

도토리 분말이 선충의 산화성 스트레스 저항성과 수명에 미치는 효과

이순영 · 이진선 · 박상규[†]

순천향대학교 의료과학대학 의료생명공학과

Effects of Acorn Powder on Lifespan and a Resistance to Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*

Soon-Young Lee, Jin-Sun Lee, and Sang-Kyu Park[†]

Dept. of Medical Biotechnology, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, Chungnam 336-745, Korea

Abstract

The free radical theory of aging suggests that oxidative damage caused by free radicals plays a key role in normal aging. We measured the anti-oxidant activity of acorns and asked whether it can modulate the aging process in *Caenorhabditis elegans*. Different concentrations of acorn powder were added to culture medium, followed by the monitoring of fertility and survival under oxidative stress. The anti-oxidant activity of 500 mg/L of acorn powder exhibited significant increases in the resistance to oxidative stress *in vivo*. Acorn powder also significantly extended both the mean and maximum lifespan of *C. elegans* (the mean lifespan was increased up to 22.4%). The fertility assay indicates the lifespan extension from acorn does not accompany a reduced reproduction, which is common in long-lived mutants. These findings indicate that acorn has a strong antioxidant activity and can induce longevity without the trade-off of reduced reproduction in *C. elegans*.

Key words: acorn, oxidative stress, lifespan, fertility, *Caenorhabditis elegans*

서 론

현재까지 제안된 수많은 노화관련 이론 중 가장 널리 알려지고 연구되어진 이론은 1956년 Denham Herman 박사에 의해 제안된 자유기 노화 이론(free radical theory of aging)이다(1). 자유기 노화 이론은 세포 내 대사과정의 부산물로 생성되는 자유기가 세포 내의 주요 물질인 DNA, 단백질, 지질 성분에 산화적 손상을 일으키고 시간이 지남에 따라 축적된 산화적 손상이 세포 기능의 손상, 나아가 조직의 기능 저하를 유도하여 궁극적으로 개체의 노화를 일으킨다는 이론이다(2,3). 가장 대표적인 자유기는 미토콘드리아의 전자전달계에서 주로 생성되는 활성산소들이다. 활성산소에는 superoxide($^1O_2^-$), hydroxy radical($\cdot OH$), 과산화수소수(H_2O_2) 등이 있다. 하지만 이러한 활성산소는 세포 내의 항산화 방어기전에 의해 제거될 수 있다. 항산화 방어기전에는 superoxide dismutase, catalase와 같은 효소를 이용한 방어기전과 비타민 E, 비타민 C, glutathione과 같은 항산화 물질을 이용한 방어기전이 존재한다(4-6). 따라서 항산화 물질을 이용한 노화 억제 및 수명 연장 효과에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 대표적으로 적포도주에 존재하는 polyphenol 성분인 resveratrol의 경우에는 여러 실험동물에서

항노화 효능이 입증되었다. Resveratrol 섭취에 의해 효모의 수명은 70% 이상 증가되었으며, 선충(*Caenorhabditis elegans*), 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서도 수명 연장 효능을 나타내었다(7,8). 그 외에 카레의 주성분인 curcumin, 비타민 E, coenzyme Q₁₀ 등과 같은 항산화 물질의 노화 억제, 수명 연장, 노화관련 질병에의 효능 연구 결과들이 활발히 보고되고 있다(9-14).

