J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 3, pp. 213~217 (2007)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

복분자 추출물이 LPS로 유도된 산화적 스트레스와 지질대사에 미치는 영향

김인덕 · 강금석 · 권륜희 · 양정옥[1] · 이중숙[1] · 하배진*
신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, [1]체육학부

The Effect of *Rubus coreanum* Miquel Against Lipopolysaccharide-induced Oxidative Stress and Lipid Metabolism

In Deok Kim, Kum Suk Kang, Ryun Hee Kwon, Jeong Ok Yang[1], Joong Sook Lee[1], and Bae Jin Ha*
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
[1]Department of Physical Therapy, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
(Received July 16, 2007/Accepted August 26, 2007)

ABSTRACT – LPS induces the synthesis of several inflammatory cytokine, chemokine, NO and inflammation in the liver of rats. The purpose of this study was to investigate the preventive effects of *Rubus coreanum* Miquel (RCM) in lipid metabolism. RCM of 100 mg/kg concentration was intraperitoneally administered into rats at dose of 1.5 ml/kg for 20 days. On the day 21, 1.5 ml/kg of LPS was injected 4 hours before anesthetization. We examined the lipid-related functions by measuring the levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), total lipid (TL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum and malondialdehyde (MDA) in liver tissue. The results showed that LPS treatment increased the values of TG, TC, TL and MDA, decreasing that of HDL-C. But RCM pretreatment decreased the high values of TG, TC, TL and MDA to the low values and increased the low value of HDL-C to the high value. These results suggested that RCM could be used as the potential candidate for the lipid metabolism natural supplement.

Key words: *Rubus coreanum* Miquel, lipopolysaccharide, MDA, HDL-C, Total lipid

서 론

생약재는 우리나라를 비롯한 동양권에서 오랜 기간 질병의 치료및 예방목적으로 사용되어 왔으며, 생약재의 2차 대사산물들이 생체에 대한 생리 활성을 나타내면서 많은 천연자원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생약재들 중의 복분자 (*Rubus coreanum* Miquel)는 우리나라 남부에서 야생하는 과실 생약으로, 식용으로 이용되고 있다. 뿐만 아니라 예로부터 한방에서 신장기능, 불임증, 음위증, 유정몽설, 강장제로 쓰였으며 혈액과 눈을 맑게 해주며 간을 보호하는 효능을 가지고 있다고 알려져 있다[1,2]. 복분자 나무에 관한 연구로는 잎과 줄기로부터 tannin 및 flavonoids 화합물 등이 보고된 바 있으며[3-5], 미숙 복분자 열매에서 gallic acid, 2,3-(s)-HHDP-D-glucopyyranose, sanguin이 보고된바 있다[6]. 복분자 추출물은 인간 면역체계에서 항체생성에 중요한 역할을 하는 인간 B세포와 T세포주의 생육을 촉진하다고 알려져 있다[7].

산화적 스트레스를 일으키는 물질인 Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 세포벽에 존재하는 구성물질의 일종이다. 대식세포(MØ)나 단핵구의 활성으로 인한 cytokine의 분비작용의 원인이 되는 물질로 열, 시상하부, 부신피질 등의 활성을 유도하여 감염이나 염증을 유발하기도 한다[8]. LPS-binding protein와 결합되어 MØ CD14에 인식되어져 패혈성 쇼크가 일어나기도 하며[9], inducible nitric oxide synthase의 유전자를 활성화 시켜 NO의 생성을 증가시킨다[10]. NO는 MØ 활성으로 인한 산물로 oxygen radical과 더불어 강력한 항 미생물 작용을 하며 NO가 생성될 때 Ca^{2+}의 농도증가로 인해 superoxide anion (O_2^-)과 H_2O_2가 함께 생성되며 산화력이 강한 OH^-로 연쇄반응을 일으켜 세포 조직에 영향을 주어 직간접적으로 조직의 노화를 초래한다[11]. 이러한 radicals는 간 세포의 지질막을 공격하여 급성 지방 변성 및 지방축적을 야기하고[12], 간 독성을 통한 세포의 파괴를 가져온다[13]. 그 결과 지질 대사 및 산화적 스트레스를 일으킨다고 할 수가 있다.

