

곤달비의 수명 연장 효과

김상현 · 임준상 · 김봉석 · 임현주 · 오종우 · 박진석 · 윤영진 · 이하나 · 차동석 · 전 훈*
우석대학교 약학대학

Lifespan Extending Effects of *Ligularia stenocephala*

Sang Hyun Kim, Jun Sang Im, Bong Seok Kim, Hyun Ju Lim, Jong Woo Oh, Jin Suck Park,
Young Jin Yoon, Ha Na Lee, Dong Seok Cha, and Hoon Jeon*
College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea

Abstract – *Ligularia stenocephala* has a wide range of types of constituents with various pharmacological properties. Here in this study, we examined the effect of methanolic extract of *L. stenocephala* (MLS) on the lifespan and stress tolerance using *Caenorhabditis elegans* model system. We found that lifespan of wild-type worms was significantly lengthened in the presence of MLS in a dose dependent manner. MLS also elevated the tolerance of worms against osmotic, heat shock, and oxidative stress. We also demonstrated *in vivo* antioxidant capacity of MLS by checking intracellular reactive oxygen species levels as well as antioxidant enzyme activities such as catalase and superoxide dismutase. We further investigated several aging-related factors, including pharyngeal pumping rate and body length. Here, we showed that MLS exerts longevity effect independent of both factors. In addition, body movement of aged worms was significantly elevated, suggesting MLS could enhance health-span as well as lifespan.

Key words – *Ligularia stenocephala*, *C. elegans*, Lifespan extension, Stress tolerance

노화는 시간의 흐름에 따라 일어나는 세포, 조직, 기관 또는 유기체 전체에 일어나는 변화로써 각종 질병과 사망까지 연관된 과정이다. 노화를 방지하고 관련된 여러 질병을 치유하기 위해 인간은 끊임없이 노력해 왔으며, 인간의 평균수명은 점점 연장되고 있는 추세이다. 최근 노화와 건강에 대한 관심이 더욱 집중되면서 많은 과학자들이 노화의 기전에 관해 연구해왔고 그에 따라 free radical이 신체 내에서 일으키는 손상이 노화의 주요 요인이 된다는 산화적 스트레스 이론이 유력한 가설로 받아들여지고 있다.^{1,2)} Free radical은 하나 이상의 짝짓지 않은 전자단을 가지고 있는 입자로써 일반적으로 불안정하고 매우 반응성이 큰 것이 특징이다. 이러한 free radical은 우리가 호흡한 산소가 에너지를 만들고 물로 환원되는 체내 대사과정 중 발생되거나 스트레스, 자외선, 세균 침투등의 외부요인에 의해 생성되고 다양한 생화학적 역할을 수행하게 된다고 알려져 있다. 특히 superoxide anion radicals($\cdot O_2^-$), hydroxyl radicals($\cdot OH$),

hydrogen peroxide(H_2O_2) 그리고 singlet oxygen(1O_2)과 같은 세포내의 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 단백질, 지질 및 DNA의 산화적 스트레스를 강력하게 유발할 수 있으며 이는 노화의 주요 원인으로 여겨지고 있다.³⁾ 따라서 이러한 ROS를 제거하거나 또는 생성을 억제할 수 있다면 이는 노화를 늦추고 수명을 연장하게 할 수 있으며, 이는 여러 연구를 통해 증명되었다.^{4,7)}

본 연구에 사용된 곤달비(*Ligularia stenocephala*)는 국화과(Compositae)에 속하는 식물로서 한국, 일본, 대만 등 아시아 지역에 주로 분포되어 있으며 말리지 않은 잎을 식용으로 주로 사용하고 있다. 밝혀진 주요 성분은 terpenoids,⁸⁾ caffeoylquinic acid,⁹⁾ benzofuran^{10,11)}과 관련 화합물이다. 이중 caffeoylquinic acid 화합물의 항궤양 효과가 밝혀진 바 있다.⁹⁾ 그러나 현재까지 곤달비의 수명연장 효과나 노화에 미치는 영향 등에 대한 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 곤달비의 수명연장 효능을 밝히기 위해 *in vivo* 모델로써 *Caenorhabditis elegans*를 사용하였다. 예쁜꼬마선충이라고 불리는 *C. elegans*는 최근 노화와 노화 관련 질병에 관한 연구에 널리 사용되는 모델로서 다루기가 쉽