도토리(acorn, *Quercus acutissima*)는 참나무(Fagaceae)과 열매로 위장병, 대장염, 인후염, 설사 등과 같은 증상의 치료제로 사용되었을 뿐만 아니라 묵이나 국수와 같은 한식의 재료로도 널리 활용되어 왔다(15). 도토리는 65~69%의 전분, 5.8~7.8%의 조단백, 1.1~7.8%의 조지방, 2.1~3.8%의 조섬유, 1.0~3.4%의 조회분, 4.6~9.3%의 탄닌, 6.5~13.7%의 수분 등으로 구성되어 있다(16). 그중 탄닌성분인 gallic acid, digallic acid, gallotannin과 같은 성분은 높은 항산화 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(17). 고지혈증을 유발한 쥐에 도토리 추출물을 섭취시킨 결과, 고지방식이로 인해 유도된 항산화 효소의 활성 변화와 지질과산화물의 함량이 감소되었으며 간손상도 억제되었다(18). 또한 대표적인 노인성 질환인 치매 모델 마우스에서 도토리 투여가 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성을 증가시키고 그 분해

[†]Corresponding author. E-mail: skpark@sch.ac.kr
Phone: 82-41-530-3094, Fax: 82-41-530-3085

효소는 억제하는 것으로 나타났다(19). 최근의 연구결과에서는 도토리 물 추출물의 경구투여가 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-10의 생성을 증가시키는 것으로 나타나 도토리 추출물이 개체의 면역능 향상에도 기여함이 보고되었다(16).

본 연구에서는 선충을 실험동물로 이용하여 도토리 분말이 개체의 산화성 스트레스에 대한 저항성에 미치는 효능을 규명하고, 나아가 개체의 수명에 미치는 영향을 연구하였다. 또한 수명연장의 주요 생체 지표 중의 하나인 번식률의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 배지제조

본 연구에서는 실험동물로 꼬마선충(*C. elegans*) N2 CGCb 종을 사용하였다. 선충의 배양배지로는 NGM(nematode growth medium)을 사용하였다. NGM 배지의 조성은 1.7% agar, 2.5 mg/mL peptone, 25 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄(pH 6.0), 5 μ g/mL cholesterol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄이다. 모든 실험에서 선충은 20°C의 온도에서 배양하였으며, 먹이로는 박테리아 OP50를 NGM 배지에 첨가하였다. 도토리 첨가 배지의 경우, 먼저 도토리 분말 시료를 3차 증류수에 녹인 후, 0.20 μ m cellulose acetate(hydrophilic) filter(Advantec, Tokyo, Japan)을 이용하여 멸균하여 수용액을 얻었다. 멸균된 도토리 시료는 고압 증기 멸균 후 50~60°C까지 상온에서 식힌 NGM 배지에 주어진 농도로 첨가하였다.

산화성 스트레스 저항성 측정

도토리 분말 수용액이 개체의 산화성 스트레스 저항성에 미치는 효과를 분석하기 위해 NGM 배지에 도토리 분말 수용액을 각각 50, 100, 500, 1,000 mg/L의 농도로 첨가한 실험군의 산화성 스트레스 하에서의 생존률을 도토리 분말 수용액을 전혀 첨가하지 않은 대조군에서의 생존률과 비교하였다. 수정 후 3일이 지난 성체 선충 5마리를 50 mm petri dish에 준비된 NGM 배지로 옮겨준 다음, 20°C 온도에서 4시간 동안 알을 낳게 하였다. 4시간 후에 배지에서 성체 5마리를 제거한 후, NGM 배지를 다시 20°C 배양기에 넣어 3일간 배양하였다. 그 다음 산화성 스트레스 유발물질인 paraquat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 20 mM의 농도로 처리한 배지로 30마리의 성체 선충을 옮겨주었다. 그 후 시간에 따른 개체의 사망률 기록하였다. 선충의 경우 물리적 자극에 전혀 반응하지 않은 경우에 사망한 것으로 간주하였다. 대조군과 실험군 각각 총 60마리의 선충을 사용하였으며, 모든 개체가 사망한 후 생존률 곡선을 그리고 log-rank test를 이용하여 대조군과 실험군과의 산화성 스트레스 저항성의 유의적 차이 여부를 분석하였다(20).

