



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

노화로 유도된 간세포 AML12에서  
필버톤의 항노화 효과

Anti-aging effects of Filbertone in  
senescence-induced AML12 hepatocytes

울산대학교 대학원  
식품영양학과  
박수정

노화로 유도된 간세포 AML12에서  
필버톤의 항노화 효과

지도교수 안병용

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 2월

울산대학교 대학원  
식품영양학과  
박수정

박수정의  
이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 유리나 (인)

심사위원 안병용 (인)

심사위원 장유미 (인)

울산대학교 대학원  
2024년 2월

## 목 차

I. 국문요약 .....	1
II. 서론 .....	3
1. 노화의 영향 .....	3
1.1. 노화와 질병 .....	3
1.2. 노화와 간 .....	4
2. 노화의 생물학적 원인 .....	4
2.1 유전적 인자 .....	4
2.2 텔로미어 .....	5
2.3 산화스트레스 .....	5
2.4 미토콘드리아 .....	6
3. 노화 유발 물질과 관련 신호 .....	7
3.1 독소루비신(Doxorubicin) .....	7
3.2 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	7
3.3 p53 signaling .....	8
3.4 p21 signaling .....	9
4. 식이인자 .....	10
4.1 식이인자의 기능 .....	10
4.2 필버톤의 효능 .....	11
III. 재료 및 방법 .....	12
1. 세포 배양 .....	12
2. 마우스 간 세포주 AML12로부터 노화 세포 생성 .....	12
3. 세포 독성도 측정 (MTT assay) .....	12
4. 노화 세포 염색 (Senescence-associated β-Galactosidase Staining) .....	13

5. 단백질 정량 .....	13
6. RNA 분리와 정량 .....	15
7. cDNA 합성 .....	15
8. Real time-PCR .....	16
9. 통계처리 .....	17
10. 시약 리스트 .....	17
IV. 결과 .....	18
1. AML12에서 필버톤의 세포독성 .....	18
2. AML12에서 독소루비신의 노화 유발 .....	18
3. AML12에서 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 의 노화 유발 .....	19
4. AML12로부터 생성된 노화 세포에서의 노화 유발 .....	19
5. 필버톤이 노화로 유도된 AML12에서 p53의 단백질 발현에 미치는 영향 .....	19
6. 필버톤이 AML12로부터 생성된 노화 세포에서 p53의 단백질 발현에 미치는 영향 .....	20
7. 필버톤이 노화로 유도된 AML12에서 p53의 유전자 발현에 미치는 영향 .....	20
8. 필버톤이 노화로 유도된 AML12에서 p21의 유전자 발현에 미치는 영향 .....	20
V. 고찰 .....	30
VI. 결론 .....	33
VII. 영문 요약 .....	34
VIII. 참고 문헌 .....	35
IX. 약어 표 .....	40
X. 감사의 글 .....	41

## I. 국문요약

**연구배경:** 세포 노화는 세포의 표현형이 변하고, 세포 주기가 정지하는 상태를 말한다. 세포의 노화는 많은 원인들에 의해 발생하고 다양한 노화와 관련된 질병의 유발에 관여한다. 간세포의 노화는 간 기능을 떨어지게 하여 재생능력 감소, 간세포 암종의 발생을 증가 시킨다. 본 연구에서는 헤이즐넛의 향기 성분인 필버톤이 마우스 간세포(AML12)에서 독소루비신(Doxorubicin), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 노화를 억제할 수 있는지 알아본다. 헤이즐넛의 성분인 필버톤의 항비만 및 항염증 효과에 대해서는 알려져 있으나, 필버톤의 항노화 효과에 관해서는 알려진 바가 없다.

**연구목적:** 본 연구에서는 파이토케미컬 중 하나인 필버톤이 항노화 물질로서 마우스의 간세포에서 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 독소루비신(Doxorubicin)에 의해 유도된 노화에 미치는 영향을 조사하였다.

**연구방법:** AML12 (mouse hepatocyte)를 10% FBS (Fetal Bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)으로 12well plate에 4X10<sup>5</sup>/well로 배양 한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>인 incubator에서 48h 동안 증식 시킨다. 48h 증식이 끝난 AML12 (mouse hepatocyte) 에 필버톤 25μM, 50μM, 100μM의 농도로 24시간 treat 한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 750μM로 1h동안 처리, Doxorubicin을 2μM로 6h 동안 처리하는 것으로 노화를 유도한다. 또한 마우스 간세포주 AML12에서 노화세포를 생성하여 실험을 진행한다. DNA가 손상을 입었을 때, DNA수선 단백질 활성화 및 세포주기의 정지와 관련된 유전자와 단백질의 발현 수준을 RT-qPCR과 western blot으로 확인한다.

**연구 결과:** AML12(mouse hepatocyte)에 필버톤을 처리 했을 때 종양억제유전자인 p53을 통해 필버톤이 노화에 효과가 있는지 protein level과 RNA level을 통해 확인하였고, 용량 의존적으로 독소루비신(Doxorubicin)과 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 인해 증가된 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였지만 RNA 수준에서는 볼 수 없는 것으로 보아, mRNA의 감소 없이도 단백질의 농도가 감소할 수 있으며 이는 mRNA가 변하지 않아도 단백질이 분해되거나 다른 과정에 의해 감소될 수 있음을 나타낸다. R

NA 수준에서 필버톤 처리에 따른 유의한 변화가 관찰되지 않는 것을 보았을 때 필버톤이 노화 유발 물질에 의한 p53 RNA 발현을 직접적으로 조절하지 않는다는 것을 나타낸다. 하지만 p53의 downstream인 p21의 gene expression을 확인한 결과, 독소루비신(Doxorubicin)과 과산화수소( $H_2O_2$ )로 인해 증가된 유전자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

**결론:** 종합하자면, AML12(mouse hepatocyte)에서 필버톤의 처리는 독소루비신(Doxorubicin), 과산화수소( $H_2O_2$ )로 인해 증가한 노화를 억제하는 효과가 있으며, 필버톤이 노화관련 전사인자인 p53과 p21을 조절한다는 것을 발견하였고 노화와 관련된 분자 기작을 규명하는데 새로운 방향을 제시하며 노화의 발현을 조절하는 새로운 분자기능을 제시 할 수 있을 것으로 사료된다.



## II. 서론

### 1. 노화의 영향

#### 1.1 노화와 질병

노화는 시간이 흘러감에 따라 생물의 신체적 기능이 퇴화하는 현상으로 개체 수준에서 세포 수준 크기는 분자 수준까지 적용할 수 있다. 또한 시간의 흐름에 따른 변화로 인해 외부 자극에 대한 반응이 감소되고, 항상성을 유지할 수 있는 능력이 떨어져 외부 스트레스에 약해지고, 질병에 대한 감수성이 증가되어 만성적인 질환으로 이어질 가능성이 증가하는 변화의 과정으로 정의할 수 있다. 베이비붐 세대의 고령 인구 편입으로 인한 고령 인구 급증으로 현재 우리나라의 고령 인구가 17.5%로 집계되었다. 또한 고령 인구의 증가로 인하여 우리나라는 2025년에 고령인구 20.6%의 초고령 사회로 진입 할 것으로 예상된다. 노인 인구의 수가 증가한다는 것은 만성 퇴행성 질환의 유병률이 높아진다는 것을 말한다. 이러한 고령인구의 증가와 더불어, 고령 인구의 84% 이상이 1개 이상의 노인성 질환을 가지고 있는 것으로 나타날 정도로 노인성 질환의 발병률도 크게 증가하고 있는 것으로 나타났다. 최근 연구 결과에 따르면 나이가 들어감에 따라 체내의 노화된 세포 양은 증가하고 증가된 노화 세포가 직접적으로 노인성 질환과 관련이 있다고 보고되어진다(Campisi et al 2020). 인간이 노화함에 따라 정상 세포는 암세포로 전환될 가능성이 높아진다(Wang et al 2018). 세포는 암세포로의 전환을 방지하기 위해 스스로 자발적으로 노화 세포로 변화하는 경향이 있다. 그러나 노화된 세포가 누적되면 다양한 염증을 유발하고, 이는 노인성 질환의 원인이 될 수 있다(Collado et al 2007). 세포는 노화함에 따라 기능을 덜 하게 된다. 세포분열이 멈춘 상태가 영구적으로 지속되는 단계를 세포의 노화로 정하며, 이는 노화의 기작으로서 암, 동맥경화, 퇴행성관절염과 같은 노화에 따르는 질병들을 유발하는 원인으로 조명되고 있다(Collado et al 2007). 세포가 노화되면 세포 수준에서 분화와 증식이 감소해 특정 분자들의 구조가 변화하고, 일련의 반응 경로가 변화한다. 그러면 세포와 분자 수준을 뛰어넘어 해부학적, 생리학적으로도 불가피한 변화가 발생하게 된다. 또한 장기 및 기관의 항상성이 저하되며, 이로 인해 외부 스트레스나 질병, 사망에 대한 감수성이 급격하게 증가한다.

## 1.2 노화와 간

노화가 진행되어도 건강한 간을 지닌 경우 간의 기능은 잘 유지가 되는 것으로 알려져 있다. 실제로 고령의 환자에게서 혈청 Alanine aminotransferase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST), Alkaline phosphatase(ALP), Bilirubin 등의 간기능 검사는 대부분 정상 범위에 있다. 하지만 노화의 진행에 따라 간의 크기가 축소되며, 간으로 향하는 혈액 유입량이 30~40% 이상 감소한다고 보고되고 있다(Igarashi et al 2022). 또한 노화된 간은 식습관, 술, 담배, 좋지 않은 영양상태 등에 의해서 손상을 쉽게 받으며 노화된 간은 갈색으로 변하며 위축되어 크기가 20-40%까지 감소한다(Ferreira et al 2018). 간 용량의 축소는 노화로 인한 간으로의 혈류량 감소에 기인하며, 65세 이상에서는 40세 이하 대비 혈류량이 약 35% 이상 감소한다(Zhu et al 2021). 일반적으로 나이가 들면서 간세포 내의 이차 용해소체, 잔체, 리포푸신에 의한 조밀체의 축적이 증가해 간세포에서 차지하는 상대적 부피가 증가한다(Ogrodnik et al 2017). 이처럼 조밀체의 축적이 늘어남에 따라 세포 내 소체나 세포 구성 성분의 대사가 올바르게 진행되지 않아 간세포 내에서 여러 대사 과정에 문제가 발생할 수 있다(Wang et al 2018). 따라서 신체의 노화가 진행됨에 따라 간의 기능은 감소하게 된다. 또한 간세포의 노화는 간 기능을 떨어지게 하여 재생능력 감소 및 간세포 암종의 발생을 증가 시킨다.

## 2. 노화의 생물학적 원인

### 2.1 유전적 인자

우리나라 평균수명은 지속적으로 증가되었지만 인간의 최대수명은 크게 변화가 없다는 것으로 보았을 때 인간의 수명이 유전적인 요인보다 외부적인 요인에 많이 의존한다는 것을 보여준다. 노화에 대한 유전적인 영향은 15~25%이고, 75~85%는 생활습관이나 환경에 의해 달라지는 것으로 알려지고 있다(Shin et al 2018). 즉, 노화에 영향을 미치는 주요 요인은 유전보다는 식습관, 운동, 환경 조건 등 생활 요소들이며, 적절한 노력과 실천으로 생물학적 연령을 실제 연령보다 젊게 유지하는 것이 가능하다는 것이다. 어떤 생활습관이나 환경이 항노화에 더 유효한가에 대해서는 더 많은 연구가 필요한 것으로 보인다.

## 2.2 텔로미어

텔로미어는 진핵생물 염색체 양쪽 말단에 위치한 특수한 입자로, 이 말단의 DNA는 특정한 염기서열이 여러 번 반복되는 특수한 패턴을 가지고 있다. 이 구조는 염색체 끝의 DNA가 떨어지거나 서로 달라붙는 것을 방지한다. 텔로미어가 짧아지는 대표적인 이유는 세포 분열 과정에서 발생한다. 세포가 분열할 때 텔로미어가 짧아지기 시작하는데 이는 노화와 밀접한 관계가 있다(Shin et al 2018). 텔로미어가 일정 수준 이상으로 단축되면 세포는 더 이상 분열할 수 없게 되어 결국 세포가 사멸하게 된다. 스트레스나 불규칙적인 생활습관, 약물 남용, 충분하지 않은 수면 등이 텔로미어 단축을 가속화 시킬 수 있다(Shin et al 2018). 텔로미어가 지속적으로 단축된다는 것은 결국 세포노화의 주된 원인이며, 이로 인해 노화 관련 질병에 걸릴 위험이 높아진다는 것을 의미한다. 연구에 따르면 텔로미어의 길이 자체가 아니라 텔로미어의 짧아지는 속도가 노화 속도와 밀접한 관련이 있다(Shin et al 2018). 텔로미어는 mitotic clock 이라 하는데, 이는 세포가 분열하면 텔로미어 길이가 감소하므로, 텔로미어의 길이를 측정함으로써 세포의 나이를 추정하고 수명을 예측할 수 있기 때문이다. 세포들이 분열하며 텔로미어가 짧아지게 되면 세포의 기능이 저하되어 뇌 세포나 근육 세포 등 거의 분열하지 않는 세포에게도 영향을 끼친다. 예를 들어 혈관 세포, 섬유조직 세포, 거대포식세포, 그리고 뉴런을 지지하고 영양을 공급하는 미세아교세포와 같은 세포들이 노화 과정에서 기능 저하를 겪게 되면, 이러한 변화는 뇌세포나 근육 세포에 손상을 입히게 된다. 텔로미어의 단축을 완전히 방지할 수 있는 확실한 방법은 없지만, 생활 방식을 조절함으로써 이 과정을 늦출 수 있는 방법은 있다. 과일, 채소, 씨앗, 견과류와 같은 자연 식품이 풍부한 식단은 항산화제, 엽산, 비타민D와 같은 특정 영양소가 있기 때문에 도움이 된다. 연구에 따르면 규칙적인 신체활동은 텔로미어 길이에 긍정적인 영향을 미치며, 규칙적으로 운동하는 사람들은 그렇지 않은 사람들보다 더 긴 텔로미어를 가지는 경향이 있다고 나타났다(Shin et al 2018). 만성 스트레스 또한 텔로미어 단축과 관련이 있으므로 스트레스 관리도 중요한 부분이다. 또한 수면을 하는 동안 아교세포가 림프액이 들어갈 수 있는 공간을 만들어 뇌의 청소를 도와주기 때문에 충분한 숙면이 필요하다.

