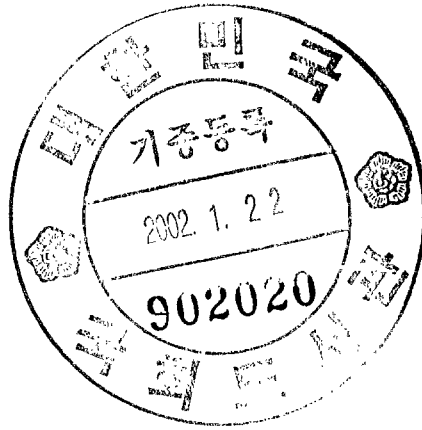


국산농림자원으로부터 노화억제소재의 탐색 및
노인용 기능성 식품의 개발
Screening of Anti-aging Biomaterials from
Agricultural Resources and Development of
Functional Foods for Elderly

연구기관

한림대학교

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국산농림자원으로부터 노화억제소재의 탐색 및 노인용
기능성식품의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 5일

주관연구기관명 : 한림대학교

총괄연구책임자 : 신 현 경

세부연구책임자 : 이 재 용

오 양 석

연구 원 : 김 현 석, 김 용 속,

서 준 교, 도 선 길,

김 현 진, 최 낙 진,

박 소 영, 박 옥 희

요 약 문

I. 제목

국산 농림 자원으로부터 노화억제 소재의 탐색 및 노인용 기능성 식품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 수명이 급속히 연장됨에 따라서 노인인구의 비율이 증가하고, 이에 따라 각종 퇴행성 만성질환의 발병이 지속적으로 증가하고 있으므로 이에 근본적으로 대처하기 위해서는 노화의 억제를 가능하게 하는 소재를 탐색하고 이를 식품 등의 형태로 개발하여 활용하는 연구가 절실하게 필요하다. 특히 현재 65세 이상의 노령 인구가 인구의 7% 이상을 넘어서고 앞으로 지속적으로 증가할 것이 예상되며 이에 따라 이들을 대상으로 한 실버산업의 수요가 크게 증가할 것으로 보인다. 실버산업 중에서도 노인들은 건강에 가장 많은 관심을 가지고 있기 때문에 노화를 억제하거나 노화에 기인하여 유발되는 각종 질병의 예방에 효능이 있는 노인용 기능성식품의 수요가 큰 시장을 형성할 것으로 보이므로 이에 적극적으로 대처할 필요가 있다. 또한 농산물의 시장개방 이후 우리 농산물은 일반적 소비형태로는 수지를 맞출 수 없기 때문에 노화억제 또는 노인성 질환예방과 같은 새로운 기능성 소재 작물을 발굴, 재배, 가공함으로써 그 활로를 찾을 수 있을 것으로 판단되기 때문에 국산자원으로부터 노화억제 소재를 탐색하고 이를 이용하여 기능성식품을 개발하기 위한 본 연구를 수행하게 되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- In vitro 노화억제 소재 검색 방법의 확립
- 대상 농림 자원을 수집, 추출, 농축, 건조 처리하여 시료 추출물 준비
- 추출물에 대한 in vitro 노화억제 소재의 검색
- 노화억제소재의 분획 및 그 효능 평가
- 유효성분의 분리
- 노화 실험동물의 육종

- 실험동물에서 노화억제소재의 효능 검증
- 노화억제 소재의 노화억제기작 조사
- 기능성식품 제조방법 개발 및 시제품 제조

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. *In vitro* 노화억제 소재 검색 방법의 확립

인간의 태아 섬유아세포(human embryonic fibroblast)의 최대 분열수를 측정함으로써 노화에 미치는 영향을 측정할 수 있는 방법을 확립하였다. 최대 분열수 조사와 더불어 보조적인 방법으로 β -galactosidase의 발현을 염색법으로 조사하고 아울러 노화관련 단백질인 p21의 발현을 조사하는 방법을 사용하는 검색방법을 확립하였다.

나. 농림자원의 수집, 추출, 농축, 건조처리

자료조사를 통하여 생약소재 32종 및 채소류 40종, 두류 및 곡류 12종, 과일 및 서류 16종 해조류 2종을 수집한 다음 이들을 70% 에탄올 용액으로 추출, 농축한 다음 냉동건조 하여 그 수율을 조사하고 *in vitro* 검색 및 *in vivo* 실험에 사용하였다.

다. *In vitro* 노화억제소재의 검색

In vitro 검색방법으로 생약소재 중에서는 현삼과 익모초 그리고 식품소재 중에서는 기장과 감자가 노화억제 효과가 있는 소재로 선발되었다.

라. 노화 실험동물의 육종 및 *in vivo* 효능 측정 방법 확립

ICR 마우스를 사육하면서 체중, 혈당, 혈장지질치, 혈액 조성치를 조사한 결과 마우스가 12개월령 이상이면 노령화 된 것으로 볼 수 있고 이들을 사용하여 6개월 정도 시료 소재를 투여하는 방법이 효능 검증 실험에 적합할 것으로 조사되었다. *In vivo* 효능의 측정방법으로는 체중변화, 혈당변화, 혈액지질치의 변화, 혈액조성치의 변화와 더불어 행동학적 조사로서 open field

test, rotor rod test, wheel test 및 총 활동량(total activity)을 측정하는 것이 타당할 것으로 판단된다.

마. 노화억제 소재의 분획 및 정제

현삼과 익모초에 대하여 Sephadex G50 column chromatography 및 HPLC를 사용하여 분리한 분획물에 대하여 그 효능을 β -gal 염색법으로 조사한 결과 현삼의 fraction 3, 익모초의 fraction 2가 노화억제능이 제일 우수한 fraction으로 밝혀졌다.

바. 선발소재의 in vivo 효능 실험

현삼, 익모초 및 기장의 추출물 및 현삼 분획을 12개월 또는 16개월 된 노령 마우스에 6개월간 투여하여 효능을 조사하였다. 현삼과 익모초는 음용수에 1%, 0.1% 농도로 용해하여 투여하였고 기장은 고형사료에 1% 및 0.1% 농도로 혼합하여 투여하였다. 조사된 항목중 모든 처리구에서 차이가 없었으나 현삼 1% 투여구 및 현삼 분획물 1% 투여구에서 대조구에 비해 총 활동량이 현저히 증가된 결과를 나타냈으며 이는 중요한 노화억제 효과로 판단된다.

사. 노화억제의 기작 조사

현삼추출물을 이용하여 생화학적 및 분자생물학적 방법으로 노화억제 기작을 조사하기 위하여 노화표식 단백질의 분석, DNA 손상분석, 항산화효소 활성 측정, 미토콘드리아 손상 분석 및 지방 과산화도를 측정하여 분석한 결과 현삼추출물에 의한 노화억제는 성장정지의 지연, free radical의 생성감소, DNA와 미토콘드리아 손상 저지 및 지방질 과산화의 억제를 유도하여 종합적으로 노화를 지연시킨 것으로 추정하였다.

아. 기능성 식품의 제조

In vitro 및 *in vivo* 실험에서 노화억제에 효과가 있는 것으로 확인된 현삼추출물과 *in vitro* 실험에서 효능이 있는 것으로 조사된 감자추출물을 이용하여 기능성 식품을 제조하였다. 현삼의 추출물은 쓴맛과 단맛이 함께 나고 검은 갈색이 강하여 커피 형태의 음료와 젤리상 시제품을 제조하였고, 감자

추출물은 노란색과 생감자 특유의 향미를 살려서 음료와 젤리상 시제품을 제조하였다. 이들의 수율은 현삼추출물이 판매되고 있는 건조 현삼에 대해서 18.4%로 매우 높고 감자는 생감자에 대하여 1.9%로 나타났다. 원료 가격 비율은 55원 수준으로 매우 저렴하여 제품화하는데 부담이 되지 않을 것으로 판단하였다. 감자추출물의 경우 생감자 가격이 1000원/kg 이므로 감자추출물 g당 53원에 상당하여 역시 원료비의 비율이 기능성에 비해 경미한 것으로 생각되어 제품화가 가능한 것으로 보인다.

2. 활용에 대한 건의

가. 국내에서 생산되는 생약소재 및 농수산물로부터 노화억제가 가능한 소재로서 현삼과 감자가 효능이 밝혀져 이들을 이용한 다양한 가공품의 제조가능성과 소비확대를 위한 기초자료가 제시되었다.

나. 현삼은 쓴맛과 흑갈색 색상 등을 살려 커피 형태의 음료 제품으로 발전시키는 것이 가능하며, 감자추출물의 경우 유효성분이 내열성이 있어 다양한 형태의 제품 즉 주스, 젤리, 기타 가공품 개발에 폭 넓게 활용될 수 있을 것으로 보인다.

다. 연구결과는 특허를 신청하여 기술권을 확보하고 이를 활용하려는 식품가공업체 또는 생산자단체에 기술을 이전하여 실용화시킬 계획이다.

SUMMARY

New rapid evaluation system for anti-aging activity by using cell culture was developed and used for screening of anti-aging material among about 120 kinds of domestic agricultural products including cereals, vegetables, fruits, medicinal herbs, and mushrooms. 70% ethanol extract of Hyunsam (*Scrophularia buergeriana* Miq) roots millet and potato and Yikmocho (*Leonurus japonicus* Houttuyn) roots showed the best anti-aging activity in *in vitro* experiments. Hyunsam extract was fractionated by using Shepadex G50 column chromatography and active fraction was found by using same anti-aging activity evaluation system. Active fraction was further purified by using DEAE ion exchange HPLC column chromatography. Again active peak was selected by using anti-aging activity evaluation system. Hyunsam showed dramatic increase in total activity of mouse when extract was fed to 16-month old mice for 6 months, whereas total activity of control mouse kept decreasing as the time passed. The mechanism for anti-aging activity of Hyunsam was investigated by analyzing expression of aging marker genes, DNA damage, activity of anti-oxidation enzymes and so on. p21, aging marker gene, was twice lower in the cells treated with extract than that in the control cells as expected. Content of hydroxy guanine in DNA that represents the extent of DNA damage, was decreased in the extract-treated cells when cells were analyzed by immunohistochemical staining using anti-hydroxy guanine antibody. The activity of superoxide dismutase (SOD) was not changed but the activity of catalase was increased twice when cells were treated with Hyunsam extract. Mitochondrial damage and lipid peroxidation was also decreased when cells were treated with Hyunsam extract. Cells treated with Hyunsam extract

appear to have much less oxidative and higher anti-oxidative enzymes. This seems to result in extended population doubling and anti-aging activity in the fibroblast cells treated with Hyunsam extract. The mechanism for in vivo anti-aging activity was also tested by analyzing the expression of p27 in brain of the mice fed with extract for 6 months. p27 was slightly decreased in the mice fed with extract. This result suggests that the mechanism of in vivo anti-aging activity maybe similar to that of in vitro anti-aging activity. Hyunsam extract could be used for a preparation of coffee-type beverage product due to its bitter taste and dark brown color. The potato extract was found to be used for various kinds of products such as juice and jelly.

CONTENTS

Chapter 1. Screening of Anti-aging Materials from Medicinal Herbs . . .	13
Chapter 2. In vivo Evaluation of Selected Materials for Anti-ageing Activity	34
Chapter 3. Screening of Anti-aging Food Materials and Product Development	76

목 차

제1장 세포배양을 통한 노화억제소재의 검색	13
제1절 서론	13
제2절 실험재료 및 방법	14
1. Human embryonic fibroblast세포주의 세포배양	14
2. 노화억제 및 지연물질에 대한 세포분열 능력의 측정	14
3. 한약재료의 추출 및 동결건조	15
4. Acidic β -galactosidase발현의 분석	15
5. 유효성분의 분리 및 성분분석	15
6. 한약재 처리후 단백질 발현의 조사 (Western Blot Analysis).....	16
7. SOD, catalase 효소활성도 측정	17
8. DNA damage 및 mitochondrial damage측정	17
제3절 결과 및 고찰	18
1. 세포배양을 통한 노화억제검색 방법의 확립	18
가. 인간의 태아섬유아세포(human embryonic fibroblast)의 세포배양 ..	18
나. 노화표식자인 acidic β -galactosidase 발현의 분석	19
다. 노화관련 유전자의 RNA 발현조사.....	20
라. 노화관련 유전자의 단백질 발현조사	20
2. 생약소재 추출물에 대한 노화억제능의 검색.....	21
3. 유효성분의 정제	24
가. Anion Exchange HPLC column을 사용한 정제.....	24
나. 현삼 및 익모초의 HPLC 분획물의 노화억제 효능 분석	25
4. 노화억제소재의 노화억제 기작 조사	26
가. 노화 표식자의 발현조사	26
나. DNA damage 분석	28
다. 항산화효소 활성 측정.....	29
라. Mitochondrial damage의 측정.....	31
마. lipid peroxidation의 측정.....	31
바. in vivo 노화억제 효능의 분자생물학적 분석.....	32

제4절 결론	32
제2장 실험동물을 이용한 노화억제소재의 효능 검정	34
제1절 서론	34
1. 연구의 배경	34
2. 연구개발의 필요성	34
3. 연구개발의 목표	35
제2절 실험재료 및 방법	36
1. 실험동물	36
2. 노화억제소재의 확보 및 투여	36
3. 체중 및 혈액조성치 측정	37
4. 혈당 및 혈장 지질치 분석	37
5. 행동학적 분석	37
6. 간에서 Total SOD (Superoxide Dismutase) 활성 측정	38
7. 장기무게의 측정 및 안정성 검사	38
8. 통계처리	38
제3절 결과 및 고찰	40
1. 노화 실험동물의 육성	40
1) ICR 마우스의 가령에 따른 체중, 혈당, 혈장지질치 및 혈액조성치의 변화(2-6개월)	40
2) ICR 마우스의 가령에 따른 체중, 혈당, 혈장지질치 변화 (7-13개월)	46
2. 노령화된 ICR 마우스(12개월)에서 현삼의 노화 억제 효능 검정	46
3. 노령화된 ICR마우스(12개월)에서 익모초의 노화 억제 효능 검정	53
4. 노령화된 ICR마우스(12개월)에서 기장의 노화 억제 효능 검정	58
5. 노령화된 ICR 마우스(16개월)에서 현삼 및 현삼정제물의 노화 억제 효능 검정	63
제4절 결론	69
제5절 참고문헌	71

제3장 노화억제 식품소재의 탐색 및 제품개발	76
제1절 서론	76
제2절 실험재료 및 방법	77
1. 실험재료	77
2. 실험방법	77
가. 식품소재 시료의 추출, 농축 및 건조처리	78
나. 세포배양을 통한 노화억제소재의 검색	78
다. 극성에 따른 용매별 분획화	80
라. 감자 추출물의 가공 특성에 따른 노화억제 능력 평가	80
마. 현삼 및 감자추출물을 이용한 가공품의 제조	81
제3절 결과 및 고찰	82
1. 식품소재 시료의 추출, 농축 및 건조처리	82
2. 식품시료 추출물을 이용한 in vitro 노화억제능 검색	86
가. 식품시료 추출물을 이용한 HDF세포의 분열능력	86
나. 노화억제 식품소재의 재 검색	89
다. 선정된 노화억제 식품소재의 항산화성 조사	93
라. 감자 추출물의 극성에 따른 용매별 분획의 노화억제능	96
3. 선발소재의 가공 특성 분석	100
가. 선발 소재의 기호 특성	100
나. 감자 에탄올 추출물의 열처리에 따른 세포분열능력	100
다. 감자 및 현삼 가공품의 관능특성	105
제4절 결론	109
제5절 참고문헌	110

제 1 장 세포배양을 통한 노화억제 소재의 검색

제1절 서론

현재까지 가장 잘 받아들여지는 노화의 이론으로는 염색체 끝의 텔로미어의 길이가 나이에 따라 점점 짧아져서 염색체가 점차 파괴되어 노화가 진행된다는 노화론(Harley et al 1990, Counter et al 1992, Wright et al 1992)과, 세포나 유전자에 라디칼이나 화학물질 등의 산화성 스트레스에 의한 손상이 나이가 들어감에 따라 축적되어 노화가 진행된다는 이론(Harman 1956, Adelman 1988, Chen et al 1995, Sohal et al 1996)등이 있다. 그러나, 아직 확실하게 증명된 이론은 없는 상태이며, 이들 이론으로 여러 다른 동물에서의 수명이나 노화의 차이를 설명하는 것은 현재로서는 어려운 실정이다. 발생과 분화를 끝낸 세포는 텔로미어를 만드는 효소인 Telomerase를 잃어버려 궁극적으로 노화한다고 보고되었으나, Telomerase를 갖지 않은 불멸화된 세포가 발견되고 여러 다른 동물에서의 수명이나 노화의 차이를 설명할 수가 없기 때문에 역시 하나의 가설에 불과하다. 먹는 음식의 양에 의한 노화이론 및 미토콘드리아에 축적되는 변형에 의한 노화이론이 제기되었으나, 노화의 전체과정을 설명하지 못하며, 마찬가지로 여러 다른 동물에서의 수명이나 노화의 차이를 설명할 수가 없다. 암억제 유전자인 p53이 노화에 관여한다는 보고가 있었으나, p53이 없는 Li Fraumeni syndrome 환자로부터의 세포 역시 노화를 하며, SV40 T antigen이 p53을 결합하여 세포내의 p53을 없애는 데도 불구하고 여전히 노화를 하기 때문에 p53이 노화에 직접 관여한다고 보수 없으며, 여러 다른 동물에서 p53이 존재함에도 불구하고 수명이나 노화의 차이가 달라지는 것을 설명할 수가 없다.

인간의 embryonic fibroblast는 약 50번의 분열을 지속하다 점점 분열 속도가 느려지고 결과적으로 성장을 정지하고 한동안 죽지 않고 노화세포의 형상을 유지한다. 노화가 시작되면서 fibroblast는 길게 늘어난 형상으로 바뀌어 그 부피가 증가하며, 세포내의 섬유성구조가 늘어나고, 세포바깥의 물질들이

늘어난다(West et al 1989, Kumazaki et al 1991, Millis et al 1992). 핵 안에서는 노화가 시작되는 약 30번의 분열수로부터, CDK (cyclin dependent kinase) inhibitor인 p21^{WAF1/CIP1}과 p16^{INK4}의 발현이 증가되어(El-deiry et al 1993, Noda et al 1994), 이 세포 성장을 억제한다. 젊은 fibroblast 와 노화하는 fibroblast에서의 RNA와 단백질의 발현의 차이를 조사한 바에 의하면, cyclinA, cFOS, CDC2, E2F-1, PCNA, Histones, ID1,2, AP1, Cyclin E- CDK2 kinase, 등이 노화하는 세포에서 저하가 되어 있고 p21^{WAF1/CIP1}과 p16^{INK4}가 활성화되는 것으로 나타나 있다(Ning et al 1991, Ogata et al 1993, Hensler et al 1994, Stein et al 1991, Dulic et al 1993, Stein 1995, Robetorye 1996, Kumazaki et al 1991, Thweat et al 1992, Maarten et al 1995).

노화의 가장 좋은 검색 표지인자로는 세포분열능력, 세포노화 시 발현이 증진되는 acidic β -galactosidase, p21과 p16, 발현이 감소되는 c-fos, hsp70, 현미경적 세포형태 등이며, 이들은 세포가 노화를 했는지를 정확히 표시해 주기 때문에 여러 농산물 추출액에 대한 노화억제효과를 검색할 수 있을 것이다.

제2절 실험재료 및 방법

1. Human embryonic fibroblast세포주의 세포배양

Human embryonic fibroblast 세포주를 trypsin-EDTA로 배양함에 의하여 1:4로 희석률(분열수 2에 해당)로 새 페트리디쉬(지름10mm)로 바꾸어 주면서 지속적으로 수를 늘리면서 다량으로 계대배양하여 세포 분열수가 20번이 될 때(아직 노화의 특성을 보여지지 않은 상태) 10% DMSO를 가하고 각 디쉬당 1바이알로 freezer stock을 만들어 액체질소에 보관한다. Fibroblast의 배양은 DMEM 10% fetal bovine serum(penicillin-streptomycin포함)을 배지로 사용하고 37°C 5% CO₂에서 매 3일 간격으로 배지를 교체한다.

2. 노화억제 및 지연물질에 대한 세포분열 능력의 측정

이 세포분열 능력측정을 위하여 액체질소에 보관한 한 바이알(분열수 25번에서 보관)을 꺼내어, 100mm dish에 넣고 배양한 후 가득 자라면 4개의 100mm

dish에 split하고, 이때 여러 가지 물질(한약제- 원액, 1/10, 1/100)을 배지에 가한 후 연속적으로 배양하여 최대로 얻을 수 있는 분열수를 측정한다. 자료의 신빙성을 높이기 위해 모든 샘플은 duplicate를 사용한다. 대조구로는 추출용매만을 같은 양으로 가하여 비교한다.

3. 한약재료의 추출 및 동결건조

건조상태의 한약제 100g 잘게 마쇄 한 후 70% 주정 에탄올을 이용하여 50℃에서 2시간동안 추출 후 에탄올에 녹아 나온 성분을 받아 rotavapor를 이용하여 에탄올 성분을 완전히 제거하고 농축한다. 이후 동결건조기를 이용하여 48시간 이상 수분을 완전히 제거한 추출물을 만든다.

이렇게 완성된 추출물의 1/10을 10ml의 물에 녹인 것을 원액으로 하여 원액의 1/10 희석액 1/100 희석액을 처리한다.

4. Acidic β -galactosidase발현의 분석

페트리디쉬의 세포를 PBS(phosphate buffer saline)으로 2회 세척하고 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde in PBS로 고정시킨다. PBS로 두 번 세척하고 37℃, CO₂가 없는 incubator에서 senescence-associated β -galactosidase 염색액(1mg X gal, 40mM citric acid/sodium phosphate(pH6.0), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂)으로 12시간 이상 동안 염색한다. 염색된 세포의 백분율을 계산하여 노화의 정도를 계산하였다.

자료의 신빙성을 높이기 위하여 sample은 duplicate 하고 한 디쉬당 2곳 이상의 지점을 정하여 염색된 세포의 수를 조사한다.

5. 유효성분의 분리 및 성분분석

가. Shepadex G50에서 추출물의 분획

추출물을 우선적으로 Shepadex G50 column (L/D:20, bed volume 20 ml)에, 2 ml의 원액(100g의 약제로부터의 추출물을 10ml 증류수에 녹인 것)을 가하고 blue dextran(분자량 2,000,000)을 marker로 사용하여 분획하였다. Column eluate는 distilled water를 사용하였으며, blue dextran이 완전히 빠져 나온

후 10ml씩(원액의 30배 희석) 6개의 tube에 분획하였다.

나. C₁₈ reverse phased HPLC column을 사용한 분리

유효성분의 분리를 위해서 두 한약제의 유효한 분획물, 즉 한약제 A-3, 한약제 B-2를 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 분리를 시도하였다. 먼저 LKB의 HPLC에서 C₁₈ reverse phased column을 사용하여, 0.1% Trifluoroacetic acid(A)와 50% acetonitrile(B)의 혼합을 B의 백분율을 0에서100%로 증가시키면서 column을 통하여 나오는 물질을 210 nm와 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. Anion Exchange HPLC column을 사용한 분리

유효성분의 분리를 위해서 두 한약제의 유효한 분획물, 즉 한약제 A-3, 한약제 B-2를 LKB의 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)에서 DEAE-2SW column을 사용하여, 10 mM Tris pH 7.0 (A)과 2M Sodium Acetate pH 6.0 (B)의 buffer를 사용하여 (B)buffer를 백분율을 0에서100%로 Gradient증가시키면서 60분 동안 column을 통하여 나오는 물질을 210 nm와 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 한약제 처리후 단백질 발현의 조사 (Western Blot Analysis)

한약제 처리 후 노화 지표 단백질 (p21)의 발현을 조사하기 위하여 분열수 54, 분열수 66, 분열수 74에서 각각 harvest 한 세포를 이용하여 NET buffer(150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.4, 5mM EDTA pH8)을 이용하여 세포를 lysis 시키고 단백질을 정량하여 20ug의 단백질을 SDS PAGE gel에서 150V 1시간동안 전기영동 후에 Transfer membrane(IPVH, Milipore Co.)에 70V 30분간 transfer 하고 milk solution에 membrane을 담그고 overnight한다. 이후 TBST washing solution으로 10분간 3회 세척하고 1차 antibody를 이용하여 1시간 30분 동안 immunoblotting 하였으며 세척액으로 3회 세척한 후 2차 antibody로 1시간 동안 immunoblotting 하고 세척액으로 3회 세척한 후 ECL Kit를 이용하여 flim에 감광시키는 방법을 이용하여 단백질의 발현을 조사하였다.

