

靑娥丸에 의한 活性 酸素類의 消去 作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 對한 研究

鄭 智 天*

ABSTRACT

Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effects
of oxygen free radicals by Cheongahwan

Jeong Ji-Cheon*

*Dept. of Internal Medicine

College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was undertaken to examine the effect of Cheongahwan(CAH), being known to reinforce *Kidney-yang*, on the activities of endogenous antioxidant enzymes and the production of oxygen free radicals in the kidney tissues. Alterations in enzyme activities were observed after in vivo treatment in rats. CAH caused a significant increase in the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. But catalase activity was not significantly altered by CAH. Treatment *in vitro* of CAH decreased the production of oxygen free radicals in a dose-dependent fashion.

* 東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

These results suggest that CAH stimulate the activities of antioxidant enzymes and inhibit directly the production of oxygen free radicals. These effects of CAH may contribute to prevent the oxygen free radical-induced impairment of cell function.

Key Words : Cheongahwan, oxygen free radicals, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase.

I. 서 론

活性酸素類(oxygen free radicals)들은 생체내에서 매우 불안정하고 활성이 강하므로 여러 組織에서 甚한 毒性을 나타내거나 過酸化脂質의 생성을 유도하여 痴呆, 心筋梗塞, 腎不全, 癌 等 많은 疾病을 일으키는 病因일 뿐만 아니라 老化에도 關係가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁴⁾

東洋醫學에서 이와 關聯된 研究는 老化의 重要原因인 腎虛에 對하여 主로 이루어지고 있는데^{5,6)} 內經·素問⁷⁾에 '天壽過度 氣脈常通 而腎氣有餘也', 虞⁸⁾가 '腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭'라고 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定되며, 腎氣虛衰가 老化의 重要原因이라고 하였다.⁹⁾ 또한 姚¹⁰⁾는 역대의 延年益壽 처방 中에 補腎填精하는 처방이 가장 빈도가 높다고 하였다. 실험 연구에 의하면 補腎 效能을 가진 五子衍宗液¹¹⁾, 還少丹¹²⁾, 清宮長春丹,¹³⁾ 左歸飲과 右歸飲¹⁴⁾ 等의 處方들이 過酸化脂質의 含量을 低下시키고 SOD 活性을 上昇시켜 老化를 抑制한다고 報告되고 있다.

靑娥丸은 太平惠民和劑局方¹⁵⁾에 최초로 기재된 이래 腎虛腰痛의 치료제로 常用되어 왔다.^{16,17)} 腎陽을 補하는 胡桃, 補骨脂, 杜冲 등의 藥들로 구성되어 있으며,¹⁸⁾ 普濟方¹⁹⁾에 '常服壯筋骨 補虛損 益精髓 反老還童'이라 하였다. 또한 腎虛腰痛은 房勞傷, 陽氣不足, 勞役, 老衰 등으로 인하여 유발되는 內傷腰痛이므로,²⁰⁾ 補腎 效能과 함께 老化 防止 效能도 있을 것으로 보인다

이에 저자는 靑娥丸의 補腎 效能이 항산화작용을 나타내는 지를 구명하고자 하였다. 以前 研究에서 저자는 靑娥丸이 靑娥丸의 腎臟에서 活性酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 活性을 有意性 있게 抑制시키고 活性 酸素에 依해 誘導되는 脂質의 過酸化反應을 抑制시키는 效能이 있음을 報告²¹⁾하였다.

따라서 本 研究에서는 靑娥丸이 活性 酸素 分解系 酵素 活性에 미치는 影響을 檢討하고 試驗管內에서 活性 酸素類의 直接的인 消去 效果를 觀察하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 材 料

(1) 藥 材

이 實驗에 使用한 靑娥丸의 藥材는 東國大學 校 附屬 韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였으며, 처방 구성은 黃¹⁸⁾에 근거하였다.