## 2.3 산화스트레스

인체에서 발생하는 활성산소는 적절한 위치, 시간, 적절한 양에서 생성될 때 긍정

적인 영향을 미치며, 동시에 우리 신체의 방어 기전은 활성산소에 의한 독성을 해소할 수 있다. 우리 몸은 체내 활성산소의 양을 자체적으로 조절하는데, 심한 운동 등으로 인해 활성산소의 생성이 빠르게 증가하거나, 활성산소를 제거하는 기능이 약해지면 다양한 질병이 활성산소에 의해 유발될 수 있다. 이에 따른 활성산소의 부작용을 산화스트레스라 말한다. 활성산소가 과하게 생성되어 계속되는 산화스트레스는 세포의 유전자에 영향을 주어 손상을 일으키며, 면역체계를 약화시키고 여러 질병을 유발하며 노화를 가속화시킬 수 있다(Hohn et al 2017). 그러므로 에너지 대사과정에서 계속 생성되는 활성산소로 인한 세포 손상과 이로 인한 노화를 방지하는 효과적인 방어 시스템은 중요한 역할을 할 것으로 기대된다(Jing et al 2022). 활성산소를 효과적으로 제거하기 위해 여러 항산화 효소와 항산화 물질인 vitamin C, E, 요산 등이 중요한 역할을 하게 된다. 연구에 따르면 세포 내 산화 스트레스 생성을 조절하는 유전자의 발현을 억제한 동물모델에서는 수명이 30% 연장되었으며, 노화 관련 질환인 죽상 동맥경화 및 혈관내피세포 기능 억제와 같은 문제가 감소한 것으로 나타났다(Hohn et al 2017).

## 2.4 미토콘드리아

세포내 소기관인 미토콘드리아는 자신의 유전체를 보유하고 있고, 미토콘드리아 유전체에서 만들어지는 전자전달연쇄 단위체들은 미토콘드리아에서 생성되는 에너지, 즉 ATP의 합성에 중요한 역할을 담당하고 있다. 세포에서 사용되는 중요한 에너지원인 ATP의 80% 이상은 미토콘드리아에 의하여 생산되며, 미토콘드리아 유전체(mtDNA)의 변이로 인해 미토콘드리아의 에너지 생산이 저하되면 다양한 질병이 발생할 수 있다. 질병의 예로는 미토콘드리아 유전병, 당뇨, 노인성 치매, 심장질환 등이 있다. 모든 미토콘드리아 유전체 변이는 궁극적으로 전자 전달연쇄의 기능 저하와 그 결과로 세포내의 에너지 합성 감소를 유발하여 증상이 발생하게 된다. 에너지 감소는 세포의 사멸을 유발하며, 세포의 사멸로 인한 신체 기능의 저하와 이상은 질병과 노화의 주요 원인이다. 질병과 노화는 궁극적으로 미토콘드리아 전자 전달 연쇄 기능의 저하와 이로 인한 에너지 합성 감소, 그리고 세포 사멸의 증가로 인한 생리적 변화로 발생하는 현상이다. 또한 활성산소에 의한 미토콘드리아 유전체 변이의 축적과 미토콘드리아의 점진적인 에너지 생산능력의 감소는 노화과정에서의 중요한 기작이다.

### 3. 노화 유발 물질과 관련 신호

#### 3.1 독소루비신(Doxorubicin)

독소루비신은 암 치료에 사용되는 화학요법 약물이다. 이는 세계보건기구(WHO)의 필수 의약품 목록에 포함되어 있다. 일반적인 부작용으로는 탈모, 골수억제, 발진, 구강 염증 등이 있으며 심각한 부작용으로는 아나팔락시스, 주사 부위 조직의 손상, 방사선 회상, 심장 손상 등이 포함될 수 있다. 독소루비신은 안트라사이클린 및 항종양 항생제 계열의 약물에 속한다. 이는 세포분열에 필요한 DNA의 기능을 방해함으로써 부분적으로 작용하며, 세포의 DNA를 손상시켜 암세포 분열을 근본적으로 차단해 죽게 만드는 항암제이다. 암세포의 DNA를 손상시켜 사멸하는 치료에 사용하며 암을 치료하려는 시도들은 DNA의 손상을 유발하고 암세포와 정상적인 세포의 노화를 촉진하는 결과를 가져온다. 세포의 세포노화환경을 생성하고자 사용된 독소루비신은 대표적인 anti-cancer drug로 DNA의 염기서열에 직접적으로 삽입되어  $\alpha$ -helix구조의 변형을 일으켜 DNA damage를 일으킨다고 알려져 있다(Song et al 2019). Doxorubicin은 농도에 따라 세포의 노화를 일으키거나 세포의 사멸을 일으킬 수 있다.

#### 3.2 과산화수소( $H_2O_2$ )

과산화수소는 hydrogen peroxide로 미토콘드리아나 다른 세포 구조에서 형성되는 중요한 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)이다. 활성산소는 세포 내에서 자연적으로 생성되는 화학적인 분자들로 생명을 유지하려는 호흡의 과정에서 자연스럽게 만들어진다. 호흡을 통해서 우리 몸에 들어온 산소는 몸에서 세포로 운반되어 에너지를 만드는데 사용된다. 세포 내 소기관인 미토콘드리아에서는 산소를 이용해 에너지를 발생시키고 그 속에서 활성산소라는 부산물도 만들어 낸다. 이렇게 생성되는 활성산소는 처음에는 세포의 기능을 방해하는 정도이지만 지속적으로 많아지게 되면 세포를 산화시켜 세포막을 공격하고 구조를 파괴하여 손상시킨다. 이로 인해 세포 기능의 저하가 심화되고 각종 질병이 발생되며 노화가 촉진된다. 일부는 세포 내에서 중요한 신호전달과 대사과정에 참여하지만 지나치게 생성되거나 불균형한 양으로 존재할 경우 세포의 손상을 초래한다. 즉, 과산화수소는 세포 내 활성산소를 증가시켜 산화스트레스를 유발하고 DNA 손상을 일으킨다(Zhu et al 2021). 이때 DNA의 손상이 제대로 복구되지 않게 되면 세포는 조기 노화를 일으키게 된다(Park et al 2017).

따라서 과산화수소는 세포 노화의 기전과 항노화물질의 연구에서 노화유발 물질로서 이용된다(Park et al 2017). 또한 세포는 단백질과 지방질에 관여하는 세포막으로 싸여 있는데 활성산소가 세포막의 지방질 성분을 공격해 말론알데히드라는 과산화지질을 생성시키기 때문에 이로 인해 노화가 촉진된다.

### 3.3 p53 signaling

p53은 리-프라우메니증후군(Li-Fraumeni syndrome)을 유발하는 유전자로, 비유전성 종양에서도 빈번하게 돌연변이를 일으키며 종양 억제 유전자로써 알려져 있다. 또한 세포 주기 조절과 세포 생존에 관여하는 중요한 단백질로, 세포 손상이나 이상 상태를 감지하고 세포의 자기파괴를 유도하여 종양의 형성을 예방한다(Sun et al 2018). 이러한 기능으로 인해 p53 단백질은 종양 억제자로 알려져 있다. 노화와 관련하여 p53의 역할은 여러 가지 방면으로 연구되고 있다. 첫 번째, 노화는 주로 세포 내 DNA 손상의 축적과 관련이 있다. p53은 세포 내의 DNA 손상을 감지하고 이에 대응하여 세포 주기를 일시적으로 멈추거나, 손상된 DNA를 복구하거나, 불가능한 경우 세포의 자기파괴를 유도한다(Zhao et al 2023). 이러한 기능으로 p53은 세포의 항상성을 유지하고 노화를 방지하는 데 중요한 역할을 한다. 두 번째, p53은 세포 주기를 조절하는 여러 단백질과 상호 작용하여 세포 분열과 성장을 조절한다(Wang et al 2023). 이 과정에서 p53의 기능이 저하되면 세포 주기의 불균형과 이에 따른 노화가 발생할 수 있다. 세 번째, p53은 세포가 노화 상태로 진입하게 하는 염려 구간에 관여한다. 세포가 G1 단계에서 S 단계(이중 가닥 DNA 복제)로 넘어가기 위해서는 염려 구간(checkpoint)을 통과해야 한다. 염려 구간은 세포 주기의 각 단계에서 세포가 올바르게 진행되고 있는지 확인하고 필요한 조치를 취할 수 있는 시기를 나타내며, 세포가 분열을 멈추고 세포외 기질에 분비되는 세포외 기질 조성 효소를 통해 주변 환경에 영향을 미치는 상태를 가리킨다. p53은 이 염려 구간의 형성에 관여함으로써 노화를 유도할 수 있다(Wang et al 2023). 또한 p53은 세포에서 DNA 손상을 감지하면 염려 구간에서 세포 주기를 일시적으로 멈추게 하고, 손상된 DNA를 수리하거나 세포 자체의 프로그램된 세포사(apoptosis)를 시작하여 세포의 노화나 비정상적인 성장을 예방한다. 따라서 p53의 기능은 세포 주기의 올바른 진행과 세포의 노화, 암 발생 예방 등에 중요한 역할을 한다. 네 번째, p53의 핵-세포 외 위치 조절은 세포 노화에도 영향을 미칠 수 있다. p53이 세포의 핵에서 세포 외로 이동함으로써 특정 유

전자의 발현이 조절되고, 이는 노화 과정에 영향을 줄 수 있다. 이처럼 p53의 다양한 기능들이 세포 노화와 관련하여 연구되고 있으며(Wang et al 2023, Nishizawa et al 2016), p53의 정상적인 기능 유지 또는 복구를 통해 노화를 지연시키거나 관리하는 전략들이 연구 분야로 활발히 탐구되고 있다.

### 3.4 p21 signaling

p21은 암 억제 단백질로써 CDKN1A 유전자로 암호화되어 있다. p21 신호전달 경로는 세포주기 조절과 세포 증식에 중요한 역할을 하는 단백질이다. 이 단백질은 주로 세포주기의 G1/S 전이 단계에서 작용하여 세포의 증식을 제어한다. 세포주기의 다양한 단계에서 활성화되는 p21은 세포주기의 정상적인 진행을 조절하고, 세포가 이상 증식하거나 변이한 경우에는 세포주기를 멈추게 함으로써 세포의 비정상적인 증식을 방지한다. 이러한 p21 신호전달 경로는 세포의 생존, 성장, 및 세포주기 조절과 관련된 여러 신호 분자와 상호작용하며 복잡한 네트워크를 형성한다. 이러한 복잡한 신호전달 네트워크를 통해 p21은 세포주기의 여러 단계에서 조절을 받아 세포의 증식과 생존을 조절한다. 또한 p21 신호전달 경로가 세포주기의 비정상적인 조절과 암 세포의 증식과 관련된 다양한 질병에서 중요한 역할을 한다는 것이 점차 밝혀지고 있다(Zhang et al 2021). 따라서 p21 신호전달 경로에 대한 깊은 이해는 암 및 다양한 세포증식 관련 질환에 대한 새로운 치료 전략과 표적치료 개발에 중요한 기여를 할 것으로 기대된다. 정상적인 상황에서, p21은 세포주기를 조절하고 세포가 이상 증식하지 않도록 방지한다. p21은 세포주기를 멈추게 함으로써 세포의 비정상적인 증식을 억제하고 세포사멸 (apoptosis)을 촉진할 수 있다. 이러한 기능들은 p21이 세포 내에서 다양한 신호 분자와 상호작용하여 활성화되고, 세포주기의 여러 단계에서 조절을 받기 때문에 가능하다. p21은 세포주기의 다양한 조절 기작에 연결되어 있어, 이를 통해 세포의 정상적인 성장과 분열이 유지된다. 그리고 이러한 기능들은 암 세포에서의 이상 증식을 억제하고 종양 성장을 제어함으로써 항암 치료 전략의 중요한 표적이 될 수 있다. 따라서 p21의 역할과 기능에 대한 깊은 이해는 암 및 기타 세포증식 관련 질환에 대한 치료 전략의 개발과 이해를 높일 수 있다. 염려 구간에서 세포는 DNA 손상이나 다른 비정상적인 상황을 감지하고, 세포 주기를 일시적으로 멈추어 이러한 문제를 해결하도록 하는데 p21은 염려 구간에서 세포 주기를 조절하고, 세포가 안정되고 올바르게 기능하도록 도와준다. 또한 p21은 세포의 DNA 손상을 감지하면 p5

3과 협력하여 세포 주기를 일시적으로 멈추게 함으로써 세포가 손상된 DNA를 수리하거나 프로그램된 세포사(programmed cell death)인 세포의 자살을 시작함으로써 세포의 노화나 비정상적인 성장을 예방한다.