*교신저자(E-mail): jeonh@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1577

고 세대가 짧은 등 여러 가지 장점을 가지고 있다.¹²⁻¹⁶⁾ 또한 *C. elegans*는 종이 완전히 다름에도 불구하고 인간 유전자의 약 70% 정도를 가지고 있으며 유전자의 상동성도 약 40%에 이르기 때문에 발생, 세포 사멸 등의 기전이 인간과 매우 유사하여 노화 연구에 매우 좋은 모델이 된다. 기존의 문헌에 의하면 선충과 포유류는 산화적 스트레스(Oxidative stress)나 식이 제한(Caloric restriction)과 같은 노화 관련 인자 뿐만 아니라 근손실, 행동량 감소와 같은 노화 과정에 있어서도 매우 유사성을 보임이 밝혀졌다.^{2,17-19)}

본 연구에서는 곤달비의 수명연장 효능을 확인하기 위해 곤달비를 농도별로 처리한 선충의 수명을 측정하고 삼투압, 온도, 산화적 스트레스 조건에서 선충의 저항력을 조사하였다. 또한 선충 체내 ROS를 측정하여 곤달비의 항산화능을 확인하였으며 CAT, SOD와 같은 항산화 효소 활성을 측정하였다. 마지막으로 곤달비가 선충의 식이, 성장, 움직임과 같은 노화 관련 인자들에 영향을 미치는지 확인하였다.

재료 및 방법

재료 - 실험에 사용된 식물은 2011년 4월 전북 전주 소재의 한약업사에서 구입하였다. 건조 작업은 우석대학교 약학대학 한약학과에서 시행하였다. 건조된 샘플 600 g은 9 L의 100% methanol을 사용해 세 번 추출되었다. 추출은 50°C를 유지한 상태에서 초음파 추출기를 통해 이루어졌다. methanol 추출물은 회전식 농축기를 이용하여 33 g(수율:5.5%)으로 농축되었으며 이 샘플은 동결건조된 후 -20°C에 보관되었다.

예쁜꼬마선충 배양 - 본 연구에 사용된 예쁜꼬마선충인 *C. elegans*(N2:wild type)는 Caenorhabditis Genetic Center (CGC; University of Minnesota, Minneapolis, MN)로부터 제공받아 *E. coli* OP50를 도말한 Nematode Growth Medium (NGM) agar plate에 20°C에서 배양되었다.²⁰⁾ 곤달비는 10% DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plates에 첨가되었다. 최종 DMSO 농도는 0.1%(v/v) 이하를 유지하였다.

수명 측정 - Lifespan assay는 20°C에서 3회 실행되었다. 선충의 성장 단계를 일치시키기 위해 NGM plate로부터 egg만을 분리하여 각 농도별 plate(곤달비 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml)에 옮겨 배양하였고 매일 생존도를 확인하였다. 선충의 생존여부는 platinum wire의 끝으로 자극했을 때 반응을 통해 분석하였다.²¹⁾ 또한 선충은 2일마다 새로운 NGM plate로 옮겨 배양되었다.