7. SOD, catalase 효소활성도 측정

SOD의 활성도는 McCord와 Fridovich의 방법(1969)에 따라 xanthine/xanthine oxidase 반응에 의한 ferricytochrome c 환원의 억제 정도를 분광광도계로 관찰함으로써 측정한다. 표준분석방법은 25°C에서 2ml의 0.1 mM EDTA가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)에서 수행한다. 반응 혼합액에는 10 uM ferricytochrome c, 50uM xanthine 및 충분한 양의 xanthine oxidase를 함유하고 있으며 500nm에서 ferricytochrome c의 환원정도를 측정한다. 상기의 조건하에서 cytochrome c를 50% 감소시키는 superoxide dismutase의 양을 1 unit로 정의한다.

Catalase의 활성도는 Aebi의 방법 (1980)에 따라 Catalase/과산화수소 반응에 의한 과산화수소 환원의 억제 정도를 분광광도계로 관찰함으로써 측정한다. 표준분석방법은 25°C에서 1ml의 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에서 수행한다. 반응혼합액에는 1mM 과산화수소와 충분한 양의 catalase를 함유하고 있으며 240nm에서 과산화수소의 환원정도를 측정한다. 상기의 조건하에서 1uM의 과산화수소를 감소시키는 catalase의 양을 1unit로 정의한다.

8. DNA damage 및 mitochondrial damage 측정

일반적인 DNA damage는 Oxidative stress에 의한 DNA damage산물의 하나인 Hydroxyguanine의 상대적인 양을 anti-hydroxyguanine antibody를 사용하여 immunohistochemistry 방법에 의해 측정하였으며 그 방법은 다음과 같다. 배양한 세포의 내인성 peroxidase를 제거하기 위해서 3% H₂O₂로 30분간 처리한다. 이후 반응하지 않은 H₂O₂를 세척해 주기 위해 0.01M PBS로 3회 세척하였다. 세척이 끝난 세포는 RNase (200mg/ml)를 넣고 1시간동안 37°C에서 반응시켰다. 이후 0.01M PBS로 3회 세척한 후 40% 에탄올을 처리했다. 그 후 40% 에탄올에 녹인 50mM NaOH로 12분간 처리를 하며 다시 40% 에탄올로 세척한 다음 40% 에탄올에 녹인 1% acetic acid를 처리한 다음 40%, 20% 에탄올로 처리한 후 물과 PBS로 세척했다. 이후 과정은 통상적인 면역염색방법을 따랐다. 즉, 비특이적 반응을 방지하기 위하여 조직을 5% normal goat serum in 0.1M PBS에 30분간 반응시켰다. 1차 항체는 mouse anti-(8-hydroxyguanine)를 사용하였다. 면역조직화학반응에 이용된 모든 항체는 2% normal goat serum 및 0.1%

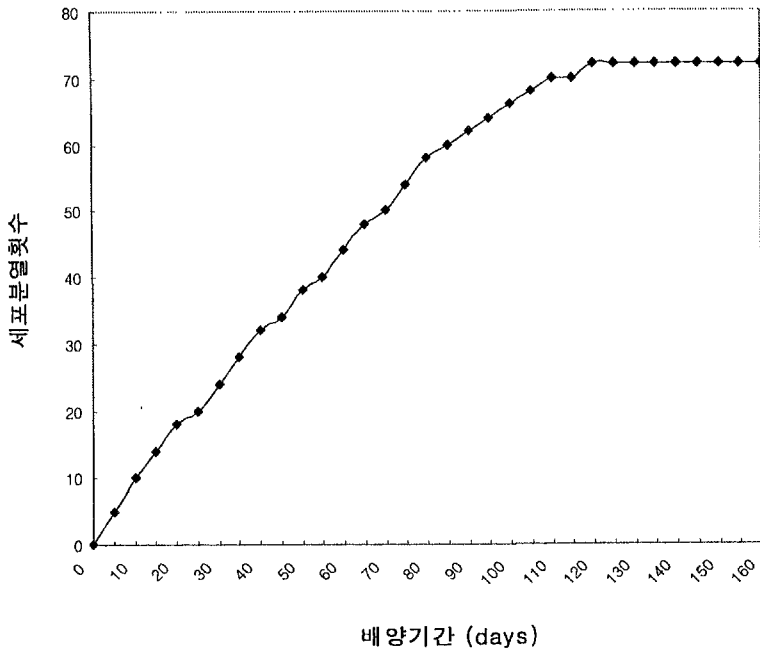
triton X-100이 함유된 PBS (0.1M, pH 7.4)에 희석해서 사용하였다. 세포는 1차항체를 상온에서 24시간 동안 반응시켰다. 이 후 2차 항체로 biotinylated goat anti-mouse IgG (Vector, USA)를 1:200으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰으며 이후 1:200으로 희석한 Vetastat (Vector, USA)에 상온에서 반응시켰다. 이상 각 단계의 반응 후에는 0.01M PBS용액 (pH 7.4)으로 4~5 차례 세척하였다. 항원항체반응이 끝난 조직은 0.03% 과산화수소와 0.05% DAB (3, 3'-diaminobezidine tetrachloride; Sigma, USA)가 함유된 PBS (pH 7.4) 용액에서 1~5분간 발색시켰다. 발색반응이 끝난 조직은 수세 후 inverted microscope를 이용하여 관찰한 후 사진촬영을 하였다. mitochondrial damage의 측정은 노화에 따른 mitochondria의 손상을 mitochondria에 존재하는 효소인 aconitase의 활성에서의 감소로 측정한다. 천연물을 처리하거나, 처리하지 않은 노화된 섬유아세포의 세포 추출액으로부터 aconitase의 활성을 측정 비교하여 천연물이 mitochondria의 손상 방지에 기여하는지를 조사한다. lipid peroxidation의 측정은 oxidative stress의 산물인 lipid peroxidation을 thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) 분석에 의해 측정한다. 천연물을 처리하거나, 처리하지 않은 노화된 섬유아세포의 세포 추출액에서 이 방법으로 lipid peroxidation을 측정하여 천연물의 노화억제 효과가 lipid peroxidation의 감소를 초래하는지 조사한다.

제3절 결과 및 고찰

1. 세포배양을 통한 노화억제검색 방법의 확립

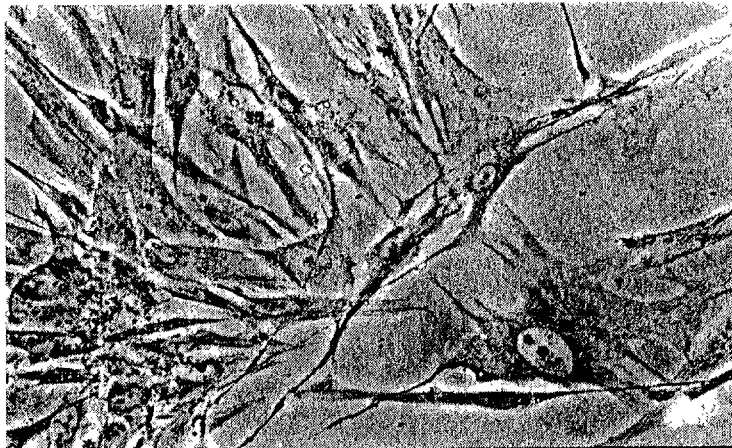
가. 인간의 태아섬유아세포(human embryonic fibroblast)의 세포배양

한림대학에서 확립한 인간의 태아섬유아세포(human embryonic fibroblast)의 세포배양을 통하여 노화과정을 조사하였으며, 성장곡선은 아래 그림과 같다.



나. 노화표식자인 acidic β -galactosidase 발현의 분석

노화하는 세포 및 조직에서만 발현이 되는 단백질인 acid β -galactosidase의 발현을 SA- β -gal 염색방법을 사용하여 분석하였다. 노화가 진행되고있는 60 population doubling의 human embryonic fibroblast를 SA- β -gal 염색방법으로 처리한 결과는 다음과 같다. 노화된 세포는 핵 부근에 파란색으로 염색



되어있다.

다. 노화관련 유전자의 RNA 발현조사

노화할 때 활성화되는 유전자인 p21의 RNA발현을 조사하기 위해 노화하는 인간의 태아섬유아세포(human embryonic fibroblast)의 배양에서 세포를 수거하여 PBS(phosphate Buffered Saline)으로 2회 세척하고 RNA Zol B(Biotecx Co)를 가하여(0.2 ml/10⁶cells) total RNA를 제조하고 RNase protection 방법에 의해 RNA 발현을 분석하였다. 젊은 세포(population doubling 수 12)와 늙은 세포(population doubling 수 72)에서의 p21 유전자의 RNA 발현분석 결과는 다음과 같이 늙은 세포에서 RNA 발현이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다

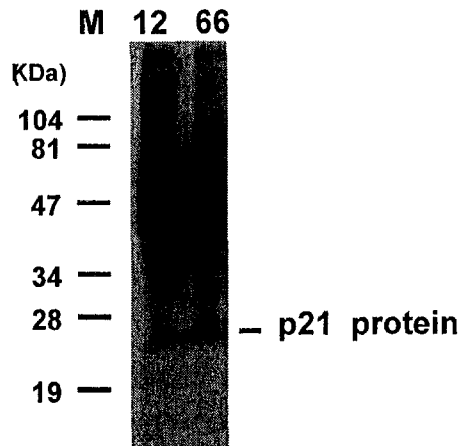
12 66



p21 RNA

라. 노화관련 유전자의 단백질 발현조사

노화할 때 활성화되는 유전자인 p21의 단백질 발현을 조사하기 위해 노화하는 인간의 태아섬유아세포(human embryonic fibroblast)의 배양에서 세포를 수거하여 PBS (phosphate Buffered Saline)으로 2회 세척하고 단백질 추출액을 만든 다음 SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의해 단백질을 분리하고 anti-p21 antibody와 ECL 염색을 사용하여 Western blot analysis에 의해 분석하였다. 젊은 세포(population doubling 수 12)와 늙은 세포(population doubling 수 72)에서의 p21 유전자의 단백질 발현분석 결과는 다음과 같이 늙은 세포에서 단백질 발현이 현저히 증가되었다.



2. 생약소제 추출물에 대한 노화억제능의 검색

70% EtOH(주정)을 사용하여 50℃에서 약 2시간 추출하고 농축한 생약소제 추출물을 원액과 1/10희석, 1/100희석액을 만든 후 인간 태아 섬유아세포배양 (60mm dish, 3 ml culture)에 각 디쉬당 0.3ml씩 첨가하고 노화억제능력 조사하였다. 추출물의 농도가 높은 경우 세포에 독성을 나타내어 죽게 하므로 농도별로 생존여부를 조사한 결과는 표1과 같이 생약제의 종류에 따라 독성이 다양하게 나타났다. 생약추출물을 첨가하고 세포배양을 실시한 결과 대조구의 인간 섬유아세포의 최대분열수 66회에 비해 생약제 처리구 중 현삼의 경우 74회, 복령 69회로 대조구에 비해 노화가 지연되었다. (표3) 한편 분열수 63번에서 노화표식자인 SA- β -gal 염색에서도 양성세포 백분율이 대조구의 20%에 비해, 현삼처리구는 16%, 복령처리구는 18% 그리고 지각 처리구는 19%로 노화의 진행이 억제되는 것으로 나타났다. (표2)

표1 생약소재 추출물 농도에 따른 세포의 생존여부(+:생존, -:죽음)

희석률 한약재	1	1/10	1/100
차 전 자	-	+	+
당 후 박	-	-	-
소 목	-	+	-
복 분 자	-	-	-
감 송 향	-	-	-
인 삼	-	-	-
구 맥	-	-	-
팔 향 각	-	-	+
인 동	-	-	+
지 각	-	+	+
정 향	-	-	+
현 삼	-	-	+
복 명	-	+	+
과 향	-	+	+
천 궁	-	-	+
세 신	-	--	+
당 귀	-	-	+
삼초뿌리	-	-	+
천황연	-	-	+
부평초	-	-	+
강진향	-	-	+
오약	-	-	+
견지황	-	-	+
속지황	-	-	+
남성	-	-	+
합판피	-	-	+
형개	-	-	+
인진	-	-	+
상백리	-	-	+
유근피	-	-	+
영지	-	-	+
익모초	-	-	+

표2 분열수63에서 SA- β -gal 염색에 양성세포의 백분율

한약재	양성세포의 %
대조구	20
현삼	16
현삼	18
복령	19
지각	20
차전자	21
인동	25
정향	40
천궁	

표3 세포가 노화하여 성장을 정지하였을 때의 분열수

한약재	분열수
대조구	66
현삼	74
복령	69
지각	66
차전자	66
인동	66
정향	63
천궁	60

3. 유효성분의 정제

가. Anion Exchange HPLC column을 사용한 정제

shepadex G50 column fraction중에서 노화억제효과를 가지는 유효한 분획물인, 한약재 A-3, 한약재 B-2를 LKB의 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)에서 DEAE-2SW column을 사용하여 다시 정제를 시도하였다. 10 mM Tris pH 7.0 (A)과 2M Sodium Acetate pH 6.0 (B)의 혼합을 B의 백분율을 0에서100%로 증가시키면서 column을 통하여 나오는 물질을 210 nm와 254 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 그림 1, 2에 나타나있다.

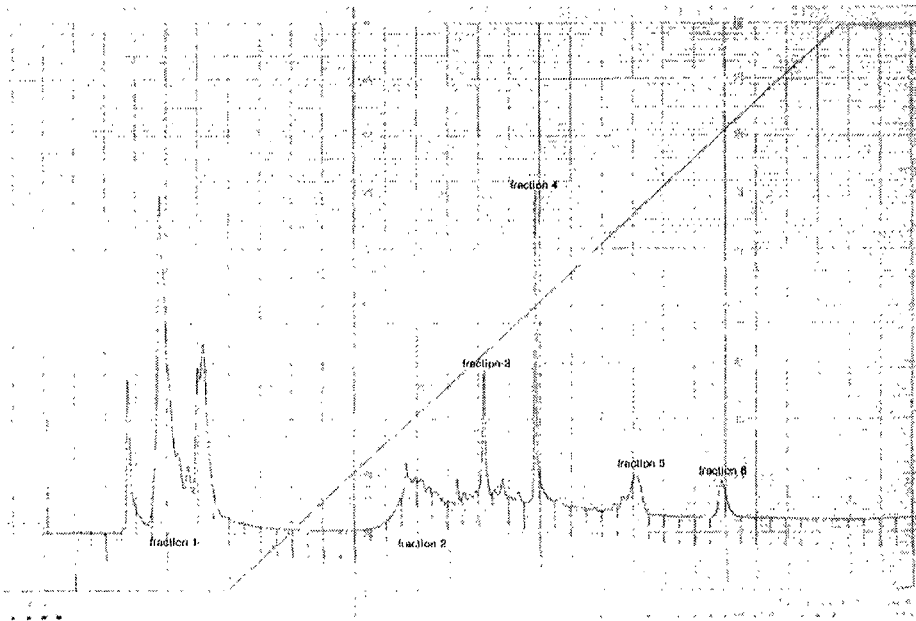


그림 1. 익모초의 Sephadex G50 분획물의 HPLC에 의한 정제

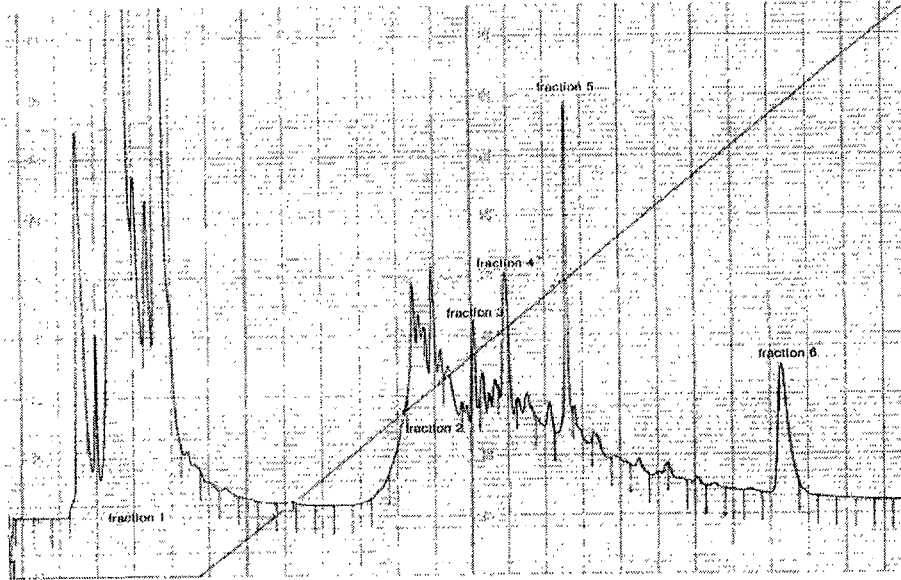


그림 2. 현삼의 Sephadex G50 분획물의 HPLC에 의한 정제

나. 현삼 및 익모초의 HPLC 분획물의 노화억제 효능 분석

(SenA-beta-gal 염색과 최대 분열수(PD)에 의해 측정)

위에서 분리한 HPLC 분획물을 인간 섬유아세포의 분열수 50에서 1/100과 1/1000으로 처리하고 계대배양에서 최대분열수를 측정하여 노화억제 효능이 어디에 있는지 조사하였다. 반복 실험의 결과는 다음과 같다.

처리시약	SA-beta-gal (1/100)			PD (1/100)	SA-beta-gal (1/1000)			PD (1/1000)	
	1	2	평균		1	2	평균		
현삼	1	76	77	76.50	68	74	80	77.00	68
	2	68	75	71.50	68	73	76	74.50	69
	3	67	56	61.50	70	73	70	71.50	70
	4	62	65	63.50	70	72	78	75.00	68
	5	85	78	81.50	68	83	72	77.50	68
	6	70	78	74.00	69	68	71	69.50	70
익모초	1	77	88	82.50	68	75	77	76.00	68
	2	77	65	71.00	70	81	61	71.00	70
	3	83	78	80.50	68	72	76	74.00	69
	4	65	86	75.50	69	81	70	75.50	68
	5	76	52	64.00	70	82	72	77.00	69
	6	72	78	75.00	68	70	81	75.50	68
control	78	81	69				76.00	68	

현삼은 HPLC fraction# 3, 익모초는 HPLC fraction# 2 가 노화억제효능이 제일 우수한 것으로 밝혀짐,

4. 노화억제소제의 노화억제 기작 조사

세포배양에서 노화억제효능을 갖는 것으로 선별된 천연물의 노화억제 기작을 생화학적 및 분자생물학적으로 조사하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

가. 노화 표식자의 발현조사

분열 수 50이후 인간 섬유아세포에 현삼 추출액을 계속 처리한 다음 분열 수 54 및 분열 중지된 섬유아세포에서 노화표식자인 p21의 protein의 발현을 western analysis (antibody: Santa Cruz Biotech, Inc. sc-397)를 사용하여 조사 한 결과 현삼추출액을 처리한 세포에서 약간의(약 2 배정도) p21

protein의 발현감소를 관찰하였다 (그림 3). 이 결과는 현삼추출액에 의한 최대분열수의 증가가 약 10% 정도이었으며, SA-β-gal염색에서 약 10% 정도 감소한 결과와 유사한 결과로서 현삼의 노화억제효능을 다시 확인해주었다.



- 1 : 대조구 (분열수 54)
- 2 : 현삼처리구 (분열수 54)
- 3 : 대조구 (분열수 66, 분열중지)
- 4 : 현삼처리구 (분열수 66)
- 5 : 현삼 현삼처리구 (분열수 74, 분열중지)

그림 3. 노화하는 섬유아세포에서 현삼추출액의 처리 후 p21 protein의 발현 변화

노화하는 섬유아세포에서 추출액의 처리 후 SA-beta-gal염색 결과의 예가 그림 4에 나타나있다. 현삼 및 익모초 처리구에서 처리하지 않은 대조구과 인삼처리구에 비해 SA-beta-gal염색된 세포의 비율이 낮은 것을 보여주고 있다. 현삼 및 익모초 G50 분획물이 노화의 표식자인 SA-beta-gal의 발현을 지연시킨다는 것을 말해주고 바로 이들의 노화억제 효능을 나타내준다.

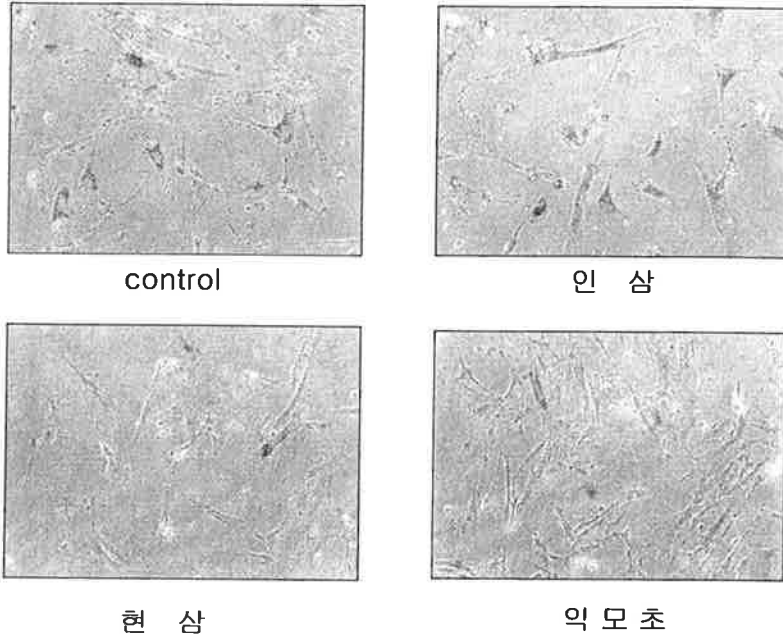


그림 4. 노화하는 섬유아세포에서 추출액의 처리 후 SA-beta-gal 염색 결과의 예

나. DNA damage 분석

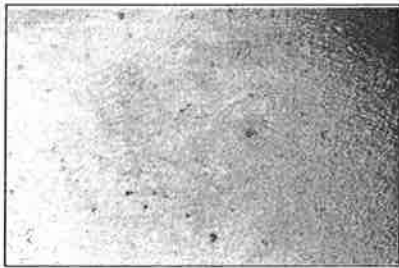
노화하는 세포에서 증가하는 것으로 알려진 oxidative stress에 의한 DNA damage의 정도를 면역염색화학적방법(immunohistochemical staining)을 사용하여 비교하였다. 현삼추출액이 첨가한 섬유아세포와 첨가하지 않은 섬유아세포에 대해 hydroxy guanine에 대한 항체를 사용한 면역염색화학적방법을 사용하여 비교한 결과 현삼추출액을 처리하지 않은 군에서 염색이 약간 더 강하게 나타났다 (그림 5). 이 결과는 바로 현삼추출액이 노화의 표식자인 DNA damage를 저하시킨다는 사실을 말해주며, DNA damage의 저하가 섬유아세포의 노화를 더디게 한다는 것을 나타내 주고 있다.



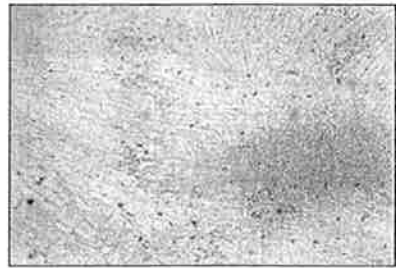
대조구 (분열수 58)



현삼 처리구 (분열수 58)



대조구 (분열수 66)



현삼 처리구 (분열수 66)

그림 5. 현삼처리 후 세포배양에서 anti-hydroxy guanine 항체를 이용한 면역염색화적 분석 (immunohistochemical staining) 결과

다. 항산화효소 활성 측정

항산화효소의 활성은 바로 oxidative stress에 의한 세포의 손상을 나타내준다. 현삼의 G50 분획물이 처리된 섬유아세포에서 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase의 활성을 측정한 결과 현삼분획물을 처리한 군에서 catalase활성은 상당히 (분열수 54에서는 2 배 이상, 분열수 66에서는 15%이상) 증가한 것으로 나타났으나 (그림 6). SOD의 활성은 거의 증가하지 않은 것으로 나타났다 (그림 7). 이 결과는 노화한 섬유아세포에서 SOD는 그다지 부족하지 않으나 catalase는 부족하여 현삼에 의해 발현이 유도되고 현삼의 노화억제 효능과 직결되는 것으로 추정된다. 이 결과는 현삼분획물이 노화한 섬유아세포내에 부족한 catalase 활성을 증가시켜서 세포내의 free radical에 의한 DNA damage 등의 세포의 손상을 방어하는 것으로

로 추정된다.