## 4. 식이인자

### 4.1 식이인자의 기능

필버톤(Filbertone)은 헤이즐넛에서 나는 향을 구성하는 천연 화합물 중의 하나로, 이러한 화합물은 식물의 특정 부분에서 추출되거나 합성될 수 있다. 식물에서 나오는 이러한 화합물들은 식이인자로서 중요한 역할을 할 수 있다. 식이인자(dietary factors)는 우리 식단에 포함된 다양한 성분들로 인해 건강과 질병 발생에 영향을 미치는 인자들을 의미한다. 이러한 식이인자들은 영양소, 비영양소 성분, 그리고 식품의 생리적 효과에 기인한다. 식이인자들은 우리 몸의 기능과 대사에 직접적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 여러 가지 식물성 화합물들이 음식의 맛과 향을 형성하며, 때로는 건강에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있다. 필버톤은 음식의 향을 향상시키는 데 사용될 수 있으며, 이는 음식의 맛과 향을 증진시켜 식욕을 증가시키고 식사 경험을 향상시킬 수 있다. 식물성 화합물들은 종종 항산화 물질을 포함하여 건강에 도움을 주는데 기여할 수 있다. 항산화 물질은 세포 손상을 예방하고 염증을 감소시키는데 도움을 주며, 이는 만성 질환의 예방과 관리 차원에서 도움을 줄 수 있다. 따라서 식물성 화합물들이 우리 식단에 다양하게 포함되면 건강에 이로울 수 있다. 하지만 필버톤이나 다른 화합물을 섭취할 때는 적절한 양과 방법을 유지하는 것이 중요하다. 과도한 섭취는 부작용을 일으킬 수 있으며, 알레르기 반응을 일으킬 수도 있다. 따라서 식물성 화합물을 섭취할 때에는 식품의 안전성과 적절한 양을 고려하는 것이 중요하다. 올바른 식이인자의 섭취는 영양 균형을 유지하고 만성 질병을 예방하는 데 도움이 될 수 있다.

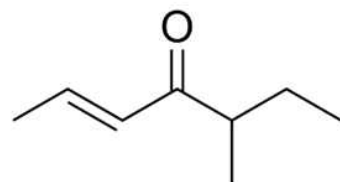
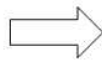


## 4.2 필버톤의 효능

필버톤(Filbertone)은 헤이즐넛의 주된 향미 화합물로, 구조식은  $C_8H_{14}O$ 이며, 분자량은  $126.2g/mol$  이다. 이는 물에는 잘 녹지 않고 기름에 녹는 특성을 가지고 있다. 향수 제조에 사용되며 식품에 사용하기에 일반적으로 안전하다고 인정되는 물질로 (GRAS)로 지정되어 있다. 맛과 향을 내기 위한 목적으로써 천연비누의 재료로 익숙한 물질이지만, 필버톤에서 항비만 및 대사성질환의 개선 용도로서의 기술을 발견해 특허로 등록하며 그 기능이 재발견되었다. 필버톤은 섭취 시 체내 발열을 유도하여 에너지 소비를 촉진함으로써, 현재 판매 중인 비만치료제 시부트라민과 당뇨치료제 메트포르민보다 당뇨, 비만, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 치료 효과가 더 탁월하다고 보고된다(Wang et al 2020). 필버톤은 체중과 내장지방을 감소시키고, 혈중 지질농도를 낮추며, 혈중 간 기능 지표를 개선하고, 혈당을 감소시키며, 대사성 염증 반응을 억제함으로써 궁극적으로 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 대사 질환의 예방 또는 치료에 도움을 준다고 보고되어진다(Moon et al 2019, Mutsnaini et al 2021). 이처럼 필버톤은 비만과 대사 질환의 개선에는 도움을 줄 수 있는 것이 알려져 있으나(Kim et al 2023), 항노화 효과에 관하여서는 알려져 있지 않다. 본 연구에서는, 필버톤이 마우스의 간세포 AML12에서 독소루비신과 과산화수소에 의해 유도된 노화에 대해 항노화 물질로의 효과가 있음을 시사한다.



Hazelnut



Filbertone ( $C_8H_{14}O$ )

### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 세포 배양

마우스 간세포인 AML12를 10% FBS (WELGENE, S101-07, Korea, Fetal Bovine serum)와 1% P/S (WELGENE, LS202-02, Korea, penicilin-streptomycin)이 포함된 DMEM (WELGENE, LM001-05, Korea, Dulbecco's Modified Eagle Medium)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 인큐베이터에서 배양하였고, 3-5 일마다 계대 배양하면서 유지한다. 세포가 80-90% 자랐을 때 100mm dish에 있는 배지를 suction해 주고 DPBS (WELGENE, LB001-02, Korea)로 2번 washing 한다. Washing 후 100mm dish에 T.E (WELGENE, LS015-01, Korea, Trypsin-EDTA) 3ml를 분주한다. T.E 분주 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 인큐베이터에 5분간 둬으로써 바닥에 부착된 세포를 분리한다. 분리된 세포에 배지를 추가하여 15ml tube에 넣어주고 1000rpm으로 3분간 원심분리 한다. 그 후 pellet을 resuspension 해준 후 spectrophotometer를 이용하여 cell을 counting해 세포를 계대배양 한다.

#### 2. 마우스 간 세포주 AML12로부터 노화 세포 생성

Protocol to Generate Senescent Cells from the Mouse Hepatic Cell Line AML12 to Study Hepatic Aging (Cell Press)을 사용하여 노화 세포를 생성한다. 세포배양용 100mm dish에 AML12를  $1.0 \times 10^6$  cells/well로 분주하고 24시간 배양시킨다. 24시간 배양시킨 후 cell이 약 50%-60% 자란 것을 확인하고, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Junsei, 23150-0350, Japan)를 1시간 동안 처리하는 것으로 산화스트레스를 유발한다. 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 시점이 산화스트레스를 주게 되는 day1이다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1시간 처리 후에는 23시간의 회복시간을 가진다. 이어서 day2부터 day6까지 매일 같은 시간에 750μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 동안 처리하고 23시간 동안 회복 기간을 가진다. day7일 때가 노화세포의 Stop point이다. 이 시점에서 세포를 배양하여 하고자 하는 실험을 진행한다.

#### 3. 세포 독성도 측정 (MTT assay)

세포배양용 48well plate에 AML12를  $0.4 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24시간 배양시킨다. 24시간 배양시킨 후 세포가 50%정도 자랐을 때 필버톤 (SIGMA, W3761

08) 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M을 처리 하고 48시간 동안 반응시킨다. 48시간 동안 반응이 완료된 후 세포가 100% 자란 상태일 때 MTT assay를 진행한다. 48시간 동안 반응이 완료된 후 배지를 제거하고 각 well에 5mg/ml 농도의 MTT (Thermo SCIENTIFIC, L11939.03, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액을 250 $\mu$ l씩 처리하여 1시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시킨다. MTT 시약이 들어있는 상층액의 배지를 제거한 후 각 well에 DMSO (SAMCHUN, 000D1137, Korea)를 200 $\mu$ l씩 넣어 15분동안 트위스터에 둬으로써 반응과정 동안 생성된 세포 내의 포르마잔을 녹인다. 이후 Microplate reader(BioTeck)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정한다.

#### 4. 노화 세포 염색 (Senescence-associated $\beta$ -Galactosidase Staining)

Senescence-associated  $\beta$ -Galactosidase Staining은 Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling, #9860)를 사용한다. 12well plate에 AML12 normal cell과 AML12로부터 생성한 노화세포가 Stop point일 때 4\*10<sup>5</sup> cells/well로 분주하고 48시간 배양시킨다. 48시간 배양시킨 후 세포가 100% 자랐을 때 노화세포에 필버톤 (SIGMA, W376108) 100 $\mu$ M을 처리 하고 24시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 plate에 있는 media를 suction하고, 1X PBS (ELPIS BIOTECH, EBA-1105)로 1번 washing한다. Kit에 포함되어 있는 10X Fixative Solution (Cell signaling, #11674)을 1X로 만들어 500 $\mu$ l/well 로 분주한다. 그 후 10-15min 간 room temperature에서 cell을 고정시킨다. Cell을 고정시킨 후 1X PBS (ELPIS BIOTECH, EBA-1105)로 2번 washing한다.  $\beta$ -Galactosidase Staining Solution (930 $\mu$ l 1X Staining Solution #11675, 10 $\mu$ l 100X Solution A #11676, 10 $\mu$ l 100X Solution B #11677, 50 $\mu$ l 20mg/ml X-gal #11678 stock solution)을 500 $\mu$ l/well 로 분주한다.  $\beta$ -Galactosidase Staining Solution을 분주한 후 증발을 방지하기 위해 plate를 파라필름으로 밀봉하여 37°C, no CO<sub>2</sub> 조건의 인큐베이터에서 overnight한다. Overnight 후 현미경으로 cell이 염색된 정도를 확인한다.

#### 5. 단백질 정량

처리가 끝난 AML12 cell plate를 ice에 놓고 1XPBS (ELPIS BIOTECH, EBA-1105)로 2번 washing한다. RIPA buffer (0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5%

deoxycholic acid, 10% NP-40, 10mM EDTA, protease inhibitor, phosphatase inhibitor, Thermo SCIENTIFIC, 89900) 200 $\mu$ l를 각 well에 분주 한 뒤 scraper를 사용하여 샘플을 모아 E-tube에 넣어준다. 그 후 sonicator (SONICS, vibra cell)를 사용하여 2sec씩 3번 분쇄하여 단백질을 추출한다. Albumin standard(2mg/ml)를 serial dilution하여 E-tube에 2mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml으로 만들어준다. BCA protein reagent A (Thermo SCIENTIFIC, #23228)와 BCA protein reagent B (Thermo SCIENTIFIC, #1859078)를 50:1로 mix 해준다. 96well plate에 mix한 BCA reagent를 각 well당 200 $\mu$ l씩 넣어준다. 분주한 BCA reagent에 Albumin standard와 protein sample을 1 $\mu$ l씩 넣어 duplicate해준다. 이때 Blank에는 BCA reagent 외에 아무것도 넣지 않고, 농도 0에는 dH<sub>2</sub>O 1 $\mu$ l를 넣어준다. 각 well에 Albumin standard와 protein sample을 모두 분주 한 후 초록색에서 보라색으로 색의 변화가 나타날 때까지 약 30분 기다려준다. 이후 Microplate reader(BioTeck)를 사용하여 562nm에서 흡광도를 측정한다. BSA standard 단백질의 양(x축)과 측정된 흡광도(y축)를 활용해 샘플의 농도를 계산한다. 그 후 4X sample buffer(0.5M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS (BIO-RAD, 161-0302), 0.4% BPB, 40% glycerol, dH<sub>2</sub>O)와 dH<sub>2</sub>O를 사용하여 1 $\mu$ g/ $\mu$ l의 prtotein sample을 만들어준다. Heat block을 95°C로 설정한 후 sample을 10min간 heating 한다. 단백질 20 $\mu$ g를 9% gel에 50V로 20min, 100V로 100min 전기영동 한다. 그 후 100V로 90min동안 nitrocellulose membrane에 transfer 한다. Transfer가 끝난 후 5% skim milk in 0.1% T-TBS (Difco, 232100)를 사용해 1시간 blocking 하는 과정을 거친다. 0.1% T-TBS에 1차 항체를 희석시켜 4°C에서 overnight한 후 incubation 하고, HRP 결합을 가진 2차 항체를 5% skim milk in 0.1% T-TBS 용액에 10000:1의 비율로 희석시켜 상온에서 1시간 incubation 한다. 반응이 끝난 후 15분씩 3회 0.1% T-TBS로 washing한다. p53 antibody (Cell signaling, 2524S, 1:4000)를 사용하여 p53 발현을 확인하였으며, 단백질 양을  $\beta$ -actin (Proteintech, 1:10000)을 사용하여 보정한다. ECL (WESTAR ANTARES, CYANAGEN) 용액은 membrane에 약 1분간 반응시킨 후, Western Blot & Chemi Imaging (Vilber, FUSION Solo S)을 사용하여 단백질 양을 분석한다.