스트레스 저항성 분석 - 성장 단계가 동일한 선충은 각 농도별 plate(곤달비 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml)에서 배양되었으며 삼투압 스트레스 저항성 분석을 위해 adult day 3에 500 mM NaCl NGM agar plate로 옮겨 12 h 후에 생존도를 측정하였다.²²⁾ 열 스트레스 저항성 분석은 adult day 4

에 깨끗한 NGM agar plate로 옮겨 36°C에서 배양한 후 매 시간마다 생존도를 측정하여 분석하였다.⁴⁾ 산화적 스트레스 저항성 분석을 위해서는 Adult day 7에 80 mM paraquat M9 buffer로 옮겨 매 시간마다 생존도를 측정하였다.²³⁾

항산화 효소 활성 측정 - Superoxide dismutase와 catalase 활성을 측정하기 위해 성장 단계가 동일한 선충은 각 농도별 plate(곤달비 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml)에서 배양되었다. Adult day 5에 M9 buffer로 3회 세척한 후 ice상에서 homogenize되어 샘플링되었다(homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5). 곤달비의 superoxide 소거능은 Ibrahim의 방법을 응용하여 측정하였다.²⁴⁾ 먼저 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)를 용매로 reaction mixture(1.6 mM xanthine과 0.48 mM NBT) 0.49 mL를 만든 뒤 sample 10 µl와 37°C에서 5분 동안 선 반응시켰다. 그 후 xanthine oxidase 1 mL(0.05 U/mL)을 첨가하고 37°C에서 다시 20분 동안 반응시켰다. 그 뒤 69 mM SDS로 반응을 멈추고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catalase activity는 Aebi의 방법을 응용하여 25 mM H₂O₂에 sample 50 µl를 반응시키고 5분 동안 240 nm로 흡광도를 측정하였다.²⁵⁾

세포내 ROS 분석 - Intracellular ROS는 2',7-dichlorodihydro fluoroscein diacetate(H₂DCF-DA)를 사용해 측정되었다. 성장 단계가 동일한 선충은 각 농도별 plate(곤달비 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml)에서 배양되었다. 이는 Adult day 4에 60 mM paraquat에 3시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 µL M9 buffer에 5마리씩 옮겨졌다. 마지막으로 25 µM H₂DCF-DA 50 µL를 첨가한 뒤 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 2시간 동안 흡광도를 측정하였다.

***C. elegans*의 노화 관련 인자 측정** - 성장 단계가 동일한 선충은 각 농도별 plate(곤달비 0 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml)에서 배양되었다. 그 후 Adult day 4, 8에 각각 깨끗한 NGM plate로 옮겨 1분 동안 인두의 움직임을 측정하였다. 한편, Adult day 1, 4에는 깨끗한 NGM plate로 옮겨 크기를 측정하였다. 또한 Adult day 8에 깨끗한 NGM plate로 옮겨 20초 동안 선충이 움직인 거리를 실체현미경과 이미지 분석 프로그램을 사용하여 측정하였다.

통계 분석 - 통계 자료의 값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M. Data)로 표시하였다. 유의성 검증은 Student's *t*-test, 혹은 Log-rank test 분석 방법을 이용하였고, *p*값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있다고 간주하였다.

결과 및 고찰

곤달비는 우리가 흔히 식용으로 사용하는 곰취와 비슷한 국화과의 식물로서 민간에서는 혈액순환에 좋다고 알려져

있고, 기침이나 천식, 당뇨등의 질병에 치료약으로 사용되기도 했다. 그러나 현재까지 곤달비의 노화 억제에 관한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 예쁜꼬마선충을 이용해 곤달비의 수명연장 효능을 밝히기 위한 연구를 수행하였다. 예쁜꼬마선충은 수명과 세대가 짧고 다루기 쉬우며¹⁶⁾ 포유류와도 많은 구조적, 유전자적 유사성을 지니고 있기 때문에^{2,18,19)} 인간 노화 억제를 위한 연구를 위한 좋은 동물 모델이 될 수 있다.^{26,27)}