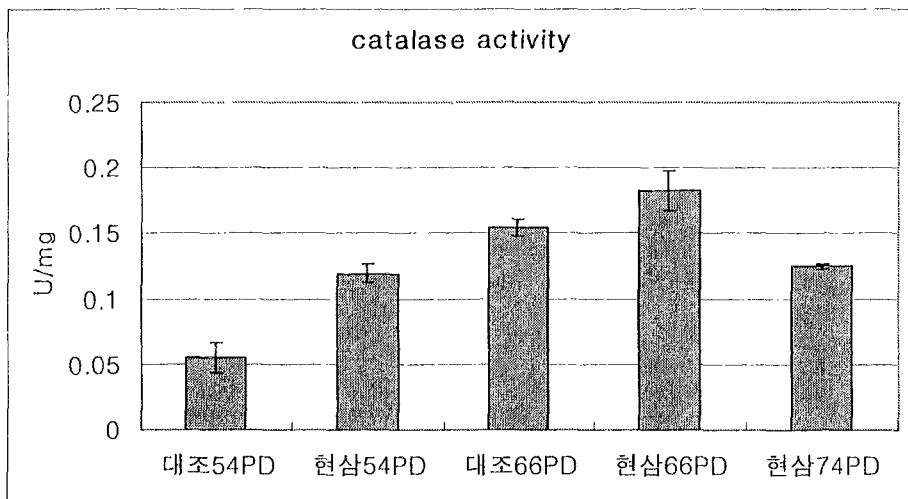


그림 6. 현삼처리한 섬유아세포에서 catalase 활성측정 결과

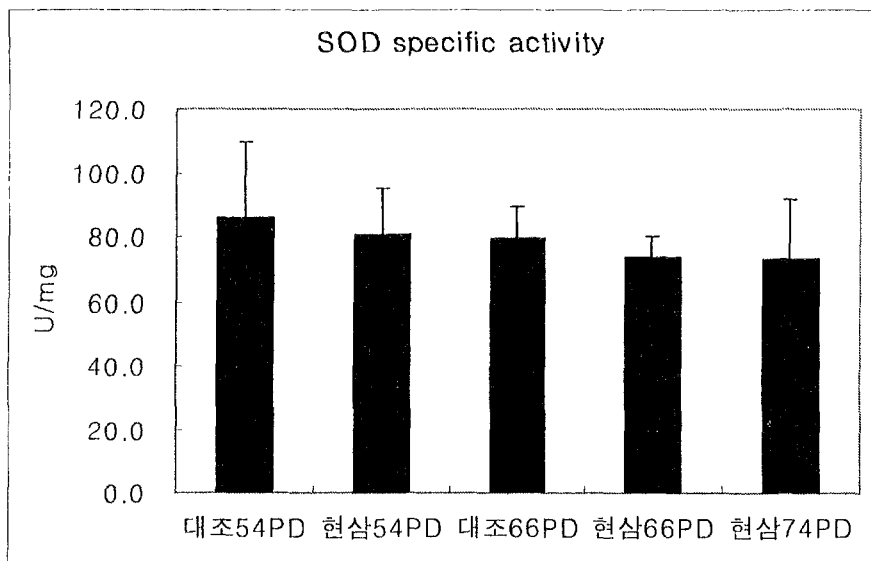
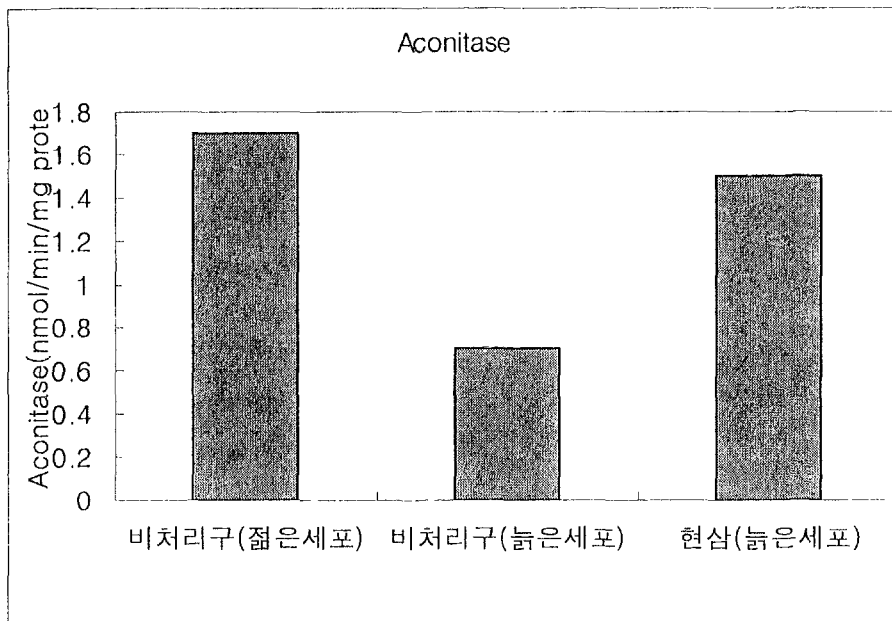


그림 7. 현삼처리한 섬유아세포에서 SOD(superoxide dismutase) 활성측정 결과

라. Mitochondrial damage의 측정

노화에 따른 mitochondria의 손상을 mitochondria에 존재하는 효소인 aconitase의 활성을 측정한 결과 처리하지 않은 노화된 섬유아세포에 비해 약 2배정도 증가하여 젊은 세포에 비교될 정도로 aconitase 활성이 증가되었으며 현삼을 처리에 의해 mitochondria의 손상이 격감하였다는 사실을 말해 주고 있다

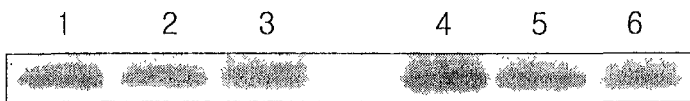


마. lipid peroxidation의 측정

oxidative stress의 산물인 lipid peroxidation을 thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) 분석에 의해 측정하였다. 그 결과 약 10% 정도의 lipid peroxidation의 감소를 관찰하였다. 항산화 효소활성의 증가가 free radical에 의한 lipid peroxidation의 감소를 초래한 것으로 추정된다.

바. in vivo 노화억제 효능의 분자생물학적 분석

현삼의 in vivo 노화억제 효능의 분자생물학적 분석을 위해서 3개월 간 mouse에 6개월 간 ICR mouse에 현삼 추출액 및 분획물을 투여한 후 뇌에서 노화의 표식자인 p27 (노화 시에 발현이 증가)의 단백질 발현을 western blot analysis에 의해 분석한 결과 3개월 처리구에서는 별 효과가 없었으나 6개월 처리구에서 현삼 추출액 및 분획물 모두 p27의 발현을 저하시켰다.



- 1 : 15개월 대조군 4 : 18개월 대조군
- 2 : 15개월 현삼 투여군 5 : 18개월 현삼투여군
- 3 : 15개월 fraction 투여군 6 : 18개월 fraction투여군

15개월 : 투여후 3개월 경과
18개월 : 투여후 6개월 경과

이 결과는 in vitro 세포배양에서 뿐 아니라 in vivo에서도 현삼이 노화를 지연시키는 효능이 있음을 나타내준다.

제 4 절 결 론

1. 노화억제 생약소재의 in vitro 탐색

인간의 테아섬유아테포의 최대분열수를 측정하여 다양한 소재의 노화억제능력을 비교, 평가할 수 있는 in vitro 평가방법을 확립하였다.

이렇게 확립된 평가방법을 사용하여 30여개의 생약소재 추출물에 대하여 최대분열수를 비교한 결과 현삼과 익모초 추출물이 효과가 크게 나타났다.

2. 유효성분의 분획 및 분리

Sephedex G 50 및 HPLC를 통하여 현삼 및 익모초의 분획을 제조하고 이들의

노화억제 활성을 조사한 결과 현삼 fraction #3이 가장 활성이 높은 것으로 나타났다.

3. 현삼추출물의 노화억제기작 조사

인간 섬유아세포 배양에서 항노화 효과를 보여준 몇몇 한약재 분획물의 노화억제 기전은 우선적으로 성장정지의 표식자인 p21 발현의 저하가 바로 노화시에 나타나는 성장정지를 지연시킨 것으로 보인다. 또 다른 현삼의 노화억제 기전은 항산화효소활성의 증가를 들 수 있는데 SOD에서의 증가보다 catalase의 증가가 바로 노화 억제 효능을 주도한 것으로 보여진다. 이러한 항산화효소의 증가는 바로 미토콘드리아 내에서 free radical의 생성을 억제하여 DNA 손상, lipid peroxidation, 미토콘드리아 손상 등의 세포내의 손상을 억제하여 노화를 지연시켰을 것으로 추정된다. 현삼에 의한 DNA 손상의 저하는 면역염색화학적방법의 실험결과에서 free radical에 의해 생성되는 hydroxy guanine의 양에서의 감소 결과로 잘 나타나있다. aconitase 활성의 증가는 바로 mitochondria의 손상의 감소를 보여주며, lipid peroxidation에서의 감소도 바로 free radical에 의한 손상의 감소를 잘 보여주고 있어 현삼내에 존재하는 물질이 바로 성장정지의 지연, free radical 생성 감소, DNA, mitochondria 및 lipid 손상의 저지를 유도하여 노화를 지연시킨 것으로 추정된다.

제2장. 노화 억제 소재의 in vivo 평가

제1절 서론

1. 연구의 배경

의학의 발달과 출산율의 저하로 우리 나라의 노령화 추세는 급속히 증가해 가고 있다. 예를 들면, 65세 이상의 노인인구는 '95년에 266만 명이지만 2,000년에는 340만, 2010년에는 500만 명으로 급속히 증가할 것으로 예상된다 (한국보건사회연구원, 1996). 노령화 사회에서의 가장 큰 관심은 건강유지이며 이 때문에 노화를 억제하거나 노화에 기인하는 각종질병의 예방은 주요한 연구분야로 부각되었다. 또한 노화억제에 효능을 갖는 노인용 기능성 건강식품의 수요도 가장 큰 시장을 형성할 것으로 예상된다.

노화억제소재 탐색 및 유효성 검사를 위해서 세포수준 및 실험동물 수준의 검정연구가 뒤따라야 한다. 노화 연구를 위한 질환모델동물로는 정상마우스보다 빨리 늙는 SAM마우스가 개발되어 있다 (TAKEDA, 1981). 그러나 지금까지의 연구결과에 의하면 SAM마우스는 수명이 정상 대조군 마우스보다 유의하게 짧으나 그 원인으로는 아밀로이드의 침착 등과 같이 퇴행성 노인질환을 위한 모델동물로는 적합하나 정상적인 노화연구를 위한 모델로는 부적합하다는 의견이 대두되고 있다 (KITAGAWA, 1994). 따라서 노화억제소재의 효능 검정을 위해 가장 적합한 실험동물은 정상적인 마우스를 자연적으로 노화시켜 사용하는 것이 가장 유효하다고 볼 수 있다.

최근 노화 기작 연구의 발전으로 노화억제효과 검정법의 개발이 가능하다고 판단된다. 특히 노화현상이 수많은 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있기 때문에 새로운 차원의 노화억제능력을 함유한 소재를 발굴하기 위해서는 세포수준의 직접적인 탐색방법과 탐색된 소재의 실험동물에서 in vivo 평가방법의 확립은 필수적이다.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

(1) 범 세계적으로 노령화 인구의 증가로 새로운 차원의 노화억제능력을 함유한 소재를 발굴하기 위한 연구 동향이 확산되고 있다.

(2) 노화 기작 연구의 발전으로 새로운 노화억제효과 검정법의 개발이 가능

하다.

(3) In vivo 실험을 통해 노화억제소재의 유효성 검색 및 부작용 검사를 통해 안정성 유전성 유무를 판단할 수 있다.

(4) 유관 학문과의 연계를 통해 보다 정확한 실험 체계를 확립할 수 있다.

(5) 우리 나라의 생약자원 및 천연물 자원에서의 노화억제소재 탐색은 농가의 소득증대와 수입원료 대체를 통해 사회에 큰 기여를 할 수 있다.

2) 경제적 측면

(1) 노화억제는 노화에 의해 유발되는 각종 순환기질환, 당뇨, 암 및 치매와 같은 퇴행성질환의 발병을 감소시킬 수 있으므로 의료비절감 등의 간접적 효과도 막대할 것으로 추산된다.

(2) 우리의 농업은 농지가격이 비싸고 농촌의 노임이 높으며 경작지가 협소하여 고소득 작물만이 적합한 구조를 가지고 있다. 따라서 그 동안의 영양소 소재를 생산하는 농업으로는 수지를 맞출 수 없고 사회적으로 고가의 수요가 많은 노화억제소재의 생산이 고소득 농업에 아주 적합한 분야이므로 개방체제 하의 우리농업에 하나의 돌파구를 마련해 줄 수 있다.

(3) 노화억제소재의 유효 성분 검출에 따라 고부가가치 상품인 신약으로서의 개발 가능성도 있다.

3) 사회적 측면

우리 나라의 천연식물 자원으로부터 노화억제식품의 개발은 농가소득 증대뿐만 아니라 생명과학 분야의 기초 기술 향상과 국민 보건 향상에도 기여할 것이다.

3. 연구개발의 목표

새롭고 혁신적인 노화 평가시스템을 개발한 다음 이를 활용하여 국내에서 생산되는 각종 과채류, 곡류, 두류, 산채류, 약초류, 버섯류 등 농림자원으로부터 고령화사회에서 그 수요가 크게 증대될 것으로 예상되는 노화억제 또는 노화를 지연시킬 수 있는 기능성 소재를 탐색한 다음, 선택된 소재의 효능을 동물실험을 통하여 평가함으로써, 노화억제소재의 개발에 필요한 동물실험 자료를 확보하는 것이 연구의 최종 목표이다.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 한림대학교 실험동물부에서 계통 유지 중인 ICR 마우스를 사용하였다. 실험기간 중 사육실 환경은 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 $55\pm 10\%$ 를 유지하였고 12시간 인공 조명 하에서 마우스용 케이지에 4마리씩 넣어 사육하였으며, 실험동물용 사료 및 식수는 자유로이 공급하였다.

2. 노화억제소재의 확보 및 투여

효능 검정에 사용한 노화억제소재는 제 1, 3세부과제로부터 *in vitro* 시스템에서 노화 방지 효능이 인정된 물질인 현삼, 현삼정제물, 익모초 및 기장을 동결 건조한 분말 상태로 확보하였다.

1) 현삼의 투여

현삼 50g으로부터 추출한 분말을 50ml의 물로 녹인 용액을 원액으로 하였다. 노화된 ICR마우스에서 효능 검정을 하기 위해서 원액을 1/100, 1/1000로 희석하여 자유 섭취 시켰다. 투여하는 노화억제 소재의 신선도를 유지하기 위해 2일 간격으로 교환하여 주었으며, 6개월 간 투여하였다.

2) 익모초의 투여

익모초 50g으로부터 추출한 분말을 50ml의 물로 녹인 용액을 원액으로 하였다. 노화 ICR마우스에서 효능 검정을 하기 위해서 원액을 1/100, 1/1000로 희석하여 자유 섭취 시켰다. 투여하는 노화억제 소재의 신선도를 유지하기 위해 2일 간격으로 교환하였으며, 6개월 간 투여하였다.

3) 기장의 투여

기장 추출 분말은 마쇄한 사료와 1/100, 1/1000으로 섞어 자유 섭취 시켰다. 투여하는 노화억제 소재의 신선도를 유지하기 위해 2일 간격으로 교환하였으며, 6개월 간 투여하였다.

4) 현삼 정제물의 투여

현삼 원액을 분획하여 얻은 추출물을 원액으로 하였다. 노화된 ICR마우스에서 효능 검정을 하기 위해서 원액 정제물을 1/100로 희석하여 자유 섭취 시

켰다. 투여하는 노화억제 소재의 신선도를 유지하기 위해 2일 간격으로 교환 하였으며, 6개월 간 투여하였다.

3. 체중 및 혈액 조성치 측정

체중은 실험 종료 시까지 1개월 간격으로 일정시간(오전 10시에) 측정하였다. 혈액조성치의 분석을 위해서 실험 종료 시까지 1개월 간격으로 마우스 안와정맥총에서 혈액을 채취하여 헤파린으로 항응고 처리하여 실험동물용 자동 혈액분석기 (Haematology, Roche Co, USA)로 적혈구, 백혈구, 혈소판, 혈색소와 적혈구 용적 등을 측정하였다.

4. 혈당 및 혈장 지질치 분석

혈당은 실험 종료 시까지 1개월 간격으로 12시간 절식시킨 후 heparin (Sigma, USA)으로 처리된 capillary 튜브를 이용하여 마우스 안와정맥총에서 혈액을 채취한 후 glucometer를 사용하여 혈당을 측정하였다. 혈장 지질치를 측정하기 위해서는 남은 혈액을 4℃, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 즉시 총 콜레스테롤 (Boehringer Mannheim, German) 및 중성지방 (Boehringer Mannheim, German)을 효소법을 이용하여 photometer로 측정하였다.

5. 행동학적 분석

1) Open-field 검사

마우스가 전혀 경험이 없는 장소 새로운 환경(open-field)에 놓아 졌을 경우 자발운동은 개체의 운동활동도, 탐색행동 및 여러 가지의 정동반응을 반영하고 있다고 밝혀져 있다. 마우스의 경우 Open-field 검사는 90cm의 정사각형의 바닥에 10cm 간격으로 가로, 세로 줄을 그은 후 사방으로 20cm의 벽을 세운다. 이러한 장치의 내부는 흰색으로 칠하고, 장치의 중앙 위쪽 80cm상에 100W의 백색광을 둔다. 마우스가 측정장치 속에서 측정자를 볼 수 없도록 한 상태에서 open-field 속에 마우스를 1분간 넣은 다음 운동량을 측정하였다.

2) Rotor-rod 검사

Rotor-rod 검사는 운동기능장애의 특징 중에 하나인 운동협조성의 장애를 검사하는 방법이다. Rotor-rod 검사는 일정 속도로 회전하는 막대 위에 마우스를 놓아두고 어느 정도까지 마우스가 막대에서 떨어지지 않고 견딜 수 있는가를 측정하는 것으로, 이 방법은 골격근의 운동장애, 근육이완 및 평형감각

의 이상 등을 검사할 수 있다.

3) Wheel test

Treadmill(Line Seiki co, Japan)을 사용하여 측정하였다. 직경 20cm의 Wheel에 동물을 넣어 3분간의 회전수를 측정하였다.

4) Total activity 측정

Motility-Meter 2012 (RHEMA-LABORTELHNIK, Germany)를 사용하여 1시간 동안의 총 운동량을 측정하였다. 실험 종료 시까지 1개월 간격으로 일정시간 (오전 10-17시 사이) 측정하였다.

6. 간에서 Total SOD (Superoxide Dismutase) 활성 측정

노화억제소재를 투여한 마우스에서 간을 추출한 후 간 무게의 10배 양의 homogenizing buffer (50mM potassium phosphate, pH7.4, 0.3 M KBr, 0.5 mM EDTA)를 첨가하여 균질화 한다. 그 후 간 추출물을 sonication한 후 4 °C에서 20분 동안 20,000 g로 원심분리 한다. 그 상층액을 즉시 total SOD (superoxide dismutase) 활성 측정에 사용하였으며 나머지 상층액은 총 단백질 정량에 사용하였다. 3 ml Cuvette에 50 mM sodium carbonate (pH 10.0)(2.4 ml)와 0.1 mM cytochrome C (0.3 ml) 그리고 0.5 mM xanthine (0.3 ml)를 넣고 25 °C에서 상층액 10 μ l와 xanthine oxidase 10 μ l를 넣은 다음 Beckman DU-70 spectrophotometer (Beckman, USA)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Total SOD는 3회 반복 측정하여 분석하였다 (Fattman et al, 2000).

7. 장기무게의 측정 및 안정성 검사

노화억제소재 투여 실험 종료 후에 실험군과 대조군을 부검하여 각종 장기의 무게를 측정하였다. 장기 무게는 개체 차이를 없애기 위하여 전체 체중에 대한 장기 무게의 비로 계산하여 통계 처리를 하였다. 그리고 이때 얻은 장기는 육안적 관찰을 통해 이상 여부를 조사하였으며, 작은 장기는 실체 현미경 (Nikon, Japan)을 이용하여 관찰하여 안정성 검사를 실시하였다.

8. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SAS (statistic analysis system) 및 microsoft excel 프로그램을 이용하여 실험군당 평균(Mean) \pm 표

준편차(S.D.)로 표시하였고 각 군의 평균에 대한 유의성을 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test 및 student's t-test에 의해 검정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 노화 실험동물의 육성

1) ICR 마우스의 가령에 따른 체중, 혈당, 혈장지질치 및 혈액조성치의 변화 (2-6개월)

(1) 체중의 변화

ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 2개월부터 매월 체중을 측정한 결과 체중은 시간이 경과함에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 생후 2개월의 암, 수 체중은 각각 26.71 ± 3.17 g, 31.44 ± 3.19 g에서, 생후 4개월에는 30.55 ± 3.22 g, 37.54 ± 2.12 g을, 생후 6개월에는 31.05 ± 3.82 g, 40.30 ± 3.33 g로 증가하였다. 성별로 체중 증가량을 비교하여보면 암컷에 비해 수컷의 증가량이 많았으며, 다른 근교계 마우스와 비교하면 체중이 높은 경향을 보였다 (Table 1).

(2) 혈당 변화

노화억제소재의 효능 검정을 위한 지표로 ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 2개월부터 매월 혈당을 측정한 결과 생후 2개월의 암, 수 혈당은 각각 127.00 ± 20.11 mg/dl, 128.66 ± 19.53 mg/dl에서, 생후 4개월에는 141.50 ± 25.82 mg/dl, 131.00 ± 40.48 mg/dl을, 생후 6개월에는 106.00 ± 20.29 mg/dl, 120.22 ± 21.00 mg/dl로 연령 증가에 관계없이 거의 일정한 혈당치를 보였으며, 암수간에도 별다른 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

(3) 혈액지질치의 변화

노화억제소재의 효능 검정을 위한 지표로 ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 2개월부터 1개월 간격으로 cholesterol과 triglyceride를 측정한 결과 생후 2개월의 암, 수 cholesterol은 각각 80.52 mg/dl, 109.60 mg/dl에서, 생후 6개월에는 58.40 mg/dl, 72.22 mg/dl 이었다. Triglyceride는 생후 2개월에 암, 수가 133.07 mg/dl, 147.60 mg/dl에서, 생후 4개월에는 135.80 mg/dl, 94.88 mg/dl로 연령에 따른 변화는 거의 없었다 (Table 1).

(4) 혈액조성치의 변화

ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 2개월부터 매월 white blood

cell(WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin (HB), hematocrit (HT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpusculahemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT) 및 mean platelet volumn (MPV)을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 전 측정 항목에서 암, 수간의 현저한 차이는 없었으며, 연령에 따른 현저한 변화도 없었다.

Table 1. The changes of body weight, blood glucose, serum lipids in ICR mice

Sex	Item	Months				
		2	3	4	5	6
Male (N=31)	Body weight (g)	31.44±3.19 ¹⁾	33.66±3.88	37.54±2.12	37.00±0.68	40.30±3.33
	Blood Glucose (mg/dl)	128.00±19.53	125.79±26.33	131.00±40.48	130.40±12.36	120.22±21.00
	Triglycerides (mg/dl)	147.60±30.48	90.67±19.46	94.88±28.87	ND	ND
	Cholesterol (mg/dl)	109.60±83.75	107.80±43.77	71.33±11.88	72.22±13.12	ND
Female (N=37)	Body weight (g)	26.71±3.71	28.04±2.56	30.55±3.22	30.37±2.88	31.05±3.82
	Blood Glucose (mg/dl)	127.00±20.11	122.45±22.34	141.50±25.82	125.55±25.41	106.00±20.29
	Triglycerides (mg/dl)	133.07±83.83	74.64±11.67	135.80±75.03	ND	ND
	Cholesterol (mg/dl)	80.52±13.69	46.00±27.33	58.40±12.03	50.80±11.40	ND

ND : Not Detected

¹⁾ : Mean±S.D.

Table 2-1. The changes of hematological values in ICR mice

Sex	Item	Months				
		2	3	4	5	6
Male (N=31)	White Blood Cells($10^3/\text{mm}^3$)	9.46±0.36 ¹⁾	11.05±5.28	4.57±0.97	13.14±2.75	5.43±2.62
	Red Blood Cell ($10^9/\text{mm}^3$)	16.80±7.04	11.36±1.88	7.23±5.38	13.22±2.60	11.19±3.00
	Hemoglobin (g/dl)	19.60±0.57	17.67±2.43	15.33±1.86	17.48±1.29	28.23±10.51
	Hematocrit (%)	47.25±16.48	48.92±8.50	43.48±6.17	49.19±15.85	41.60±16.79
Female (N=37)	White Blood Cells($10^3/\text{mm}^3$)	9.62±0.54	9.20±2.73	5.18±2.21	8.88±2.30	8.20±5.43
	Red Blood Cell ($10^9/\text{mm}^3$)	13.83±4.45	12.96±1.45	10.12±5.73	14.85±6.81	15.43±4.85
	Hemoglobin (g/dl)	13.85±6.90	20.72±2.09	17.08±3.62	18.80±1.98	19.52±3.48
	Hematocrit (%)	53.00±4.24	57.34±4.72	47.31±13.56	48.72±21.57	48.40±13.15

¹⁾ : Mean±S.D.