*Correspondence to: Bae Jin Ha, Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, 1-1 San, Gwaebup-dong, Sasang-gu, Busan, 617-736, Korea
Tel: 82-51-999-5466, Fax: 82-51-999-5684
E-mail: bjha@silla.ac.kr

지질 대사는 또한 노화과정과 관계를 가지고 있다. 활성산소가 지질뿐만 아니라 단백질과 DNA같은 핵산까지 공격의 대상이 되면서 산화적 스트레스의 결과로서 과산화 지질(lipid peroxide), 산화단백질(oxidized protein) 및 변이(mutation)를 유발하면서 노화를 촉진한다.[14,15]이들 중에서 가장 중요한 인자가 바로 지질대사로서 혈액중의 중성지질, LDL-콜레스테롤을 억제하는 항콜레스테롤 인자 (anti-cholesterol factor)인 HDL-cholesterol 로 밝혀지고 있다.[16,17]

본 연구는 각종 성인병에 관련된 효소들의 활성을 검색하여 이들에 대한 복분자 추출물의 이용 및 부가가치를 높이고자 하여 LPS로부터 유도된 산화적 스트레스 및 지질대사에 대한 효과를 혈청중의 지질 함량과 과산화지표로 검증함으로써 복분자 추출물의 효능을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

복분자 열매는 2006년 5월경 부산 구포시장의 약재상에서 국산인 것을 확인하여 구입하였다.

실험동물 및 식이

실험동물은 체중 170~180 g 내외의 생후 7주 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 대구 효창 사이언스로부터 제공받았고 7일 동안 적응시켰다. 실험흰쥐는 난괴법에 따라 총 21마리를 7마리씩 3군으로 나누었고 군별로 cage에 분리시키고 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다(Table 1). Auto Control System기기(SS-2000, daejong, Korea)를 사용하여 22±1°C의 온도와 60±5% 상대습도로 유지시켰다. 정상군(NOR; normal group)은 21일 동안 1.5 ml/kg of 0.9% saline을 투여하였다. 대조군(CON; LPS-treated group)의 경우 20일 동안 1.5 mg/kg of 0.9% saline을 매일 투여한 후 21일째 되는 날 LPS를 5 mg/kg의 농도로 만들어 1 ml/kg의 용량으로 복강 내로 투여하였다. 또한 시료군(RCM; *Rubus coreanum* Miquel extract and LPS-treated group)은 100 mg/kg의 농도로 복분자 추출물을 만들어 1.5 ml/kg의 용량으로 매일 투여한 후 21일째 되는 날 LPS를 5 mg/kg의 농도로 만들어 1 ml/kg의 용량으로 복강 내로 투여하였다. 대조군과 시료군에서 실험동물의 지질대사 이상 및 산화적 스트레스를 유발시켰다. LPS를 투여하고 절식 시킨 뒤 4시간 후에 ether로 마취하고 희생시켜서 혈액을 채취하고 간을 적출하여 실험하였다.

복분자 시료의 제조

복분자의 건조중량의 100 g을 1 L의 증류수에 환류냉각을 통해 8시간 동안 추출한 다음 evaporator를 이용하여 추출물을 농축한 뒤 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

혈액 채취 및 간 적출

시료 투여 기간 종료 후 실험동물을 ether 마취 하에서 개복한 후 심장으로부터 채취한 각 혈액은 헤파린 관으로 옮긴 후, 상온에서 30분간 반응시켜 원심분리기(Mega17R, Hanil, Korea)를 사용하였다. 800에서 10분간 혈액을 원심분리하여 혈청을 분리해 사용하였다. 간 4엽을 전부 적출하여 0.9% 생리 식염수로 세척 여지로 흡착한 후 -70°C deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다. 간 무게 5배의 PBS (pH 7.4)을 넣어 균질화한 후 800×G, 4°C에서 10 min 원심 분리하여 얻은 상등액으로 실험에 사용하였다.