곤달비의 수명 연장에 대한 효과를 검증하기 위해 먼저 lifespan assay를 수행한 결과 곤달비는 선충의 수명을 농도 의존적으로 각각 10.0%, 15.9%증가시켰다(Fig. 1, Table 1). 그러나 control group에 비해 곤달비 500 µg/ml group의 평균수명이 오히려 감소했는데(Table 1) 이는 곤달비 500 µg/ml 농도에서 선충에 독성이 있음을 나타낸다. 수명 연장 효

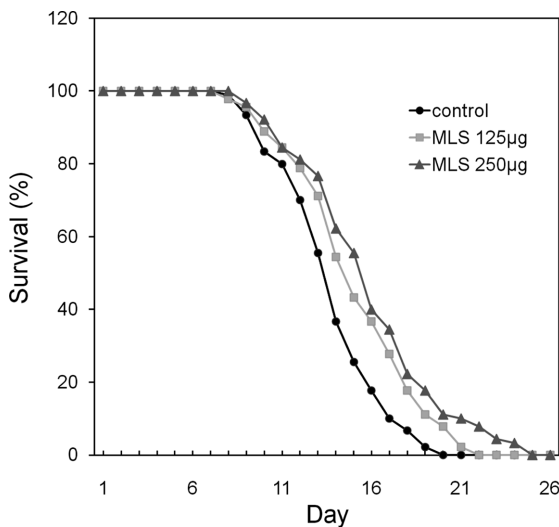


Fig. 1. Effects of MLS on the lifespan of wild-type N2 nematodes. Worms were grown in the NGM agar plate at 20°C in the absence or presence of MLS. The number of worms used per each lifespan assay experiment was 40 and three independent experiments were repeated (N=3). The mortality of each group was determined by daily counting of surviving and dead animals. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test.

Table I. Effects of MLS on the Lifespan of wild-type N2 nematodes

Treatment (µg/ml)	Mean lifespan	Maximum lifespan	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Control	13.8 ± 0.3	19	-	-
MLS 125	15.2 ± 0.4	21	10.0	$P < 0.001^{***}$
MLS 250	16.0 ± 0.4	25	15.9	$P < 0.001^{***}$
MLS 500	13.8 ± 0.3	17	-11.8	$P = 0.098$

Mean lifespan presented as mean±S.E.M. data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at $^{***}p < 0.001$.

과는 스트레스 저항성의 증가와 관련이 있는 경우가 많기 때문에,²⁸⁾ 본 연구에서는 곤달비가 선충의 스트레스 저항성을 증가시키는지 실험을 통해 확인하였다. 먼저 삼투압 스트레스 저항성에 곤달비가 미치는 영향을 알아보기 위해 고농도의 NaCl이 포함된 plate에서 선충을 배양하여 생존도를 분석한 결과, 곤달비는 선충의 삼투압 스트레스 저항성 향상에 뛰어난 효과를 보였다(Fig. 2A). 또한 생존률은 농도 의존적으로 증가하였으며(15.8%, 70.0%, 88.3%) control group에 비교하여 큰 유의성을 보였다($^{**}p < 0.01$). 다음으로 곤달비가 선충의 열자극 스트레스 저항성에 미치는 영향을 알아보기 위해 선충을 36°C에서 배양하고 생존도를 시간대별로 확인하였다(Fig. 2B). 실험 결과 곤달비는 열자극 조건에서 농도 의존적으로 생존시간을 늘리는 효과를 보였다(7.1, 8.5, 10.0 시간). 마지막으로 지질과산화물 일으켜 조직에 손상을 일으키게 하는 paraquat을 이용하여 곤달비가 *C. elegans*의 산화적 스트레스 저항성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다(Fig. 2C). 실험 결과 80 mM paraquat NGM plate에서 control group의 평균 생존시간은 11.0 시간인데 반해 곤달비군은 저농도와 고농도에서 각각 12.2, 13.7 시간으로 농도 의존적으로 증가했다. 이러한 결과는 곤달비의 수명 연장효과가 stress resistance의 증가와 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