Table 2-2. The changes of hematological values in ICR mice

Sex	Item	Months				
		2	3	4	5	6
Male (N=31)	Mean Corpuscular Volume	37.00±1.41 ¹⁾	45.26±4.59	38.57±0.98	40.69±11.94	46.00±2.28
	Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	14.51±2.16	16.70±5.14	14.73±4.52	13.35±1.78	15.62±8.52
	Mean Corpuscular Hemoglobin C (pg)	33.83±3.45	34.72±4.32	34.08±5.08	31.46±2.22	33.50±12.74
	Platelets (10 ³ /mm ³)	462.85±228.31	340.79±151.45	435.17±151.90	544.80±199.89	223.50±126.66
Female (N=37)	Mean Corpuscular Volume	42.06±9.41	44.18±4.67	37.50±2.55	40.00±9.62	41.00±4.36
	Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	17.40±3.37	15.99±1.53	12.90±3.54	13.36±4.00	13.10±2.31
	Mean Corpuscular Hemoglobin C (pg)	36.82±0.48	35.97±1.89	30.67±3.24	35.82±15.29	33.87±2.04
	Platelets (10 ³ /mm ³)	285.50±177.48	359.55±134.79	368.67±204.17	320.75±190.00	199.57±87.48

¹⁾ : Mean±S.D.

Table 2-3. The changes of hematological values in ICR mice

Sex	Item	Months				
		2	3	4	5	6
	Mean Volume	8.44±2.82 ¹⁾	6.15±1.94	5.05±0.43	4.81±0.34	7.98±0.85
Male (N=31)	Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	0.34±0.19	0.24±0.20	0.27±0.07	0.40±0.06	0.12±0.02
	Mean Corpuscular Hemoglobin C (pg)	26.60±5.77	26.31±4.37	19.60±2.39	22.09±2.91	32.90±1.97
	Mean Corpuscular Volume	8.41±2.47	6.89±2.16	5.57±1.38	7.77±3.48	10.40±3.68
Female (N=37)	Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	0.77±0.18	0.23±0.18	0.22±0.08	0.31±0.12	0.16±0.12
	Mean Corpuscular Hemoglobin C (pg)	24.28±5.72	24.62±4.47	23.30±4.56	25.47±7.41	27.30±10.32

¹⁾ : Mean ± S.D.

2) ICR 마우스의 가령에 따른 체중, 혈당, 혈장지질치 변화 (7-13개월)

(1) 체중의 변화

ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 7개월부터 매일 체중을 측정한 결과 체중은 시간이 경과함에 따라 암컷에서는 조금 증가하는 경향을 보였으나 수컷에서는 체중이 조금 감소하는 경향을 보였다. 생후 7개월의 암수 체중은 각각 31.10 ± 3.14 g, 41.22 ± 3.67 g에서, 생후 10개월에는 34.11 ± 6.01 g, 38.67 ± 2.99 g, 생후 13개월에는 35.40 ± 5.85 g, 38.31 ± 2.89 g 이었다 (Table 3).

(2) 혈당 변화

노화 억제 소재의 효능 검정을 위한 지표로 ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 7개월부터 매일 혈당을 측정한 결과 생후 7개월의 암수 혈당은 각각 135.60 ± 8.66 mg/dl, 124.00 ± 15.54 mg/dl에서, 생후 10개월에는 154.50 ± 27.27 mg/dl, 150.30 ± 25.82 mg/dl을, 생후 13개월에는 143.90 ± 12.74 mg/dl, 137.80 ± 13.14 mg/dl로 연령 증가에 관계없이 거의 일정한 혈당치를 보였으며, 암수간에도 별다른 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

(3) 혈액지질치의 변화

노화 억제 소재의 효능 검정을 위한 지표로 ICR 마우스를 암수 구분하여 생후 7개월부터 1개월 간격으로 cholesterol과 triglyceride를 측정한 결과 생후 7개월의 암수 cholesterol은 각각 48.50 mg/dl, 66.60 mg/dl에서, 생후 10개월에는 55.80 mg/dl, 71.20 mg/dl을, 생후 13개월에는 66.50 mg/dl, 83.40 mg/dl로 연령 증가에 따라 조금 증가하는 경향을 보였다. Triglyceride는 생후 7개월에 암, 수가 127.60 mg/dl, 138.70 mg/dl에서, 생후 12개월에는 185.40 mg/dl, 220.00 mg/dl로 증가하였으나 생후 13개월에는 125.70 mg/dl, 132.40 mg/dl로 다시 감소하였다 (Table 3).

2. 노령화된 ICR 마우스(12개월)에서 현삼의 노화 억제 효능 검정

1) 체중의 변화

노화억제소재 투여시 ICR 마우스의 체중을 보면 대조군 (A군) 31.42 ± 2.64 g, 100배 희석 투여군 (B군) 41.22 ± 3.67 g, 1000배 희석 투여군 (C군) 29.78 ± 2.20 g였으나, 6개월 간 투여 후에는 A군이 33.30 ± 1.21 g, B군이

31.80±1.85 g, C군이 31.83±2.33 g로 모든 군에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Table 4).

2) 혈당 변화

혈당은 투여 실험 직전에 A군 131.20±10.45 mg/dl, B군 128.60±16.77 mg/dl, C군 123.80±19.02 mg/dl이었으나, 6개월 간 투여 후 A군 111.00±15.13 mg/dl, B군 108.00±12.12 mg/dl, C군 121.75±13.50 mg/dl으로 통계적인 유의성을 보이지 않았다(Table 4).

3) 혈액지질치의 변화

중성지방은 투여 실험 전 A군 117.20 mg/dl, B군 135.40 mg/dl, C군 127.80 mg/dl에서 투여 1, 3개월 후에는 A군 132.25, 123.75 mg/dl, B군 85.60, 63.00 mg/dl, C군 55.60, 110.000 mg/dl을 각각 나타내어 통계적인 유의함을 보였다. 또한 콜레스테롤은 투여 실험 전 A군 60.00 mg/dl, B군 65.40 mg/dl, C군 66.20 mg/dl이었으나, 투여 2개월 후에는 A군 46.00 mg/dl, B군 58.00 mg/dl, C군 62.80 mg/dl으로 통계적인 유의함을 보였다. 그러나 중성지방과 콜레스테롤은 투여 일수가 경과될수록 유의차가 없어져 일시적인 것으로 사료되었다(Table 4).

4) 혈액조성치의 변화

백혈구(WBC)는 A군 10.95-7.10 $10^3/mm^3$, B군 9.08-8.40 $10^3/mm^3$, C군 8.90-7.63 $10^3/mm^3$ 으로 조금 감소하는 경향을 보였다. 적혈구(RBC)는 A군 9.80-9.15 $10^6/mm^3$, B군 9.50-9.88 $10^6/mm^3$, C군 9.00-9.90 $10^6/mm^3$ 으로 일정한 수치를 유지하였다. 혈색소(HB)는 A군 15.18-13.03 g/dl, B군 15.10-14.40 g/dl, C군 14.76-14.65 g/dl으로 유의한 변화가 없었다. 혈구용적비(HT)는 A군 39.84-35.80%, B군 39.96-39.40%, C군 37.96-39.23%으로 일정하게 유지되었다. 혈소판(PLT)은 A군 489.80-875.00 $10^3/mm^3$, B군 268.25-894.00 $10^3/mm^3$, C군 321.00-827.50 $10^3/mm^3$ 으로 다소 변화가 있었으나 통계적인 유의성은 보이지 않았다 (Table 5).

5) 행동학적 조사 결과

(1) Open field test

노화억제소재 투여전은 A군이 21.80 ± 8.17, B군이 37.00 ± 12.04,

C군이 43.60 ± 15.34 였으나, 현삼을 6개월간 투여한 후에는 A군이 49.00 ± 2.83 , B군이 54.67 ± 13.61 , C군이 57.75 ± 12.28 로 대조군과 노화억제소재 투여군간의 유의한 변화는 보이지 않았다(Table 6).

(2) Rotor rod test

노화억제소재를 6개월간 투여한 ICR 마우스에서 rotor rod test 결과를 보면 rod에서 마우스가 떨어지는 횟수가 A군이 1.00 ± 1.73 , B군이 0.00 ± 0.00 , C군이 0.50 ± 0.58 였으며, rod위에 있는 시간도 A군이 178.00 ± 3.46 , B군이 180.00 ± 0.00 , C군이 179.00 ± 1.15 로 대조군에 비해 현삼 투여군이 운동협조성 면에서 개선되는 것으로 나타났다(Table 6).

(3) Wheel test

투여 전후를 살펴보면 A군 28.80-49.50 (회전수/3분), B군 42.40-49.50, C군 41.40-49.25으로 대조군은 다소 증가하였으나 실험군에서는 일정한 운동량을 유지하였다. 모든 군에서 통계적인 유의성은 보이지 않았다 (Table 6).

Table 3. The changes of body weight, blood glucose and lipid profiles in aged ICR mice

	Sex	Months						
		7	8	9	10	11	12	13
Body Weight (g)	Male	41.22 ± 3.67 ¹⁾	40.10 ± 4.18	38.51 ± 2.57	38.67 ± 2.99	36.92 ± 2.71	36.26 ± 2.07	38.31 ± 2.89
	Female	31.10 ± 3.14	32.34 ± 4.91	32.38 ± 4.91	34.11 ± 6.01	33.27 ± 4.73	33.68 ± 5.47	35.40 ± 5.85
Blood Glucose (mg/dl)	Male	124.00 ± 15.54	116.40 ± 29.43	127.70 ± 28.67	150.30 ± 25.82	149.60 ± 25.69	140.10 ± 21.55	137.80 ± 13.14
	Female	135.60 ± 8.66	107.40 ± 15.80	136.00 ± 22.44	154.50 ± 27.27	141.30 ± 27.41	140.60 ± 17.80	143.90 ± 12.74
Triglycerides (mg/dl)	Male	138.70 ± 63.72	97.60 ± 26.74	114.50 ± 50.91	176.40 ± 44.68	129.80 ± 42.36	220.00 ± 80.71	132.40 ± 36.49
	Female	127.60 ± 39.70	117.40 ± 46.52	158.60 ± 58.94	171.20 ± 33.70	113.50 ± 24.23	185.40 ± 49.67	125.70 ± 40.19
Cholesterol (mg/dl)	Male	66.60 ± 10.67	58.00 ± 5.31	56.80 ± 8.04	71.20 ± 12.73	76.90 ± 15.23	74.30 ± 11.55	83.40 ± 12.16
	Female	48.50 ± 10.30	50.00 ± 12.45	48.10 ± 9.47	55.80 ± 18.72	54.82 ± 21.91	55.60 ± 14.45	66.50 ± 11.94

¹⁾ Mean ± S.D.

Male : N=31

Female : N=37

Table 4. The changes of body weight, blood glucose and lipid profiles in aged ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* extract

	Group (N=5)	Months							
		12	13	14	15	16	17	18	
Body Weight (g)	A	31.42 ± 2.64 ¹⁾	33.95 ± 3.27	32.89 ± 1.82	33.43 ± 3.11	34.67 ± 1.90	33.60 ± 2.23	33.30 ± 1.21	
	B	30.82 ± 2.06	32.56 ± 2.25	31.60 ± 1.33	31.50 ± 0.87	31.57 ± 1.03	31.30 ± 0.95	31.80 ± 1.85	
	C	29.78 ± 2.20	31.64 ± 2.14	32.10 ± 1.92	31.70 ± 2.51	31.74 ± 2.16	31.03 ± 3.40	31.83 ± 2.33	
Blood Glucose (mg/dl)	A	131.20 ± 10.45	127.50 ± 27.11	135.00 ± 12.19	112.75 ± 32.17	120.00 ± 16.70	142.67 ± 16.26	111.00 ± 15.13	
	B	128.60 ± 16.77	157.80 ± 37.80	115.00 ± 19.20	128.67 ± 23.03	104.67 ± 4.93	120.67 ± 12.42	108.00 ± 12.12	
	C	123.80 ± 19.02	150.60 ± 21.73	135.00 ± 28.02	139.40 ± 24.46	96.20 ± 22.82	118.50 ± 9.88	121.75 ± 13.50	
Triglycerides (mg/dl)	A	117.20 ± 39.98	132.25 ± 66.02 ²⁾	98.75 ± 48.59	123.75 ± 43.58 ^a	152.67 ± 82.95	76.33 ± 32.35	141.33 ± 63.12	
	B	135.40 ± 15.14	85.60 ± 22.83 ^a	70.75 ± 16.21	63.00 ± 5.57 ^b	94.67 ± 29.84	72.33 ± 12.70	103.67 ± 23.67	
	C	127.80 ± 24.13	55.60 ± 10.74 ^b	101.00 ± 36.48	110.00 ± 37.57 ²⁾	127.80 ± 32.64	98.25 ± 46.84	147.75 ± 49.06	
Cholesterol (mg/dl)	A	60.00 ± 12.51	52.50 ± 5.20	46.00 ± 4.97 ^a	54.75 ± 5.68	55.67 ± 5.51	43.33 ± 10.21	63.00 ± 4.36	
	B	65.40 ± 13.79	57.20 ± 8.44	58.00 ± 7.35 ^b	54.67 ± 3.06	50.00 ± 8.89	57.33 ± 5.69	67.33 ± 10.97	
	C	66.20 ± 8.11	60.80 ± 7.76	62.80 ± 6.53 ^b	59.80 ± 3.11	54.80 ± 4.55	48.25 ± 6.18	68.75 ± 4.79	

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:1000 diluted with water)

1) Mean ± S.D.

2) Values within the same column with different alphabets are significantly different (P<0.05) among groups by Duncan's multiple range test

Table 5. The change of blood cell count in aged ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* extract

	Group (N=5)	Months						
		12	13	14	15	16	17	18
WBC (103/mm3)	A	10.95 ± 2.61 ¹⁾	7.45 ± 1.90	7.45 ± 2.97	9.75 ± 0.24	10.17 ± 0.12	9.03 ± 2.15	7.10 ± 2.42
	B	9.08 ± 1.37	4.93 ± 1.07	6.25 ± 2.76	9.93 ± 0.12	10.00 ± 0.20	8.40 ± 1.01	8.40 ± 0.95
	C	8.90 ± 2.64	6.88 ± 3.06	5.90 ± 1.64	9.96 ± 0.05	9.98 ± 0.18	8.28 ± 3.84	7.63 ± 3.28
RBC (106/mm3)	A	9.80 ± 0.32	10.28 ± 0.94	10.08 ± 0.65	8.32 ± 3.35	10.51 ± 0.91	9.08 ± 0.18	9.15 ± 1.40
	B	9.50 ± 0.67	10.43 ± 0.79	10.40 ± 0.62	10.41 ± 0.15	10.18 ± 0.78	9.27 ± 0.90	9.88 ± 0.70
	C	9.00 ± 0.67	10.26 ± 0.84	10.20 ± 1.07	10.37 ± 0.44	10.42 ± 0.40	9.04 ± 0.41	9.90 ± 0.29
HB (g/dl)	A	15.18 ± 0.85	15.75 ± 0.93	14.18 ± 0.90	12.98 ± 0.26	13.20 ± 0.00	13.30 ± 0.10	13.03 ± 1.66
	B	15.10 ± 0.71	15.24 ± 2.32	13.98 ± 2.51	13.20 ± 0.00	13.20 ± 0.00	13.70 ± 1.20	14.40 ± 0.98
	C	14.76 ± 0.50	16.08 ± 0.89	15.04 ± 0.85	13.20 ± 0.00	13.20 ± 0.00	13.43 ± 0.84	14.65 ± 0.60
HT (%)	A	39.84 ± 2.15	43.48 ± 3.10	42.95 ± 1.52	41.05 ± 2.67	40.33 ± 2.42	37.23 ± 0.95	35.80 ± 4.48
	B	39.96 ± 1.68	42.48 ± 6.16	42.10 ± 6.38	44.03 ± 0.98	39.87 ± 2.61	38.70 ± 3.25	39.40 ± 2.27
	C	37.96 ± 1.60	38.26 ± 14.23	44.48 ± 2.53	44.92 ± 3.02	41.52 ± 2.65	37.65 ± 1.74	39.23 ± 1.31
PLT (103/mm3)	A	489.80 ± 215.02	161.00 ± 21.42	504.00 ± 113.92	511.25 ± 211.52	354.33 ± 96.34	893.33 ± 168.42	875.00 ± 93.21
	B	268.25 ± 168.15	251.00 ± 168.47	487.33 ± 230.82	565.33 ± 114.03	288.67 ± 122.17	815.00 ± 121.64	894.00 ± 183.13
	C	321.00 ± 173.08	305.80 ± 196.04	555.40 ± 97.39	543.60 ± 96.41	302.00 ± 153.99	529.25 ± 148.89	827.50 ± 143.65

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:1000 diluted with water)

1) Mean ± S.D.

Table 6. The behavior tests in aged ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* extract

	Group (N=5)	Months							
		12	13	14	15	16	17	18	
Open field test	A	21.80 ± 8.17 ¹⁾	22.00 ± 2.94 ²⁾	36.25 ± 14.57 ^a	39.25 ± 11.76 ^a	44.33 ± 1.53	41.67 ± 9.07	49.00 ± 2.83	
	B	37.00 ± 12.04	37.20 ± 11.90 ^b	44.50 ± 5.74 ^a	50.33 ± 9.50 ^{ab}	51.67 ± 15.57	51.67 ± 8.50	54.67 ± 13.61	
	C	43.60 ± 15.34	45.00 ± 11.81 ^b	61.60 ± 3.29 ^b	62.00 ± 6.28 ^b	54.60 ± 13.70	57.75 ± 16.94	57.75 ± 12.28	
Rotor rod test	The frequency of fall	A	3.80 ± 1.30	2.00 ± 2.45	1.25 ± 1.89	1.75 ± 2.22	0.67 ± 1.15	0.67 ± 1.15	1.00 ± 1.73
		B	1.20 ± 2.17	0.80 ± 1.10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		C	1.00 ± 1.41	0.20 ± 0.45	0.20 ± 0.45	0.80 ± 0.89	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58
Duration (sec)	A	166.40 ± 8.32	177.25 ± 4.27	177.50 ± 3.79	177.00 ± 3.46	178.67 ± 2.31	178.67 ± 2.31	178.00 ± 3.46	
	B	175.80 ± 8.32	179.20 ± 1.10	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	
	C	177.20 ± 4.38	179.80 ± 0.45	179.60 ± 0.89	178.40 ± 2.61	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	179.00 ± 1.15	
Wheel test	A	28.80 ± 8.11	26.00 ± 4.24	45.00 ± 10.55	36.25 ± 16.21	36.33 ± 6.03	41.33 ± 16.50	49.50 ± 2.12	
	B	42.40 ± 17.98	37.60 ± 15.49	46.25 ± 10.40	53.67 ± 16.50	48.67 ± 19.04	52.00 ± 25.36	49.33 ± 13.87	
	C	41.40 ± 13.81	46.40 ± 11.33	49.00 ± 11.02	47.80 ± 11.76	48.00 ± 18.59	54.00 ± 24.75	49.25 ± 16.09	

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:1000 diluted with water)

1) Mean ± S.D.

2) Values within the same column with different alphabets are significantly different (P < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

3. 노령화된 ICR마우스(12개월)에서 익모초의 노화 억제 효능 검증

1) 체중의 변화

노화억제소재의 투여시 ICR마우스의 체중을 보면 대조군 (A군) 32.47 ± 6.53 g, 100배 희석투여군 (B군) 33.13 ± 8.46 g, 1000배 희석투여군 (C군) 33.45 ± 3.81 g였으나, 5개월간 투여 후에는 A군이 30.00 ± 2.95 g, B군이 26.90 ± 32.70 g, C군이 32.70 ± 1.96 g으로 B군에서 조금 감소하였으나 통계학적 유의성을 보이지 않았다(Table 7).

2) 혈당 변화

혈당은 투여 실험 직전에 A군 13.2 ± 20.58 mg/dl, B군 125.67 ± 27.72 mg/dl, C군 121.83 ± 22.16 mg/dl였으나, 6개월간 투여 후 A군 94.50 ± 14.91 mg/dl, B군 89.00 ± 1.41 mg/dl, C군 91.75 ± 5.91 mg/dl으로 통계적인 유의성을 보이지 않았다(Table 7).

3) 혈액지질치의 변화

중성지방은 투여 실험 전 A군 107.17 mg/dl, B군 88.30 mg/dl, C군 98.17 mg/dl에서 투여 6개월 후에는 A군 118.75 mg/dl, B군 82.50 mg/dl, C군 91.75 mg/dl을 각각 나타내어 B군에서 감소 경향을 나타냈으나 통계적인 유의함을 보이지 않았다. 또한 콜레스테롤은 투여 실험 전 A군 42.67 mg/dl, B군 53.33 mg/dl, C군 56.33 mg/dl였으나, 투여 6개월 후에는 A군 55.00 mg/dl, B군 54.50 mg/dl, C군 61.25 mg/dl으로 통계적인 유의함을 보이지 않았다 (Table 7).

4) 혈액조성치의 변화

백혈구(WBC)는 A군 $13.50-9.55$ $10^3/\text{mm}^3$, B군 $14.33-5.50$ $10^3/\text{mm}^3$, C군 $18.65-11.27$ $10^3/\text{mm}^3$ 으로 조금 감소하는 경향을 보였다. 적혈구(RBC)는 A군 $9.83-10.61$ $10^6/\text{mm}^3$, B군 $9.82-11.16$ $10^6/\text{mm}^3$, C군 $10.27-10.73$ $10^6/\text{mm}^3$ 으로 일정한 수치를 유지하였다. 혈색소(HB)는 A군 $15.43-15.05$ g/dl, B군 $15.72-15.72$ g/dl, C군 $17.03-15.03$ g/dl으로 유의한 변화가 없었다. 혈구용적비(HT)는 A군 $41.03-40.03\%$, B군 $41.62-42.65\%$, C군 $44.12-40.37\%$ 으로 일정하게 유지되었다. 혈소판(PLT)은 A군 $216.50-336.00$ $10^3/\text{mm}^3$, B군 $113.17-1326.50$ $10^3/\text{mm}^3$, C군 $108.83-272.33$ $10^3/\text{mm}^3$ 으로 다소 변화가 있었으나

통계적인 유의성은 보이지 않았다(Table 8).

5) 행동학적 조사 결과

(1) Open field test

노화억제소재 투여전은 A군이 45.00 ± 20.07 , B군이 43.17 ± 20.61 , C군이 55.83 ± 15.72 였으나, 익모초을 6개월간 투여한 후에는 A군이 65.00 ± 7.07 , C군이 57.00 ± 16.24 로 대조군과 노화억제소재 투여군간의 유의한 변화는 보이지 않았다(Table 9).

(2) Rotor rod test

노화억제소재를 6개월간 투여한 ICR 마우스에서 rotor rod test 결과를 보면 rod에서 마우스가 떨어지는 횟수가 A군이 0.50 ± 0.71 , C군이 0.25 ± 0.50 였으며, rod위에

Table 7. The changes of body weight, blood glucose and lipid profiles in aged ICR mice fed *Leonurus sibiricus* extract

	Group (N=5)	Months							
		12	13	14	15	16	17	18	
Body Weight (g)	A	32.47 ± 6.53 ¹⁾	35.28 ± 6.51	34.50 ± 6.30	34.73 ± 7.11	31.15 ± 1.46	30.00 ± 2.95	30.90 ± 3.25	
	B	33.13 ± 8.46	36.10 ± 8.05	34.66 ± 6.33	34.50 ± 9.62	27.95 ± 0.78	26.90 ± 2.26	ND	
	C	33.45 ± 3.81	34.37 ± 4.61	35.50 ± 5.04	34.95 ± 4.01	32.48 ± 3.72	32.70 ± 1.96	33.17 ± 2.56	
Blood Glucose (mg/dl)	A	132.67 ± 20.58	118.40 ± 31.91	116.60 ± 28.59	108.75 ± 16.26	93.00 ± 19.20	94.50 ± 14.91	103.50 ± 9.19	
	B	125.67 ± 27.72	119.33 ± 41.39	122.80 ± 14.69	100.00 ± 12.73	90.00 ± 5.66	89.00 ± 1.41	ND	
	C	121.83 ± 22.16	134.00 ± 29.52	130.83 ± 18.96	90.40 ± 11.67	82.50 ± 6.61	91.75 ± 5.91	108.00 ± 10.82	
Triglycerides (mg/dl)	A	107.17 ± 40.67	124.40 ± 50.72	121.40 ± 53.16	123.75 ± 37.46	113.50 ± 39.16	118.75 ± 38.70	85.50 ± 34.65	
	B	88.33 ± 29.71	108.00 ± 55.48	83.80 ± 16.32	103.00 ± 14.14	80.00 ± 19.80	82.50 ± 57.28	ND	
	C	98.17 ± 15.11	138.17 ± 16.30	116.83 ± 28.00	128.60 ± 21.61	106.50 ± 32.56	91.75 ± 10.31	109.00 ± 17.35	
Cholesterol (mg/dl)	A	42.67 ± 16.08	55.00 ± 21.02	45.80 ± 14.46	54.00 ± 9.09	57.25 ± 7.09	55.00 ± 4.32	47.50 ± 0.71	
	B	53.33 ± 11.11	58.50 ± 11.13	59.20 ± 13.12	51.00 ± 2.83	56.50 ± 7.78	54.50 ± 0.71	ND	
	C	56.33 ± 6.02	57.33 ± 17.74	56.17 ± 9.24	52.00 ± 6.63	66.25 ± 12.04	61.25 ± 15.31	57.33 ± 12.34	

A : Negative control

B : Administration of *Leonurus sibiricus* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of *Leonurus sibiricus* extract (1:1000 diluted with water)

1) : Mean ± S.D.