실험 방법

Triglyceride (TG)의 측정 – 혈청 중의 중성지질로서 트리글리세리드(triglyceride)의 함량은 TG킷트 시약 (Triglyceride kit, Young Dong, Korea)을 사용하여 분석하였다. 혈액분석기를 통해 혈청의 10 ul을 사용하여 kit를 통해 함량을 측정하였다.

Total Lipid의 측정 – 혈청 중의 지질 함량을 측정하는 것으로 혈청의 0.1 ml에 H_2SO_4 2 ml을 가한 후 100°C에서 10분간 가열을 처리하였다. 가열 후 냉각과정을 거치고 100 ul를 취하여 phospho-vanillin reagent를 5 ml 첨가하여 준다. 37°C에서 15분간 가열 방치 후 분광광도계(Uvikon-xs, Bio-Tek, Italy)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total-cholesterol의 함량 측정 – 혈청 중에 총 콜레스테롤의 함량의 측정은 킷트 시약으로(cholesterol kit no. BC

Table 1. Experimental design of rats

Experimental group	day 1-20	day 21
	dose of sample	dose of sample
NOR (7)	1.5 ml/kg of 0.9% saline, i.p	1.5 ml/kg of saline, i.p.
CON (7)	1.5 ml/kg of 0.9% saline, i.p	1.5 ml/kg of LPS (5 mg/kg), i.p.
RCM (7)	1.5 ml/kg of *Rubus coreanum* Miquel fraction (100 mg/kg), i.p.	

NOR : normal group, CON : LPS-treated group, RCM : *Rubus coreanum* Miquel-pretreated and LPS-posttreated group.
The number of experiment animals is given in parenthesis.
i.p. : intraperitoneally, LPS : Lipopolysaccharide.

108-E, Young Dong, Korea)을 사용하여 분석하였다. 혈액 분석기를 통해 혈청의 10 ul을 사용하여 kit를 통해 함량을 측정하였다.

HDL-cholesterol의 측정 – 혈청 중의 HDL-콜레스테롤 함량의 측정은 킷트 시약(HDL-cholesterol kit no. A308-HDL, Young Dong, Korea)을 사용하여 측정하였다. 시료의 전처리 과정으로 혈청과 침전시약을 반응시켜 10분간 방치 후 3000 rpm에서 침전시킨 후 상등액을 채취하여 혈액분석기를 통해 함량을 측정하였다.

Malon dialdehyde(MDA)의 측정 – 간 조직에서의 지질 과산화 정도를 특정 하는 지표로서 Ha의 방법[18]으로 측정하였다. 분광광도계(Uvikon-xs, Bio-Tek, Italy)로 535 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 SPSS를 이용한 ANOVA로 검정하였다.

결과 및 고찰

Triglyceride (TG)에 미치는 영향

TG는 생체 내에서 에너지 저장형태로 존재하지만 성인병(chronic degenerative disease) 발병 원인물질의 하나로 알려져 있다. 이러한 TG는 정상적으로 체내에 존재할 경우에는 문제가 되지 않지만 과량으로 축적되면 성인병을 비롯한 각종 질병에 걸리기 쉬워진다. 본 실험에서는 복분자 추출물을 선투여하고 LPS를 후투여하여 TG 대사 장애에 대한 복분자 추출물 보호효과를 보았다. TG 함량에 미치는 복분자 추출물의 효과는 Fig. 1에 나타내었다. LPS를 투여하여 지질대사에 장애가 일어난 대조군은 LPS를 투여하지 않은 정상군에 비해 TG 함량이 3.9배 증가하였고, 복분자 추출물 투여군의 경우 대조군에 비해 56.4%정도의 억제효과를 나타낸 것으로 보아 지질 축적으로부터 예방하는 효과를 가질 수 있었다.

Total Lipid에 미치는 영향

Total lipid의 경우 혈청안에 들어 있는 지질의 함량을 측정하는 것으로 함량이 높을수록 고지혈증, 동맥경화, 지방간으로 이어지며 부작용을 일으킨다. Fig. 2에서 보는 것과 같이 정상군에 비해 대조군의 경우 1.67배의 지질 함량이 증가함을 보았다. 대조군은 지질 함량의 증가로 성인병이 유발될 수 있는 조건이 되었으나, RCM 투여군의 경우 대조군에 비해 59.2%의 억제 효과를 보여 줌으로서 복분자 추출물의 총 지질 함량이 개선됨을 볼 수 있었다.