기존의 연구에 의하면, ROS로 인한 산화적 자극은 다양한 기전을 거쳐 노화를 가속화 한다고 알려져 있다.²⁹⁾ 따라서 본 연구에서는 곤달비의 항산화능이 선충에 미치는 영향을 확인하기 위해 SOD와 CAT의 활성 측정실험을 수행하였다. 선충 homogenate의 소거능을 정량하여 곤달비가 선충의 SOD와 catalase 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3A, B). 본 실험에서 곤달비는 SOD의 활성을 control 대비 215.8%, 239.5% 증가시켰으며 catalase의 항산화 활성을 또한 크게 증가시켰다(각각 2.06, 4.30, 9.45 U/protein). 다음으로 곤달비가 실제로 세포 내 ROS를 감소시키는지 알아보기 위해 H₂DCF-DA와 선충 세포 내부의 ROS를 반응시켜 2시간동안 30분 간격으로 형광을 측정하였다. 실험 결과 control에 비해 시간에 따른 형광의 증가가 곤달비 투여에 의해 현저하게 감소됨이 확인 되었다(Fig. 3C). 이러한 결과

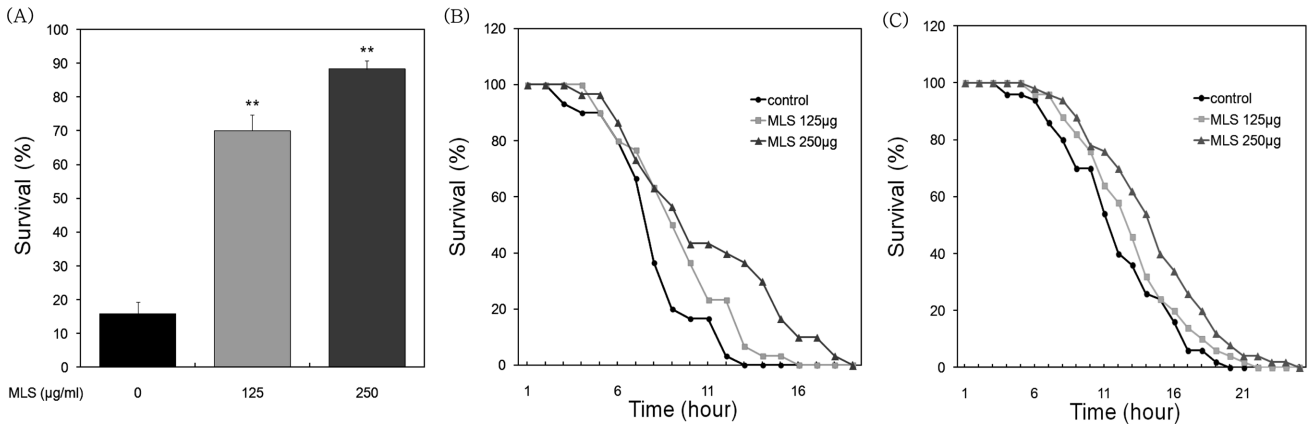


Fig. 2. Effects of MLS on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. (A) Resistance to osmotic stress was measured by placing worms to NGM agar plate containing 500 mM NaCl and survival rate was calculated after 12 h incubation. (B) To assess thermal tolerance, worms were incubated at 36°C and then their viability was scored. (C) For the oxidative stress assays, worms were transferred to NGM agar plate containing 80 mM of paraquat, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. Error bars represent the standard error of mean (S.E.M.). Differences compared to the control were considered significant at $**p < 0.01$ by one-way ANOVA.