수명연장 효능 평가

수명연장 효능 여부는 500 mg/L 농도의 도토리 분말 수용액을 첨가한 NGM 배지에서 키운 실험군의 수명과 도토리 분말 수용액을 첨가하지 않은 일반 NGM 배지에서 키운 대조군의 수명을 비교하여 평가하였다. 산화성 스트레스 저항성 실험에서와 같이 5마리의 성체 선충을 4시간 동안 알을 낳게 한 다음, 20°C 온도에서 3일간 배양하였다. 그 후 각 배지로부터 성체 선충 30마리를 새로운 NGM 배지로 옮겨주었다. 이때 사용한 NGM 배지에는 수명측정에 사용될 성체의 자손에 의한 체내 부화를 막기 위해 5-fluoro-2'-deoxyuridine(Sigma-Aldrich)을 12.5 μ g/mL의 농도로 첨가하였다. 첫 5일간은 선충을 매일 새로운 NGM 배지로 옮겨주었고, 그 후로는 2~3일에 한 번씩 선충을 옮겨주면서 매일 사망한 개체의 수를 기록하였다. 대조군과 실험군 각각 60마리의 선충을 사용하였으며, 기록되어진 결과는 생존률 곡선과 log-rank test를 이용하여 통계 처리하여 평균수명과 최대수명에의 효과를 분석하였다.

번식력 분석

부화 후 2일이 경과된 선충을 각 NGM 배지에 1마리씩 옮겨주었다. 1마리의 선충이 옮겨진 배지를 20°C에서 배양하여 24시간 동안 알을 낳도록 하였다. 다음날 선충은 다시 새로운 배지로 옮겨주고, 알이 남아있는 배지는 다시 2일간 배양하여, 수정란으로부터 부화된 자손 선충의 수를 기록하였다. 이러한 방식으로 선충이 더 이상 알을 낳지 않을 때까지 실험을 반복하며 부화된 자손 선충의 수를 날짜별로 기록하였다. 대조군과 500 mg/L 농도의 도토리 분말 수용액을 처리한 대조군과의 번식률의 차이를 정량적으로 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

도토리 분말 수용액의 항산화 효능 평가

개체 수준에서 도토리 분말 수용액의 항산화 효능을 평가하기 위해 준비된 도토리 분말 수용액을 다양한 농도로 선충의 배지에 첨가하여 산화성 스트레스 유발 하에서의 생존률을 분석하였다(Table 1). 1차 실험에서는 도토리 분말 수용액을 전혀 첨가하지 않은 배지에서 키운 대조군(0 mg/L 도토리 분말 수용액)에 비해 500 mg/L와 1,000 mg/L 농도로 도토리 분말 수용액을 첨가한 배지에서 키운 선충이 산화성 스트레스에 대해 유의적으로 증가된 저항성을 보였다. 산화성 스트레스를 유발할 경우 대조군은 평균 생존 시간이 79.9 시간인데 반해 500 mg/L의 도토리 분말 수용액과 1,000 mg/L의 도토리 분말 수용액을 첨가한 실험군은 평균 생존 시간이 각각 92.5시간과 94.5시간으로 증가되었다($p < 0.05$). 2차 반복실험에서는 대조군의 평균 생존 시간이 70.6시간으로 관찰되었고, 마찬가지로 500 mg/L와 1,000 mg/L의 농도에서 산화성 스트레스 저항성이 증가하였다. 하지만 500 mg/L

Table 1. The effect of acorn on resistance to oxidative stress in *C. elegans*

	Conc. (mg/L)	Mean survival time (h) ¹⁾	p-value ²⁾
1st experiment	0	79.9	
	50	78.8	0.801
	100	77.6	0.405
	500	92.5	<0.001
	1,000	94.5	0.017
2nd experiment	0	70.6	
	50	67.1	0.287
	100	68.5	0.087
	500	81.8	<0.001
	1,000	75.2	0.420

¹⁾Mean survival time was determined with sixty worms.

