 피부 섬유모세포 경우가 가장 낮았으며 저연령자의 피부 섬유모세포 경우는 중간을 나타내었다. 그리고 세 부류간의 회귀선 간의 평행이동은 세포 공여자의 연령에 의해 결정되어지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 16 세포 이상의 세포집락 비율 분포가 세포

공여자의 *in vivo* 연령의 정확한 추정치가 될 수 있고 생체 내 집단이배화를 반영할 수 있는 결과임을 보여준 것이었다. 그리고 16 세포 이상의 세포집락 비율과 집단이배화 간의 직선 회귀식에서 직선이 피부 섬유모세포의 *in vitro* 총수명(total life span) 근사치 지점의 수평축에 가로질러 그려지기 때문에 이 지점을 알게 되면 사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 총수명을 예상할 수 있음을 보고하였다. 본 실험에서 집단이배화와 16 세포집락 비율 간에 밀접한 연관성을 얻을 수 있었는데 Fig. 1 에서 보여진 직선회귀식으로부터 C3a 섬유모세포의 *in vitro* 집단이배화가 약 30 정도가 될 것으로 예상할 수 있었고 그리고 C1과 C2 피부 섬유모세포의 경우는 50 이상의 집단이배화를 가질 것으로 예상할 수 있어 16 세포집락 비율을 관찰함으로서 *in vitro* 세포 노화정도를 알 수 있는 한가지 방법이 될 수 있을 것으로 생각되었다.

Smith 등[2]의 실험에서 세포집락크기 분포와 in vivo 노화간의 관계를 평가하기 위하여 9명의 저연령자와 8명의 고연령자 로부터 얻어진 피부 섬유모세포 배양으로부터 16 세포 이상의 세포집락 비율을 측정한 결과 두 대상간에 서로 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서도 C1 피부 섬유모세포 공여자의 연령은 44세 였고 C3a 공여자의 연령은 55세로 나이가 더 많았는데 두 공여자 표본간에 집단이배화 증가에 따른 16 세포집락 비율이 감소되는 정도에 차이가 있는 것으로 나타났으며 저연령자의 피부 섬유모세포 일수록 집단이배화에따라 16 세포집락 비율 감소가 고연령자경우보다 완만하게 감소되었다.

세포집락크기 분포의 측정은 *in vitro* 에서 총 수명을 결정하는 것보다 좋은 몇 가지 장점을 갖고 있는데 첫째로 세포배양에서 *in vitro* 수명을 결정하는데 6 9개월 걸리는데 비해 세포집락 크기 분포 측정은 2주 밖에 걸리지 않아 *in vitro* 증식 실험들을 장기적인 노화에 대한 연구로 접목시킬 때 특히 중요하며, 둘째로 실험 상태의 재현성(reproducibility)을 좀더 효과적으로 조절할 수 있다는 것이다. 즉 특정한 *in vitro* 집단이배체를 갖는 표준 세포주 냉동군체(frozen stock)를 액체질소안에 보관하였다가 해동시킨 후 일정한 간격으로 실험할 수 있으며, 이러한 방법으로 *in vitro* 수명에 영향을 주는 혈청이나 배지의 질과 같은 조직배양 변수들에 대하여 세포집락크기 분포를 표준화시킬 수 있음이 알려져 있다.[2]

세포집락크기 분포는 또한 *in vitro* 배양시 잔여 집단이배화(population doublings remaining)의 민감한 측정치가 될 수 있기 때문에 *in vitro* 세포 수명의 증가 또는 감소를 관찰함으로써 실험적인 치료에 대한 효과를 빨리 평가하려는데 사용할 수도 있다. Sartin 등[23]은 어떤 약물에 대한 세포의 반응을 알아보기 위하여 세포집락크기 분포를 관찰하였는데, 개(dog)의 유방암 조직으로부터 유래된 세포주에 대한 실험에서 tamoxifen 또는 doxorubicin에 대한 세포반응으로써 에스트로젠 수용기(estrogen receptor)를 갖는 세포주들은 tamoxifen에 노출시 더 작은 세포집락을 갖는 것을 관찰할 수 있었다. Lindahl 등[24]도 토끼의 골단 연골세포의 세포집락형성에 대한 연구에서 사람 성장호르몬(growth hormone)과 유사인슐린 성장인자(insulin-like growth factor-I)의 효과를 알아보고자 세포집락 크기의 함수로서 세포집락들의 수를 측정하였다.