## 6. RNA 분리와 정량

처리가 끝난 AML12 cell plate의 각 well을 1XPBS (ELPIS BIOTECH, EBA-1105) 용액으로 2번 washing 해준다. 각 well에 TRIzol reagent (Takara Bio Inc, #9109) 1000 $\mu$ l를 넣어 cell membrane 이 완전하게 녹을때까지 pipetting 한다. Cell membrane이 완전하게 녹은 TRIzol reagent를 E-tube에 넣어 준 후 chloroform (SIGMA, C2432) 200 $\mu$ l를 첨가한다. 이때 chloroform과 TRIzol reagent의 비율은 1:5로 맞추어 넣어준다. 이후 chloroform 200 $\mu$ l을 넣은 sample을 30초 15초 15초 간격으로 vortexing한다. Vortexing한 sample은 2-3분간 ice에 두었다가 4°C centrifuge에 12000rpm으로 10min간 원심분리 한다. 이 과정이 끝나고 나면 층 분리가 된 것을 확인할 수 있다. Centrifuge후 분리된 상층의 RNA층을 따서 새로운 E-tube에 옮겨준다. RNA와 동량의 Isopropanol (SAMCHUN, 000P2083) 을 넣고 inverting 해준 후 -20°C에 overnight 한다. 그 후 sample을 4°C centrifuge에 12000rpm으로 20min간 원심분리 한다. 이후 가라앉은 pellet에 주의하며 상층액을 제거한다. 상층액을 제거한 후 70% EtOH 1ml를 넣어준 후 tapping하여 pellet을 떨어뜨려준다. pellet을 떨어뜨린 후 4°C centrifuge에 12000rpm으로 5min간 돌려 원심분리 한다. Pellet이 떨어지지 않게끔 주의하며 70% EtOH을 완전하게 제거한 후 잔여 EtOH이 날아가도록 E-tube 뚜껑을 열어두고 5-10min dry 시켜준다. Dry 후 pellet이 완전히 투명해지면 pellet의 양에 따라 20-30 $\mu$ l의 Rnase free water (SolBio, WAT001)를 넣어준다. 58°C로 설정한 Heat block에 sample을 3min 에 1번씩 총 3번에 걸쳐 tapping하여 완전하게 녹여준다. RNA를 완전히 녹여주는 과정이 끝나고 나면 ice에 sample을 5-10min 둔 후 농도를 측정한다. Biochrom BioDrop  $\mu$ LITE Micro-volume Spectrophotometer을 사용하여 단위를 ng/ $\mu$ l로 설정하고 Rnase free water (SolBio, WAT001)로 blank를 한번 측정해준 후 sample들의 농도를 차례로 측정한다.

## 7. cDNA 합성

RNA isolation을 진행한 후 Real time-PCR을 진행하기 위하여 cDNA를 합성한다. 한 sample 당 10X MMLV buffer (Promega, Madison, #B201) 2.5 $\mu$ l, 10mM dNTP (Promega, Madison, U151B) 1.5 $\mu$ l, Rnase inhibitor (Promega, Madison, #2313A) 1 $\mu$ l, Random primer (150ng/ $\mu$ l, Promega, Madison, C118A) 2 $\mu$ l, MML

V RT Enzyme (Promega, Madison, RT001S) 1 $\mu$ l를 넣어준다. 이때 RNA의 농도는 2 $\mu$ g으로 하며, total volume은 25 $\mu$ l으로 하여 나머지 volume은 Rnase free water (SolBio, WAT001)로 맞춰준다. 그 후 voltexing과 spin down하는 과정을 거친다. TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> 을 사용하여 37°C에서 1hr, 72°C에서 10min, 그 후 4°C로 유지하는 과정을 통해 cDNA를 합성한다.

### 8. Real time-PCR

합성된 cDNA를 주형가닥으로 2X Ex Taq (TaKaRa Bio Inc, #RR820A) 11 $\mu$ l, Rnase free water (SolBio, WAT001) 8 $\mu$ l 및 Rplp0, Trp53, CDKN1A primer (Bionics, Korea) 2 $\mu$ l를 첨가한 후 voltexing과 spin down 하는 과정을 거쳐 duplicate 한다. Real-time PCR 기기 (Takara Bio inc, Japan)를 사용하여 95°C 30sec 1cycle (Hold), 95°C 5sec / 58°C 10sec / 72°C 20sec 40cycle (3 Step PCR), 95°C 15sec / 60°C 30sec / 95°C 15sec (Dissociation)하는 과정을 거쳐 증폭시킨다. 그 후 Real-Time System TP800 software (Takara)를 이용하여 결과를 분석한다. 각 시료의 유전자 발현 양은 Rplp0(36b4)의 발현 양으로 보정한다.

Table1. Primer list for RT-qPCR

Gene name	species	Forward Primer sequence (5' to 3')	Reverse Primer sequence (5' to 3')
Rplp0	Mouse	GATGAGAGCCATGACGACCAGA	TGTGTACCACACCACCCAGGA
Trp53	Mouse	CTCCGAAGACTGGATGACTG	ACAGATCGTCCATGCAGTGAG
CDKN1A	Mouse	TGTCTTGCACTCTGGTGTCTG	CAATCTGCGCTTGGAGTGAT

## 9. 통계처리

본 연구에서 실험은 3번 이상 반복하여 수행했다. 실험 분석 결과는 GraphPad Prism5 software를 활용하여 mean  $\pm$  SD로 나타내었다. 실험군과의 비교는 one-way ANOVA (analysis of variance)를 사용하여 통계적으로 처리하였다. 결과의 유의성은 Tukey (compare all pairs of columns)를 이용하여 확인하였으며, 유의성 수준은 #  $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  로 표시하였다. 유의하지 않은 결과는 NS (Not Significant)로 나타내었다.

## 10. 시약 리스트

FBS (S101-07, Korea, Fetal Bovine serum), P/S (LS202-02, Korea, penicillin-streptomycin), DMEM (LM001-05, Korea, Dulbecco's Modified Eagle Medium), DPBS (LB001-02, Korea), T.E (LS015-01, Korea, Trypsin-EDTA)는 WELGENE에서 구매하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (23150-0350, Japan)는 Junsei에서 구매하였다. 5-Methyl-2-hepten-4-one (W376108), Chloroform (C2432)는 SIGMA에서 구매하였다. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (L11939.03), RIPA buffer (89900), BCA protein reagent A (#23228), BCA protein reagent B (#1859078)는 Thermo SCIENTIFIC에서 구매하였다. DMSO (000D1137, Dimethyl sulfoxide), Isopropanol (000P2083)는 SAMCHUN에서 구매하였다. PBS (EBA-1105)는 ELPIS BIOTECH에서 구매하였다. SDS (161-0302)는 BIO-RAD에서 구매하였다. Skim milk (232100)는 Difco에서 구매하였다. p53 (2524S), Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (#9860)는 Cell signaling에서 구매하였다.  $\beta$ -actin 은 Proteintech에서 구매하였다. ECL은 WESTAR ANTARES, CYANAGEN에서 구매하였다. TRizol (#9109), 2X Ex Taq (#RR820A)는 TaKaRa Bio에서 구매하였다. 10X MMLV RT buffer (#B201), 10mM dNTP (U151B), Rnase inhibitor (#2313A), Random primer (C118A), MMLV RT Enzyme (RT001S)는 Promega에서 구매하였다. Rnase free water (WAT001)는 Sol Bio에서 구매하였다.

## IV. 결과

### 1. 필버톤의 AML12 간세포에서의 세포독성

필버톤을 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M 및 100 $\mu$ M 농도로 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 독성을 확인했다. 결과적으로 AML12 세포에서는 필버톤 처리에 따른 세포 독성이 관찰되지 않았으며, 그래프에 나타난 모든 처리 그룹에서 세포 생존율이 실험군과 유사하게 나타났다(Figure 1). 이러한 결과는 필버톤이 AML12 세포에 대해 선택적이고 안전하게 작용한다는 것을 시사한다. 따라서 필버톤은 세포 독성을 유발하지 않으면서도 특정 세포 주에서 안전하게 사용될 수 있음을 제시하고 있다. 또한 필버톤이 AML12 세포에 대해 안전하게 작용하며, 세포의 생존율에 부정적인 영향을 미치지 않음을 보여준다. AML12 세포에서 필버톤 처리는 세포에 미치는 부정적인 영향이 없거나 미미하며, 필버톤의 농도 변화에 따라 세포 생존율에 유의한 차이가 나타나지 않았다.

### 2. AML12 간세포에서 독소루비신의 노화 유발

독소루비신의 처리가 AML12 세포에서 노화 관련 유전자인 p53의 발현에 영향을 주는 시점을 확인하기 위해, 독소루비신의 다양한 농도 및 처리 시간에 따른 p53 단백질의 발현 양을 조사하였다. AML12 세포에 독소루비신 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M 농도로 6시간, 24시간 처리하여 p53 단백질의 발현을 확인하였다(Figure 2A). 6시간 처리한 그룹에서 독소루비신을 2 $\mu$ M로 처리하였을 때 p53의 발현이 유의하게 증가했다(Figure 2B, left). 또한 24시간 처리한 그룹에서도 독소루비신을 2 $\mu$ M로 처리하였을 때 p53의 발현이 유의하게 증가했다(Figure 2B, right). 특히, 2 $\mu$ M 독소루비신을 6시간 처리한 경우에는 24시간 처리한 것보다 더 높은 발현 양을 관찰하였다. 따라서 6시간 보다 더 적은 시간을 처리했을 때의 p53의 발현 양을 조사해 보았다. AML12 세포에 독소루비신 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M 농도로 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 처리하여 p53 단백질의 발현을 확인하였다(Figure 2C). 1 $\mu$ M 독소루비신을 6시간 처리하였을 때 p53의 발현이 유의하게 증가했다(Figure 2D, left). 또한 2 $\mu$ M 독소루비신을 6시간 처리하였을 때 p53의 발현이 더 유의하게 증가했다(Figure 2D, right). 이를 통해 독소루비신 2 $\mu$ M을 6시간 처리하는 것으로 시점을 설정하였다.



### 3. AML12 간세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 노화 유발

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리가 AML12 세포에서 노화 관련 유전자인 p53의 발현에 영향을 주는 시점을 확인하기 위해, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리 시간에 따른 p53 단백질의 발현 양을 조사하였다. AML12 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750μM 농도로 15분, 30분, 45분, 60분 처리하여 p53 단백질의 발현을 확인하였다(Figure 3A). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750μM을 1시간 처리한 그룹에서 p53의 발현이 유의하게 증가했다(Figure 3B). AML12 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750μM 농도로 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 처리하여 p53 단백질의 발현을 확인하였다(Figure 3C). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750μM을 1시간 처리한 그룹에서 p53의 발현이 유의하게 증가했다(Figure 3D). 이를 통해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750μM을 1시간 처리하는 것으로 시점을 설정하였다.

### 4. AML12로부터 생성된 노화 세포에서의 노화 유발

AML12로부터 생성된 노화세포에서 노화가 일어났는지 확인하기 위해 Senescence-associated β-galactosidase (β-gal) staining을 통해 확인하였다. AML12로부터 생성된 노화세포에서 진해졌던 염색의 강도가 Filbertone을 처리하였을 때 AML12 정상세포와 유사하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 4A). 또한 정상세포와 노화세포를 비교하였을 때 노화가 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, 노화세포에 필버톤을 처리하였을 때 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 4B). 이를 통해 AML12세포로부터 생성된 노화세포가 노화되었다는 것을 확인하였고, 필버톤에 의해 노화의 정도가 억제되는 것을 확인하였다.

### 5. 필버톤이 노화로 유도된 AML12에서 p53의 단백질 발현에 미치는 영향

필버톤의 처리가 노화로 유도된 AML12 세포에서 노화 관련 유전자인 p53의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 p53 단백질의 발현 양을 조사하였다. AML12 세포에 필버톤 25μM, 50μM, 100μM 농도로 24시간 처리한 후 독소루비신 2μM 6시간(Figure 5A), 과산화수소 750μM 1시간동안 처리하여 p53 단백질의 발현을 확인하였다(Figure 5B). 결과적으로 독소루비신만 처리한 그룹에 비해 필버톤을 함께 처리하였을 때 p53의 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 5A). 또한, 과산화수소만 처리한 그룹에 비해 필버톤을 함께 처리하였을 때 p53의 발현이 유의적으로 감소하는 경향을 보이는 것으로 확인하였다(Figure 5B). 이러한 결과는 필버톤의 처리에 의해 독소루비신과 과산화수소에 의해 증가되었던 노화가 억제 되었다는 것을

나타낸다. 이는 필버톤이 노화를 유발하는 환경에서 p53 발현을 억제하는 것을 시사한다.