Total-cholesterol에 미치는 영향

Total cholesterol은 인체의 여러 조직에서 만들어지나 주로 간에서 생성된다. 혈중 cholestrol의 증가는 비만, 동맥경화, 고혈압 등의 심혈관 질환과 당뇨병 지방대사 장해 등을 일으킨다. 복분자의 투여에 의한 혈청 중의 총콜레스테롤의 함량은 비교하여 보면 Fig. 3와 같다. 총 콜레스

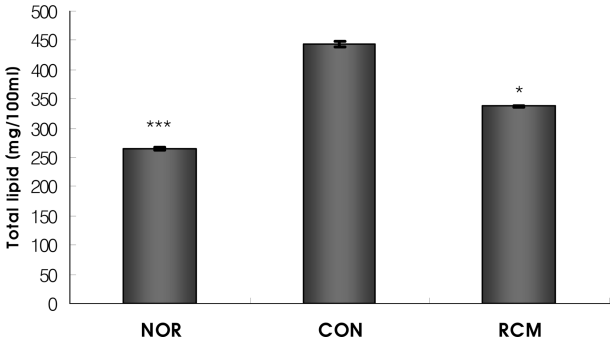

Fig. 2. Effects of RCM fractions on total lipid activities in LPS-treated rat. NOR: normal group, CON: LPS-treated group, RCM: *Rubus coreanum* Miquel-pretreated and LPS-posttreated group. ***p<0.001, *p<0.05 values are mean ± SE (n=7)

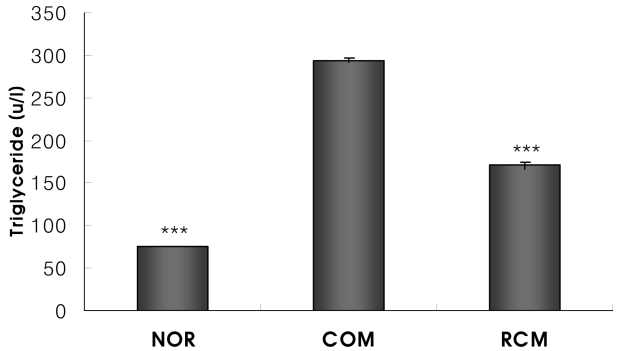

Fig. 1. Effects of RCM fractions on TG activities in LPS-treated rat. NOR: normal group, CON: LPS-treated group, RCM: *Rubus coreanum* Miquel-pretreated and LPS-posttreated group, ***p< 0.001 value are mean ± SE (n=7).

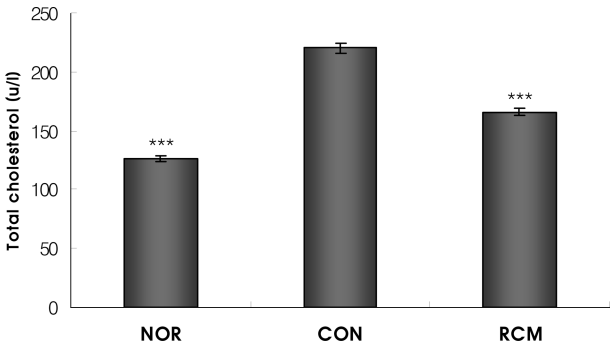

Fig. 3. Effects of RCM fractions on TC activities in LPS-treated rat. NOR: normal group, CON: LPS-treated group, RCM : *Rubus coreanum* Miquel-pretreated and LPS-posttreated group. ***p< 0.001 value are mean ± SE (n=7).

테롤의 측정의 경우 정상군에 비해 대조군은 1.74배로 콜레스테롤 함량이 증가되어 지질 대사의 장해를 유발하였다. 복분자 투여군의 경우 대조군에 비해 57.4%로 감소됨으로 인해 지질 대사 장애로부터 예방효과를 나타냈었다.