杜 冲	Eucommiae Cortex	50
補骨脂	Pasoraliae Semen	50
胡 桃	Juglandis Semen	50
生 薑	Zingberis Rhizoma	31.25
Total amount		181.25g

(2) 實驗 動物

外觀上 健康한 250g 내외의 雄性 Sprague-Dawley系 흰쥐를 實驗前 16時間 동안 물만 주고 絶食시켜 使用하였다.

(3) 試藥 및 機器

試藥은 bovine serum albumin, glutathione reduced, hematoxylin, nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced(NADPH) Sigma사로부터, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene은 Junsei chemical사로부터, glutathione oxidised는 Fluka 사로부터 구입하였으며 기타 실험에 사용한 모든 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다.

機器는 refrigerated centrifuge(Hanil supra 22K), ultracentrifuge(Dupont Sorval OTD 65B), spectrophotometer(Shimadzu 2021) 등이었다.

2. 實驗 方法

(1) 靑娥丸 抽出物 製造

靑娥丸 181.25g을 round flask에 증류수 1,000ml와 함께 넣은 뒤 heating mantle에서 냉각기를 부착하고 3시간 동안 가열 추출한 다음, 濾過한 濾液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 추출물을 얻었다.

試料는 흰쥐 體重 kg當 150mg의 用量으로 1日 1回 15日間 esophagus needle을 使用해 經口 投與하였으며, 對照群은 동량의 생리식염수를 經口 投與하였다.

(2) 酵素源의 製造

動物은 ether로 痲醉시킨 다음 腹部 正中線을 따라 開腹하여 下大動脈으로 부터 採血한 後 生理食鹽水로 貫流시킨 腎臟을 摘出하여 食鹽食鹽水로 깨끗이 씻고 濾紙로 壓迫하여 남아 있는 血液 및 生理食鹽水를 除去한 後 組織 1g當 4倍

量의 0.1M potassium phosphata buffer(pH 7.5, 以下 K.P buffer로 略함)를 加하여 氷冷下에서 glass teflon homogenizer로 磨碎하여 均質液을 만들었다. 이 磨碎均質液을 600×g에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎部分을 除去한 上澄液을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20分間 遠心分離하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 한편, mitochondrial fraction을 除去시킨 上澄液을 105,000×g에서 1時間 동안 超遠心分離하여 cytosol fraction을 分離하였다. Cytosol fraction은 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase 活性 測定源으로 使用하였으며 mitochondrial fraction은 0.1 M K.P buffer에 懸濁시킨 다음 再遠心分離하였다. 이때 얻은 沈澱物을 一定量의 0.1 M K.P buffer에 再懸濁시켜 freezing & thawing한 다음 catalase 活性 測定源으로 使用하였다. 以上의 모든 操作은 0-4℃에서 行하였다.

(3) 過酸化脂質 含量 측정

Ohkawa 등의 방법²²⁾에 準하여 腎臟 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95℃에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음, 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol:Pyridine(15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였고 단백질 1mg당 nmoles로 표시하였다.

(4) 酵素 活性的의 測定

1) Superoxide dismutase 活性 測定

Superoxide dismutase 活性 測定은 Martin 등²³⁾의 方法에 準해 實施하였다. 酵素源 製造 方法에 따라 分離된 cytosolic fraction에 EtOH:CHCl₃ (5:3) 混液 0.4倍量을 加하여 잘 混合한 다음 10,000×g에서 20分間 遠心分離하였다. 反應液은 50mM K.P. buffer (pH 7.5, EDTA 0.1

mM 함유) 일정량에 5 mM hematoxylin 酵素液의 용량을 달리 하여添加하고 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 25°C에서 5分間 反應시킨 다음 560nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素 活性를 算定하였다. 酵素 活性의 unit는 酵素를 넣지 않고 反應시킨 5 mM hematoxylin液의 吸光度 增加를 50% 抑制하는 蛋白質의 量으로 算定하였다.