ND : Not Detected

Table 8. The changes of blood cell count in aged ICR mice fed *Leonurus sibiricus* extract

	Group (N=5)	Months						
		12	13	14	15	16	18	19
WBC (103/mm ³)	A	13.50 ± 8.77 ¹⁾	14.70 ± 17.34	10.24 ± 0.23	10.03 ± 0.15	7.86 ± 2.38	6.13 ± 2.36	9.55 ± 2.76
	B	14.33 ± 9.26	5.38 ± 2.51	10.00 ± 0.17	9.85 ± 0.21	11.55 ± 5.59	5.50 ± 1.84	ND
	C	18.65 ± 3.50	7.12 ± 3.98	10.00 ± 0.12	9.98 ± 0.11	8.03 ± 1.48	7.05 ± 2.14	11.27 ± 2.40
RBC (106/mm ³)	A	9.83 ± 2.09	9.84 ± 0.85	11.30 ± 1.03	10.09 ± 0.46	10.74 ± 0.37	10.59 ± 0.31	10.61 ± 0.45
	B	9.82 ± 1.05	7.80 ± 2.07	10.35 ± 1.48	9.61 ± 0.72	12.06 ± 0.94	11.16 ± 1.06	ND
	C	10.27 ± 0.35	9.05 ± 1.75	10.12 ± 0.94	9.37 ± 1.23	10.39 ± 0.59	10.32 ± 0.26	10.73 ± 0.19
HB (g/dl)	A	15.43 ± 3.65	13.82 ± 2.49	13.20 ± 0.00	13.20 ± 0.00	14.54 ± 2.64	15.13 ± 1.50	15.05 ± 0.21
	B	15.72 ± 1.51	11.65 ± 2.56	13.20 ± 0.00	13.20 ± 0.00	18.30 ± 1.56	15.75 ± 2.05	ND
	C	17.03 ± 0.64	13.43 ± 2.48	11.54 ± 1.32	13.20 ± 0.00	15.78 ± 1.48	14.55 ± 0.66	15.03 ± 0.85
HT (%)	A	41.03 ± 9.37	41.12 ± 6.47	43.94 ± 1.80	39.55 ± 1.71	43.75 ± 2.27	41.70 ± 2.61	40.35 ± 0.92
	B	41.62 ± 4.52	35.27 ± 7.31	42.17 ± 5.90	38.30 ± 1.84	48.90 ± 3.39	42.65 ± 4.60	ND
	C	44.12 ± 1.79	39.57 ± 7.59	41.60 ± 2.82	37.10 ± 3.97	42.25 ± 3.42	39.80 ± 1.47	40.37 ± 1.82
PLT (103/mm ³)	A	216.50 ± 130.32	480.00 ± 441.13	553.20 ± 311.32	318.00 ± 178.30	823.25 ± 160.70	795.75 ± 90.81	336.00 ± 200.82
	B	113.17 ± 47.15	198.00 ± 84.72	417.00 ± 250.29	241.50 ± 12.02	777.00 ± 267.29	1326.50 ± 31.82	ND
	C	108.83 ± 50.21	184.00 ± 126.81	406.40 ± 149.36	258.60 ± 171.14	825.25 ± 184.40	1467.25 ± 451.50	272.33 ± 58.32

A : Negative control

B : Administration of *Leonurus sibiricus* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of *Leonurus sibiricus* extract (1:1000 diluted with water)

1) : Mean ± S.D.

ND : Not Detected

Table 9. The behavior tests in aged ICR mice fed *Leonurus sibiricus* extract

	Group (N=5)	Months							
		12	13	14	15	16	17	18	
Open field test	A	45.00 ± 20.07 ¹⁾	30.60 ± 14.14	45.40 ± 20.79	51.00 ± 24.12	47.00 ± 22.09	46.00 ± 15.71	65.00 ± 7.07	
	B	43.17 ± 20.61	36.50 ± 15.00	43.00 ± 13.06	26.50 ± 16.26	55.00 ± 24.04	47.00 ± 14.14	ND	
	C	55.83 ± 15.72	57.67 ± 8.02	54.83 ± 7.70	58.40 ± 9.21	60.75 ± 11.76	53.00 ± 10.83	57.00 ± 6.24	
Rotor rod test	The frequency of fall	A	1.00 ± 2.45	1.80 ± 1.92	1.00 ± 1.73	0.50 ± 1.00	1.25 ± 2.50	0.25 ± 0.50	0.50 ± 0.71
		B	1.67 ± 1.63	0.40 ± 0.55	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.71	1.00 ± 1.41	0.50 ± 0.71	ND
		C	0.67 ± 0.82	0.50 ± 0.55	0.17 ± 0.41	0.20 ± 0.45	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
	Duration (sec)	A	179.83 ± 5.31	176.40 ± 3.85	178.00 ± 3.46	179.00 ± 2.00	177.50 ± 5.00	179.50 ± 1.00	179.00 ± 1.14
		B	177.50 ± 5.58	179.20 ± 1.10	180.00 ± 0.00	179.00 ± 1.41	178.00 ± 2.83	179.00 ± 1.41	ND
		C	180.67 ± 1.63	179.00 ± 1.10	179.67 ± 0.82	179.60 ± 0.89	179.00 ± 1.15	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00
Wheel test	A	33.83 ± 12.07	33.50 ± 8.10	34.80 ± 9.76 ^{az)}	41.00 ± 6.27 ^a	29.75 ± 11.09	29.75 ± 3.59	33.50 ± 9.19	
	B	25.67 ± 13.28	33.60 ± 11.01	36.80 ± 15.91 ^{ab}	36.00 ± 5.66 ^a	38.00 ± 14.14	30.50 ± 12.02	ND	
	C	48.17 ± 9.11	46.00 ± 8.12	52.83 ± 11.44 ^b	53.60 ± 4.34 ^b	51.75 ± 15.41	50.75 ± 11.53	49.67 ± 7.57	

A : Negative control

B : Administration of *Leonurus sibiricus* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of *Leonurus sibiricus* extract (1:1000 diluted with water)

1) Mean ± S.D.

2) Values within the same column with different alphabets are significantly different (P < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

ND : Not Detected

있는 시간도 A군이 179.00 ± 1.14 , C군이 180.00 ± 0.00 로 대조군과 노화 억제 투여군간의 유의한 변화는 없었다(Table 9).

(3) Wheel test

투여 전후를 살펴보면 A군이 33.83-33.50 (회전수/3분), C군이 48.17-49.67으로 노화억제소재 투여군에서 극히 증가하였으나 통계적인 유의성은 보이지 않았다(Table 9).

4. 노령화된 ICR마우스(12개월)에서 기장의 노화 억제 효능 검증

1) 체중의 변화

노화억제소재 투여시 ICR 마우스의 체중을 보면 대조군 (A군) 33.60 ± 3.84 g, 100배 희석투여군 (B군) 31.76 ± 2.36 g, 1000배 희석투여군 (C군) 31.32 ± 2.22 g였으나, 6개월간 투여 후에는 A군이 33.03 ± 5.33 g, B군이 32.60 ± 2.72 g, C군이 31.82 ± 2.32 g으로 모든 군에서 유의한 변화는 보이지 않았다(Table 10).

2) 혈당 변화

혈당은 투여 실험 직전에 A군 157.50 ± 21.46 mg/dl, B군 143.20 ± 13.03 mg/dl, C군 171.60 ± 5.73 mg/dl였으나, 1, 2개월간 투여 후 A군 141.75, 108.50 mg/dl, B군 120.80, 151.40 mg/dl, C군 125.80, 150.80 mg/dl으로 통계적인 유의성을 보였다. 그러나, 3개월 이후 일정한 수치를 유지하였다 (Table 10).

3) 혈액지질치의 변화

중성지방은 투여 실험 전 A군 144.00 mg/dl, B군 140.60 mg/dl, C군 103.00 mg/dl에서 투여 1, 2개월 후에는 A군 86.00, 155.00 mg/dl, B군 70.40, 97.00 mg/dl, C군 117.80, 89.80 mg/dl을 각각 나타내어 통계적인 유의함을 보였다. 그러나, 3개월 이후 통계적인 유의함을 보이지 않았다. 콜레스테롤은 투여 실험 전 A군 69.00 mg/dl, B군 56.00 mg/dl, C군 59.20 mg/dl였으나, 투여 6개월 후에는 A군 78.50 mg/dl, B군 51.50 mg/dl, C군 62.20 mg/dl으로 통계적인 유의성을 보이지 않았다(Table 10).

4) 혈액조성치의 변화

백혈구(WBC)는 A군 8.18-10.13 $10^3/\text{mm}^3$, B군 10.74-11.83 $10^3/\text{mm}^3$, C군 9.58-9.92 $10^3/\text{mm}^3$ 으로 일정하게 유지되었다. 적혈구(RBC)는 A군 10.57-10.20 $10^6/\text{mm}^3$, B군 10.66-10.51 $10^6/\text{mm}^3$, C군 10.55-9.89 $10^6/\text{mm}^3$ 으로 일정한 수치를 유지하였다. 혈색소(HB)는 A군 13.83-15.10 g/dl, B군 13.58-15.70 g/dl, C군 13.42-14.66 g/dl으로 유의한 변화가 없었다. 혈구용적비(HT)는 A군 45.78-38.48%, B군 45.32-39.88%, C군 44.90-37.20%으로 6개월에 조금 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 혈소판(PLT)은 A군 310.00-482.25 $10^3/\text{mm}^3$, B군 279.80-174.00 $10^3/\text{mm}^3$, C군 246.00-331.80 $10^3/\text{mm}^3$ 으로 통계적인 유의성은 보이지 않았다(Table 11).

5) 행동학적 조사 결과

(1) Open field test

노화억제소재 투여전은 A군이 64.25 ± 19.67, B군이 56.40 ± 5.27, C군이 64.00 ± 9.14였으나, 기장을 6개월간 투여한 후에는 A군이 54.75 ± 25.57, B군이 44.00 ± 12.19, C군이 58.80 ± 12.91로 대조군과 기장 투여군에서 모두 감소를 하였으나 기장 투여군에서 감소폭이 적었다(Table 12).

(2) Rotor rod test

노화억제소재를 6개월간 투여한 ICR 마우스에서 rotor rod test 결과를 보면 rod에서 마우스가 떨어지는 횟수가 A군이 0.50 ± 0.58, B군이 0.00 ± 0.00, C군이 0.00 ± 0.00였으며, rod위에 있는 시간도 A군이 179.00 ± 1.15, B군이 180.00 ± 0.00, C군이 180.00 ± 0.00로 대조군과 기장투여군간에 유의차는 보이지 않았다(Table 12).

(3) Wheel test

기장을 6개월간 투여한 후에 wheel test 결과를 보면 A군이 48.25 ± 35.39, B군이 66.00 ± 14.21, C군이 64.60 ± 11.74로 대조군에 비해 기장 투여군에서 운동성이 호전되었으나 통계적인 유의차는 없었다(Table 12).

Table 10. The changes of body weight, blood glucose and lipid profiles in aged ICR mice fed *Panicum miliaceum* extract

	Group (N=5)	Months						
		12	13	14	15	16	17	18
Body Weight (g)	A	33.60 ± 3.84 ¹⁾	32.84 ± 3.81	29.75 ± 3.49	29.83 ± 3.18	32.43 ± 4.86	32.10 ± 5.61	33.03 ± 5.33
	B	31.76 ± 2.36	30.94 ± 1.88	30.40 ± 2.01	30.45 ± 2.16	33.20 ± 1.90	32.65 ± 2.86	32.60 ± 2.72
	C	31.32 ± 2.22	32.38 ± 3.41	31.72 ± 3.77	29.60 ± 3.43	32.50 ± 3.24	30.50 ± 3.84	31.82 ± 2.32
Blood Glucose (mg/dl)	A	157.50 ± 21.46	141.75 ± 6.65 _{a2)}	108.50 ± 27.26 _a	88.50 ± 19.09	124.50 ± 21.92	103.75 ± 9.32	126.00 ± 9.20
	B	143.20 ± 13.03	120.80 ± 17.28 _b	151.40 ± 8.44 _b	95.25 ± 11.24	117.25 ± 8.26	114.75 ± 16.86	126.75 ± 15.00
	C	171.60 ± 5.73	125.80 ± 9.73 _{ab}	150.80 ± 21.26 _b	84.80 ± 11.54	118.20 ± 9.88	102.20 ± 8.20	122.40 ± 10.95
Triglycerides (mg/dl)	A	144.00 ± 47.98	86.00 ± 18.28 _{ab}	155.00 ± 61.23 _a	102.75 ± 13.05	170.25 ± 54.08	103.75 ± 39.69	147.75 ± 17.29
	B	140.60 ± 40.87	70.40 ± 30.91 _a	97.00 ± 19.85 _{ab}	99.75 ± 22.10	139.75 ± 28.78	139.00 ± 89.50	128.75 ± 29.55
	C	103.00 ± 34.66	117.80 ± 23.30 _b	89.80 ± 37.60 _b	98.80 ± 34.87	169.80 ± 56.80	83.40 ± 24.95	78.60 ± 18.96
Cholesterol (mg/dl)	A	69.00 ± 9.66	59.25 ± 10.84	68.00 ± 11.89	69.50 ± 7.59	84.50 ± 6.45	61.50 ± 7.85	78.50 ± 32.38
	B	56.00 ± 8.28	54.60 ± 6.88	52.80 ± 8.23	59.75 ± 4.57	58.50 ± 4.43	61.75 ± 6.99	51.50 ± 11.50
	C	59.20 ± 10.13	54.20 ± 13.99	51.00 ± 13.86	68.80 ± 15.58	72.60 ± 18.96	60.40 ± 18.45	62.20 ± 47.24

A : Negative control

B : Administration of 1% *Panicum miliaceum* extract

C : Administration of 0.1% *Panicum miliaceum* extract

1) Mean ± S.D.

2) Values within the same column with different alphabets are significantly different (P < 0.05) among groups by Duncan's

Table 11. The changes of blood cell count in aged female ICR mice fed *Panicum miliaceum* extract

	Group (N=5)	Months						
		12	13	14	15	16	17	18
WBC (103/mm ³)	A	8.18 ± 0.73 ¹⁾	12.75 ± 0.10	10.15 ± 0.06	14.40 ± 4.73	6.13 ± 0.59	13.95 ± 3.62	10.13 ± 2.61
	B	10.74 ± 1.55	12.78 ± 0.11	10.04 ± 0.18	10.25 ± 3.59	5.93 ± 0.85	13.65 ± 1.47	11.83 ± 0.67
	C	9.58 ± 1.37	12.70 ± 0.07	10.20 ± 0.07	7.58 ± 2.33	11.62 ± 6.11	14.60 ± 1.46	9.92 ± 2.30
RBC (106/mm ³)	A	10.57 ± 0.90	9.89 ± 0.52	10.44 ± 0.64	10.76 ± 0.01	10.41 ± 0.83	10.87 ± 0.68	10.20 ± 0.62
	B	10.66 ± 0.87	10.33 ± 0.57	9.51 ± 2.26	11.17 ± 0.22	10.45 ± 0.63	11.47 ± 0.61	10.51 ± 0.23
	C	10.55 ± 0.46	10.51 ± 0.62	10.79 ± 0.39	11.12 ± 0.79	10.62 ± 0.74	11.28 ± 0.63	9.89 ± 0.65
HB (g/dl)	A	13.83 ± 0.81	16.10 ± 2.57	13.20 ± 0.00	16.78 ± 0.47	16.08 ± 0.25	15.35 ± 0.48	15.10 ± 1.40
	B	13.58 ± 0.59	18.30 ± 0.00	13.20 ± 0.00	16.95 ± 0.24	15.65 ± 0.41	15.43 ± 0.77	15.70 ± 0.41
	C	13.42 ± 0.83	18.30 ± 0.00	13.20 ± 0.00	15.96 ± 1.11	15.72 ± 0.45	15.00 ± 0.59	14.66 ± 0.67
HT (%)	A	45.78 ± 1.96	42.95 ± 1.62	45.43 ± 0.88	44.33 ± 1.75	40.54 ± 0.08	40.80 ± 1.14	38.48 ± 3.51
	B	45.32 ± 1.91	44.14 ± 2.29	41.14 ± 9.35	45.00 ± 0.62	40.45 ± 1.52	40.78 ± 2.40	39.88 ± 1.21
	C	44.90 ± 2.44	44.62 ± 2.25	46.20 ± 2.01	44.06 ± 2.97	40.30 ± 1.72	40.38 ± 1.50	37.20 ± 1.70
PLT (103/mm ³)	A	310.00 ± 204.09	489.50 ± 136.82	588.50 ± 46.05	830.50 ± 129.76	823.50 ± 75.32	1356.25 ± 672.29	482.25 ± 308.41
	B	279.80 ± 202.83	593.40 ± 49.89	434.20 ± 173.85	847.00 ± 59.30	802.75 ± 78.27	1491.50 ± 467.90	174.00 ± 54.07
	C	246.00 ± 129.50	630.60 ± 127.82	526.00 ± 253.88	816.80 ± 217.17	687.60 ± 190.98	1199.20 ± 802.31	331.80 ± 205.89

A : Negative control

B : Administration of 1% *Panicum miliaceum* extract

C : Administration of 0.1% *Panicum miliaceum* extract

1) Mean ± S.D.

Table 12. The behavior tests in aged female ICR mice fed *Panicum miliaceum* extract

	Group (N=5)	Months							
		12	13	14	15	16	17	18	
Open field test	A	64.25 ± 19.67 ¹⁾	67.25 ± 16.32	64.50 ± 22.28	61.75 ± 11.62	53.00 ± 9.42	55.50 ± 18.38	54.75 ± 25.57	
	B	56.40 ± 5.27	50.20 ± 7.73	49.60 ± 9.56	54.00 ± 11.03	61.75 ± 7.80	53.75 ± 11.09	44.00 ± 12.19	
	C	64.00 ± 9.14	54.20 ± 9.81	57.20 ± 13.24	65.40 ± 22.12	61.60 ± 8.35	61.00 ± 15.36	58.80 ± 12.91	
Rotar rod test	The frequency of fall	A	2.25 ± 0.96	1.50 ± 1.29	1.00 ± 2.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.50 ± 1.00	0.50 ± 0.58
	B	1.00 ± 0.71	0.20 ± 0.45	0.20 ± 0.45	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
	C	1.60 ± 2.61	0.20 ± 0.45	0.60 ± 0.89	0.20 ± 0.45	0.60 ± 1.34	0.40 ± 0.55	0.00 ± 0.00	
Duration (sec)	A	177.00 ± 1.41	177.50 ± 2.08	178.00 ± 4.00	179.50 ± 1.00	180.00 ± 0.00	179.00 ± 2.00	179.00 ± 1.15	
	B	179.20 ± 0.45	179.60 ± 0.89	179.60 ± 0.89	179.50 ± 1.00	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	180.00 ± 0.00	
	C	177.80 ± 3.49	179.60 ± 0.89	178.80 ± 1.79	179.60 ± 0.89	178.80 ± 2.68	179.20 ± 1.10	178.80 ± 1.79	
Wheel test	A	32.50 ± 18.73	38.00 ± 25.85	36.75 ± 27.12	36.75 ± 33.63	39.75 ± 32.35	43.25 ± 33.88	48.25 ± 35.39	
	B	47.60 ± 3.21	51.80 ± 5.85	55.40 ± 6.80	57.75 ± 12.64	66.25 ± 8.38	65.50 ± 7.77	66.00 ± 14.21	
	C	41.20 ± 8.79	40.20 ± 7.66	46.00 ± 9.70	48.80 ± 15.88	49.20 ± 14.62	51.60 ± 9.10	64.60 ± 11.74	

A : Negative control

B : Administration of 1% *Panicum miliaceum* extract

C : Administration of 0.1% *Panicum miliaceum* extract

1) Mean ± S.D.

5. 노령화된 ICR 마우스(16개월)에서 현삼 및 현삼정제물의 노화 억제 효능 검증

1) 체중의 변화

노화억제소재의 투여시 노화마우스의 체중을 보면 대조군이 (A군) 38.1 ± 5.4 g, 100배 희석한 현삼추출물 투여군이 (B군) 37.6 ± 5.7 g, 100배 희석한 현삼정제물 투여군이 (C군) 37.4 ± 3.3 g였으나, 6개월간 투여 후에는 B군이 41.2 ± 7.4 g, C군이 35.3 ± 3.3 로 대조군과 비교할 때 통계적인 유의함은 없었다(Table 13).

2) 총 운동량의 변화

생후 16개월된 ICR 마우스에서 1 시간 동안의 총운동량은 816 ± 341 에서 생후 22개월에서는 총운동량이 439 ± 308 로 연령이 증가함에 따라 운동량이 현저하게 감소하였다(46.2% 감소). 100배 희석한 현삼추출물을 투여한 군에서는 총운동량이 749 ± 354 에서 생후 22개월에서는 총운동량이 924 ± 344 로 연령이 증가함에도 불구하고 운동량이 실험시작시 보다 23.1%가 증가하였다. 100배 희석한 현삼정제물을 투여한 군에서는 투여후 5개월부터 대조군에 비해 총운동량이 유의차 있게 증가하여 22개월에는 849 ± 291 을 나타냄으로서 12.9 %의 총운동량 증가를 보였다 (Table 14).

3) 간에서 Total SOD (Superoxide Dismutase) 활성의 변화

생후 16개월된 ICR 마우스에 현삼추출물 및 현삼정제물을 각각 100배씩 희석하여 6개월간 투여한 후에 간에서 SOD의 활성을 측정한 결과 조직 g당 활성이 대조군에서는 $1,118 \pm 110.7$, 현삼추출물 투여군에서는 $1,099 \pm 120.7$, 현삼정제물 투여군에서는 $1,253 \pm 38.1$ 로 대조군에 비해 현삼추출물 투여군은 감소를, 현삼정제물 투여군은 유의차 있게 활성이 증가하였다(Table 15). 한편, 단백질 mg 당 SOD 활성도 유사한 경향을 보여 대조군에서는 9.2 ± 0.3 , 현삼추출물 투여군에서는 8.5 ± 2.8 , 현삼정제물 투여군에서는 12.0 ± 0.8 로 대조군에 비해 현삼추출물 투여군은 감소를, 현삼정제물 투여군은 유의차 있게 활성이 증가하였다(Table 15).

4) 안정성 검사 및 장기무게의 변화

생후 16개월된 ICR 마우스에 현삼추출물 및 현삼정제물을 각각 100배씩 희석하여 6개월간 투여한 후에 심장, 간, 폐, 신장, 비장, 부신 및 뇌를 일반

부검을 통해 얻어 육안검사를 실시하였으나 이상을 보인 장기는 발견되지 않았다. 또한 대조군과 투여군 사이에 체중비 장기무게는 통계적인 유의차 나타나지 않아 안정성 검사의 소견을 뒷받침하였다 (Table 16).

Table 13. The changes of body weight in the ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* for 6 months

Group	Months							
	(N=10)	16	17	18	19	20	21	22
A		38.1±5.4 ¹⁾	35.5±6.5	34.6±6.0	35.9±6.2	36.0±8.6	28.9±2.2	31.0±4.7
B		37.6±5.7	37.3±5.6	37.0±6.3	37.1±6.2	40.4±6.4	41.2±7.4*	41.5±7.4
C		37.4±3.3	35.7±4.0	35.7±3.5	36.8±3.9	37.1±3.5	35.3±3.3*	35.8±3.5

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of gel filtration solution of *Scrophularia buergeriana* (1:100 diluted with water)

¹⁾ : Mean±S.D.