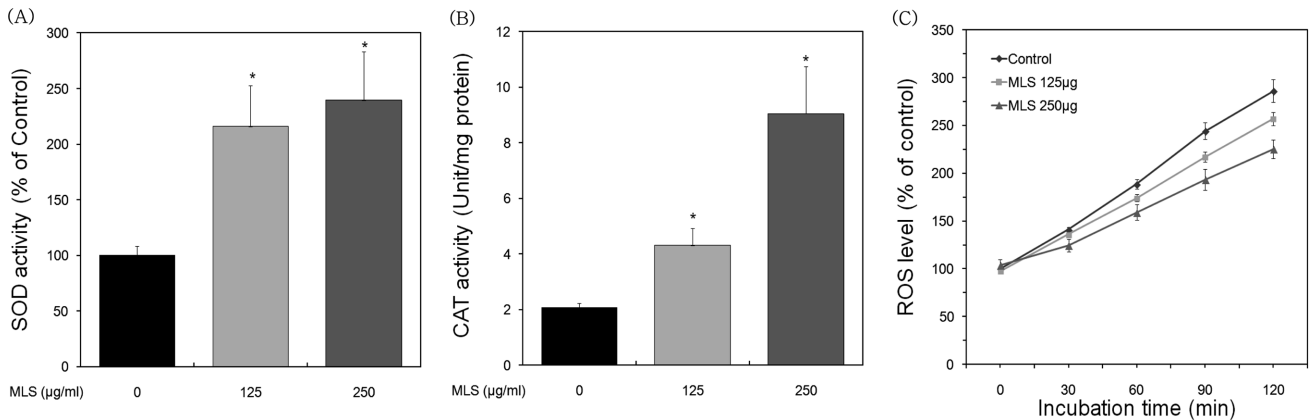


Fig. 3. Effects of MLS on the antioxidant enzyme activity and intracellular ROS accumulation of wild-type N2 nematodes. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was estimated spectrophotometrically through formazan formation by NBT reduction. SOD activity was expressed as a percentage of the scavenged amount per control. (B) Catalase activity was calculated from the concentration of residual H_2O_2 , as determined by a spectrophotometric method. Catalase activity was expressed in U/mg protein. (C) The worms were incubated with 60 mM paraquat for 3 h, and subsequently treated with the uorescent probe $H_2DCF-DA$. Intracellular ROS accumulation was quantified spectrometrically at excitation 485 nm and emission 535 nm. Plates were read every 30 min for 2 h. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (N=3).

를 통해 곤달비는 항산화 효소 활성화를 통해 세포 내 ROS의 농도를 감소시키는 효과가 있으며, 곤달비의 이러한 항산화 활성은 수명 연장 효과와 관련이 있을 것으로 예상된다.

기존 연구에 따르면 식이섭취, 성장 등의 노화 관련 인자들은 수명과 반비례 관계에 있는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ 본 연구에서는 곤달비의 수명연장 효과가 노화 관련 인자들과 관련이 있는지 알아보기 위해서 선충의 인두 움직임과 선충의 길이 등을 분석하였다(Fig. 4A). 선충의 인두 움직임을 측정 한 결과 adult day 4에 비해 노화가 진행 된 adult day 8에 인두 움직임이 감소되는 경향을 보였으며, 곤달비

가 투여된 선충은 adult day 4,8 모두에서 control과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 성장 정도를 측정한 실험에서도 adult day 1, 4에서 모두 각 group간의 유의적인 차이가 보이지 않았다(Fig. 4B). 이러한 결과는 곤달비가 노화관련인자의 조절을 통해서 선충의 수명을 연장하는 것이 아님을 나타낸다.

노화에 따른 선충의 행동량 감소는 인간의 그것과 매우 비슷한 양상을 보인다.¹⁸⁾ 본 연구에서는 곤달비가 단순히 수명만을 연장시키는지 아니면, 선충이 건강하게 살 수 있는 시간을 연장시키는지 알아보기 위해서 선충의 운동량 변화