2) Glutathione peroxidase 活性 測定

Glutathione peroxidase 活性 測定은 Paglia 等²⁴⁾의 方法에 準해 一定量의 0.1 M Tris·HCl buffer(pH 7.2) 溶液에 基質인 H₂O₂, 1 mM GSH, GR(2 I.U.), 0.2 mM NADPH 및 酵素源을 添加하여 25°C에서 5分間 反應시키는 동안에 生成되는 GSSG를 還元시키는 데 消費된 NADPH의 含量을 340nm에서 測定하여 그 活性를 算定하였다. 酵素의 活性는 1分當 1mg의 蛋白質이 酸化시킨 NADPH의 量을 nmole로 나타내었다.

3) Glutathione S-transferase 활성 측정

Glutathione S-transferase 활성 측정은 Habig²⁵⁾ 등의 方法에 따라 0.1MK.P. buffer(pH 6.5) 용액 일정량에 1mM의 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 과 GSH를 기질로 하여 효소액을 가하고 25°C에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA로 반응을 종료시킨 후 생성된 conjugated 2,4-dinitrobenzene-GSH의 양을 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성을 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 conjugated 2,4-dinitrobenzene-GSH의 양을 nmole로 표시하였다.

4) Catalase 活性 測定

Catalase 活性 測定은 Aebi²⁶⁾의 方法에 準해 50 mM K.P. buffer (pH 6.8)에 기질인 H₂O₂ 10.5 mM 및 酵素液을 添加하여 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 25°C에서 30秒間 反應시키면서 240nm에서 H₂O₂의 分解 程度를 測定하여 分子 吸光計數(E₂₄₀=0.041 mM⁻¹cm⁻¹)를 利用하여 酵素의 活性度를 算定하였

다. 酵素의 活性度는 1分當 1mg의 蛋白質이 分解시킨 H₂O₂의 量을 μ mole로 나타내었다.

(5) Hydroxyl radical 含量 測定

Hydroxyl radical 含量 測定은 Richmond 等²⁷⁾의 方法에 따라 0.1 M KH₂PO₄·KOH buffer (pH 7.4)에 2.5 mM sodium salicylate, 0.3 mM EDTA, 0.1 mM FeSO₄, 1 mM H₂O₂, 0.2 mM hypoxanthine 및 xanthine oxidase를 添加시켜 25°C에서 90分間 反應시킨 다음 11.65 N HCl로 反應을 終了시키고 反應 產物을 ether로 이행, 抽出, 乾燥시킨 후 蒸溜水 1ml에 녹여 10% TCA, 10% sodium tungstate, 0.5% sodium nitrite 및 0.5 M KOH 溶液을 加해 發色시킨 後 波長 510nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 hydroxyl radical의 含量을 算定하였다. 한편, hydroxyl radical의 直接 消去 作用을 觀察한 實驗은 上記 反應液 中에서 xanthine oxidase system을 除外시킨 後 反應시켰다. Hydroxyl radical의 含量은 上記 反應에서 salicylic acid로부터 hydroxyl radical에 依해 生成된 2,3-dihydroxy benzoic acid 量을 nmoles로 나타내었다.

(6) Superoxide radical 含量 測定

Superoxide radical 含量 測定은 Azzi 等²⁸⁾의 方法에 準해 50 mM K.P. buffer(pH 7.5) 一定量에 基質인 90 mM succinate, 150 mM KCl, 30 mM KCN, 0.3 mM cytochrome c 및 mitochondria 酵素源을 添加하여 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 37°C에서 2分間 反應시키면서 550nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 superoxide radical의 含量을 算定하였다. Superoxide radical 含量은 1mg의 蛋白質이 1分間 生成시킨 reduced cytochrome C의 量을 nmoles로 나타내었다.

(7) 蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowry 等²⁹⁾의 方法에 準해 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 定量 하였다. 한편, 實驗 結果의 有意性 檢定은 Student's t-test를 利用하여 相互比較하여 觀察하였다.