이상을 종합해 볼 때 사람 피부 섬유모세포를 이용한 *in vitro* 배양실험에서 16 세포집락 비율 분포가 *in vitro* 세포노화 정도 및 배양표본 공여자의 *in vivo* 노화정도를 예상할 수 있는 지표가 될 수 있으며, 16 세포집락 비율 분포를 세포노화에 대한 실험뿐만 아니라 임상적인 면에서 치료 약물에 대한 효과를 평가하기 위하여 적용할 수 도 있음을 알 수 있다. 또한 세포의 *in vitro* 노화과정을 좀 더 정확하게 평가하기 위하여 세포노화에 관련된 유전자 연구를 포함한 분자생물학적인 연구도 도움이 될 것으로 생각된다.

결 론

3명의 유방암 환자로부터 얻어진 C1, C2, C3a, 및 C3b 등의 피부 섬유모세포를 배양하여 각 계대배양에 따른 16 세포집락 비율과 집단이배화를 관찰하여 *in vitro* 세포노화에 따른 16 세포집락 비율의 변화와 섬유모세포 공여자의 연령과 16 세포집락 비율간의 연관성에 대하여 분석한 결과 다음과 같았다.

1) 사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 계대배양 횟수의 증가에 따라 16 세포집락 비율이 감소하였으며 그 중 C3a의 피부 섬유모세포의 상관계수가 0.982(P=0.0001)로 가장 강한 상관관계를 나타내었다.

2) 사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 집단이배화가 증가될수록 16 세포집락 비율이 감소하였으며 그중 C3a 섬유모세포의 상관계수가 0.954(P=0.0001)로서 가장 강한 상관관계를 나타내었다.

3) 동일한 피부 섬유모세포 공여자였던 C3a와 C3b의 배양에서 집단이배화가 증가될 때 16 세포집락 비율 감소는 같은 경향을 나타내었다.

4) 피부 섬유모세포 표본 공여자 중 저연령자인 C1와 고연령자인 C3a는 표본간에 집단이배화 증가에 따른 16 세포집락 비율 감소 정도에 있어서 차이를 나타내었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 사람 피부 섬유모세포의 *in vitro* 배양에서 계대배양 증가에 따라 집단이배화는 증가되고, 세포 노화로 인해 16 세포집락 비율은 감소되는 것을 알 수 있었다. 또한 저연령의 피부 섬유모세포일수록 집단이배화에 따른 16 세포집락 비율 감소가 고연령의 경우보다 완만하였다. 따라서 피부 섬유모세포 *in vitro* 배양에서 관찰되는 16 세포집락 비율은 *in vitro* 세포노화의 지표로서 유용하며 또한 피부 섬유모세포 공여자의 연령 평가에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. **Hall EJ.** Cell survival curves. In: Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. 4th ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Co. 1994:30-43
2. **Smith JR, Pereira-Smith OM, Schneider EL.** Colony size distributions as a measure of *in vivo* and *in vitro* aging. Proc Natl Acad. Sci USA 1978; 75:1353-1356
3. **Freshney RI.** Biology of the cultured cell. In: Freshney RI. Culture of animal cells. New York, Alan R. Liss, inc. 1984:7- 13
4. **West MD.** The cellular and molecular biology of skin aging. Arch Dermatol 1994; 130:87-95
5. **Hayflick L, Moorhead PS.** The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961; 25:585-621
6. **Hayflick L.** The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1965; 37:614-636
7. **Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ.** Replicative life-span of cultivated human cells. Lab Invest 1970; 23:86-92
8. **Schneider EL, Mitsui Y.** The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73:3584-3588
9. **Poten J, Westermark B.** Cell generation and aging of nontransformed glial cells from adult humans. In: Fedoroff S, Hertz L. Advances in cellular neurology. New York. Academic Press. 1980:209-227
10. **Hay RJ, Strehler BL.** The limited growth span of cell strains isolated from the chick embryo. Exp Gerontol 1967; 2: 123
11. **Bayreuther K, Francz PI, Gogol H, et al.** Differentiation of primary and secondary fibroblast in cell culture system. Mutation Research 1991; 256:233-942
12. **Rodermann HP, Peterson HP, Schwenke K, et al.** Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. Planning Microscopy 1991; 5:1135
13. **Emmy P, Rogakou & Kalliope E, Sekeri-Pataryas .** A biochemical marker for differentiation is present in an *in vitro* aging cell system. Biomedical and biophysical reserch communications 1993; 196:1274-1279
14. **Toussaint O, Michiels C, Raes M, et al.** Cellular aging and the importance of energetic factors. Exp Gerontol 1995; 30:1-22
15. **Norwood TH, Pendergrass WR.** The cultured diploid fibroblast as a model for the study of cellular aging. Cri Rev Oral Biol Med 1992; 3:353-370
16. **Barrett JC, Annab LA, Futreal PA.** Genetic and molecular basis for cellular senescence. Adv Exp Med Biol 1993; 330: 27-43
17. **Pendergrass W, Angello J, Norwood TH.** The relationship between cell size, the activity of DNA polymerase alpha and proliferative activity in human diploid fibroblast-like cell cultures. Exp Gerontol 1989; 24:383-393
18. **Wistrom C, Villeponteau B.** Cloning and expression of SAG: A novel marker of cellular senescence. Exp Cell Res 1992; 199:355-362
19. **Yamamoto K, Yamamoto M.** Changes in the cell surface of human diploid fibroblasts during cellular aging. Mutat Res Dnaging Genet Instab aging 1991; 256:169-175
20. **Dimri GP, Lee X, Basile G, et al.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad. Sci USA 1995; 92:9363-9367
21. **Kulju KS, Lehman JM.** Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblast. Exp Cell Res 1995; 217:336-345
22. **Peter A, Howard W, Igor G, et al.** Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:8348-8352
23. **Sartin EA, Barnes S, Toivio-Kinnucan M, et al.** Heterogenic properties of clonal cell lines derived from canine mammary carcinomas and sensitivity to tamoxifen and doxorubicin. Anticancer Res 1993; 13:229-236
24. **Lindahl A, Nilsson A, Isaksson OG.** Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on colony formation of rabbit epiphyseal chondrocytes at different stages of maturation. J Endocrinol 1987; 115:263-271