#### **6. 필버톤이 AML12로부터 생성된 노화 세포에서 p53의 단백질 발현에 미치는 영향**

AML12 정상 세포에서 노화세포를 만들어, 정상세포와 노화세포에 같은 농도의 필버톤을 24시간 처리하였다. 정상세포의 대조군보다 노화세포의 대조군에서 p53 발현이 증가하는 것으로 보아 노화가 유도되었다는 것을 확인하였다. 정상세포와 노화 세포에서 대조군에 비해 필버톤을 처리하였을 때 p53 발현이 감소하는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과는 필버톤이 노화를 유발하는 환경에서 p53 발현을 억제하는 것을 시사한다(Figure 6).

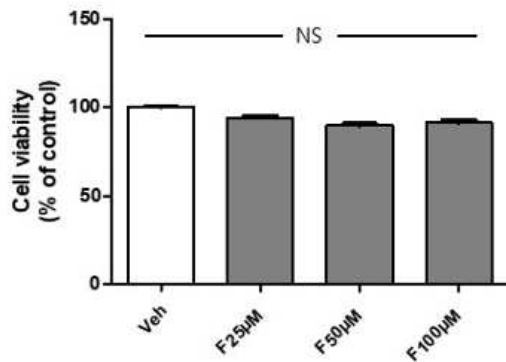
#### **7. 필버톤이 노화로 유도된 AML12에서 p53의 유전자 발현에 미치는 영향**

필버톤의 처리가 노화로 유도된 AML12 세포에서 노화 관련 유전자인 p53의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 p53 mRNA의 발현 양을 조사하였다. AML12 세포에 필버톤을 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M 농도로 24시간 동안 처리한 후 독소루비신 2 $\mu$ M을 6시간(Figure 7A) 및 과산화수소 750 $\mu$ M을 1시간 동안 처리하여 p53의 mRNA 발현을 확인했다(Figure 7B). 결과적으로 독소루비신과 필버톤을 처리한 그룹에서는 p53의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다(Figure 7A). 또한, 과산화수소와 필버톤을 처리한 그룹에서도 p53의 mRNA 발현에 유의한 영향을 미치지 않았다(Figure 7B). 더불어 정상 세포에서 노화세포를 만들어 정상세포와 노화세포에 같은 농도의 필버톤을 24시간 처리한 후 p53의 mRNA 발현을 확인하였을 때에도 유의한 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있다(Figure 7C). 즉, 필버톤은 노화로 유도된 AML12 세포에서 p53의 mRNA 발현에 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

#### **8. 필버톤이 노화로 유도된 AML12에서 p21의 유전자 발현에 미치는 영향**

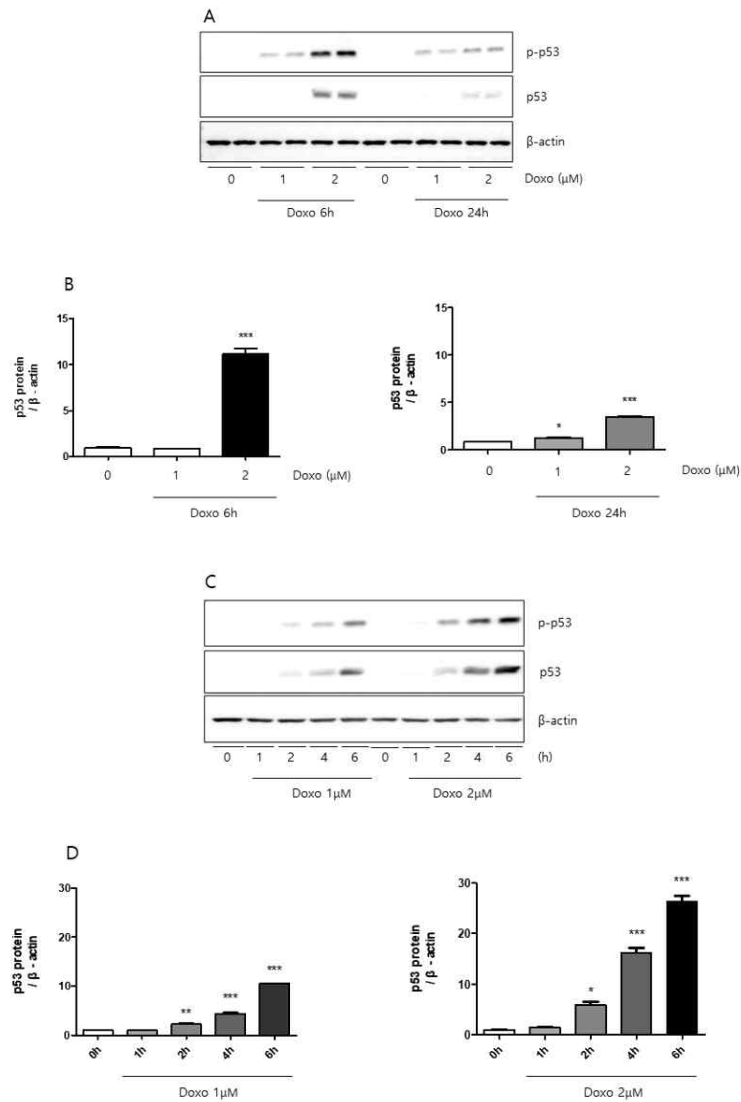
필버톤의 처리가 노화로 유도된 AML12 세포에서 노화 관련 유전자인 p21의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 p21 gene expression을 조사하였다. AML12 세포에 필버톤을 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M 농도로 24시간 동안 처리한 후 독소루비신 1 $\mu$ M을 6시간(Figure 8A) 및 과산화수소 750 $\mu$ M을 1시간 동안 처리하여 p21의 gene ex

pression을 확인했다(Figure 8B). 결과적으로 독소루비신만 처리한 그룹에 비해 필버톤을 함께 처리하였을 때 p21의 gene expression이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 8A). 더불어, 과산화수소만 처리한 그룹에서도 필버톤을 함께 처리하였을 때 p21의 gene expression이 감소하는 경향을 보였다(Figure 8B). 더불어 정상 세포에서 노화세포를 만들어 정상세포와 노화세포에 같은 농도의 필버톤을 24시간 처리한 후 p21의 gene expression을 확인하였을 때에도 필버톤에 의해 p21의 gene expression이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 8C). 이는 필버톤이 노화를 유발하는 조건에서 p21 gene expression을 억제하는 것을 나타내며, 필버톤이 독소루비신과 과산화수소에 의해 증가되었던 노화를 감소시킴으로써 노화를 억제하는 경향이 있다는 것을 시사한다.



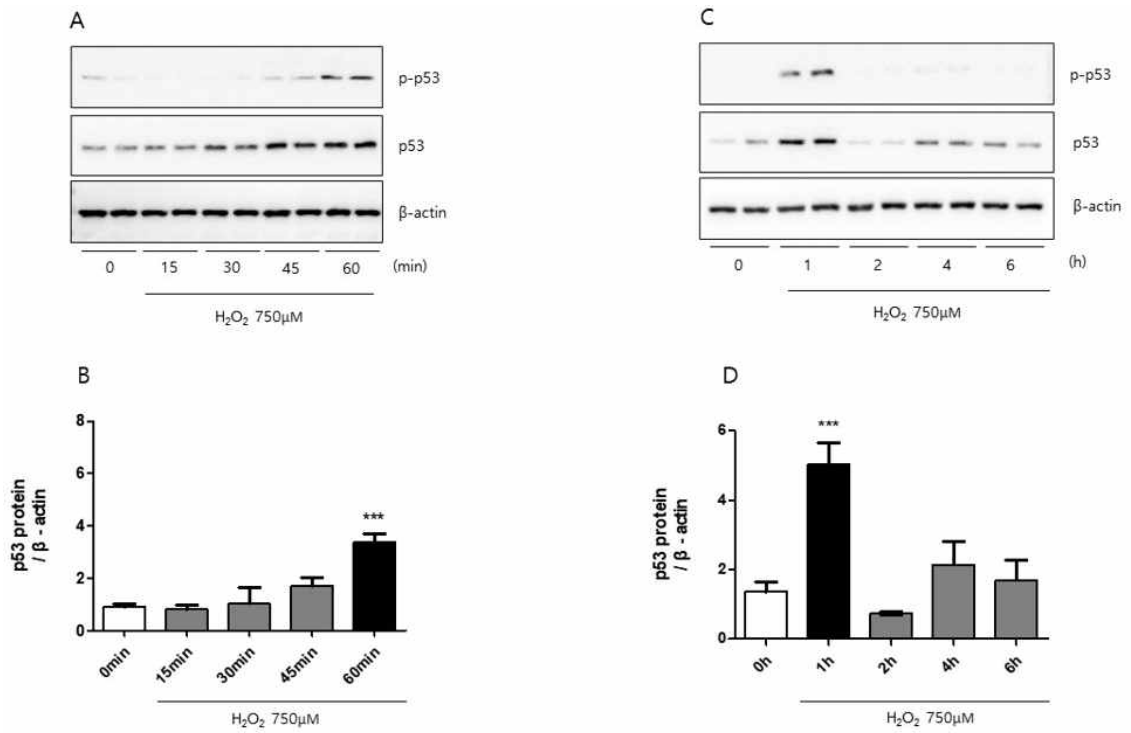
**Figure1. Cytotoxicity of Filbertone in AML12 hepatocytes**

Graph of MTT assay results after a 48hour treatment of AML12 cells with filbertone at concentrations of 25µM, 50µM, and 100µM. The cell viability is expressed as % cell viability in comparison to a positive control (n=4). The data represent mean±SD. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared with control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.



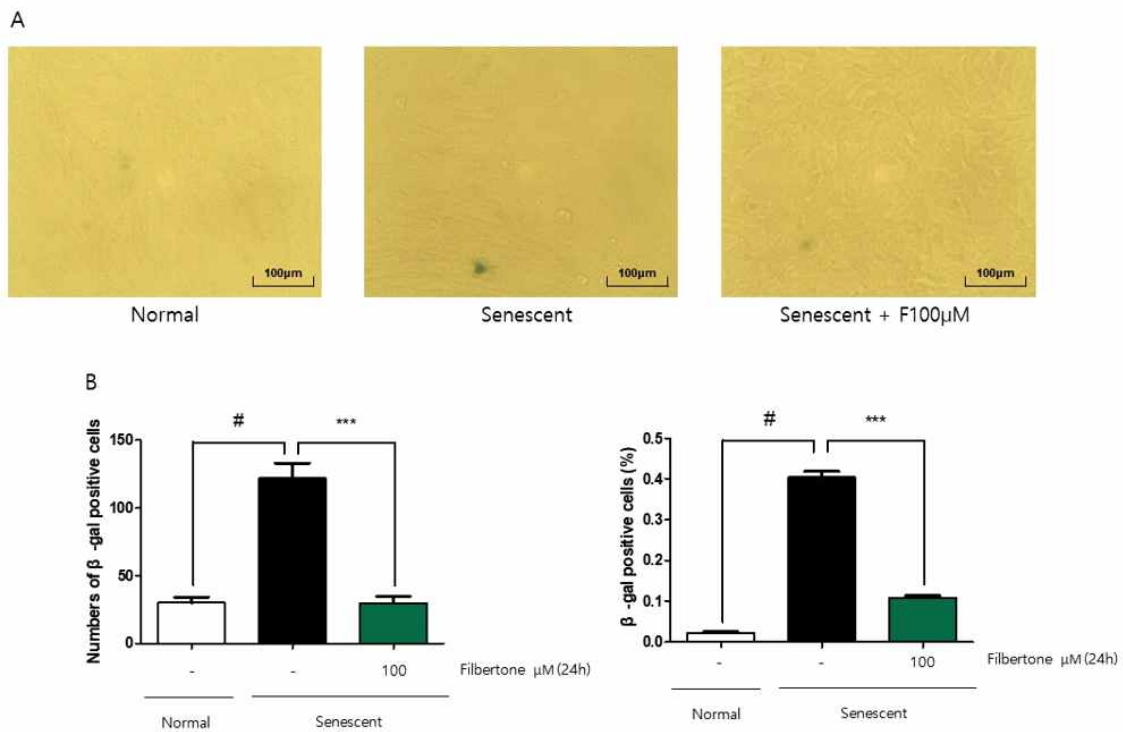
**Figure 2. Doxorubicin induces senescence in AML12 hepatocytes**

(A) Western blot analysis of senescence-related protein. (B) When treated with 1 μM and 2 μM doxorubicin for 6 hours, the protein levels were assessed (left). When treated with 1 μM and 2 μM doxorubicin for 24 hours, the protein levels were assessed (right). (C) Western blot analysis of senescence-related protein. (D) When treated to 1 μM doxorubicin for 1,2,4,6 hours, protein levels were assessed (left). When treated to 2 μM doxorubicin for 1,2,4,6 hours, protein levels were assessed (right) (n=3). Protein levels were normalized to β-actin. The data represent mean±SD. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared with control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.