²⁾Survival data of each concentration of acorn powder were compared to that of 0 mg/L of acorn powder. p-value was calculated using log-rank test and p-value lower than 0.05 was regarded as statistically significant.

의 농도에서는 평균 생존 시간이 81.8시간으로 유의적으로 증가한 반면(p<0.05), 1,000 mg/L의 농도에서는 75.2시간으로 증가하기는 하였지만 대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 못했다(p=0.420). 반면 50 mg/L와 100 mg/L의 저농도 실험군은 1, 2차 실험 모두에서 유의적인 산화성 스트레스에 대한 저항성의 변화를 보이지 않았다. 대조군과 500 mg/L 농도 실험군의 시간에 따른 생존률의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 도토리 분말 수용액은 선충에서 산화성 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 항산화 효능을 보였으며, 그 효능은 500 mg/L의 농도에서 가장 효과적임이 밝혀졌다. 본 연구결과를 도토리의 항산화 효능을 실험동물을 이용하여 개체 수준에서 보여준다. 따라서 향후 도토리를 이용한 기능성 식품이나 의약품 개발의 과학적 근거로 사용될 수 있다. 도토리 분말 수용액의 항산화 효능 평가 결과를 근거로 다음 수명 실험에서는 항산화 효능이 가장 높은 500 mg/L 농도를 사용하였다.

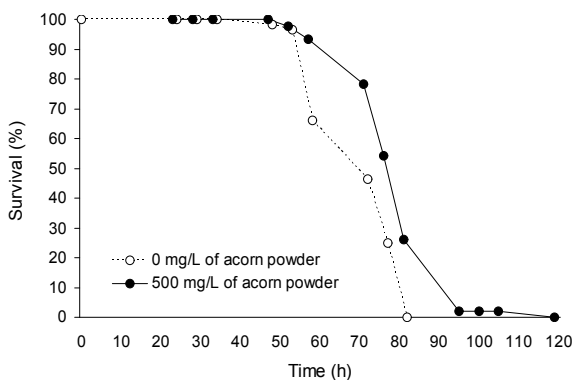


Fig. 1. Resistance to oxidative stress was significantly increased by acorn in *C. elegans*. Oxidative stress was induced in age-synchronized young adult worms with paraquat. Dead worms were monitored three times a day until all worms were dead. Survival time under oxidative stress lengthened significantly by 500 mg/L of acorn powder (p<0.05). The X-axis indicates time exposed to paraquat.

Table 2. The lifespan-extending effect of acorn in *C. elegans*

	Conc. (mg/L)	Mean lifespan (day) ¹⁾	Maximum lifespan (day) ²⁾	p-value ³⁾	% increase ⁴⁾
1st experiment	0	25.1	35		
	500	30.7	39	<0.001	22.4
2nd experiment	0	24.5	31		
	500	26.2	31	0.012	7.2

¹⁾Mean lifespan was the day when 50% of worms were dead.

²⁾Maximum lifespan was the one day before the last worm was dead.

³⁾p-value was calculated using log-rank test and p-value lower than 0.05 was regarded as statistically significant.

⁴⁾% increase of lifespan was calculated as $[(A-C)/C] \times 100$, where A is the mean lifespan of worms with 500 mg/L of acorn powder and C is the mean lifespan of worms with 0 mg/L of acorn powder.