HDL-cholesterol (HDL-C)에 미치는 영향

콜레스테롤에는 좋은 콜레스테롤로서 HDL (high density lipoprotein) - 콜레스테롤이 있으며 혈관벽에 침착하여 동맥경화를 유발하고 협심증이나 뇌졸중 등의 성인병 유발을 억제하는 콜레스테롤이다. Fig. 4에서 보면 정상군과 비교시 LPS 투여한 대조군의 경우 2.62배 감소하였다. HDL 콜레스테롤의 감소는 혈중의 지질 함량을 증대시켜 각종 성인병을 유발시킨다. 그에 비해 RCM을 투여한 군의 경우는 대조군에 비해 81.6% 예방 효과를 보임으로서 복분자 추출물의 유효성을 볼 수 있었다.

Malondialdehyde (MDA)에 미치는 영향

과산화 지질 반응은 여러 가지 독성화합물과 약물에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있으며, 조직의 손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화 등과 같은 여러 가지 유해 작용에 관련 한다. 이러한 과산화 지질 반응의 최종산물인 MDA농도를 각 군 혈장에서 측정하였다. 혈중 과산화 지질 농도의 감소는 혈중에 존재하는 지질농도에 관계한다고 알려지고 있고 항산화작용을 하는 성분이 많이 존재할 때도 관계가 있는 것으로 알려져 있다[19-22].

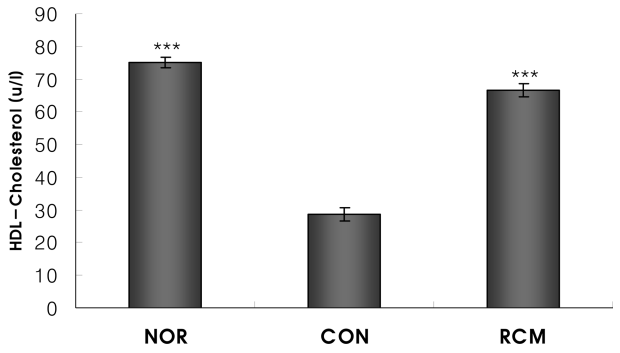

Fig. 4. Effects of RCM fractions on HDL-C activities in LPS-treated rats. NOR: normal group, CON: LPS-treated group, RCM : *Rubus coreanum* Miquel-pretreated and LPS-posttreated group. ***p<0.001 value are mean ± SE (n=7).

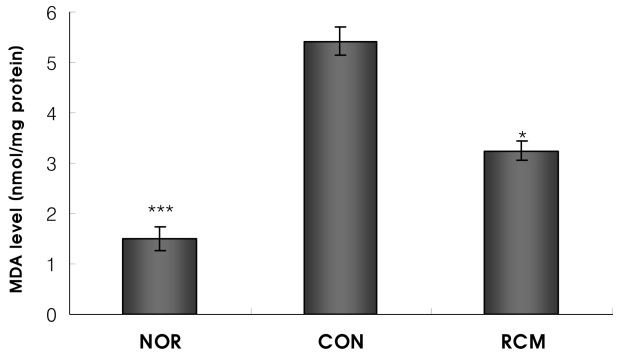

Fig. 5. Effects of RCM fractions on MDA activities in LPS-treated rats. NOR: normal group, CON: LPS-treated group, RCM : *Rubus coreanum* Miquel-pretreated and LPS-posttreated group. ***p<0.001, *p<0.05 values are mean ± SE (n=7).

Fig. 5의 결과를 보면 복분자는 지질대사에 개선효과를 가지는 것으로 나타났고, 혈중 지질농도와 콜레스테롤을 억제하는 것으로 나타났다. 간 조직에서의 MDA 활성 정도는 대조군에서 정상군에 비해서 약 1.74배 정도로 높게 나타남으로서, LPS로 인한 지질 과산화를 확인할 수 있었다. 선 투여된 RCM군은 대조군에 비해 57.4%의 억제효과보임으로써 생체내의 노화를 억제할 수 있는 효과를 볼 수 있었다.