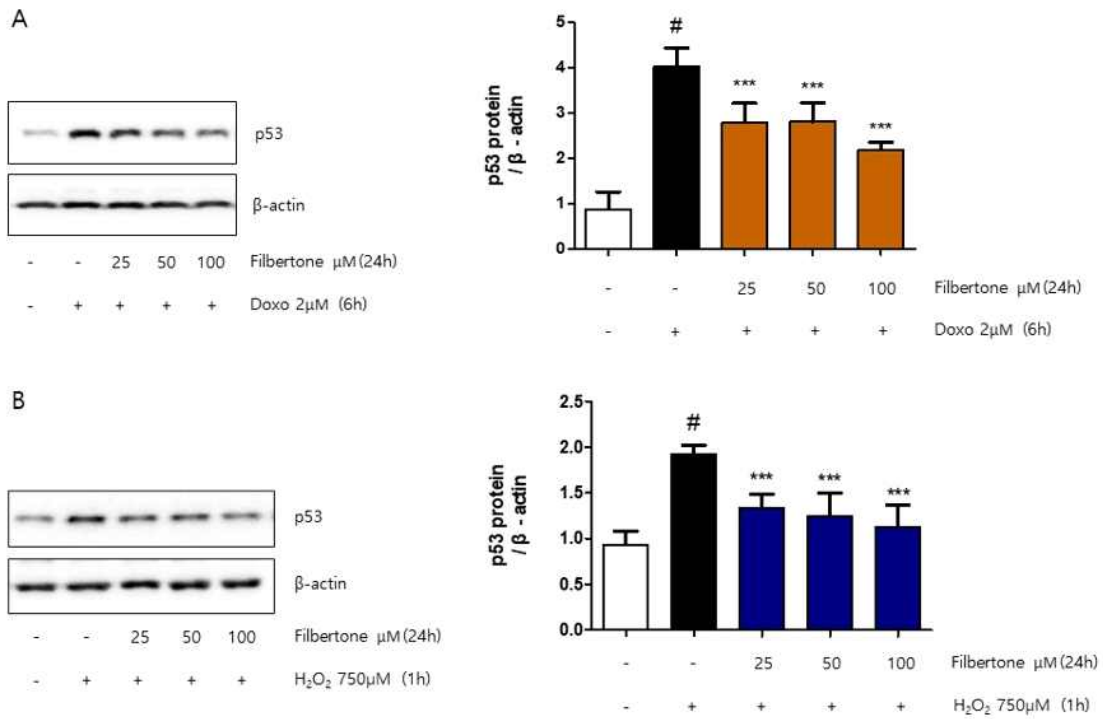
**Figure3.  $H_2O_2$  induces senescence in AML12 hepatocytes**

(A) Western blot analysis of senescence-related protein. (B) When treated with  $750\mu M H_2O_2$  for 15,30,45,60 min, the protein levels were assessed. (C) Western blot analysis of senescence-related protein. (D) When treated with  $750\mu M H_2O_2$  for 1,2,4,6 hours, the protein levels were assessed ( $n=3$ ). Protein levels were normalized to  $\beta$ -actin. The data represent mean $\pm$ SD. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  compared with control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.



**Figure4.** Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) staining of senescent cells derived from AML12 hepatocytes

(A) Representative morphologies of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) stained (bluish-green color) AML12 with normal cell, senescent cells were induced in AML12 cells and then treated with filbertone for 24 hours (scale bar=100 $\mu$ m). (B) Numbers of SA- $\beta$ -gal positive cells (n=3). The data represent mean $\pm$ SD. # p<0.001 vs. normal, and \*\*\*p<0.001 vs. senescent + F100 by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.



**Figure5.** The protein level of p53 is inhibited by filbertone in senescence-induced AML12 hepatocytes

(A) After 24h of filbertone at concentrations of 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , and 100 $\mu\text{M}$  pre-treated on AML12 cells and then treated to doxorubicin 2 $\mu\text{M}$  for 6hours and (B) hydrogen peroxide 750 $\mu\text{M}$  for 1hours (n=5). Protein levels were normalized to  $\beta$ -actin. The data represent mean $\pm$ SD. # p<0.001 vs. negative control, and \*\*\*p<0.001 vs. positive control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.



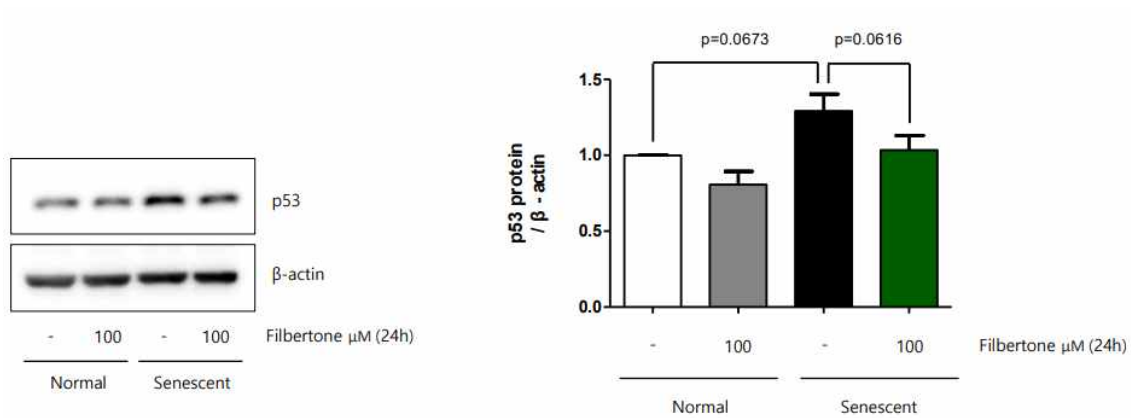


Figure6. The protein level of p53 is inhibited by filbertone in senescent cells derived from AML12 hepatocytes

Senescent cells were induced in AML12 cells and then treated with filbertone for 24 hours to assess the expression of p53 protein (n=3). Protein levels were normalized to β-actin. The data represent mean±SD. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared with control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.

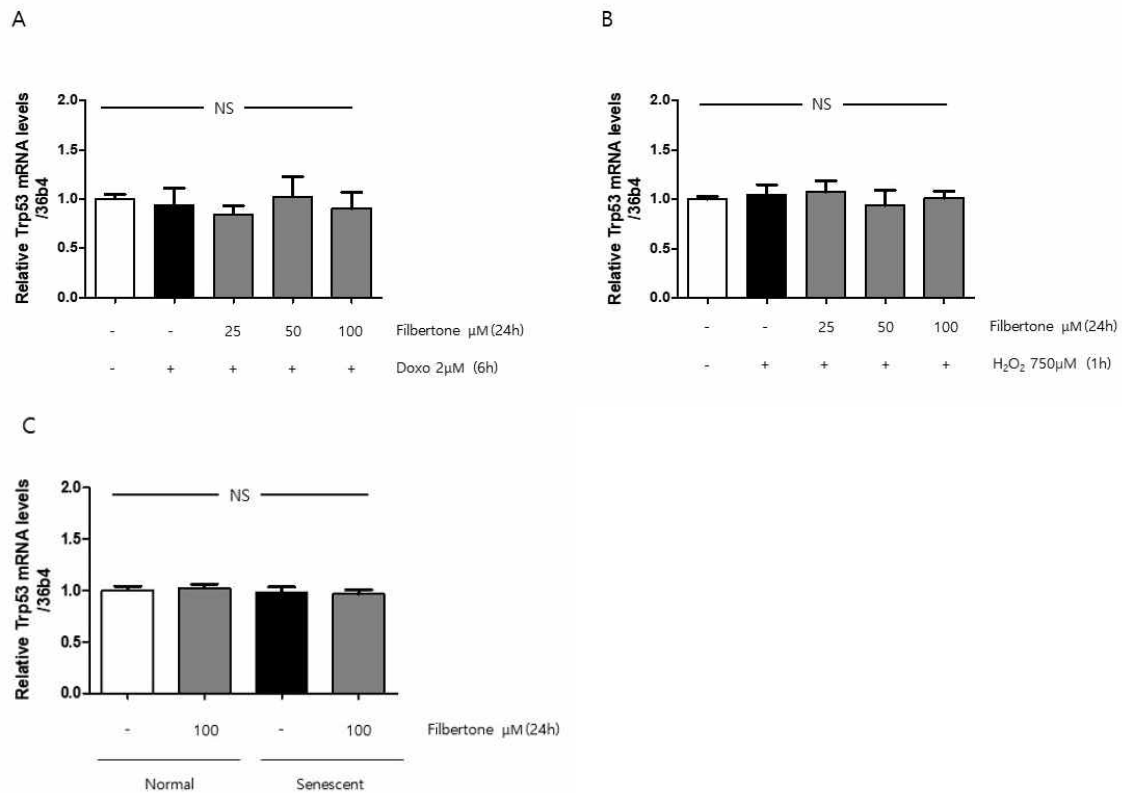
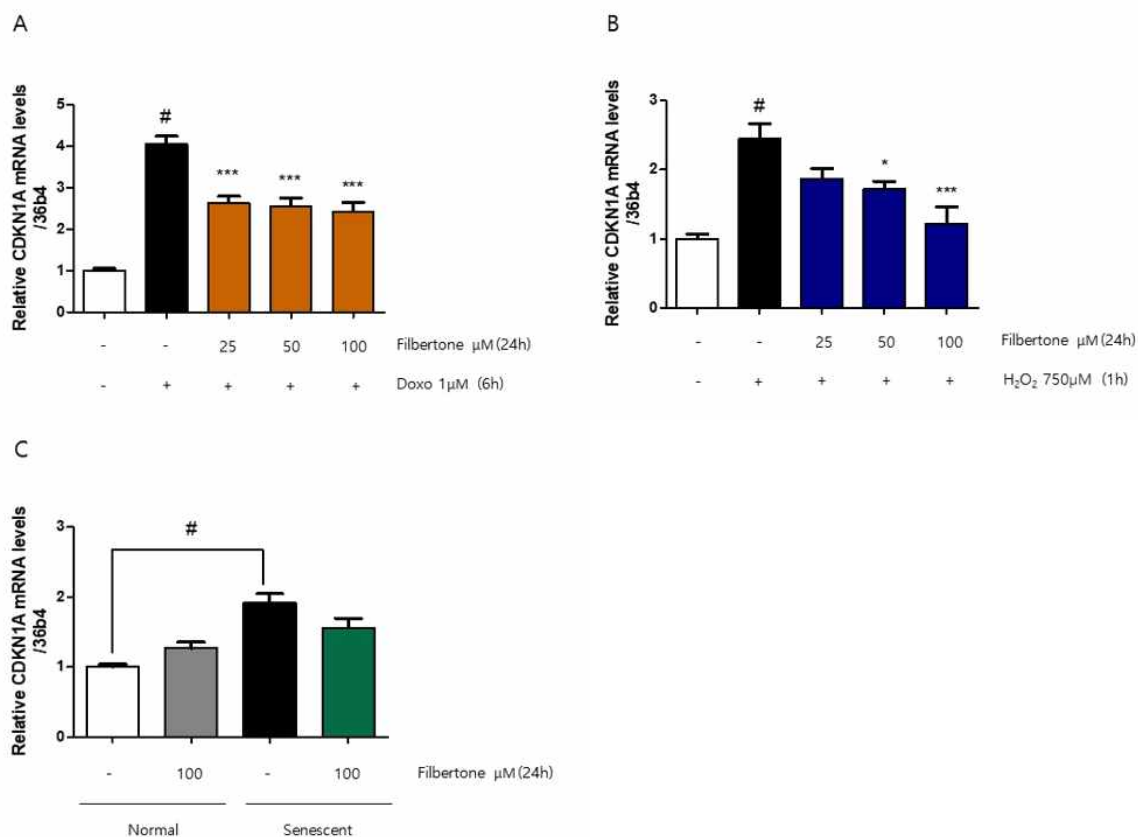


Figure7. The mRNA level of Trp53 (p53) is no effect by filbertone in senescence-induced AML12 hepatocytes and AML12-derived senescent cells

(A) After 24h of filbertone at concentrations of 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , and 100 $\mu\text{M}$  pre-treated on AML12 cells and then treated to doxorubicin 2 $\mu\text{M}$  for 6hours and (B) hydrogen peroxide 750 $\mu\text{M}$  for 1hours to assess the expression of p53 mRNA. (C) Senescent cells were induced in AML12 cells and then treated with filbertone for 24 hours to assess the expression of p53 mRNA (n=3). mRNA levels were normalized to Rplp0 (36b4). The data represent mean $\pm$ SD. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.



**Figure 8.** The mRNA level of CDKN1A (p21) is inhibited by filbertone in senescence-induced AML12 hepatocytes and AML12-derived senescent cells

(A) After 24h of filbertone at concentrations of 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , and 100 $\mu\text{M}$  pre-treated on AML12 cells and then treated to doxorubicin 1 $\mu\text{M}$  for 6hours and (B) hydrogen peroxide 750 $\mu\text{M}$  for 1hours to assess the expression of CDKN1A mRNA. (C) Senescent cells were induced in AML12 cells and then treated with filbertone for 24 hours to assess the expression of p21 mRNA (n=3). mRNA levels were normalized to Rplp0 (36b4). The data represent mean  $\pm$ SD. #  $p < 0.001$  vs. negative control, and \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. positive control by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparisons post hoc test.