* : Significantly different at the P <0.05 level compared with control by student's t-test

Table 14. The changes of total activity in the ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* for 6 months

Group	Months							
	(N=10)	16	17	18	19	20	21	22
A		816 ± 341 ¹⁾	636 ± 298	604 ± 294	520 ± 300	571 ± 365	200 ± 61	439 ± 308
B		749 ± 354	607 ± 279	694 ± 456	682 ± 525	883 ± 405	809 ± 429	924 ± 344
C		752 ± 185	796 ± 262	849 ± 198	810 ± 351	1039 ± 419	908 ± 529*	849 ± 291*

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of gel filtration solution of *Scrophularia buergeriana* (1:100 diluted with water)

¹⁾ : Mean ± S.D.

* : Significantly different at the P < 0.01 level compared with control by student's t-test

Table 15. The total SOD activity in the liver of ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* for 6 months

Group (N=2)	Units/g wet weight of tissue	Unit/mg of total protein
A	1,118 ± 110.7 ¹⁾	9.2 ± 0.3
B	1,099 ± 120.7	8.5 ± 2.8
C	1,253 ± 38.1 [*]	12.0 ± 0.8 [*]

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of gel filtration solution of *Scrophularia buergeriana* (1:100 diluted with water)

¹⁾ : Mean ± S.D.

^{*} : Significantly different at the P < 0.01 level compared with control by student's t-test

Table 16. The changes of organ weight in the ICR mice fed *Scrophularia buergeriana* for 6 months

Group (N=2)	Organ	Organ weight/animal weight x 100 ratio
A	Heart(g)	0.9±0.1
	Liver(g)	6.1±0.5
	Spleen(g)	1.0±0.0
	Lung (g)	0.9±0.2
	kidney	
	Left (g)	1.0±0.3
	Right(g)	0.9±0.1
B	Heart(g)	1.0±0.3
	Liver(g)	4.8±0.2
	Spleen(g)	0.4±0.0
	Lung (g)	1.0±0.2
	kidney	
	Left (g)	1.1±0.1
	Right(g)	1.1±0.1
C	Heart(g)	0.7±0.1
	Liver(g)	4.6±0.2
	Spleen(g)	0.3±0.1
	Lung (g)	0.8±0.1
	kidney	
	Left (g)	0.8±0.3
	Right(g)	0.8±0.2

A : Negative control

B : Administration of *Scrophularia buergeriana* extract (1:100 diluted with water)

C : Administration of gel filtration solution of *Scrophularia buergeriana* (1:100 diluted with water)

1) : Mean ± S. D.

제 4 절 결 론

생약자원 및 국산농수산 자원으로부터 노화 예방 및 노화억제효과를 갖는 기능성 식품소재를 개발한 다음, 선택된 소재의 효능을 검증하는 동물실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ICR 마우스에서 생후 2개월부터 생후 13개월까지 체중을 측정한 결과 수컷은 생후 7개월이 41.22 ± 3.67 g으로 가장 높았고 이후 연령이 증가함에 따라 조금씩 감소하여 생후 13개월에는 38.31 ± 2.89 g 이었다. 암컷은 연령이 증가함에 따라 체중이 점차적으로 늘어나 생후 13개월에는 35.40 ± 5.85 g 이었다. 암수의 체중 증가를 비교하면 수컷은 생후 7개월에 최고의 체중을 보이는 반면 암컷은 연령이 증가함에 따라 계속 증가하는 경향을 보였다.
2. ICR 마우스에서 생후 2개월부터 생후 13개월까지 혈당을 측정한 결과 수컷은 생후 2개월에 128.00 ± 19.53 mg/dl에서 생후 13개월에는 137.80 ± 13.14 mg/dl 이었으며, 암컷은 생후 2개월에 127.00 ± 20.00 mg/dl에서 생후 13개월에는 143.90 ± 12.74 mg/dl로 암수 동일하게 연령이 증가함에 따라 혈당이 상승하는 경향을 보였으며, 암수를 비교할 때는 수컷보다 암컷이 조금 높은 경향을 보였다.
3. ICR 마우스에서 생후 2개월부터 생후 13개월까지 총콜레스테롤을 측정한 결과 수컷은 생후 2개월에 109.60 ± 83.75 mg/dl에서 생후 13개월에는 83.40 ± 12.16 mg/dl로 조금 감소하는 경향을 보였으며, 암컷에서도 생후 2개월에 80.52 ± 13.69 mg/dl에서 생후 13개월에는 66.50 ± 11.94 mg/dl로 감소하는 경향을 보였다. 암수 비교할 때는 암컷이 수컷 보다 낮은 경향을 보였다. 동일한 요령으로 중성 지방을 측정한 결과, 암수 같이 연령이 증가함에 따라 중성지방이 조금씩 감소하는 경향을 보였고, 암수를 비교하면 암컷이 조금 낮은 경향을 보였다.
4. 12개월령의 ICR 마우스에 현삼추출물을 100배, 1000배 희석하여 6개월 간 투여한 결과 체중, 혈당, 총콜레스테롤, 중성지방, WBC, RBC, HB, HT, PLT 수치는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 행동학적 분석에서는 rotor rod test, wheel test에서 대조군과 비교하여 변화가 없었으나, open field

test에서 현삼추출물 투여 1개월부터 대조군에 비해 유의하게 행동량이 증가하였다.

5. 12개월령의 ICR 마우스에 익모초추출물을 100배, 1000배 희석하여 6개월 간 투여한 결과 체중, 혈당, 총콜레스테롤, 중성지방, WBC, RBC, HB, HT, PLT, rotor rod test, open field test 결과는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. Wheel test에서 대조군과 비교하여 변화가 없었으나, open field test에서 익모초추출물 투여 2개월부터 4개월까지 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나 이후 통계적인 유의차가 없어져 일시적인 것으로 사료되었다.

6. 12개월령의 ICR 마우스에 기장추출물을 사료에 1%, 0.1% 섞어서 6개월 간 투여한 결과 체중, 혈당, 총콜레스테롤, 중성지방, WBC, RBC, HB, HT, PLT, rotor rod test, wheel test, open field test 결과는 대조군과 별다른 변화를 보이지 않았다.

7. 16개월령의 노화 ICR 마우스에 100배 희석한 현삼추출물과 100배 희석한 현삼정제물을 6개월 간 투여한 결과, 현삼정제물을 투여한 군에서 투여 5개월부터 총활동량이 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 또한 현삼정제물을 6개월 간 투여한 군에서 superoxide dismutase 활성이 대조군에 비해 유의차 있게 증가를 보였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 노화된 실험동물에 현삼정제물을 장기간 투여하면 노화의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 항산화효소의 활성을 증가시켜 노화를 방지할 수 있으며, 이러한 결과가 총활동량의 증가 나타나는 것으로 사료된다.

제 5 절 참 고 문 헌

Adelman, R., Saul, R. L., and Ames, B. N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rates and life span. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2706-2708, 1988

Chance B, Sies, H and Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Phys Rev* 59, 527-605

Comfort A (1979) The biology of senescence. pp.261-298 Elsevier, New York

Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L.-J., and Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4337-4341, 1995

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. Telomere shorting associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11:1921-1929, 1992

Fattman CL, Enghild JJ, Crapo JD, Schaefer LM, Valnickova Z & Oury TD, Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275:542-548, 2000.

Flood J. et al. (1993) Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in SAM. *Neurobiology of aging.* 14:153-157

Fry, D. G., Hurlin, P. J., Maher, V. M., and McCormick, J. J. Transformation of diploid human fibroblasts by transfection with V-SIS, PDGF2/C-SIS or T24H-ras gene. *Mutat. Res.* 199:341-351, 1988

Goldstein, S. Aging in vitro: Growth of cultured cells from the Galapagos Tortoise. *Exp. Cell Res.* 83:297-302, 1976

Harman D (1956) Aging : A theory based on free radical and radical chemistry. *J. Gerontology* 11, 298-300

Harman D (1981) The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7124-7128

Harman, D. Aging:a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11:298-300, 1956

Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37:614-636, 1965

Hayflick, L. The cellular basis for biological aging, p159-186. In Hayflicks, L. and Finch, C. E. (ed.), *Handbook of biological aging.* Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1977

Hensler, P. J., Annab, L. A., Barrett, J. C., and Pereira-Smith, O. M. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2291-2300, 1994

Higuchi K. et al. (1992) Development and age-related changes in apolipoprotein B mRNA editing in mice. *Journal of lipid research.* 33:300-311

Hofland, H. E., Shephard, L., and Sullivan, S. M. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 : 7305-7309, 1996

Jazwinski, M. S. Longevity, genes, and aging. *Science* 273: 54-59, 1996

Johnstone, A., and Thorpe, R. *Immunochemistry in Practice*, Chapter 12 Immunocytochemistry, Blackwell Scientific Publications, 1982

Kadonaga, J. T. *Methods in Enzymology* 208: 10-23, 1991

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 : 2011-2015, 1994

Kitagawa K. et al. (1994) Age-associated decreases in the messenger ribonucleic acid level and the rates of synthesis of apolipoprotein A-II in murine senile amyloidosis. *Laboratory Investigation*. 70(4):565-571

Kumazaki, T., Robetorye, S. S., and Smith, J. R. *Exp. Cell Res.* Fibronectin expression increase during in vitro cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 195: 13-21, 1991

Kurozumi M. et al. (1994) Age-related changes in lung structure and function in the SAM. *Am. J. Crit. Care Med.* 149:776-782

Lee, P. J, Washer, L. L., Law, D. J., Boland, C. R., Horon, I.L, and Feinberg, A. P. Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 10366-10370, 1996.

Macieira-Coelho, A. Implications of the recognition of the cell genome for aging or immortalization of dividing cells in vitro. *Gerontolog* 26:276-285, 1980

McAllister, J. M., and Hornsby, P. J. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23: 677-682, 1987

Meek, R. L., Bowman, P. D., and Daniel, C. W. Establishment of mouse embryo cells in vitro: relationship of DNA synthesis, senescence and malignant transformation. *Exp. Cell Res.* 107:277-284, 1977

Millis, A. J., Hoyle, M., McCue, H. M., and Martini, H. *Exp. Cell Res.* 201: 379-385, 1992

Ning, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5635-5639, 1991

Ogata et al. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6306-6312, 1993

Rheinwald, J. G., and Green, M. *Cell* 6:331-340, 1975

Rohme, D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocyts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5009-5013, 1981

Saitoh Y. et al. (1994) Age-related hearing inpairment in SAM. *Hearing Research.* 75:27-37

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning a laboratory manual* 2 nd edition, ed by Chris Nolan, Cod Spring Harbor Laboratory Press 1989

Sohal, R. S., and Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59-63, 1996

Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M., and Smith J. R. Senescent cell fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11012-11016, 1991

Stein, G. H., and Dullic, V. *BioEssays* 17: 537--541, 1995

Sugimura Y. et al. (1994) Age-related changes of the prostate gland in the SAM. *The Prostate.* 24:24-32

Takeda T. et al. (1981) A new murine model of accelerated senescence.

Mechanism of ageing and deveolpment. 17:183-194

Tassin, J., Malaise, E., Courtois, Y. *Exp. Cell Res.* 123: 388-396, 1979

Thweatt, R., Murano, S., Fleischmann, R. D., and Goldstein, S. *Experimental Gerontol*, 27:433-438, 1992

Totter JR (1980) Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1763-1767

West, M. D., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a regulation and dverexpression of collagenase activity. *Exp. Cell Res.* 184: 138-147, 1989

Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., and Shay, J. W. Reversible cellular senescence: Implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 9:3088-3092, 1989

Wright, W. E., and Shay, J. W. Telomere positional effect and the regulation of cellular senescence. *Trends in Genetics* 8:193-197, 1992

Zhang, W., Grasso, L., McClain, C. D., Gambel, A. M., Cha, Y., Travali, S., Deisseroth, A. B., and Mercer, W. E. p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer res.* 55: 668-674, 1995

제 3 장. 노화억제 식품소재의 탐색 및 제품개발

제1절 서론

최근 수명이 연장됨에 따라 노인인구의 비율이 증가하고, 이에 따라 각종 퇴행성질환의 발병이 지속적으로 증가하고 있으므로 이에 근본적으로 대처하기 위해서 노화현상의 억제에 대한 관심이 높아지고 있다. 노화를 촉진시키는 원인의 하나로 슈퍼옥사이드, 과산화수소, 수산화기 및 일중항산소와 같은 활성산소종들의 대사산물로 생성된 자유기(free radical)들이 생체 내에서 단백질, 생체막, DNA 등에 작용하여 산화적 손상을 입힘으로써 노화가 발생하고 각종 노인성질환이 유발되는 것으로 알려져 있으므로 이들 작용을 억제시키기 위해서 항산화 성분에 대해 많은 연구가 이루어졌고 항산화작용을 갖는 새로운 소재를 탐색하기 위한 연구가 국내외에서 활발하게 이루어지고 있다. 그러나, 항산화작용을 갖는 소재들이 노화를 억제하거나 노화에 의해 유발되는 성인병을 예방하는 작용을 하기 위해서는 세포수준 및 실험동물 수준의 검증연구가 뒤따라야하므로 세포의 노화와 직접 관련 있는 탐색방법이 확립되고 이를 바탕으로 노화억제능력의 평가가 이루어 질 수 있다면 이상적인 방법이 될 수 있을 것이다. 최근의 노화의 기작 연구에서의 발전으로 이러한 새로운 노화억제효과 검증법의 개발이 가능하다고 판단된다. 특히 노화현상이 산화에 의해서만 이루어지는 것이 아니고 수많은 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있기 때문에 새로운 차원의 노화억제능력을 함유한 소재를 발굴하기 위해서는 세포수준의 직접적인 탐색방법과 탐색된 소재의 실험동물에서 *in vivo* 평가방법의 확립이 절실히 필요하다.

인간을 포함한 정상적인 동물의 조직으로부터 채취한 세포는 세포배양에서 계속 자라지 못하고 제한된 수의 분열을 반복한 후 정지하며 노화된 동물의 세포의 모습을 그대로 보여준다(Hayflick 1965, 1977). 동물 세포는 채취한 동물에 따라 그 분열 할 수 있는 수가 다르며, 그 분열 수는 동물의 최대 수

명과 비례한다고 알려졌으며(Rohme 1981), 이 사실은 동물의 수명이나 노화가 세포수준에서 결정된다는 사실을 의미한다.

세포 노화에 대한 연구로는 현재까지 fibroblast가 주로 사용되어왔으며, 노화에 따른 세포의 형태, 유전자의 발현의 변화가 조사되었다. Fibroblast 이외의 세포에 대해서도 유사한 결과가 보고되어 세포 노화의 현상이 모든 세포에서 일어나는 일반적인 것으로 받아들여지고 있다(Rheinwald et al 1975, Tassin et al 1979, Thompson et al 1983, McAllister et al 1987, Medrano et al 1994).

노화의 가장 좋은 검색 표지인자로는 (1)세포분열능력, 세포노화 시 발현이 증진되는 (2)acidic β -galactosidase, (3)p21과 (4)p16; 발현이 감소되는 (5)c-fos, (6)hsp70, (7)현미경적 세포형태 등이며, 이들은 세포가 노화를 했는지를 정확히 표시해주기 때문에 여러 농산물 추출액에 대한 노화억제효과를 검색할 수 있을 것이다. 현재까지 이 방법을 사용한 농산물의 검색이 시도되지 않았기 때문에 새로운 노화억제소재의 선별이 되면 실험동물에서 노화억제 효과의 검정을 통하여 새로운 노화억제 기능성식품으로의 개발 가능성이 매우 높다.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 재료는 국내외에서 보고된 전문학술지, 연구보고서 및 신간서적으로부터 향산화식품소재, 기능성식품소재, 질병예방식품소재 및 노화억제소재로서 활용가능 할 것으로 판단되는 채소류 45종, 두류 및 곡류 18종, 과일 및 서류 22종, 해조류 3종 등 총 89종의 시료를 선정하였다. 선정된 시료는 대부분 농약 등을 적게 사용한 유기농 재배방식에 의하여 생산된 것을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

가. 식품소재 시료의 추출, 농축 및 건조처리

건조시료는 분쇄기를 이용하여 분말상태로 만들었으며 각각의 분말시료에 70% 에탄올을 시료 중량의 10배가 되도록 첨가하였다. 생시료의 경우 수분함량을 고려하여 최종 알콜 농도가 70%가 되도록 95% 알콜 주정을 첨가한 후 mixer를 이용하여 갈아주었다. 이들 현탁액을 50℃ 수욕조상에서 1시간 추출하고 거즈를 이용하여 건더기를 압착한 후 상등액은 3000rpm에서 10min 동안 원심분리하였다. 원심분리 된 상등액을 rotary evaporator를 사용하여 감압농축하고 이를 동결건조하여 실험용 시료로 사용하였다.

나. 세포배양을 통한 노화억제소재의 검색

1) embryonic fibroblast 세포주의 세포배양

세포배양을 통한 노화억제 소재의 검색에는 Human embryonic fibroblast 세포주(제1세부과제에서 확립한 세포주)를 사용하였다. Culture dish에 세포를 배양하면서 confluent해지면 trypsin -EDTA를 사용하여 1:4의 희석률(2의 분열수에 해당)로 계대배양하였다. 연속적으로 수를 늘리면서 다량으로 계대배양하여 세포분열수가 20번이 될 때(아직 노화의 특성을 보여주지 않은 상태) 10% DMSO를 첨가하여 각 디쉬당 1 바이알로 freezer stock을 만들어 액체 질소에 보관하였다. Fibroblast의 배양은 10% fetal bovine serum - DMEM (penicillin-streptomycin 포함)을 배지로 사용하고 37℃, 5~8% CO₂ 조건에서 매 3일 간격으로 배지를 교체하며 배양하였다.

2) 추출물에 대한 세포분열 능력의 측정

세포분열능력 측정을 위하여, 액체질소에 보관한 한 바이알(분열수 20번에서 보관)을 꺼내어 100 mm dish에 넣고 배양한 후 가득(confluent) 자라면 4개의 100mm dish에 split하고, 이때 추출물을 여러 농도로(사용 배지의 고품분 함량의 0.01%, 0.1%) 배지에 가한 후 연속적으로 배양하여 최대로 얻을 수 있는 분열 수를 측정한다. 대조구로는 동결건조 분말을 녹이는데 사용한 용매(DMSO)를 같은 양으로 가하여 비교한다.

3) Acidic β -galactosidase 발현의 분석

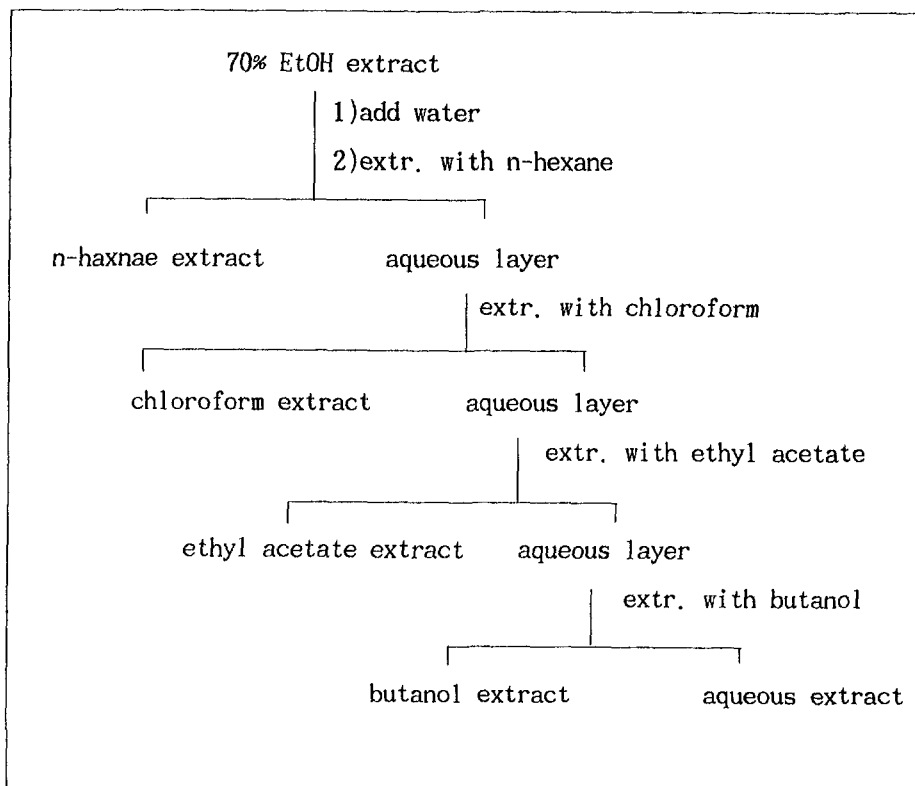
Acid β -galactosidase는 노화하는 세포에서만 발현이 되는 단백질로 잘 알려져 있으며, 디쉬에 붙어서 자라는 fibroblast를 간단히 염색함으로써 쉽게 노화의 정도를 알 수 있다. β -galactosidase는 특히 세포배양뿐 아니라, *in vivo*의 피부에서도 노화하는 세포에만 파란 색을 띠도록 염색시키는 것으로 밝혀졌다. 세포배양은 세포분열 능력을 측정할 때와 같은 방법으로 하였다. 세포의 분열수가 56~60회에 이르렀을 때 culture dish의 세포를 PBS(phosphate Buffered Saline)으로 2회 세척하고 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde in PBS로 고정시킨다. PBS로 2번 세척하고, 37°C에서 senescence-associated β -gal(SA- β -gal)염색액(1mg의 X-gal, 40mM citric acid/sodium phosphate(pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂)으로 12~16시간동안 발색시켰다. 염색된 세포의 수를 세어 노화의 정도를 계산하였다.

4) 추출물의 In vitro 항산화능력 평가

DPPH-radical 소거능력의 평가를 측정하기 위해 DMSO에 녹인 식품추출물에 0.5mM DPPH ethanol 용액과 99% ethanol을 첨가하였다. 상온에서 한시간 방치한 후에 UV-spectrophotometer를 사용하여 517nm 흡광도를 측정하였다. 또한 BuOOH, methHb과 식품추출물의 혼합물이 *Staphylococcus aureus* 209P 생존율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 *Staphylococcus aureus*를 BHI배지에서 배양 후 균체를 모아 PBS로 세척한다. 균을 1×10⁷ cfu/ml로 조절하여 BuOOH, Met Hb, 식품추출물의 혼합물을 첨가하고 30분간 반응을 시킨 후 2× mannit phenol red broth를 넣어 반응을 중지시킨다. 96 well microplate에 1× mannit phenol red broth와 반응 혼합액을 넣어 37°C에서 24시간 배양한다. 이를 microplate reader를 이용하여 570nm - 655nm의 흡광도를 측정한다.

다. 극성에 따른 용매별 분획화

감자의 70% ethanol 추출물의 동결건조 sample(1g)에 증류수 20ml를 가하여 현탁시킨 후 n-hexane(20ml)을 가하고 분획 깔때기로 n-hexane층과 수층으로 분획하는 조작을 2회 실시하여 n-hexane층을 분리하였다. 분리된 n-hexane층에 질소 증진을 하여 용매를 제거하고 동결건조하여 n-hexane extract를 얻었다. 계속해서 수층을 상기와 같은 방법으로 chloroform(CH_2Cl_2), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH) 순으로 추출하여 각각의 extract를 얻고 남은 수층을 동결건조하여 water extract를 얻었다. 이들 분획의 동결건조 분말은 실험에 사용할 때까지 -70°C 에서 냉동 보관하였다.



라. 감자 추출물의 가공 특성에 따른 노화억제 능력 평가

70% EtOH 감자 추출 동결건조물 1g을 1ml의 증류수에 녹인 후 각각 50°C 에서 10분, 30분, 100°C 에서 10분 30분간 중탕 가열하였다. 이를 speed vac을

사용하여 건조시켜 감자 추출물의 열처리 sample로 사용하였다. 이들 sample의 노화억제 능력을 평가하기 위하여 세포분열 능력 및 β -galactosidase 발현을 분석하였다.

마. 현삼 및 감자추출물을 이용한 가공품 제조

1) 감자, 현삼 음료의 제조

감자의 경우 에탄올 추출물 용액 자체의 색과 향이 양호하여 음료로 이용이 가능할 것으로 생각되었다. 그러나 생감자의 향이 개인의 취향에 따라 불쾌할 수도 있으며 맛은 큰 특색이 없어 구연산과 설탕을 이용하여 약간의 가미를 하였다.

현삼의 경우 에탄올 추출물 용액의 갈색이 진하고 한약 특유의 맛이 있어 설탕을 제외한 다른 첨가물을 가미하지 않고 차, 커피와 유사한 음료 및 탕제의 형태로 가공하였다.

2) 감자 및 현삼의 젤리형 제품제조

감자의 경우 gelatin 1.8 g을 물 10 ml에 넣어 5분간 불린 후 감자 추출물 용액을 40ml 최종 농도 5%가 되도록 조절하여 가하고 설탕과 구연산의 양을 달리하여 첨가하여 100℃에서 2분간 가열, 살균한 후 냉각하여 감자 젤리를 제조하였다.