요 약

복분자 (*Rubus coreanum* Miquel)는 우리나라 남부에서 야생하는 과실 생약으로, 식용으로 이용되고 있다. 예로부터 한방과 민간에서 맹안, 태생, 지사, 음위, 강장, 그리고 양모 등에 약재로 이용하고 있다. 뿐만 아니라 예로부터 한방에서 신장기능, 불임증, 음위증, 유정몽설, 강장제로 쓰였으며 혈액과 눈을 밝게 해주며 간을 보호하는 효능을 가지고 있다고 알려져 있다.

LPS는 그람양성균의 세포벽을 만드는 물질의 일종으로 NO를 생성시키고 Ca^{2+}를 증가시키며 free radicals를 형성하여 간 조직의 막을 파괴하고 간의 지방을 축적시키고 노화를 촉진하는 역할을 한다. 그래서 복분자의 산화적 스트레스로부터의 지질개선효과를 알아보기 위해서 정상군, 대조군, 시료군 (RCM)군으로 분류하여 20일간 매일 같은 시간 내에 선 투여하고 21일째 되는 날 LPS를 4시간 전에 투여하여 그 독성이 가장 강할 때 해부를 하여서 활성도를 혈액 및 간 조직에서의 효소 활성의 변동을 평가하였다.

중성지방 (TG)의 에너지의 저장 형태로 존재하는 지방이다. 이는 안정한 물질로 몸에 축적된다. 하지만 과도할 경우 각종 성인병을 일으키는 요인으로 작용을 한다. 정상군에 비해 대조군의 경우 3.9배 증가하였으며 이는, 몸에 지질이 쌓이게 되어 성인병으로 이어지는 원인이 된다. 그에 비해 RCM을 투여한 군의 경우 56.4%로의 지질함량을 억제효과를 알 수 있었다.

총 지질 (Total lipid)는 혈청안에 있는 지질함량을 측정하는 방법으로 함량이 높을 수록 고지혈증, 동맥경화, 지방간으로 이어지며 부작용을 일으킨다. 이 경우 정상군에 비해 대조군은 1.67배로 증가를 하였지만 RCM투여군은 대조군에 비해 59.2%로 지질 함량을 유의적인 감소 효과를 알 수 있었다.

총 콜레스테롤 (Total-cholesterol)은 인체의 여러 조직에서 만들어지나 주로 간에서 생성된다. 혈중 cholestrol의 증가는 비만, 동맥경화, 고혈압 등의 심혈관 질환과 당뇨병 지방 대사 장해 등을 일으킨다. 함량의 경우 정상군에 비해 대조군은 1.74배 증가 하였다. 그에 비해 RCM 투여군의 경우 대조군에 비해 57.4%의 예방효과를 측정할 수 있었다.

HDL-콜레스테롤은 항 동맥경화의 지표로서 콜레스테롤을 말초혈관에서 간으로 수송하여 동맥경화를 진행시키지 않는 방향으로 콜레스테롤을 운반하여 지질대사 장해에 대한 방어 작용을 지니고 있다고 볼 수 있다. 정상군에 비해 대조군은 2.62배 감소하였다. 그에 비해 RCM 투여군은 대조군보다 81.6% 증대되는 효과를 볼 수 있었다.

과산화 지질 (Malondialdehyde)의 경우 지질조직의 손상 정도를 나타내는 중요한 효소로 인정되고 있으며, 조직의 손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화 등과 같은 여러 가지 유해 작용을 일으킨다. 정상군에 비해 대조군은 1.74배 수치가 증가되었으며, RCM 투여군의 대조군과 비교 시 57.4% 감소되는 효과를 볼 수 있었다.

본 연구는 LPS로부터 유도된 산화적 스트레스에 대한 복분자의 선투여 후 예방효과를 알아보았다. 생약재의 일종인 복분자의 경우 LPS로 유도된 산화적 스트레스 억제 및 지질대사로부터의 개선 효과가 있는 것으로 판단되며 지질과산화에 대해서 강한 억제 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 복분자는 생활 습관병의 예방과 개선에 유효한 것으로 사료되었으며, 지질대사와 과산화지표의 검증을 통해 기능성 식품소재로 활용될 수 있음을 보여주었다.