대한방사선종양학회지 1999;17(2):158 165

Abstract

Colony Size Distributions according to *in vitro* Aging in Human Skin Fibroblasts

Jun Sang Kim, M.D.*, Jae Sung Kim, M.D.*, Moon June Cho, M.D.*,
Jeong Kyu Park, M.D.† and Tae Hyun Paik, M.D.‡

*Department of Therapeutic Radiology, †Department of Microbiology, Chungnam National University Medical College, Taejon, Korea
‡Department of Microbiology, Konyang University Medical College, Nonsan, Korea

Purpose : To investigate the percentage of colonies with 16 or more cells distribution of human skin fibroblast according to *in vitro* aging, and to evaluate the relationship between percentage of colonies with 16 or more cells and *in vivo* donor age in human skin fibroblast culture.

Material and Method : C1, C2, C3a, and C3b human skin fibroblast samples from three breast cancer patients were used as subjects. The C1, C2, and C3a donor were 44, 54, and 55 years old, respectively. C3a and C3b cells were isolated from the same person. Single cell suspension of skin fibroblasts was prepared with primary explant technique. One hundred cells are plated into 100ml tissue culture flask and cultured for two weeks. The colony size was defined as colonies with 16 or more cells. The cultured cell was stained with crystal violet, and number of cells in each colony was determined with stereo microscope at ×10 magnification. Passage number of C1, C2, C3a and C3b skin fibroblast were 12th, 17th, and 14th, respectively.

Results : Percentage of colonies with 16 or more cells of skin fibroblast samples decreased with increasing *in vitro* passage number. In contrast, cumulative population doublings of skin fibroblast sample increased with increasing *in vitro* passage number. Percentage of colonies with 16 or more cells also decreased with increasing population doublings in human skin fibroblast culture. There was strong correlation with percentage of colonies with 16 or more cells and population doublings in C3a skin fibroblast sample. At the same point of population doublings, the percentage of colonies with 16 or more cells of the young C1 donor was higher level than the old C3a donor.

Conclusion : The population doublings increased with increasing *in vitro* passage number but percentage of colonies with 16 or more cells decreased. The results of this study imply that percentage of colonies with 16 or more cells is useful as a indicator of *in vitro* human skin fibroblast aging and may estimate the *in vivo* donor age.

Key Words : Human skin fibroblast, *In vitro* aging, Colony size