현삼의 경우 감자와 같은 방법으로 젤리를 제조하였으나 구연산을 첨가하지 않았으며 쓴맛을 고려하여 설탕의 양을 좀 더 많이 첨가하였다.

3) 시제품의 관능적 특성평가

식품가공 전문가들의 토론키 평가결과를 요약, 기술하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 식품소재 시료의 추출, 농축 및 건조처리

70% 주정용액을 사용하여 50℃에서 추출한 후 동결건조하여 건조시료에 대한 수율을 표시한 결과는 표 1과 같다. 채소류의 경우 건물기준으로 냉동건조 추출물의 수율이 1.1~7.4%의 범위를 나타내고 이들 중 마늘, 무청, 시금치, 파 등이 6%이상의 높은 수율을 나타냈다. 두류 및 곡류 중에서는 검정콩, 땅콩, 대두, 팥 및 차수수가 6%이상의 수율을 보여주었으며 과일류는 대부분 7% 이상의 높은 수율을 보여주었는데 이는 높은 당 함량 때문으로 판단된다.

표1. 노화억제용 식품소재의 선정 및 추출물의 냉동건조 수율

(1) 채소류

시료명	냉동건조수율(%)
가지	2.87
갓	2.62
근대	3.80
냉이	3.46
녹색 양배추	4.06
늪은호박	2.37
달래	2.10
당근	6.65
돌나물	1.77
들깨잎	2.61
마늘	6.60
무(뿌리)	6.35
무청(잎)	1.75
미나리	2.43
배추	4.99
벌크생취	2.22
부추	4.01
상치	2.20
샐러리	1.82
생강	1.15
시금치	6.59
신선초	2.97
쑥	3.07
쑥갓	2.84
아욱	2.04
애호박	4.95
양파	5.14

시료명	냉동건조수율(%)
오이	2.92
원추리	4.10
참나물	2.76
청경채	1.81
치커리(잎)	1.85
케일	4.90
콜리플라워	4.98
콩나물	1.97
토마토	3.26
파	7.41
파슬리	3.00
풋고추	5.03
피망	3.11

(2) 두류 및 곡류

시료명	냉동건조수율(%)
검정콩	13.30
대두	6.49
땅콩	9.17
완두콩	4.69
은행	3.19
팥	6.93
귀리	1.54
기장	2.08
밀	2.87
울무	2.99
차수수	6.33
찰수수쌀	2.02

(3) 과일 및 서류

시료명	냉동건조수율(%)
감	10.62
감귤	8.88
딸기	7.63
레몬	7.13
바나나	13.48
배	10.89
사과	9.87
수박	7.50
오렌지	8.48
자몽	7.05
참외	5.80
키위	10.05
포도 과육	11.57
호두	20.15
감자	1.91
자색 고구마	5.57

(4) 해조류

시료명	냉동건조수율(%)
파래	3.93
톳	4.76

2. 식품시료 추출물을 이용한 in vitro 노화억제능 검색

가. 식품시료 추출물을 이용한 HDF세포의 분열능력

84종의 식품소재 추출물을 사용배지(DMEM)의 고형분 함량에 대하여 0.1%, 0.01% 농도로 첨가하여 인간의 섬유아세포를 배양한 결과를 표 1에 나타내었다. 식품소재 추출물을 첨가하지 않고 DMEM 배지만을 사용한 control 구에서는 최대 분열수가 62회 정도이고 대부분의 식품 추출물의 첨가가 분열수를 증가시키고 있으며, 시료 중에서는 무화과 0.1%, 배 0.01%, 자두 0.01%, 감자 0.1%, 고구마 0.1%, 완두콩 0.1%, 기장 0.1%와 0.01%, 대두 0.1%, 적두 0.1%, 흑미 0.1%, 홍합 0.1%, 호도 0.1% 첨가구에서 최대 분열수가 68회에 달하여 우수한 것으로 나타났다. 이들 중 특히 기장의 경우 0.1%와 0.01%에서 모두 68회까지 분열하여 이를 1차적으로 우수한 시료로 선정하였으며 채소류 중에서는 달래, 두릅, 쑥갓, 신선초, 치커리가 세포 분열수를 증가시키는 것으로 나타났다. 0.01%에서 68회까지 분열한 시료들은 실험의 정확성을 기하기 위하여 재 실험을 실시하였다.

표 2. 식품소재 추출물이 섬유아세포의 분열수에 미치는 영향

식품소재	분열수 (Control의 분열수)	식품소재	분열수 (Control의 분열수)
마늘 0.01 %	62(62)	미나리 0.01 %	66(60)
마늘 0.1 %	62(62)	미나리 0.1 %	62(60)
당근 0.01	60(62)	애호박 0.01	64(60)
당근 0.1	60(62)	애호박 0.1	66(60)
시금치 0.01	-	풋고추 0.01	58(60)
시금치 0.1	60(62)	풋고추 0.1	64(60)
토마토 0.01	60(62)	피망 0.01	-
토마토 0.1	60(62)	피망 0.1	64(60)
깻잎 0.01	58(62)	생강 0.01	56(60)
깻잎 0.1	56(62)	생강 0.1	56(60)
샐러리 0.01	60(62)	도라지 0.01	64(60)
샐러리 0.1	-	도라지 0.1	66(60)
콜리플라워 0.01	60(62)	썩 0.01	-
콜리플라워 0.1	60(62)	썩 0.1	-
무청 0.01	58(62)	브로콜리 0.01	62(60)
무청 0.1	60(62)	브로콜리 0.1	64(60)
배추 0.01	62(62)	달래 0.01	68(60)
배추 0.1	60(62)	달래 0.1	62(60)
가지 0.01	-	돌나물 0.01	64(60)
가지 0.1	-	돌나물 0.1	62(60)
갓 0.01	64(62)	두릅 0.01	68(60)
갓 0.1	60(62)	두릅 0.1	62(60)
근대 0.01	62(62)	파슬리 0.01	62(60)
근대 0.1	64(62)	파슬리 0.1	64(60)
냉이 0.01	62(62)	상추 0.01	62(62)
냉이 0.1	-	상추 0.1	70(62)
콩나물 0.01	-	썩갓 0.01	70(62)
콩나물 0.1	-	썩갓 0.1	68(62)
대파 0.01	64(60)	원추리 0.01	70(62)
대파 0.1	64(60)	원추리 0.1	70(62)

continue

식품소재	분열수 (Control의 분열수)	식품소재	분열수 (Control의 분열수)
청경채 0.01 %	70(62)	참외 0.01 %	68(68)
청경채 0.1 %	70(62)	참외 0.1 %	68(68)
치커리 0.01	70(62)	수박 0.01	68(68)
치커리 0.1	70(62)	수박 0.1	68(68)
부추 0.01	70(62)	감 0.01	68(68)
부추 0.1	70(62)	감 0.1	68(68)
참나물 0.01	70(62)	키위 0.01	68(68)
참나물 0.1	70(62)	키위 0.1	68(68)
신선초 0.01	70(62)	포도과피 0.01	68(68)
신선초 0.1	70(62)	포도과피 0.1	64(68)
케일 0.01	70(62)	포도과육 0.01	68(68)
케일 0.1	70(62)	포도과육0.1	68(68)
무 0.01	60(62)	포도씨 0.01	66(68)
무 0.1	66(62)	포도씨 0.1	58(68)
오이 0.01	54(62)	딸기 0.01	68(68)
오이 0.1	66(62)	딸기 0.1	68(68)
벌크생취 0.01	54(62)	레몬 0.01	64(68)
벌크생취 0.1	68(62)	레몬 0.1	64(68)
아욱 0.01	58(62)	바나나 0.01	64(68)
아욱 0.1	70(62)	바나나 0.1	68(68)
늪은호박 0.01	70(62)	무화과 0.01	66(62)
늪은호박 0.1	70(62)	무화과 0.1	68(62)
사과 0.01	68(68)	배 0.01	68(62)
사과 0.1	68(68)	배 0.1	66(62)
자몽 0.01	68(68)	복숭아 0.01	66(62)
자몽 0.1	68(68)	복숭아 0.1	66(62)
대추 0.01	68(68)	살구 0.01	62(62)
대추 0.1	68(68)	살구 0.1	66(62)
감귤 0.01	68(68)	오렌지 0.01	66(62)
감귤 0.1	64(68)	오렌지 0.1	66(62)

continue

식품소재	분열수 (Control의 분열수)	식품소재	분열수 (Control의 분열수)
자두 0.01 %	68(62)	적두 0.01 %	66(62)
자두 0.1 %	64(62)	적두 0.1 %	68(62)
감자 0.01	66(62)	은행 0.01	66(62)
감자 0.1	68(62)	은행 0.1	66(62)
고구마 0.01	66(62)	현미 0.01	66(62)
고구마 0.1	68(62)	현미 0.1	66(62)
완두콩 0.01	64(62)	흑미 0.01	66(62)
완두콩 0.1	68(62)	흑미 0.1	68(62)
기장 0.01	68(62)	보리 0.01	66(62)
기장 0.1	68(62)	보리 0.1	66(62)
흑향미 0.01	66(62)	밀 0.01	62(62)
흑향미 0.1	66(62)	밀 0.1	66(62)
차수수 0.01	66(62)	울무 0.01	66(62)
차수수 0.1	66(62)	울무 0.1	66(62)
찰수수쌀 0.01	66(62)	파래 0.01	66(62)
찰수수쌀 0.1	66(62)	파래 0.1	64(62)
치커리뿌리 0.01	64(62)	룻 0.01	64(62)
치커리뿌리 0.1	66(62)	룻 0.1	64(62)
대두 0.01	66(62)	홍합 0.01	-
대두 0.1	68(62)	홍합 0.1	68(62)
검정콩 0.01	66(62)	호도 0.01	66(62)
검정콩 0.1	66(62)	호도 0.1	68(62)
땅콩 0.01	64(62)		
땅콩 0.1	-		

나. 노화억제 식품소재의 재 검색

동물실험에서 식품소재 중 선정된 기장의 노화억제 효과가 미흡함에 따라 새로운 노화억제 소재를 선별하기 위한 in vitro 실험이 다시 수행되었다. 그 동안 수행된 세포배양 실험에서 비교적 우수한 결과를 나타낸 16개 소재의 추출물을 인체의 섬유아세포 배양시 첨가하여 분열수의 증가 정도를 비교하여

표3 과 같은 결과를 얻었다. 한편 노화시 발현되는 β -galactosidase를 분열 수 30에서 염색하여 그 결과를 표3, Fig 1에 나타내었다. 분열수가 많았던 기장, 감자 추출물을 첨가한 세포는 염색된 세포의 수가 대조군에 비하여 상대적으로 적게 나타났다. 뿐만 아니라 같은 분열수의 세포에서 세포의 모양을 보면 타 세포는 노화세포의 전형적 모양인 넓게 퍼진 세포로 구성되어 있었으나 기장, 감자 추출물 첨가군은 젊은 세포와 같은 길쭉길쭉한 모양을 지니고 있었다.

표3. 식품소재 추출물이 섬유아세포의 분열수에 미치는 영향
및 β -gal 염색 비율

식품소재	분열수	β -gal 염색 비율(%)
Control	60	100
달래 0.1	58	100
달래 0.01	56	-
두릅 0.1	56	-
두릅 0.01	54	-
쑥갓 0.1	60	100
쑥갓 0.01	60	0.2
신선초 0.1	62	0.8
신선초 0.01	62	0.2
치커리 0.1	60	28
치커리 0.01	60	27
감자 0.1	64	0
감자 0.01	60	1
고구마 0.1	62	0
고구마 0.01	60	50
대두 0.1	56	-
대두 0.01	58	-
기장 0.1	60	0
기장 0.01	58	47
보리 0.1	60	2
보리 0.01	58	100
흑미 0.1	58	-
흑미 0.01	56	-
감 0.1	60	0.2
감 0.01	60	5
배 0.1	56	-
배 0.01	58	75
포도과육 0.01	58	-
포도과육 0.1	58	-
무화과 0.1	56	-
무화과 0.01	60	14
호두 0.1	58	-
호두 0.01	58	13
Vitamin C 0.1	60	1
Vitamin C 0.01	60	0.6

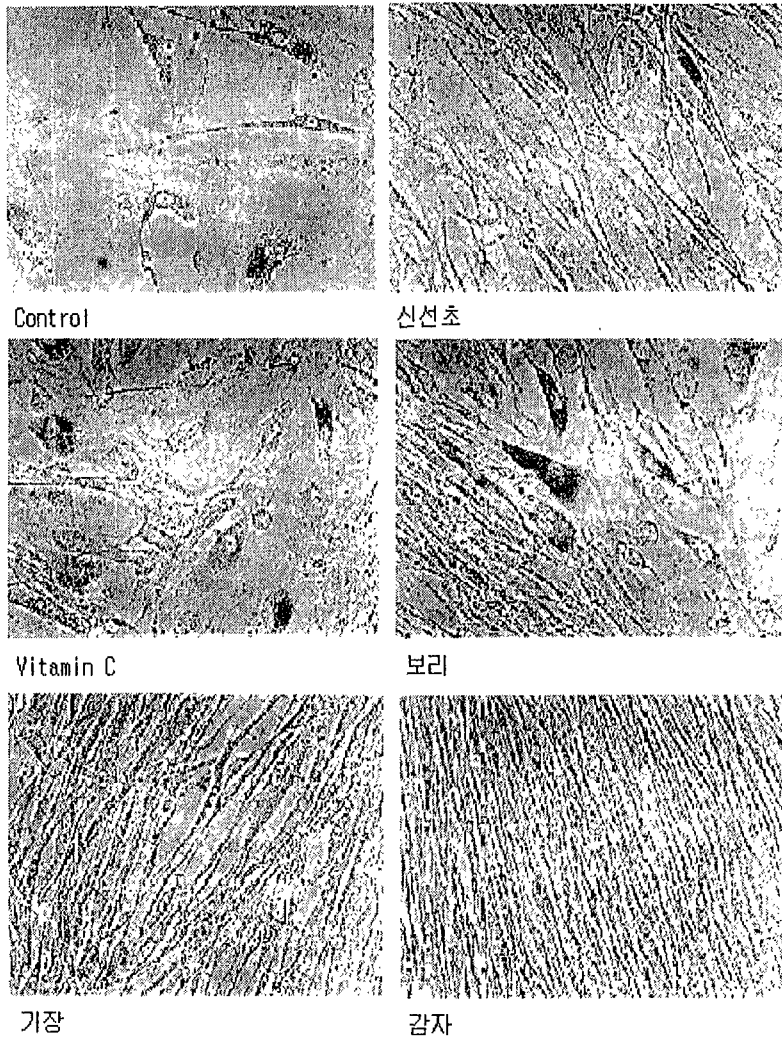


Fig. 1. 식품소재 추출물의 β -gal 염색

다. 선정된 노화억제 식품소재의 항산화성 조사

노화억제의 기작으로 항산화성이 주요한 역할을 하는 것으로 보고되기 때문에 DPPH법을 이용하여 free radical 소거능력을 측정하였다. 또한 t-BuOOH과 hemoglobin의 반응에 의해 생성된 t-BuOOH·에 의하여 *Staphylococcus aureus* 209P가 살균된다는 원리를 이용한 bio-assay를 통하여 항산화 활성을 조사하였고 그 결과를 Fig. 2, 3에 나타내었다. 감자, 치커리, 달래, 두릅, 쑥갓의 Free radical 소거능력이 control에 비하여 유의적으로 뛰어난 것으로 나타났으나 reference인 vitamin C의 free radical 소거능력에는 미치지 못하는 것으로 보여졌다. 한편 bio-assay의 결과 달래, 쑥갓, 감자, 대두, 보리의 항산화 능력이 유의적으로 높은 것으로 나타났으며 vitamin C의 항산화 능력을 능가하는 것으로 나타났다. 세포에서의 doubling time, β -galactosidase 발현과 항산화성 실험을 종합한 결과 4가지 실험에서 모두 좋은 효과를 보여준 감자를 최종 식품소재로 선발하였다.

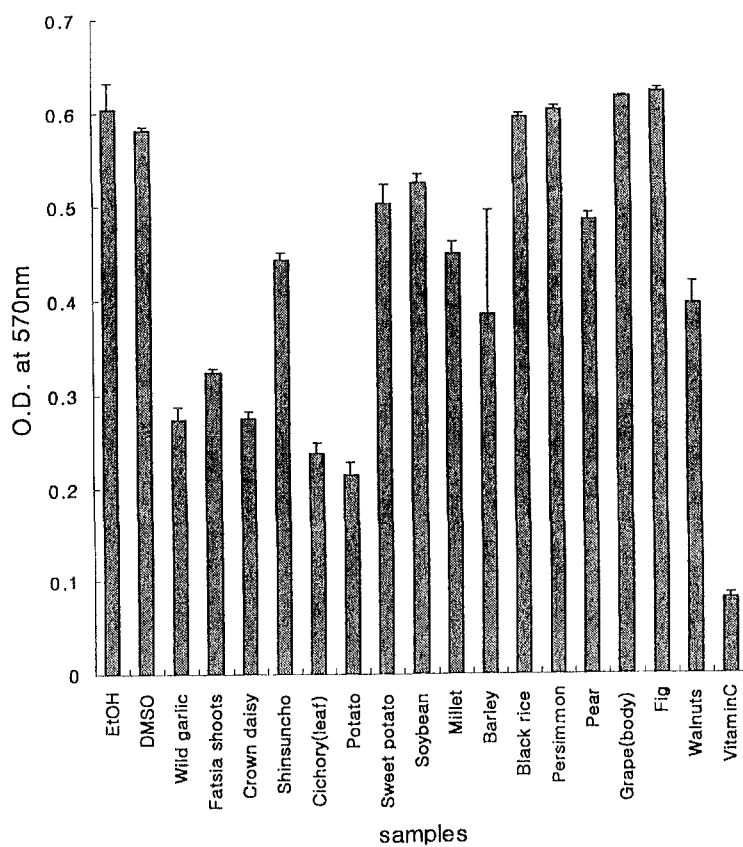


Fig 2. Free radical scavenging effect of food material samples by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method.

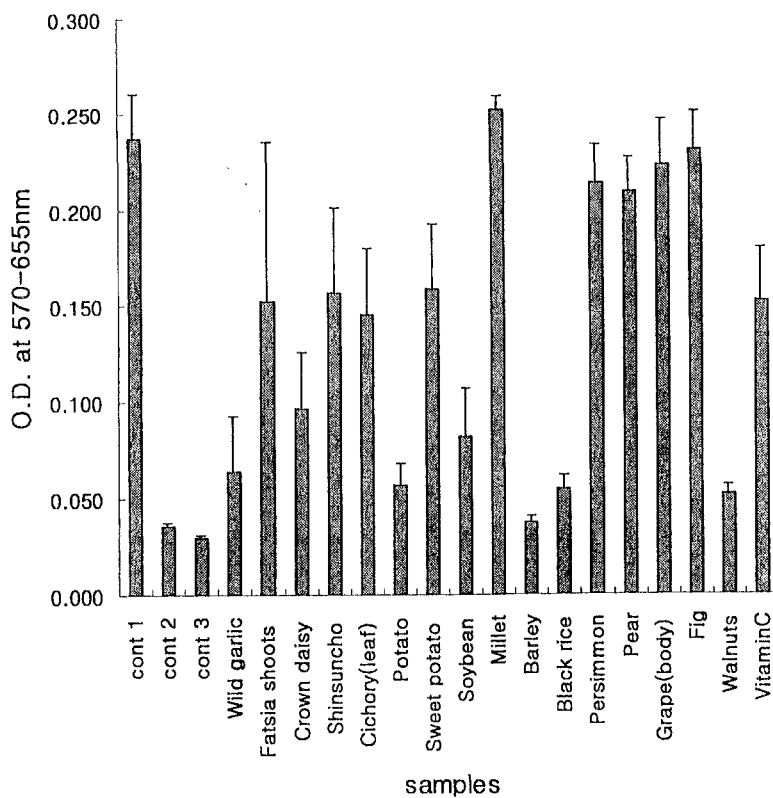


Fig 3. Cytocidal effect by reaction of hydroperoxide and methemoglobin against *Staphylococcus aureus* 209P with food material samples.

Control 1: absence sample, Control 2: absence sample+metHb

Control 3: absence sample+metHb+BuOOH

라. 감자 추출물의 극성에 따른 용매별 분획의 노화억제능

감자 70% 에탄올 추출물을 이용하여 용매의 극성도에 따라 순차분획을 실시하여 fraction별 노화억제능력을 조사한 결과를 표4, Fig 4.에 나타내었다. Doubling time은 모든 유기용매 분획에서 56회로 같았으며 이때 노화의 지표가 되는 단백질인 senescence-associated β -galactosidase 염색을 실시한 결과 대부분의 분획에서 100% 염색이 되었다. 그러나 ethanol 추출물을 처리한 경우에는 55%의 염색율을 보여 노화가 덜 진행된 것으로 나타났다. 현미경을 통한 세포의 모양을 관찰한 결과 buthanol 분획물을 처리한 경우 세포수가 가장 많았으며 모양도 비교적 양호한 편이었다. 또한 ethanol 추출물을 처리한 군에서도 다른 분획을 처리한 군에 비하여 세포 모양도 양호하고 β -gal 염색도 흐린 것으로 나타났다.

세포 수준에서의 노화억제능 실험에서 분획물의 현저한 차이가 나타나지 않아 in vitro에서 DPPH 소거능 실험을 실시한 결과 buthanol 분획의 DPPH 소거능이 82.5%로 가장 높았으며 water 분획과 Ethanol 추출물 자체에서도 40% 이상의 높은 DPPH 소거능을 보여주었다. 특히, buthanol 분획의 경우 세포수준의 실험에서도 세포수가 많고 그 모양이 비교적 양호한 것으로 판단되었고 DPPH 소거능도 가장 뛰어난 것으로 나타났다.

이 두 결과를 종합하여 볼 때 70% ethanol 추출물을 이용한 여러 용매의 분획물 중 노화를 억제시켜주는 유효성분이 buthanol 분획에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 판단된다.