도토리 분말 수용액이 개체의 수명에 미치는 영향

자유기 노화 이론에서 주장하는 바와 같이 시간이 지남에 따라 체내에 축적되는 산화성 손상의 증가는 노화 및 개체의 수명과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 체내 산화성 스트레스 저항성을 증가시키는 도토리 분말 수용액이 개체의 수명에 미치는 영향을 관찰하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 500 mg/L 농도의 도토리 분말 수용액을 첨가한 배지에서 자란 선충의 경우 대조군(0 mg/L 도토리 분말 수용액)에 비해 평균 수명과 최대 수명 모두가 유의적으로 증가하였다. 1차 실험에서는 대조군이 25.1일의 평균 수명과 35일의 최대 수명을 보인 반면, 500 mg/L 농도의 도토리 분말 수용액을 첨가한 실험군은 평균 수명과 최대 수명이 각각 30.7일과 39일로 증가하였다(p<0.001). 2차 실험에서는 500 mg/L 농도의 도토리 분말 수용액에 의해 평균 수명이 24.5일에서 26.2일로 연장되었다(p=0.012). 평균 수명을 이용해 계산한 도토리 분말 수용액의 수명 연장 효과는 1차와 2차 실험에서 각각 22.4%와 7.2%로 나타났다. 대조군과 실험군(500 mg/L 도토리 분말 수용액)의 시간에 따른 생존률의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 이러한 연구 결과로부터 도토리 분말 수용액의 항산화 효능이 개체의 산화성 스트레스 저항성을 증가시키고, 그로 인해 노화과정에서 수반되는 세포내 물질의 산화적 손상을 완화하여 결과적으로 개체의 수명을 연장시킨 것으로 추정할 수 있다. 항산화 물질을 이용한 노화연구에는 대표적으로 적포도주 성분인 resveratrol을 이용한 연구와 인도 카레의 주성분인 curcumin을 이용한 연구 등을 들 수 있다(8,9). 최근에는 로얄젤리와 녹차 성분의 항산화 및 항노화 효능을 평가한 연구가 발표되었다(21,22). 이러한 항산화 물질을 이용한 노화 및 수명연장 연구는 전 세계가 직면하고 있는 고령화 사회에 필수적인 연구 분야이다. 본 연구에서 사용한 도토리는 한식의 재료로 널리 사용되고 있는 안전한 식품 재료로서 한식의 우수성과 항노화 가능성을 널리 알리는데 이바지할 것으로 기대된다.

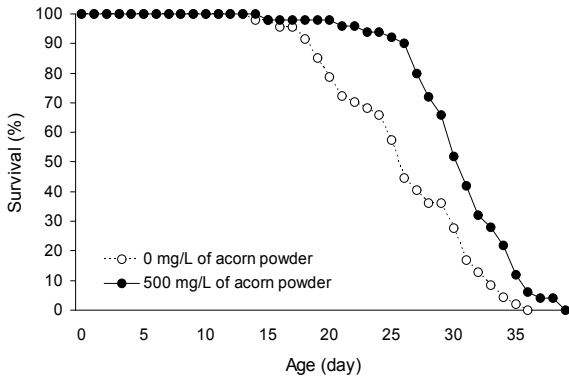


Fig. 2. Both mean and maximum lifespan was extended by acorn in *C. elegans*. Treatment of 500 mg/L of acorn powder conferred longevity phenotype in *C. elegans*. Sixty age-synchronized worms were used for this lifespan assay. Alive and dead worms were scored everyday until all worms were dead. For statistical analysis, log-rank test was employed. The X-axis indicates the day after egg-lay.

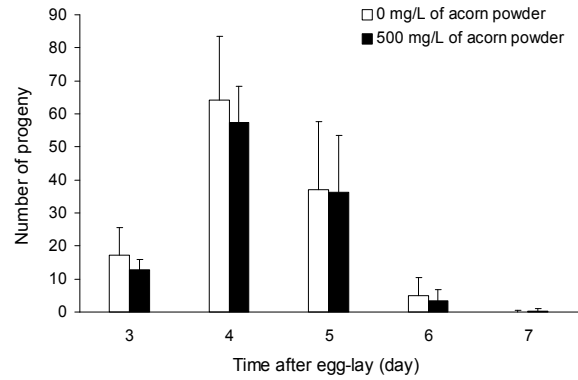


Fig. 3. The effect of acorn on fertility of *C. elegans*. Time-course distribution of number of progeny produced was compared between worms treated no acorn powder and worms treated with 500 mg/L of acorn powder. Statistical analysis using two-tailed student t-test result in no significant difference in fertility for each days. Data indicate mean±SD.