III. 실험성적

1. 흰쥐의 신조직에서 過酸化脂質 함량 변화

흰쥐에 靑娥丸 抽出物을 15日間 經口投與한 후 腎조직의 過酸化脂質 함량의 變化를 관찰하였다. 對照群의 過酸化脂質 함량이 11.72 ± 1.21 nmoles 였으나 靑娥丸投與群은 8.16 ± 0.72 nmoles 로서 약 33% 정도의 有意性 있는 감소를 보였다. (Fig. 1)

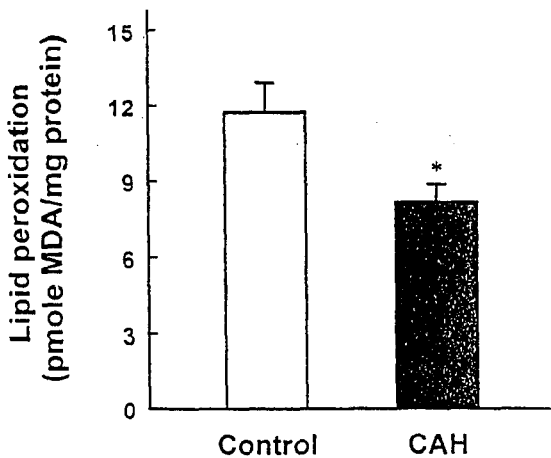


Fig. 1. Effects of the extracts of Cheongahwan (CAH) on the Renal lipid peroxide content in Rats.

Rats were received the extracts of CAH (150mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(* : $p < 0.05$)

2. Superoxide Dismutase 活性度の 變化

흰쥐에 靑娥丸 抽出物을 15日間 經口投與한 후 腎에서의 superoxide dismutase 活性의 變化를 관찰하였다. 對照群이 4.09 ± 0.25 units/mg protein인 반면, 靑娥丸 投與群은 5.33 ± 0.30 units/mg protein으로 약 30%의 有意性 있는 增加를 보였다. (Fig. 2)

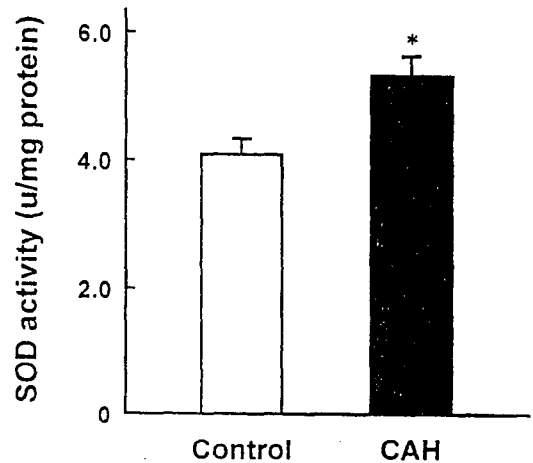


Fig. 2. Effects of the extracts of Cheongahwan (CAH) on the Renal Cytosolic Superoxide Dismutase Activity in Rat.

Rats were received the extracts of CAH (150mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(* : $p < 0.05$)

3. Glutathione Peroxidase 活性度の 變化

活性 酸素의 毒性을 抑制하기 爲한 生體內에서의 또 다른 防禦 酵素中의 하나인 glutathione peroxidase의 活性에 미치는 靑娥丸의 影響을 觀察하였다. 腎에서의 glutathione peroxidase 活性은 對照群이 171.1 ± 11.7 nmoles/mg protein/min인 반면, 靑娥丸 投與群은 241.9 ± 17.4 nmoles/mg protein/min로 나타나 약 41%의 有意性 있는 增加를 보였다. (Fig. 3.)

IV. 고찰

活性酸素類에는 superoxide anion radical ($\cdot O_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 및 hydroxyl radical($\cdot OH$) 등이 있다. 외부 자극에 의해 세포 내에서 활성산소류가 과량으로 발생하거나 유해 산소에 대한 방어 기전들의 기능이 저하되게 되면 세포는 損傷을 받게 되므로 이들을 제거하거나 몸속에 이들에 대한 방어 기전을 증대시키는 약물이 있는지를 밝히는 것은 대단히 중요하고 의미 있는 일로 인정된다.