표 4. 감자 추출물의 용매별 분획이 세포의 노화에 미치는 영향

	Doubling Time	β -gal (%)	현미경을 통한 세포의 모양
Control(DMSO 처리)	56	100	세포가 넓게 퍼져 하나의 세포가 차지하는 영역이 매우 넓음
Ethanol 추출물 0.01	56	100	세포가 좀 길어진 모양을 하고 있으며 β -gal 염색이 흐린편임
Ethanol 추출물 0.1	56	55	세포가 좀 길어진 모양을 하고 있으며 β -gal 염색이 흐린 편임
Chloroform 분획 0.01	56	100	세포수가 비교적 많은 편이나 넓게 퍼져있고 부분적으로 연하게 염색된 세포 존재
Chloroform 분획 0.1	56	100	세포가 넓게 퍼져 있으며 부분부분 염색이 진하게 되어있음
Hexan 분획 0.01	56	100	세포가 넓게 퍼진 모양을 하고 있으나 염색은 진하지 않은 편
Hexan 분획 0.1	56	100	세포가 넓게 퍼져 있으며 염색이 부분부분 진하게 되어 있음
Ethyl acetate 분획 0.01	56	-	doubling time 56 상태에서 contamination
Ethyl acetate 분획 0.1	56	100	세포 모양이 많이 퍼져있고 염색도 진하게 되어 있음
Buthanol 분획 0.01	56	100	세포수가 보통 정도이고 세포 모양도 넓게 퍼져 있음
Buthanol 분획 0.1	56	100	세포수 비교적 많고 세포모양도 양호한 편이나 1-2개 세포를 제외하고 모두 염색이 되어 있음
물 분획 0.01	56	100	세포수 적고 모양도 넓게 퍼져있음
물 분획 0.1	56	100	세포수가 많고 모양도 양호한 편이나 모든 세포에 진하게 염색
Young Cell(P26)		0	

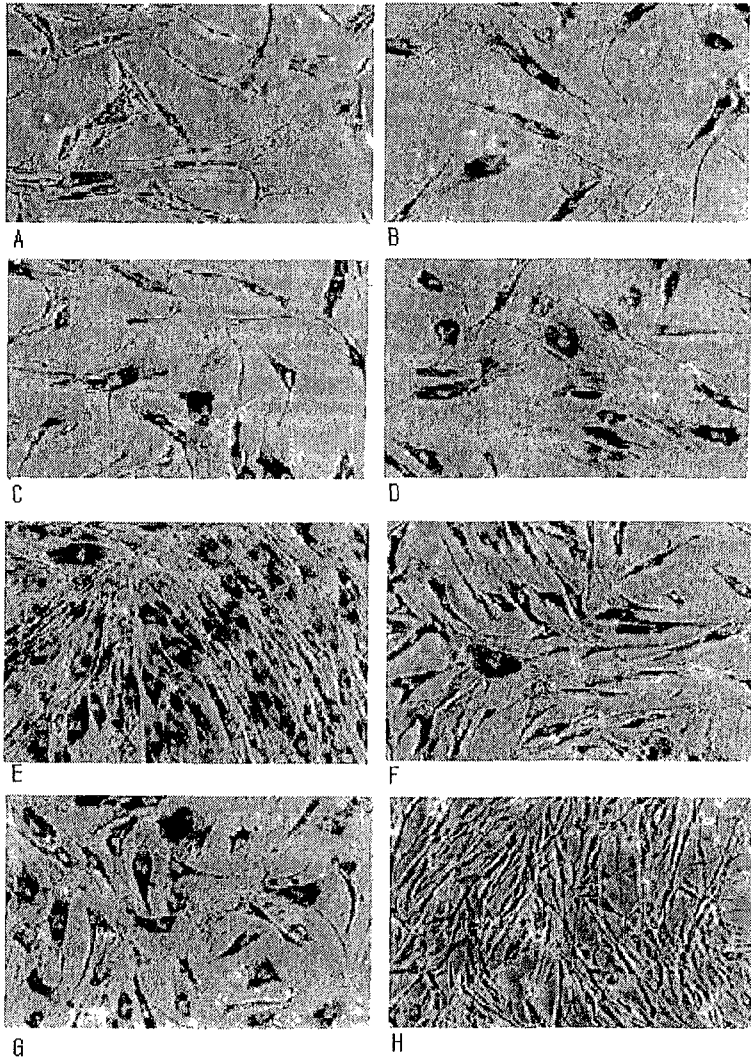


Fig. 4. 감자추출물의 유기용매 분획물을 처리한 세포에서
 senescence-associated β -galactosidase 발현
 A: Ethanol 추출물 B: Control(DMSO처리) C: Hexan 분획 D: Chloroform 분획
 E: 물 분획 F: Butanol 분획 G: Ethyl acetate 분획 H: Young cell(p26)

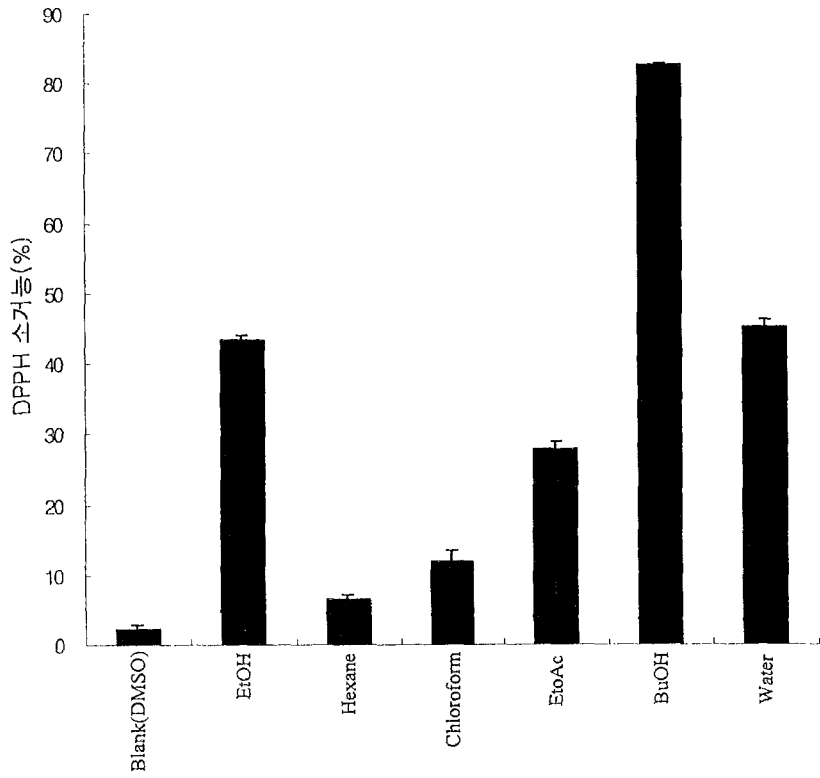


Fig 5. DPPH법을 이용한 감자추출물의 용매별 분획의 free radical 소거능

3. 선발소재의 가공 특성 분석

가. 선발 소재의 기호 특성

기장을 70 % ethanol로 추출할 경우 수율이 약 3%에 이르고 물로 추출하였을 때는 3.8 %로 약간 높게 나타났다. Ethanol 추출물 대부분이 물에 불용성 상태를 보이며 침전을 형성하여 음료형태의 제품을 제조하는데 부적합한 것으로 판단되었다. 색상은 샛노란 황색으로 부드러운 옥수수의 냄새와 삶은 옥수수의 맛과 유사한 맛을 타나내 주어 기호성은 거부감이 없는 것으로 생각된다. 한편 기장을 물 추출한 추출물은 물에 잘 용해되어 유백색 색상을 나타내고 냄새는 옥수수 삶은 냄새 또는 밤꽃 냄새와 유사한 냄새를 타나냈고 맛은 약간 단맛을 띠면서 미숫가루와 유사한 맛을 나타냈다. 한약재 중 선발된 현삼은 수용성으로서 10 % 수용액에서 갈색을 나타냈으며 냄새는 한약과 cresol취를 나타냈고 맛은 달면서 약산 신맛이 섞여 있었다. 익모초 추출물은 수용액에 일부만 용해되었으며 수용액은 담황색을 나타내고 한약과 건초 취를 나타내면서 맛은 쓰고 떫은맛이 섞여 있었다.

한편 선발소재 중 기장의 70 % ethanol 용액 추출물의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 80℃ ~ 100℃에서 30분~2시간 동안 처리하여 섬유아세포의 분열수를 조사한 결과 이러한 정도의 열처리는 안정한 것으로 나타났다.

표 5. 선발소재의 기호특성(10 % 수용액 상태)

소재	추출방법	수용성	색상	냄새	맛
기장	70 % ethanol 용액	불용	황색	삶은 옥수수	옥수수 맛
	물	수용	유백색	밤꽃냄새	단맛 + 미숫가루 맛
현삼	70% ethanol	수용	갈색	한약 및 cresol취	달고 시며 cresol취
익모초	70% ethanol	일부불용	담황색	방향 및 건초취	쓰고 떫은 맛

나. 감자 에탄올 추출물의 열처리에 따른 세포분열능력

가공 특성에 따른 감자의 ethanol 추출물의 노화억제 능력의 변화를 살펴보기 위하여 여러 가지 온도와 시간으로 가열한 후 세포에 일정 농도로 처리하

여 세포의 doubling time을 측정하였다. 추출물의 열처리에 따른 세포의 doubling time은 거의 변화가 없었으며 열처리를 하지 않은 감자 추출물 처리군과 50℃에서 30분 가열 처리한 군에서 doubling time 단지 2회 증가한 것으로 나타났다(표 6). 노화의 지표가 되는 senescence-associated β -galactosidase를 염색하여 본 결과 염색된 색의 정도의 차이는 있었으나 모든 세포들이 염색이 되어 노화된 것으로 보여졌다. 현미경을 통하여 살펴본 각 처리군의 세포모양에서는 대체적으로 세포의 수가 많은 편이었고 특히, 감자 추출물의 비열처리군, 50℃×30min 처리군의 경우 염색도 흐리고 세포모양도 양호하였으며 세포수도 상당히 많았다. 이들 sample을 사용하여 DPPH 소거능을 살펴본 결과를 Fig 7에 나타내었다. 감자 추출물의 경우 모든 열처리 군에서 20% 내외의 DPPH 소거능을 보였으나 각각의 처리군에서 소거능은 유의적 차이가 없었다. 반면 vitamin C의 경우 100%에 가까운 높은 DPPH 소거능을 보였다.

이러한 결과를 토대로 볼 때 감자 추출물의 노화억제 성분은 열처리에 상당히 강하다고 볼 수 있으며 식품 소재가 노화를 억제하는 능력은 단지 하나의 능력만으로는 설명할 수 없을 것이라 생각된다.

표 6. 감자추출물의 열처리물이 세포의 노화에 미치는 영향

	Doubling Time	β -gal (%)	현미경을 통한 세포의 모양
Control I (DMSO첨가)	56	100	세포수 보통, 세포 모양 넓게 퍼져있으나 염색 정도는 진하지 않음
P. 비열처리 0.01	58	100	세포수 많고 모양도 양호하나 모든 세포에 염색되어 있음
P. 비열처리 0.1	58	100	세포수 많고 모양은 양호한 편이나 염색이 진하게 되어 있음
P. 50°C×10min 0.01	56	100	세포수 보통이고 세포 모양이 많이 퍼져 있고 모든 세포가 염색되어 있음
P. 50°C×10min 0.1	56	100	세포수 많고 모양은 양호한 편이나 염색이 진하게 되어 있음
P. 50°C×30min 0.01	58	100	세포수 아주 많고 모양도 양호하나 모든 세포가 염색되어 있음
P. 50°C×30min 0.1	58	100	세포수 많고 모양은 양호한 편이나 염색이 진하게 되어 있음
P. 100°C×10min 0.01	56	100	세포수 많고 세포 모양 조금 퍼져 있으며 염색이 진하게 되어 있음
P. 100°C×10min 0.1	56	100	세포수 많고 모양은 양호한 편이나 염색이 진하게 되어 있음
P. 100°C×30min 0.01	56	100	세포수 많고 세포 모양 조금 퍼져 있으며 염색이 진하게 되어 있음
P. 100°C×30min 0.1	56	100	세포수 많고 세포 크기가 작고 퍼져 있으나 염색이 진하게 되어 있음
normal (D.W. 첨가)	58	100	세포수는 아주 많으나 모든 세포가 아주 진하게 염색되어 있음

*. P. = 감자 70% 에탄올 추출물

V. = 비타민 시약

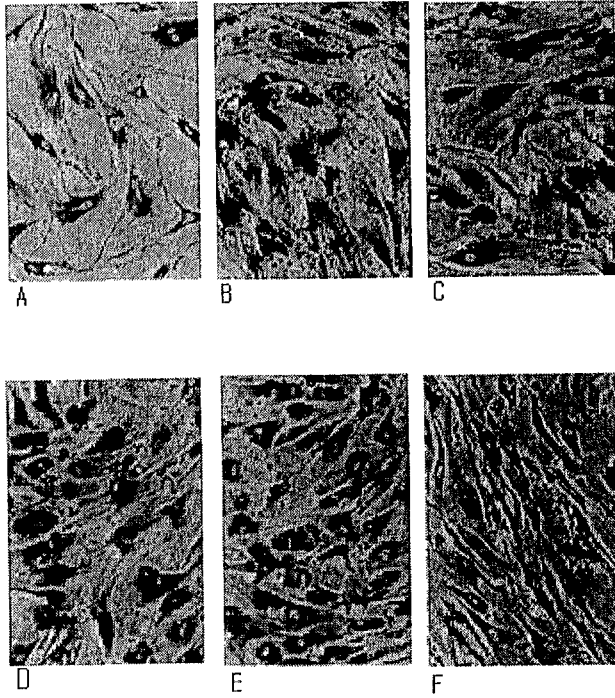


Fig. 6. 감자추출물의 열처리 물을 처리한 세포에서 senescence β -galactosidase 발현

A: Control(DMSO처리) B: 감자(No heating) C: 감자(50°C × 10min)
 D: 감자(50°C × 30min) E: 감자(100°C × 10min) F: 감자(100°C × 30min)

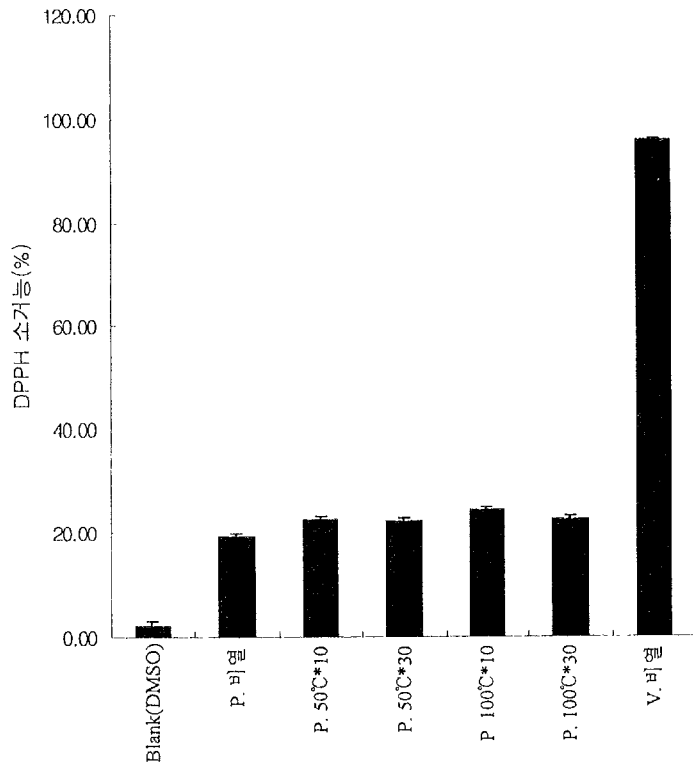


Fig 7. DPPH법을 이용한 감자추출물의 열처리물의 free radical 소거능

다. 감자 및 현삼 가공품의 관능특성

Table 7. 감자 추출물을 이용한 음료의 관능특성

시제품 형태	관능적 특성	Brix 당도	pH
5% 감자 추출물 용액	색상은 오렌지 주스와 같으며 향은 생감자 향이 그대로 느껴짐. 음료로서는 농도가 너무 진함		
2% 감자 추출물 용액	노란색의 색상을 지니며 생감자 향이 나고 약간 미끄러운 듯한 뒷맛을 지님. 생감자 맛의 감소 또는 보완이 필요	2.0	5.84
2% 감자 추출물 용액 (100℃×1min 가열)	2% 감자 추출물 용액의 관능적 특성과 같은 특성을 보임	2.0	5.71
2% 감자 추출물 용액 (100℃×10min 가열)	2% 감자 추출물 용액의 관능적 특성과 같은 특성을 보임	2.2	5.68
2% 감자 추출물 용액 + 1.5% 설탕 + 0.2% 구연산	맛있는 감자음료의 맛을 보충하기 위하여 설탕과 구연산을 보충했으나 감미는 적절한 반면 산미는 조금 부족함	3.7	4.09
2% 감자 추출물 용액 + 1.5% 설탕 + 0.3% 구연산	생감자의 향이 조금 줄어들었고 감미와 산미가 적절하게 조화됨	4.0	3.89

표 7에서 보는 바와 같이 감자의 70% 에탄올 추출물을 2-5% 농도로 물에 용해하여 기호도를 살펴본 결과 5% 농도는 생감자의 냄새와 맛이 너무 강하게 느껴서 2% 정도로 낮추는 것이 바람직하게 평가되었다. 오렌지 색상과 신선한 감자 향을 살리기 위해서는 설탕 1.5% 및 구연산 0.3% 정도를 첨가하여 주스 형태의 제품을 제조하는 것이 적합하게 판단되었다.

Table 8. 현삼 및 현삼추출물을 이용한 음료의 관능특성

시제품 형태	관능적 특성	Brix 당도	pH
현삼 차 (현삼을 뜨거운 물에 우려냄)	색상은 검정 색이며 화장품 향과 같은 불유쾌한 향이 남.	2.6	5.55
현삼 탕제 (현삼에 10배의 물을 넣고 90℃, 2hr 가열)	맛이 부드럽고 향이 불쾌하지 않으며 body가 충분함. 적절한 쓴맛이 있고 조화로운 맛을 보여 그대로 제품화 가능	6.0	4.84
5% 현삼 추출물 용액	색은 갈색으로 양호하고 탄 냄새와 함께 톨루엔 냄새가 약하게 나며 쓴맛이 진함	4.2	4.95
2% 현삼 추출물 용액 + 1.5% 설탕	색은 갈색으로 양호하며 탄 냄새와 쓴맛이 줄어들고 감미가 생겨 조화로운 맛이 남	4.4	5.53
2% 현삼 추출물 용액 + 2% 설탕	색은 갈색으로 양호하고 탄 냄새와 쓴맛이 줄었으나 단맛이 조금 강한 편	4.2	5.44
2% 현삼 추출물 용액 + 2% 올리고당	색은 갈색으로 양호하고 탄 냄새는 줄었으나 올리고당 첨가량에 비하여 단맛이 약하여 쓴맛을 보완하지 못함	4.0	5.32
현삼 fraction #3 용액	색은 갈색으로 양호하나 용매취가 심하게 나 식용이 불가할 것으로 생각됨	3.8	4.74

표 8에서 보면 현삼을 그대로 물로 추출하거나, in vitro 및 in vivo 효능실험에서 유효한 분획으로 평가된 현삼 fraction #3 분획은 불유쾌한 냄새가 강하여 식품 형태의 제품 제조에 부적합한 것으로 판단되었다. 한편 현삼을 90℃에서 2시간 정도 열처리하면서 추출한 탕제 형식의 제품은 맛과 향 그리고 body가 적절한 제품의 기호도를 타나내었다. 노화억제에 효과가 있는 현삼의 70% 에탄올 추출물을 사용한 제품 개발은 현삼 추출물 2% 및 설탕 1.5% 정도의 비율로 혼합함으로써 색상, 감미, 고미 등이 적절하게 조화를 이룬 커피형태의 제품이 가능함을 발견하였다.

Table 9. 감자와 현삼 추출물을 이용한 젤리의 관능적 특성

시제품 형태	관능적 특성
5% 감자추출물 + 2% 설탕	색상은 노란색으로 좋았으나 생감자 향과 맛이 강하고 상대적으로 감미가 적음
5% 감자추출물 + 6% 설탕	색상은 노란색으로 좋았으며 적절한 정도의 생감자 향과 맛이 느껴졌으며 감미도 적절함
5% 감자추출물 + 6% 설탕 + 0.3% 구연산	색상은 노란색으로 좋았고 감미도 좋았으나 산미가 조화롭지 못함
5% 현삼추출물 + 2% 설탕	색상은 투명한 짙은 갈색이고 쓴맛이 너무 강한 반면 단맛은 너무 약함
5% 현삼추출물 + 6% 설탕	색상은 좋았으나 여전히 단맛이 약하고 쓴맛이 강함
5% 현삼추출물 + 8% 설탕	색상은 투명한 짙은 갈색으로 좋았으며 쓴맛과 단맛이 적절히 조화를 이룸

감자 및 현삼의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 고령 노인들이 좋아하는 젤리 형태의 제품을 제조해 본 결과 표 9에서 볼 수 있는 바와 같이 감자의 경우 감자추출물 5%, 설탕 6%, 젤라틴 3.6%를 첨가하여 제조한 젤리제품이 기호도가 좋았으며 현삼의 경우 현삼추출물 5%, 설탕 8%, 젤라틴 3.6% 량을 혼합하여 제조한 젤리제품이 관능평가결과 우수하였다.

라. 현삼 및 감자추출물의 경제성 검토

현삼의 70% 에탄올 추출물의 수율은 시판되고 있는 건조 현삼에 대하여 18.4%이고, 감자의 추출물 수율은 생감자에 대하여 1.9%의 수율을 나타내고 있다. 이들 원재료의 가격은 국산 현삼이 약 10,000원/kg이고, 국산 생감자의 가격이 약 1,000원/kg 이므로 추출물 중 원재료비 가격은 g당 현삼이 55원, 감자가 53원 수준으로 기업화시킬 때 부담이 없는 수준이다. 한편 이들 추출물을 제조하기 위하여 70% 에탄올 용액으로 50℃에서 1시간 동안 추출한 다음 에탄

올을 증발시키면 추출액을 얻을 수 있고 이를 건조할 필요 없이 바로 제품제조에 활용할 수 있으므로 가공비용이 크게 발생할 것으로 보이지 않기 때문에 용이하게 실용화 할 수 있을 것으로 생각된다.

제 4 절 결 론

1. 식품소재로부터 노화억제소재의 탐색

인체 섬유아세포(Human embryonic fibroblast)를 배양하면서 그 최대분열수를 측정하여 84종의 농산물 및 식품소재들의 노화지연능력을 조사한 결과 무화과, 배, 자두, 감자, 고구마, 완두콩, 기장, 대두, 적두, 흑미, 홍합 및 호도의 추출물에서 최대분열수가 68회에 달하여 대조구의 62회보다 우수한 것으로 나타났다. 이들 중 0.1%와 0.01%에서 모두 우수한 것으로 나타난 기장과 감자를 우수시료로 선정하였다.

2. 감자추출물의 in vitro 항노화 활성

감자추출물은 섬유아세포의 최대분열수가 클 뿐 아니라 세포의 형태에 있어서도 노화지연 상태를 보여주었고, 노화와 관련이 깊은 것으로 알려진 free radical의 소거능력 및 항산화활성에 있어서도 대조구 및 다른 소재들에 비하여 우수한 효과를 나타냈다.

3. 현삼 및 감자추출물을 이용한 제품개발

현삼 및 감자의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 음료 및 젤리형태의 제품을 제조해 본 결과 현삼은 커피형태의 음료로 발전시키는 것이 바람직하며, 감자는 쥬스, 젤리 기타 다양한 형태의 제품 제조에 활용될 수 있을 것으로 파악하였다.

제 5 절 참고문헌

Bennett, M. K., Lopez, J. M., Sanchez, H. B., Osborne, T. F., Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. J. Biol. Chemistry. 270:25578-25583, 1995

Comfort A (1979) The biology of senescence. pp.261-298 Elsevier, New York

Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L.-J., and Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4337-4341, 1995

Dullic, V., Drullinger, L. F., Mees, E., Reed, S. I., and Stein G. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11034-11038, 1993

Flood J. et al. (1993) Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in SAM. Neurobiology of aging. 14:153-157

Fry, D. G., Hurlin, P. J., Maher, V. M., and McCormick, J. J. Transformation of diploid human fibroblasts by transfection with V-SIS, PDGF2/C-SIS or T24H-ras gene. Mutat. Res. 199:341-351, 1988

Goldstein, S. Aging in vitro: Growth of cultured cells from the Galapagos Tortoise. Exp. Cell Res. 83:297-302, 1976

Harman D (1956) Aging : A theory based on free radical and radical chemistry. J. Gerontology 11, 298-300

Harman D (1981) The aging process. Proc Natl Acad Sci USA 78, 7124-7128

Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol. 11:298-300, 1956

Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37:614-636, 1965

Hayflick, L. The cellular basis for biological aging, p159-186. In Hayflicks, L. and Finch, C. E. (ed.), Handbook of biological aging. Van Nostrand Reinhold Co., New York. 1977

Hofland, H. E., Shephard, L., and Sullivan, S. M. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93 : 7305-7309, 1996

Jazwinski, M. S. Longevity, genes, and aging. Science 273: 54-59, 1996

Kadonaga, J. T. Methods in Enzymology 208: 10-23, 1991

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266 : 2011-2015, 1994

Kumazaki, T., Robetorye, S. S., and Smith, J. R. Exp. Cell Res. Fibronectin expression increase during in vitro cellular senescence. Exp. Cell Res. 195: 13-21, 1991

Lee, P. J, Washer, L. L., Law, D. J., Boland, C. R., Horon, I.L, and Feinberg, A. P. Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 10366-10370, 1996.

McAllister, J. M., and Hornsby, P. J. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23: 677-682, 1987

Medrano, E. E., et al *Mol. Biol. Cell* 5: 497-502, 1994

Naoki Abe, Takashi Murata and Akira Hirota, Novel Dsidized Sorbicillin Cimers with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Radical Scavenging Activity from a Fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(11): 2120-2026, 1998

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. Cloning of senescence cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211: 90-98, 1994

Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawis, A., Sands, A. T., Bradley, E. N., Olson, E. N., Haper, J. W., and Elledge, S. J. p53 independent expression of p21CIP1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267: 1024-1027, 1994

Rohme, D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocyts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5009-5013, 1981

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning a laboratory manual* 2 nd edition, ed by Chris Nolan, Cod Spring Harbor Laboratory Press 1989

Sohal, R. S., and Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59-63, 1996

Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M., and Smith J. R. Senescent cell fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11012-11016, 1991

Takaaki Akaike, Keizo Sato, Sumiko Ijiri, Yoichi Miyamoto. Bactericidal Activity of Alkyl Peroxyl Radicals Generated by Heme-Iron-Catalyzed Decomposition of Organic Peroxides. Archives of Biochemistry and Biophysics. 294(1): 55-63, 1992

Thompson, S. C., Mueller, S. N., and Levine, E. M. Science 222: 623-626, 1983

Thweatt, R., Murano, S., Fleischmann, R. D., and Goldstein, S. Experimental Gerontol, 27:433-438, 1992

West, M. D., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a regulation and overexpression of collagenase activity. Exp. Cell Res. 184: 138-147, 1989

Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., and Shay, J. W. Reversible cellular senescence: Implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 9:3088-3092, 1989

Wright, W. E., and Shay, J. W. Telomere positional effect and the regulation of cellular senescence. Trends in Genetics 8:193-197, 1992