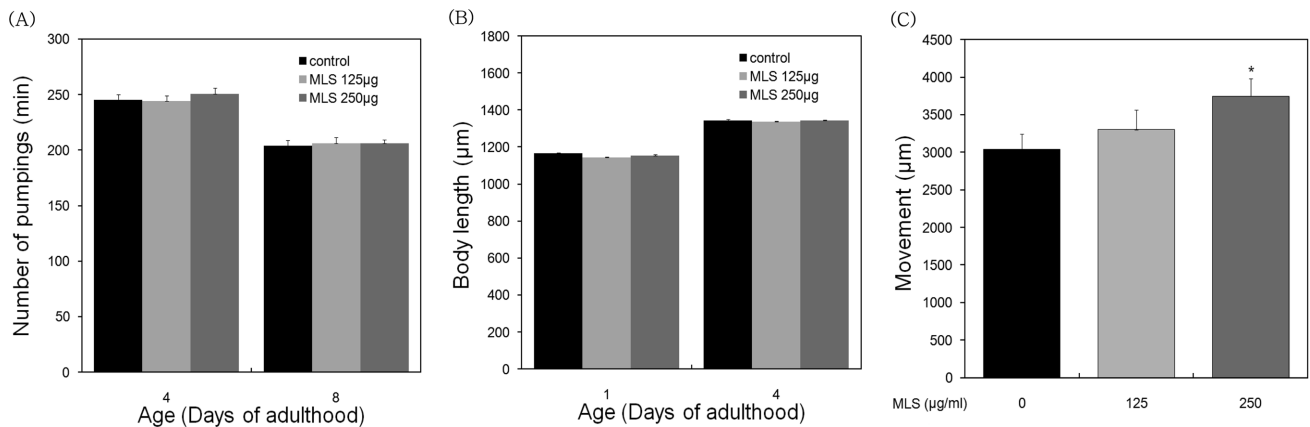


Fig. 4. Effects of MLS on the various aging-related factors of wild-type N2 nematodes. (A) On the 4th and 8th days of adulthood, the pharyngeal pumping rates were counted under a dissecting microscope for 1 min. (B) For the growth alteration assay, photographs were taken of worms and the body length of each animal was analyzed on the 4th and 8th days of adulthood. (C) On the 8th day, body movement were counted under a dissecting microscope for 1 min. Data are expressed as the mean±S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at $*p<0.05$ by one-way ANOVA.

를 측정하였다(Fig. 4C). 선충의 노화가 진행되어 움직임이 확연히 줄어드는 adult day 8에 운동량을 측정한 결과 control에 비해 곤달비 투여에 의해 선충의 활동량이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다(각각 8.8%, 23.4%, $*p<0.05$). 이러한 결과는 곤달비가 건강한 상태로 수명을 연장시키는 항노화 효과가 있음을 나타낸다.