靑娥丸은 補腎 效能으로 腎虛腰痛의 치료와 虛損을 補하고 精髓를 더해 주는 작용이 있다. 구성 약물은 性溫味甘하여 補腎壯陽 溫肺潤腸하는 胡桃, 性大溫味辛甘하며 補腎壯陽 固精縮尿하는 補骨脂, 性溫味甘하며 補肝腎 強筋骨하는 杜仲, 및 祛寒發表 宣肺調中하는 生薑으로 되어 있다.^{9,30,31} 실험 연구에 의하면 杜仲과 補骨脂³²는 흰쥐의 뇌조직에서 過酸化脂質의 함량을 감소시켰으며, 生薑은 superoxide anion radical과 hydroxyl radical의 생성을 억제하고³³ methanol 추출물에 강한 항산화활성이 있다고 하였으며,³⁴ 胡桃의 藥液³⁵에서 강력한 항산화작용을 나타낸다고 하였다.

이전 연구에서 저자는 靑娥丸이 흰쥐의 腎臟에서 活性酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 活性을 有意性 있게 抑制시키며, 또한 脂質의 過酸化反應을 抑制시키는 效能이 있음을 報告한 바 있다.²¹

정상 세포 속에는 산소유리기들을 분해하는 효소들을 가지고 있는데 이들 효소에는 superoxide를 분해하는 superoxide dismutase,³⁶ H_2O_2 를 분해하는 catalase²⁶와 glutathione peroxidase,^{37,38} glutathione S-transferase^{25,39} 등이 있다. 따라서 靑娥丸이 만약 세포내 내재성으로 가지고 있는 이들 항산화 효소들의 활성을 증가시킨다면 oxidant에 의한 세포 손상과 그로 인한 지질의 과산화를 방지할 수 있는 효과를 나타낼 수 있을

것이다.

本 實驗에서는 靑娥丸 抽出物을 흰쥐에 15일간 經口投與한 후 腎臟 組織에서 活性酸素 分解系 酵素 活性에 對한 影響을 觀察하고 試驗管內에서 活性酸素類의 直接的인 除去 效果를 檢討하였다.

毒性이 강한 superoxide anion을 보다 毒性이 弱한 hydrogen peroxide로 轉換시키는 酵素인 SOD의 活性 變化를 검토한 결과 靑娥丸 投與群은 實驗動物의 腎臟에서 SOD의 活性을 有意性 있게 增加시켰다.

Catalase는 free radical에 依한 細胞 毒性時 初期에 反應하는 重要한 抗酸化 酵素(40)로 hydrogen peroxide를 물(H_2O)로 分解함으로써 hydrogen peroxide 增加에 따른 組織 損傷을 防止하는 效果가 있으며⁴¹, 여러 臟器에서 多樣하게 存在하지만 腎臟과 肝臟에서 活性도가 特히 높다.⁴² Catalase 活性은 靑娥丸 投與群에서 增加되었으나 유의성은 없었다.

Glutathione peroxidase와 glutathione S-transferase는 glutathione을 媒介로 하여 hydrogen peroxide를 물(H_2O)로 還元시키는 反應을 促進하여 superoxide radical로부터 細胞를 保護하는데 重要한 役割을 擔當하고, lipid peroxide를 lipid alcohol로 還元시켜 無毒化시키는 酵素이다. 본 실험 결과 腎臟에서 glutathione peroxidase와 glutathione S-transferase 活性은 靑娥丸 投與에 의해 有意性 있는 增加를 보였다.

本 實驗에서 靑娥丸이 活性酸素類를 分解시키는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase와 glutathione S-transferase의 活性을 增加시켰는데 이러한 결과는 靑娥丸이 세포내 항산화 효소의 활성을 증가시켜 산소유리기에 의한 세포 손상과 지질의 과산화를 방지하는 효과가 있음을 강력히 암시하고 있다.