번식력 측정

선충에서 현재까지 밝혀진 많은 장수 모델 돌연변이들은 수명 연장 효과를 보일 시 개체의 번식력의 감소를 수반하는 경우가 많았다(23,24). Insulin/IGF-1-like 신호전달 체계의 감소에 의해 수명이 연장되는 것으로 알려진 *daf-2* 돌연변이의 경우도 번식력 감소로 인한 자손 수의 감소를 수반한다(25). 또한 최근에는 조선시대 거세된 환관들이 양반들에 비해 평균 14~19년 더 장수했다는 흥미로운 연구 결과가 발표되었다(26). 본 연구에서는 도토리 분말 수용액에 의한 수명 연장이 선충에서 개체의 번식력 감소를 수반하는지 여부를 관찰하였다. 대조군과 500 mg/L 도토리 분말 수용액을 처리한 대조군에서 성체로 자란 선충이 생산하는 자손의 수를 매일 기록하여 전체 자손 수의 차이와 날짜별 번식력을 비교하였다. 그 결과 전체 자손 수에서는 대조군과 실험군 사이에서 유의적인 차이를 발견하지 못하였다(Table 3). 대조군은 총 123.5±42.24마리의 자손을 생산하였으며, 실험군은 110.2±32.70마리의 자손을 생산하였다(p>0.05). Fig. 3에 나타난 바와 같이 날짜별 자손 수의 비교에서도 대조군과 실험군은 큰 차이를 보이지 않았다. 이것은 지금까지 알려진 수명 연장 효과와 번식력의 변화의 관계와는 다른 양상의 결과이다. 즉 본 연구 결과는 도토리 분말 수용액은 기존의 장수 모델 기전들과는 달리 수명 연장에 수반되는 번식력 감소라는 멧가를 치루지 않고서도 수명 연장 효과를 유발할 수 있음을 보여준다. 그러므로 향후 도토리의 수명연장 기전 관련 연구

Table 3. Total number of progeny produced by worms treated with acorn

Conc. (mg/L)	Number of worms used	Total number of progeny ¹⁾	p-value ²⁾
0	8	123.5±42.24	
500	6	110.2±32.70	0.126

¹⁾Data indicates the average total number of progeny±SD of each group.

²⁾p-value was calculated using two-tailed student t-test.

와 노화 관련 질병에의 효능 평가와 같은 연구의 수행이 요구된다.

요 약

도토리의 항산화 효능을 평가하기 위해 선충을 실험동물로 사용하여 생체 내 산화성 스트레스에 대한 저항성을 평가하였다. 배양배지에 50, 100, 500, 1,000 mg/L 농도의 도토리 분말 수용액을 첨가하여 산화성 스트레스 하에서의 생존률을 비교한 결과, 500 mg/L의 농도에서 유의적인 생존률 증가를 관찰할 수 있었다. 그 다음 위의 생체 내 항산화 효능 농도에서 도토리 분말 수용액이 개체의 수명에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 도토리 분말 수용액을 첨가한 배양배지에서 키운 선충이 대조군에 비해 유의적으로 증가된 평균 수명과 최대 수명을 가지는 것을 관찰하였다. 이는 도토리 분말 수용액이 생체 내에서 항산화 효능을 발휘하여 노화에 따른 세포 내 물질의 산화적 손상을 완화시키고, 그로 인해 개체의 수명 연장까지 일으킨 것으로 사료된다. 또한 번식률 변화를 관찰한 결과, 도토리 분말 수용액은 개체의 번식력에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 기존의 많은 수명 연장 표현형을 보이는 돌연변이 선충들에서의 결과와는 상반되는 것으로, 도토리 분말 수용액의 경우에는 번식력 감소를 수반하지 않고서도 수명 연장이 가능하다는 것을 보여준다. 본 연구의 결과는 향후 도토리를 이용한 항산화, 항노화 기능성 식품 개발과 같은 응용 연구 분야와 도토리의 생체 기능성과 관련 기전 연구와 같은 기초 연구 분야에도 널리 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 한식세계화용역연구사업의 한식우수성·기능성 연구 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다(과제번호 911044-1).