이상의 결과로 곤달비가 예쁜꼬마선충의 수명을 효과적으로 증가시키고, 이는 스트레스 저항성의 향상 및 항산화 효소활성의 증가에 따른 체내 ROS 감소에 따른 결과임이 확인되었다. 또한, 곤달비의 수명연장 효과는 식이, 성장 등의 노화관련인자의 변화와는 관련이 없다는 것을 알 수 있었다. 곤달비는 노화 선충의 운동량을 유의적으로 증가시켜 수명연장의 질적인 측면에서도 유의함이 확인되었다. 향후 추가적인 연구를 통해 곤달비의 수명연장 기전을 밝히려는 노력이 필요할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Bokov, A., Chaudhuri, A. and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 811-826.
2. Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
3. Oliveira, B. F., Nogueira-Machado, J. A. and Chaves, M. M. (2010) The role of oxidative stress in the aging process. *Scientific World Journal* **10**: 1121-1128.
4. Wu, Z., Smith, J. V., Paramasivam, V., Butko, P., Khan, I., Cypser, J. R. and Luo, Y. (2002) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **48**: 725-731.
5. Ishii, N., Senoo-Matsuda, N., Miyake, K., Yasuda, K., Ishii, T., Hartman, P. S. and Furukawa, S. (2004) Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 41-46.
6. Adachi, H. and Ishii, N. (2000) Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55**: B280-285.
7. Harrington, L. A. and Harley, C. B. (1988) Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **43**: 71-78.
8. Yaoita, Y., Kikuchi, M., and Machida, K. (2012) Terpenoids and related compounds from plants of the family Compositae (Asteraceae). *Nat. Prod. Commun.* **7**: 533-538.
9. Lee, B. I., Nugroho, A., Bachri, M. S., Choi, J., Lee, K. R., Choi, J. S., Kim, W. B., Lee, K. T., Lee, J. D. and Park, H. J. (2010) Anti-ulcerogenic effect and HPLC analysis of the caffeoylquinic acid-rich extract from *Ligularia stenocephala*. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 493-497.
10. Toyoda, K., Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (2005) Three new dimeric benzofuran derivatives from the roots of *Ligularia stenocephala* MATSUM. et KOIDZ. *Chem. Pharm. Bull.* **53**: 1555-1558.
11. Yan, F. L., Wang, A. X. and Jia, Z. J. (2005) Three new polymeric isopropenyl benzofurans from *Ligularia stenocephala*. *Pharmazie* **60**: 155-159.
12. Tazearslan, C., Ayyadevara, S., Bharill, P. and Shmookler Reis, R. J. (2009) Positive feedback between transcriptional and kinase suppression in nematodes with extraordinary longevity and stress resistance. *PLoS Genet.* **5**: e1000452.
13. Golden, T. R. and Melov, S. (2007) Gene expression changes associated with aging in *C. elegans*. *WormBook* 1-12.
14. Antebi, A. (2007) Ageing: when less is more. *Nature* **447**:

- 536-537.
15. Brown, M. K., Evans, J. L. and Luo, Y. (2006) Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **85**: 620-628.
 16. Guarente, L. and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408**: 255-262.
 17. Lakowski, B. and Hekimi, S. (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 13091-13096.
 18. Herndon, L. A., Schmeissner, P. J., Dudaronek, J. M., Brown, P. A., Listner, K. M., Sakano, Y., Paupard, M. C., Hall, D. H. and Driscoll, M. (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* **419**: 808-814.
 19. Glenn, C. F., Chow, D. K., David, L., Cooke, C. A., Gami, M. S., Iser, W. B., Hanselman, K. B., Goldberg, I. G. and Wolkow, C. A. (2004) Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59**: 1251-1260.
 20. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
 21. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E. (1995) Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 7540-7544.
 22. Horikawa, M. and Sakamoto, K. (2009) Fatty-acid metabolism is involved in stress-resistance mechanisms of *caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**: 402-407.
 23. Mekheimer, R. A., Sayed, A. A. and Ahmed, E. A. (2012) Novel 1,2,4-*s*-triazolo [1,5-*a*] pyridines and their fused ring systems attenuate oxidative stress and prolong lifespan of *caenorhabditis elegans*. *J. Med. Chem.* **55**: 4169-4177.
 24. Ibrahim, H. R., Hoq, M. I. and Aoki, T. (2007) Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**: 631-640.
 25. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
 26. Collins, J. J., Evason, K. and Kornfeld, K. (2006) Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* **41**: 1032-1039.
 27. Petrascheck, M., Ye, X. and Buck, L. B. (2007) An antidepressant that extends lifespan in adult *caenorhabditis elegans*. *Nature* **450**: 553-556.
 28. Kenyon, C. J. (2010) The genetics of ageing. *Nature* **464**: 504-512.
 29. Kampkotter, A., Gombitang Nkwonkam, C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Watjen, W. and Kahl, R. (2007) Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *caenorhabditis elegans*. *Arch. Toxicol.* **81**: 849-858.
 30. Partridge, L., Gems, D. and Withers, D. J. (2005) Sex and death: What is the connection? *Cell* **120**: 461-472.
- (2015. 1. 26 접수; 2015. 2. 25 심사; 2015. 3. 2 게재확정)