참고문헌

1. Kim, H.C. and Lee, S.I.: Comparision of the pharmacological effects of kinds of Rubi Fructus. *J. Herbology,* **6**, 3-12 (1991).
2. Kim, T.J.: Korean resources plants. *Seoul University Republished,* **11**, 276-285 (1997).
3. Kim. M.S., Pang, G.C. and Lee, M.W.: Flavonoids from the leaves of Rubus coreannum. *Yakhak Hoeji*., **41**, 1-6 (1997).
4. Lee, M.W.: Phenolic compounds from the leaves of Rubus coreanum. *Yakhak Hoeji*., **39**, 200-204 (1995).
5. Lee, Y.A. and Lee, M.W.: Tannins from Rubus coreanum. *Korean J.Pharmacogn.*, **26**, 27-30 (1995).
6. Pang, G.C., Kim, M.S. and Lee, M.W.: Flavonoids from the leaves of Rubus coreanum. *Korean J. Pharmacogn*., **27**, 366-370 (1996).
7. Lee, M.K., Lee, H.S., Choi, G.P., Oh, D. H., Kim, J.D., Yu, C.Y. and Lee, H.Y.: Screeig of biological activities of the extracts from Rubus coreanus Miq, *Kor. J. Medicinal Crop Sci.*, **11**, 5-12 (2003).
8. Jean, L., Bret, D., Chistophe. C.: Systemic Capsaicin Pretreatment Fails to Block the Decrease in Food-Motivated Behavior induced by Lipopolysaccharide and Interleukin-1ß. *Brain Research Bul.* **42**, 443-449 (1997).
9. Charles, A.J.: Immunobiology., pp. 68 (2002).
10. Dantzer, R., Bluthe, R.M., Gheusi, G., Cremona, S., Laye, S., Parnet, P. and Kelley, K.W.: Molecular basis of sickness behavior. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **856**, 127-134 (1998).
11. Halliwell, B.: How to charactrize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.*, **9**, 1-13 (1990).
12. Jeong, C.S., Jung, K.W. and Jeong, J.S.: Hepatoprotective Effect of Subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on the Reversal of Biotransformation Enzyme Activities in CCl_4-induced Hepatotoxic Rats. *J. Fd. Hyg. Safety*, **14**, 172-178 (1999).
13. Enomoto, N., Yamashina, S., Kono, H.: Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of kupffer cells. *Hepatology.*, **29**, 1680-1689 (1999).
14. Gutterige, J.M.C. and Halliwell, B.: Anitioxidants in Nutrition, Health and Disease. *Oxford University Press*. **27**, 1-62 (1994).
15. Halliwell, B.H., Gutteridge, J.M.C. and Arouoma, O.L.: The deoxyribose method, A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hyfroxyl radicals. *Anal. Biochem*., **165**, 215-219 (1987).
16. Choi, J.H., Kim, D.W., Kim, J.H., Kim, K.S. and Lee, J.S.: Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats I. Feeding effect of PNE on lipid and oxygen radical metabolisms in serum of SD rats. *Korean J. Life Science,* **7**, 371-376 (1997).
17. Khan, M.A., Manejwala, A.M.: Cholesterol metabolism and atherosclerosis in Aging. *Handbook of Geriatric Nutrition*, **45**, 88-104 (1981).
18. Ha, B.J.: Effect of Brazilin on the Liver Fatty Acid in Alloxan Diabetic Mice. *Silla University Journal*, **27**, 377-386 (1985).
19. Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: Biology of disease-Free radical and tissue injury. *Lav. Invest*., **47**, 412-426 (1982).
20. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.A., McCord, J.M. and Harman, D.: Oxygen radicals and human discase. *Ann Intern Med.*, **107**, 526-545 (1987).
21. Sourthorn, P.P.G.: Free radicals in medicine. Involvement in human disease. *Mayo. Clin. Proc.,* **63,** 390-408 (1988).
22. Yu, B.P.: Oxidative damage by free radicals and lipid peroxidation in aging. *Free Radicals In Aging. Boca Taton, CRC Press,* **28**, 57-88 (1993).