문헌

1. Herman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
2. Sohal RS, Weindruch R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63.
3. Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581.
4. Sohal RS, Agarwal A, Agarwal S, Orr WC. 1995. Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 270: 15671-15674.
5. Miquel J. 2001. Nutrition and ageing. *Public Health Nutrition* 4: 1385-1388.
6. Wei YH, Lee HC. 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 671-682.
7. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196.
8. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430: 686-689.
9. Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, Sari FR, Meilei H, Soetikno V, Arumugam S, Giridharan VV, Suzuki K, Kodama M. 2011. Curcumin attenuates hyperglycaemia-mediated AMPK activation and oxidative stress in cerebrum of streptozotocin-induced diabetic rat. *Free Radic Res* 45: 788-795.
10. Sreejayan N, Rao MN. 1996. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* 46: 169-171.
11. Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. 2002. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 959: 275-284.
12. Park SK, Page GP, Kim K, Allison DB, Meydani M, Weindruch R, Prolla TA. 2008. α - and γ -tocopherol prevent age-related transcriptional alterations in the heart and brain of mice. *J Nutr* 138: 1010-1018.
13. Lee CK, Pugh TD, Klopp RG, Edwards J, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA. 2004. The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Radic Biol Med* 36: 1043-1057.
14. Rosenfeldt FL, Pepe S, Linnane A, Nagley P, Rowland M, Ou R, Marasco S, Lyon W, Esmore D. 2002. Coenzyme Q10 protects the aging heart against stress: studies in rats, human tissues, and patients. *Ann N Y Acad Sci* 959: 355-359.
15. Lee JM, Kim SH. 2008. Antioxidant properties of acorn hot-water extract using response surface methodology. *Korean J Food Preserv* 15: 111-117.
16. Ryu HS. 2010. Effects of water extract acorn on mouse immune cell activation *ex vivo*. *Korean J Food & Nutr* 23: 135-140.
17. Kim BN. 1995. A study on the literature review of acorn in Korea. *Korea J Soc Food Sci* 11: 158-163.
18. Sung IS, Park EM, Lee MK, Han EK, Jang JY, Cho SY. 1997. Effect of acorn extracts on the antioxidative enzyme system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 494-500.
19. Lee SH, Kim DI, Cho SY, Jung HJ, Cho SM, Park HJ, Lillehoj HS. 2005. Effects of acorn (*Quercus acutissima* CARR.) supplementation on the level of acetylcholine and its related enzyme activities in the brain of dementia mouse model. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 738-742.
20. Peto R, Peto J. 1972. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *J R Statist Soc A* 135: 185-207.
21. Honda Y, Fujita Y, Maruyama H, Araki Y, Ichihara K, Sato A, Kojima T, Tanaka M, Nozawa Y, Ito M, Honda S. 2011. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6: e23527.
22. Kitani K, Yokozawa T, Osawa T. 2004. Interventions in aging and age-associated pathologies by means of nutritional approaches. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 424-426.
23. Hughes SE, Evason K, Xiong C, Kornfeld K. 2007. Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. *PLoS Genet* 3: e25.
24. Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. 1995. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139: 1567-1583.
25. Gems D, Sutton AJ, Sundermeyer ML, Albert PS, King KV, Edgley ML, Larsen PL, Riddle DL. 1998. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150: 129-155.
26. Min KJ, Lee CK, Park HN. 2012. The lifespan of Korean eunuchs. *Current Biology* 22: R792-R793.

(2013년 1월 14일 접수; 2013년 2월 22일 채택)