## V. 고찰

헤이즐넛의 항비만 및 항염증 효과에 대해서는 알려져 있으나, 헤이즐넛의 성분인 필버톤의 항노화 효과에 관해서는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 마우스의 간세포 (mouse liver cell, AML12)를 연구대상으로 하여 AML12의 노화를 억제할 수 있는 항노화 물질로서 필버톤의 효과에 관해 알아보려고 했다. 본격적인 연구를 진행하기에 앞서 AML12 간세포에 필버톤을 24시간 동안 처리하였고, 노화에 대한 필버톤의 효과를 밝히기 위하여 필버톤 처리 후에 노화유발물질인 독소루비신과 과산화수소를 처리하였다. 독소루비신과 과산화수소의 경우 여러 시간대로 처리해본 후, p53 발현이 가장 많이 일어나는 시점으로 설정하였다.

본 연구에서는 세포 노화의 중요한 인자로 알려진 p53에 주목하였다. 연구 결과, 필버톤 처리는 p53 단백질 수준을 감소시킴으로써 노화 유발 물질로 인한 p53 단백질 발현을 억제함을 확인하였다. 이러한 결과는 필버톤이 세포 노화를 억제하는 효과를 나타낸다. p53 단백질은 세포 주기 조절, 세포 사멸, DNA 손상 등에 관여하는 주요 단백질로, 이러한 단백질 수준의 감소는 세포 노화의 지연과 관련이 있을 것으로 시사된다. 그러나 흥미로운 점은 필버톤 처리에 따른 p53 RNA 수준에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다는 것이다. 이러한 결과는 필버톤이 노화 유발 물질에 의한 p53 RNA 발현을 직접적으로 조절하지 않는다는 것을 나타낸다. 필버톤의 항노화 효과가 주로 p53 단백질 수준에서 나타나며, 이는 세포 노화 억제에 있어서 필버톤의 영향이 주로 단백질 수준에서 일어나는 것으로 추론된다. p53의 activity가 protein을 조절하지만 protein의 변화가 gene expression과는 관련이 없다는 것을 알 수 있다. p53이 노화에 의해 증가한 것을 확인했기 때문에 downstream에도 영향을 줄 것으로 보고 downstream인 p21의 gene expression을 확인해보았다. 필버톤의 처리에 의해 p21의 gene expression 수준은 감소하는 경향을 보였다. 그 결과 p53 protein이 감소하는 것과 동일하게 downstream인 p21의 gene expression이 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 세포 내에서의 유전자 발현과 단백질 수준 간의 복잡한 상호작용을 보여주며, 이를 이해하는 것은 세포의 상태 및 병리학적 과정에 대한 깊은 통찰을 제공할 수 있을 것으로 기대되며 이와 관련된 정확한 분자 기작은 더 깊은 연구가 필요할 것으로 보인다.

p21과 p53은 세포주기 조절과 세포 증식을 조절하는데 핵심적인 역할을 하는 단백질이다. 두 단백질 간의 관계는 매우 밀접하며 복잡하다. 일반적으로, p53은 p21의 발현을 촉진함으로써 세포 주기를 조절한다. p21은 세포 주기의 여러 단계에서 p53의 조절 하에 있는 유전자로, p53에 의해 활성화될 때 p21을 증가시켜 세포 주기를 중단시킨다. 이는 세포가 이상 증식하거나 세포 내에 DNA 손상이 발생한 경우에 세포 주기를 일시적으로 멈추어 세포가 DNA 손상을 복구하거나, 필요한 경우에는 세포 사멸 (apoptosis)로 이끈다. 이러한 p21과 p53의 상호작용은 세포의 정상적인 성장과 복잡한 신호전달 네트워크에서 중요한 역할을 하며, 세포 주기의 이상 증식을 방지하고 세포의 생존과 죽음을 균형 있게 조절한다.

본 연구 결과에서는 필버톤이 노화 유발 물질로 인한 세포 노화를 억제하는데 있어서 중요한 역할을 할 수 있음을 보여준다. p53, p21 단백질은 세포의 건강과 생존에 관련된 핵심적인 인자이며, 필버톤이 이를 조절함으로써 노화를 지연시킬 수 있는 가능성이 제기된다. 이러한 발견은 노화 관련 질병의 예방 및 치료에 새로운 전략을 모색하는데 기여할 수 있을 뿐만 아니라 노화와 관련된 분자 기작을 규명하는데 새로운 방향을 제시한다. 향후 연구에서는 필버톤이 세포 노화를 어떻게 억제하고, 이와 관련된 신호전달 경로 및 유전자 발현을 어떻게 조절하는지에 대한 더 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 보이며 세포 노화와 관련된 기본적인 이해를 확장시키고, 노화 관련 질병에 대한 새로운 치료법을 개발하는 데 기여할 것으로 기대된다.

더불어 필버톤의 세포 노화를 억제하는 효과를 입증함으로써, 필버톤이 항노화 물질로서 노화 관련 질병의 예방과 치료에 활용될 수 있는 가능성이 제시된다. 또한 세포 노화 연구 분야에 새로운 시각을 제공하며, 필버톤이 세포 노화와 관련된 중요한 단백질 조절 메커니즘을 가진 성분임을 시사한다. 향후 필버톤의 노화와 관련된 다양한 질병이나 질병의 치료 및 예방에 대한 잠재적인 활용 가능성에 대하여는 더 연구될 필요가 있으며, 미래의 임상 연구 및 신약 개발에 기초를 제공하며, 노화 관련 질병에 대한 효과적인 치료법을 개발하는 데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구의 한계점은 첫 번째, in vitro 실험만을 수행하여 얻은 결과를 기반으로 하고 있다는 것이다. 이로 인해 세포 외 환경에서의 결과를 반영할 수 있는 능력이

제한되어 있다. 향후 연구에서는 in vivo 실험을 추가적으로 수행하여 더 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 필요가 있다. 두 번째, senescence pathway의 일부로 p53과 p21에 중점을 두고 있다. 그러나 이러한 경로는 더 넓은 맥락에서 상호작용하므로 다른 관련된 유전자와 단백질들에 대한 연구도 필요하다. 세 번째, p53의 경우 protein과 RNA level을 모두 확인하였지만 protein level이 감소하고 RNA level이 감소하는 것에 대한 추가적인 실험이 필요하다. RNA 보다 protein이 더 빨리 분해되는 경우 RNA level은 변하지 않고 protein level이 감소할 수 있으며, protein이 cell 내에서 수명이 짧아서 protein은 계속 감소하지만 RNA는 일정한 경우가 존재할 수 있다. 또한 protein은 translation후에도 다양한 modification 거칠 수 있다. 그렇기 때문에 protein이 변형되어 활성이 감소하면서 RNA level은 그대로 일 수 있다. 따라서 연구의 신뢰성을 강화하기 위해 추가적인 실험과 연구가 필요할 것으로 보인다.

마우스 세포에서 노화에 대한 개선은 인간의 노화에서도 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 가능성을 시사한다. 간세포의 노화는 간 기능을 떨어지게 하여 재생능력 감소, 간세포 암종의 발생을 증가 시킨다. 노화된 세포에서의 부정적인 기능을 억제시키는 것은 다양한 질환과 노화에 효과를 나타낼 것이라고 기대된다. 노화와 질병 간의 관련성이 높기 때문에 노화 과정을 제어할 수 있는 항노화 물질에 대한 연구의 필요성이 더욱 부각되고 있다. 이러한 연구는 노화 관련 질병에 대한 효과적인 치료법을 개발하는 데 기여할 것으로 기대되며, 잠재적으로는 노화와 관련된 질병의 예방에도 기여할 수 있을 것이다. 또한 필버튼이 세포 노화와 관련된 기본적인 이해를 확장시키고, 노화 관련 질병에 대한 새로운 치료법을 개발하는 데 기여할 수 있을 것으로 보인다.

VI. 결론

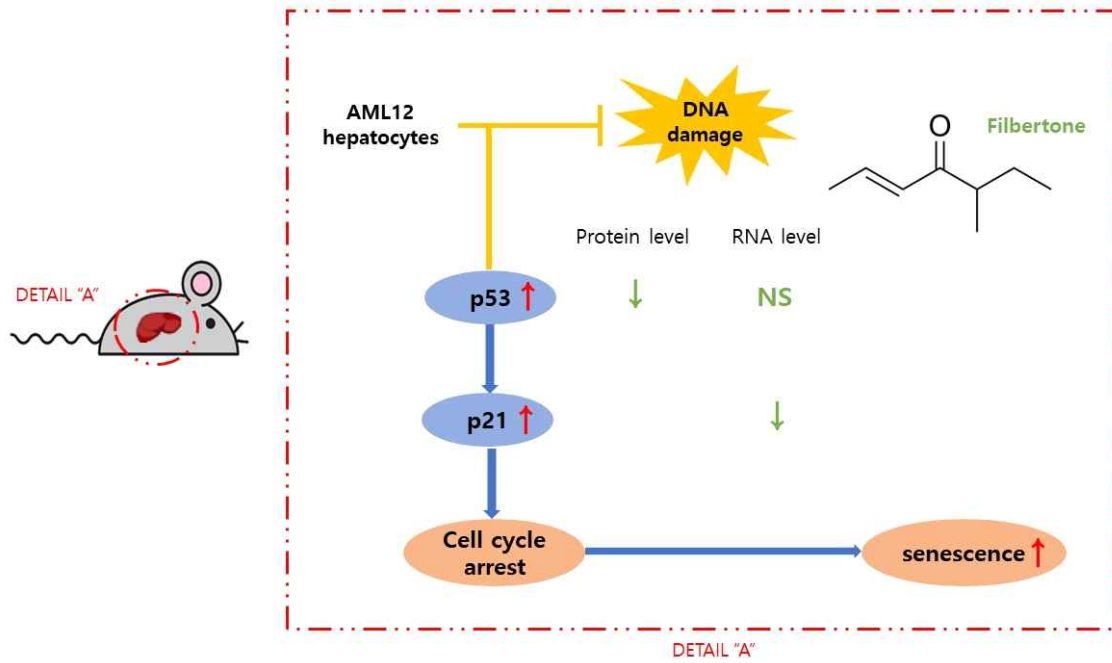


Figure9. Filbertone may suppress senescence in AML12 hepatocytes

## VII. 영문 요약

Aging, a phenomenon where biological functions decline over time, can be observed at individual, cellular, and even molecular levels. Recent research indicates that as organisms age, the number of senescent cells in the body increases, and these senescent cells are directly related to age-related diseases in the elderly. South Korea is currently transitioning into a super-aged society where half of the population is elderly. With the growing elderly population, there is a heightened interest in aging, leading to extensive research aimed at finding ways to delay this process. Filbertone, a natural compound found in hazelnuts and responsible for their aroma, has been reported to have preventive and therapeutic effects against obesity, diabetes, dyslipidemia, fatty liver, and insulin resistance syndrome. However, little research has been conducted on the antioxidant effects of filbertone. Therefore, this study investigates whether filbertone can inhibit aging induced by  $H_2O_2$  and Doxorubicin in mouse liver cells. The results revealed a decrease in the protein levels of p53, which is involved in cell cycle control and apoptosis induction, upon filbertone treatment. These findings indicate that filbertone inhibits cellular senescence by suppressing the increased expression of p53 protein induced by aging-related agents. In contrast, significant changes were not observed at the p53 RNA level following filbertone treatment. This suggests that filbertone's antioxidant effects primarily manifest at the protein level, focusing on the impact on protein levels. However, it was observed that the RNA levels of p21, a key player in cell cycle regulation and cell proliferation, decreased upon treatment with filbertone. These discoveries contribute to exploring new strategies for the prevention and treatment of age-related diseases and provide a novel direction for unraveling the molecular mechanisms associated with aging.