이러한 增加 現狀이 어떤 機轉으로 나타났는지에 對해서는 알 수가 없으나 어떤 機轉으로 酵素의 活性을 增加시켰던지 간에 이러한 效果

는 活性 酸素類에 依해 誘發될 수 있는 여러가지 病的 狀態를 豫防할 수 있는 可能性을 提示하고 있다.

試驗管內에서 靑娥丸의 superoxide radical에 對한 直接的인 消去 效果를 檢討하였을 때 靑娥丸의 添加 濃度에 依存的으로 superoxide radical의 含量이 減少하였다. 또한, 活性 酸素中 가장 強力한 活性을 지니고 있는 hydroxyl radical에 對한 靑娥丸의 作用을 살펴 본 결과 濃度 依存的으로 hydroxyl radical의 生成을 有意性 있게 減少시키는 것을 나타냈다.

以上的 結果를 綜合하여 보면, 靑娥丸은 oxygen free radical의 分解系 酵素인 SOD, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase의 活性을 增加시키며 또한 活性 酸素類인 superoxide radical과 hydroxyl radical을 직접 消去시키는 作用을 가지는 것으로 여겨진다. 그리고 靑娥丸이 活性 酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase의 活性과 過酸化脂質 生成을 直接 抑制한다는 報告²¹⁾와 關聯시켜 볼 때, 活性 酸素類의 生成을 抑制할 뿐만 아니라 生成된 活性 酸素類를 除去하는 作用도 가지고 있어 이러한 作用을 통해 老化를 防止하는 效果를 나타낼 可能性을 強力히 示唆하고 있다.

V. 결 론

靑娥丸이 活性 酸素類의 分解에 미치는 影響을 알아 보기 爲하여 흰쥐에 抽出物을 經口投與한 後 腎臟에서 過酸化脂質의 含量, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 및 catalase 活性의 變化와 試驗管內에서 superoxide radical, hydroxyl radical 消去 效果를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 過酸化脂質의 含量은 靑娥丸 투여에 의해

유의하게 감소되었다.

2. SOD 活性은 靑娥丸 投與群에서 유의성 있게 增加되었다.

3. Glutathione peroxidase와 glutathione S-transferase 活性은 靑娥丸 투여군에서 유의성 있는 증가를 나타내었다.

4. Catalase 活性은 靑娥丸 投與群에서 증가를 나타내었으나 有意性은 없었다.

5. 試驗管內에서 靑娥丸의 첨가 濃度에 比例하여 superoxide radical과 hydroxyl radical의 生成이 減少되었다.

以上的 結果로 보아 靑娥丸은 흰쥐의 腎臟 組織에서 oxygen free radical 分解系 酵素인 SOD, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione S-transferase의 活性을 增加시키고 同時에 superoxide radical과 hydroxyl radical을 直接 消去시키는 作用을 통해 老化 防止에 效果를 나타낼 것으로 思料된다.

참고문헌

1. Batteli, N. G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. : Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxidase) : Purification and inter-conversion and some properties. Biochem.J., 131 : 191-198, 1973.
2. Floyd R.A. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J., 4 : 2587-2597, 1990.
3. Harman, D : Free radical theory of aging ; Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. Free Radicals, Aging and De-