## VIII. 참고 문헌

1. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 729-740.
2. Chen, J., D. Wang, Y. Zong and X. Yang (2021). "DHA Protects Hepatocytes from Oxidative Injury through GPR120/ERK-Mediated Mitophagy." *Int J Mol Sci* 22(11).
3. Collado, M., M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." *Cell* 130(2): 223-233.
4. Ferreira-Gonzalez, S., W. Y. Lu, A. Raven, B. Dwyer, T. Y. Man, E. O'Duibhir, P. J. S. Lewis, L. Campana, T. J. Kendall, T. G. Bird, N. Tarrats, J. C. Acosta, L. Boulter and S. J. Forbes (2018). "Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration." *Nat Commun* 9(1): 1020.
5. Huang, Y. H., M. H. Chen, Q. L. Guo, Z. X. Chen, Q. D. Chen and X. Z. Wang (2020). "Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis." *Cell Signal* 66: 109445.
6. Igarashi, N., K. Miyata, T. M. Loo, M. Chiba, A. Hanyu, M. Nishio, H. Kawasaki, H. Zheng, S. Toyokuni, S. Kon, K. Moriyama, Y. Fujita and A. Takahashi (2022). "Hepatocyte growth factor derived from senescent cells attenuates cell competition-induced apical elimination of oncogenic cells." *Nat Commun* 13(1): 4157.
7. Inoue, C., C. Zhao, Y. Tsuduki, M. Uono, L. Wang, M. Nomura and Y. Katakura (2017). "SMARCD1 regulates senescence-associated lipid accumulation in hepatocytes." *NPJ Aging Mech Dis* 3: 11.
8. Jiang, C., H. Chen, Y. Kang, X. He, J. Huang, T. Lu, X. Sui, H. Chen, J. Xiao, J. Zhang, H. Zhang, J. Zheng, Y. Yang, J. Yao, J. Cai and Y. Zhang (2023). "Administration of AG490 decreases the senescence of umbilical cord-mesenchymal stem cells and promotes the cytotherapeutic effect in l

- iver fibrosis." *Cell Death Discov* 9(1): 273.
9. Jing, F. Y., Y. J. Weng and Y. Q. Zhang (2022). "The Protective Effect of Sericin on AML12 Cells Exposed to Oxidative Stress Damage in a High-Glucose Environment." *Antioxidants (Basel)* 11(4).
  10. Ju, J., J. C. Schmitz, B. Song, K. Kudo and E. Chu (2007). "Regulation of p53 expression in response to 5-fluorouracil in human cancer RKO cells." *Clin Cancer Res* 13(14): 4245-4251.
  11. Kim, H. and B. Ahn (2023). "Filbertone, (2E)-5-methyl-2-hepten-4-one, regulates thermogenesis and lipid metabolism in skeletal muscle of a high-fat diet fed mice." *Applied Biological Chemistry* 66(1).
  12. Kohli, R., X. Pan, P. Malladi, M. S. Wainwright and P. F. Whittington (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species signal hepatocyte steatosis by regulating the phosphatidylinositol 3-kinase cell survival pathway." *J Biol Chem* 282(29): 21327-21336.
  13. Lin, H., Y. S. Huang, J. M. Fustin, M. Doi, H. Chen, H. H. Lai, S. H. Lin, Y. L. Lee, P. C. King, H. S. Hou, H. W. Chen, P. Y. Young and H. W. Chao (2021). "Hyperpolyploidization of hepatocyte initiates preneoplastic lesion formation in the liver." *Nat Commun* 12(1): 645.
  14. Luo, X., X. Jiang, J. Li, Y. Bai, Z. Li, P. Wei, S. Sun, Y. Liang, S. Han, X. Li and B. Zhang (2019). "Insulin-like growth factor-1 attenuates oxidative stress-induced hepatocyte premature senescence in liver fibrogenesis via regulating nuclear p53-progerin interaction." *Cell Death & Disease* 10(6).
  15. Marei, H. E., A. Althani, N. Afifi, A. Hasan, T. Caceci, G. Pozzoli, A. Morrione, A. Giordano and C. Cenciarelli (2021). "p53 signaling in cancer progression and therapy." *Cancer Cell Int* 21(1): 703.
  16. Moon, Y., T. Tong, W. Kang and T. Park (2019). "Filbertone Ameliorates Adiposity in Mice Fed a High-Fat Diet via Activation of cAMP Signaling." *Nutrients* 11(8).
  17. Mukhopadhyay, B., K. Holovac, K. Schuebel, P. Mukhopadhyay, R. Cina

- r, S. Iyer, C. Marietta, D. Goldman and G. Kunos (2023). "The endocannabinoid system promotes hepatocyte progenitor cell proliferation and maturation by modulating cellular energetics." *Cell Death Discov* 9(1): 104.
18. Muratsu, J., M. Iwabayashi, F. Sanada, Y. Taniyama, R. Otsu, H. Rakugi and R. Morishita (2017). "Hepatocyte Growth Factor Prevented High-Fat Diet-Induced Obesity and Improved Insulin Resistance in Mice." *Sci Rep* 7(1): 130.
19. Mutsnaini, L., J. Yang, J. Kim, C.-S. Kim, C.-H. Lee, M.-S. Kim, T. Park, T. Goto and R. Yu (2021). "Filbertone Protects Obesity-induced Hypothalamic Inflammation by Reduction of Microglia-mediated Inflammatory Responses." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 26(1): 86-92.
20. Nishizawa, H., G. Iguchi, H. Fukuoka, M. Takahashi, K. Suda, H. Bando, R. Matsumoto, K. Yoshida, Y. Odake, W. Ogawa and Y. Takahashi (2016). "IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner." *Sci Rep* 6: 34605.
21. Ogrodnik, M., S. Miwa, T. Tchkonja, D. Tiniakos, C. L. Wilson, A. Lahat, C. P. Day, A. Burt, A. Palmer, Q. M. Anstee, S. N. Grellscheid, J. H. J. Hoeijmakers, S. Barnhoorn, D. A. Mann, T. G. Bird, W. P. Vermeij, J. L. Kirkland, J. F. Passos, T. von Zglinicki and D. Jurk (2017). "Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis." *Nat Commun* 8: 15691.
22. Park, S., K. J. Bak, C. Y. Ok, H.-J. Park, H.-O. Jang, M.-K. Bae and S.-K. Bae (2017). "Melatonin Rescues Human Dental Pulp Cells from Premature Senescence Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." *International Journal of Oral Biology* 42(3): 91-97.
23. Sefried, S., H. U. Haring, C. Weigert and S. S. Eckstein (2018). "Suitability of hepatocyte cell lines HepG2, AML12 and THLE-2 for investigation of insulin signalling and hepatokine gene expression." *Open Biol* 8(10).
24. Shin, Y.-A., C.-S. Kim and D.-H. Park (2018). "Effects of Physical Activity, Exercise Training and Physical Fitness on Telomere Length as Biomarker of Cell Aging." *Exercise Science* 27(2): 96-108.

25. Sim, B. C., Y. E. Kang, S. K. You, S. E. Lee, H. T. Nga, H. Y. Lee, T. L. Nguyen, J. S. Moon, J. Tian, H. J. Jang, J. E. Lee and H. S. Yi (2023). "Hepatic T-cell senescence and exhaustion are implicated in the progression of fatty liver disease in patients with type 2 diabetes and mouse model with nonalcoholic steatohepatitis." *Cell Death Dis* 14(9): 618.
26. Song, S., L. Chu, H. Liang, J. Chen, J. Liang, Z. Huang, B. Zhang and X. Chen (2019). "Protective Effects of Dioscin Against Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity Via Regulation of Sirt1/FOXO1/NF-kappaB Signal." *Front Pharmacol* 10: 1030.
27. Sun, J., Y. Wen, Y. Zhou, Y. Jiang, Y. Chen, H. Zhang, L. Guan, X. Yao, M. Huang and H. Bi (2018). "p53 attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity by regulating drug-metabolizing enzymes and transporter expression." *Cell Death Dis* 9(5): 536.
28. Tu, X., Y. Zhang, X. Zheng, J. Deng, H. Li, Z. Kang, Z. Cao, Z. Huang, Z. Ding, L. Dong, J. Chen, Y. Zang and J. Zhang (2017). "TGF-beta-induced hepatocyte lincRNA-p21 contributes to liver fibrosis in mice." *Sci Rep* 7(1): 2957.
29. Wang, C., W. J. Chen, Y. F. Wu, P. You, S. Y. Zheng, C. C. Liu, D. Xiang, M. J. Wang, Y. C. Cai, Q. H. Zhao, U. Borjigin, W. Liu, W. J. Xiong, K. J. Wangenstein, X. Wang, Z. M. Liu and Z. Y. He (2018). "The extent of liver injury determines hepatocyte fate toward senescence or cancer." *Cell Death Dis* 9(5): 575.
30. Wang, H., M. Guo, H. Wei and Y. Chen (2023). "Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy." *Signal Transduct Target Ther* 8(1): 92.
31. Wang J, Zhou M, Wu T, Fang L, Liu C, Min W. 2020. Novel anti-obesity peptide (RLLPH) derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch) protein hydrolysates inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by regulating adipogenic transcription factors and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation. *J Biosci Bioeng* 129: 259-68

32. Zhang, H.-T., T. Gui, R.-X. Liu, K.-L. Tong, C.-J. Wu, Z. Li, X. Huang, Q.-T. Xu, J. Yang, W. Tang, Y. Sang, W. Liu, N. Liu, R. D. Ross, Q.-Y. He and Z.-G. Zha (2021). "Sequential targeting of YAP1 and p21 enhances the elimination of senescent cells induced by the BET inhibitor JQ1." *Cell Death & Disease* 12(1).
33. Zhu, R. Z., B. S. Li, S. S. Gao, J. H. Seo and B. M. Choi (2021). "Luteolin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cellular senescence via modulation of SIRT1 and p53." *Korean J Physiol Pharmacol* 25(4): 297-305.
34. Zhu, W., X. Zhang, M. Yu, B. Lin and C. Yu (2021). "Radiation-induced liver injury and hepatocyte senescence." *Cell Death Discov* 7(1): 244.

## IX. 약어 표

BPB	Bromophenol blue
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribo nucleic acid
Doxo	Doxorubicin
FBS	Fetal Bovine serum
GRAS	generally recognized as safe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	reactive oxygen species
PBS	phosphate-buffered saline
P/S	penicilin-streptomycin
p53	TP53, tumor protein p53
p21	CDKN1A, cyclin dependent kinase inhibitor 1A
SDS	sodium dodecyl sulfate
T.E	Trypsin-EDTA

## X. 감사의 글

우선 바쁜 시간을 내주시어 저의 학위 논문을 심사 해주신 유리나 교수님, 안병용 교수님, 장유미 교수님께 감사하다는 말씀 드립니다.

처음 해보는 실험실 생활은 결과로 인해 성취감을 주기도 했고 때로는 허탈감을 주기도 했습니다. 하지만 안병용 교수님의 가르침과 충고로 인해 2년의 석사 생활을 잘 마무리 할 수 있었습니다. 선배가 없던 저희에게 실험과 실험실 생활에 대해 하나 하나 알려주시느라 노고 많으셨습니다. 교수님께서 해주신 말씀들은 앞으로 제가 나아가는데 있어서 좋은 영향을 줄 것이며 늘 감사했다고 말씀 드리고 싶습니다.

2년의 석사 생활 동안 같이 힘이 되어준 수민이, 예진이 에게도 감사합니다. 모두 처음 해보는 실험실 생활에서 어려움을 겪는 순간들에 서로가 있었기에 격려해주고 북돋아 주면서 잘 견딜 수 있었습니다, 2년 동안 함께 들었던 충고들과 서로 해주었던 응원들이 좋은 발판이 되어 미래에 큰 힘이 될 것이라고 생각하며 늘 고마웠다고 마음을 전합니다.

그리고 제가 석사 1학기 옯을 때 인턴으로 들어와 지금은 석사 3학기를 앞두고 있는 민지, 형모에게도 잘할 수 있을 것이라고 응원의 말을 보냅니다. 부족했지만 제가 가르쳐 주는 것을 잘 따라와주고 함께 성장할 수 있어서 고마웠다고 전하고 싶습니다.

잘 하고 있는지 제 자신에게 의심이 들 때 옆에서 곳곳이 잘하고 있다고 응원해주며 기댈 수 있게 해주고, 늘 힘이 되어주고 격려해 준 저의 남자친구 강현오빠에게도 감사의 말을 전합니다. 막막할 때도 있었던 2년의 석사 생활에서 덕분에 마지막까지 잘 헤쳐나갈 수 있었다고 생각합니다. 좋은 일이 있을 때 덕분에 더 많이 웃었고 힘들 때에는 웃었던 시간들을 생각하며 버틸 수 있었습니다. 옆에서 변함없이 힘이 되어줘서 감사하다고 마음을 전합니다.

대학원에 진학하고자 했을 때 제 선택을 믿고 지원해주신 부모님께도 감사한 마음을 전합니다. 엄마 아빠가 저를 믿어주셔서 제가 여기까지 할 수 있었고, 그 덕분에 더 나아가려는 다짐을 하게 되었습니다. 부모님께서 해주신 은혜에 보답할 수 있는 자랑스러운 딸이 되도록 하겠습니다. 다시 한번 진심으로 감사합니다. 그리고 하나뿐인 내 동생이자 베프인 수경이 에게도 고맙다고 말해주고 싶습니다. 나이차이가 많이 나는 편이지만 그런 생각이 들지 않을 정도로 성숙하고 진심어린 응원으로 제게 힘을 주었고, 제가 힘들어할 때 누구보다 응원과 격려를 아끼지 않고 언니는 잘 할 거라고 해 주어서 감동 받았던 기억이 납니다. 수경이 에게도 앞으로의 대학생활 잘 할 수 있을 것이라고 언니가 누구보다 항상 응원한다고 전하고 싶습니다.

이렇게 많은 분들이 도와주셨기 때문에 지금의 제가 있을 수 있었습니다. 처음 해보는 실험실 생활과 처음 써보는 논문은 저에게 어려움을 주기는 했지만 저를 더욱 단단하게 해주었고, 결국 감사의 글을 쓰는 이 시간을 가능하게 해주었습니다. 2년간의 석사 생활은 마무리되었지만 많은 분들의 따뜻한 응원을 마음에 간직하며, 이 경험을 바탕으로 앞으로 잘 나아가겠습니다!