- generative Disease (ed. Johnson, J.E. et al.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp.3-49, 1986.
4. Simon, R. H., Scogging, C. M. and Patterson, D. : Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 266 : 7181- 7186, 1981.
 5. 余月明 外 : 自由基衰老學說, 腎虛與衰老及補腎抗衰老研究, 陝西中醫, 14(4) : 187-188, 1993.
 6. 許沛虎 外 : 中醫藥研究中有關自由基研究近況, 中西醫結合雜誌, 15(3) : 185-188, 1995.
 7. 南京中醫學院醫經教研組 : 黃帝內經素問譯釋, 上海科學技術出版社, pp.4-5, 1983.
 8. 虞搏 : 醫學正傳, 成輔社, p.9, 1986.
 9. 王其飛 外 : 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.50, 53, 54, 331-336, 342-344, 348-350, 1989.
 10. 姚培發 : 祖國醫學抗老年齡問題初探, 上海中醫藥雜誌, 6 : 2-4, 1981.
 11. 王學美 外 : 五子衍宗液延緩衰老的臨床觀察, 中國中西醫結合雜誌, 12(1) : 23-25, 1992.
 12. 杜辛 外 : 還少丹膠囊抗衰老及治療腎陽虛臨床觀察, 中國中西醫結合雜誌, 12(1) : 20-22, 1992.
 13. 張文彭 外 : 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇水平影響的研究, 中醫雜誌, 30(3) : 34, 1989.
 14. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 활성산소류의 消去작용과 항산화효소계의 활성 증가 효과에 대한 연구, 대한한의학회지, 17(1) : 21-36, 1996.
 15. 太平惠民和劑局 編 : 太平惠民和劑局方, 北京, 人民衛生出版社, p.175, 1985.
 16. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, 278, 1981.
 17. 江克明 外 : 抗衰老方劑辭典, 上海中醫學院出版社, pp.273-274, 1987.
 18. 黃度淵 : 方藥合編, 서울, 南山堂, p.216-217, 1989.
 19. 朱櫛 : 普濟方(欽定四庫全書 券 22), 大成文化社, p.480, 1995.
 20. 尹哲浩, 鄭智天 : 內科 領域의 腰痛에 對한 文獻的 考察, 대한한방내과학회지, 318-346, 1994.
 21. 鄭智天 外 : 흰쥐의 腎臟조직에서 靑娥丸의 抗酸化작용에 관한 연구, 대한한방성인병학회지, 2(1) : 119-131, 1996.
 22. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95 : 351-358, 1976.
 23. Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Arch. Biochem.*, 255 : 329- 336, 1987.
 24. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70 : 158-169, 1967.
 25. Habig, W. H., PABIST, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249 : 7130-7139, 1974.
 26. Aebi, H. : La Catalase erythrocytaire, in : Exposes Annuels de Biochimie Medicale, 29 ieme serie, Masson & Cie(eds), Paris, pp.139-164, 1969.
 27. Richmond, R., Halliwell, B., Chauhan, J. and Darbre, A. : Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals : Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal. Biochem.*, 118 : 328-335. 1981.
 28. Azzi, A., Montecucco, C. and Richter, C. : The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals

- produced in biological membranes. *Biophys. Res. Commun.*, 65 : 597-603, 1975.
29. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
30. 李尙仁 : 本草學, 醫藥社, p.69, pp.84-85, p.91, 202, 1980.
31. 吳儀洛 : 本草從新, 上海科學技術出版社, pp.52-53, p.167, pp.203-204, 222-223, 1982.
32. 舒守琴 外 : 27種中藥及SOD對體外大白鼠腦均漿過氧化脂質生成的影響, 山東中醫學院學報, 15(3) : 70-72, 1991.
33. 曹兆豐 外 : 生薑對超氧陰離子及경自由基的清除作用, 中國中藥雜誌, 18(12) : 750-751, 1993.
34. 金鏞揮 外 : 生薑中 Methanol 추출물의 항산화활성, 전북대학교 농대 논문집, 20 : 66-71, 1989.
35. 金永海 外 : 胡桃藥鍼液의 항산화효과에 대한 연구, 대한한의학회지, 17(1) : 9-18, 1996.
36. McCord, J. M. : Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185 : 529-531, 1974.
37. Flohe L and Gunzler WA : Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105 : 114-121, 1984.
38. Little, C. and O'Brien, P. J. : An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 31 : 145-150, 1968.
39. Jakoby, W. B. : The glutathione S-transferase : A group of multi-functional detoxication protein. *Adv. Enzymol.*, 46 : 383-414, 1978.
40. Safirstein, R., Winston, J., Goldstein, M, et al. : Cisplatin nephrotoxicity. *Am J. Kidney Dis.*, 8 : 356, 1986.
41. Frank, L. and Massaro, D. : Oxygen toxicity. *Am. J. Med.* 69 : 117-126, 1980.
42. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59 : 527, 1979.