Journal of Life Science 2005, Vol. 15. No. 4. 572~577 ©JLS

음양곽의 항산화작용에 의한 간 보호 효과

하배진* · 김희진 · 이상헌 · 하종명 · 이상현 · 이재화 · 이동근 · 박은경 · 남천석

신라대학교 생명공학전공

Received April 12, 2005 / Accepted July 13, 2005

The Hepatoprotective Effects of *Epimedii Herba* through the Antioxidation. Bae Jin Ha*, Hee Jin Kim, Sang Hun Lee, Jong-Myung Ha, Sang-Hyeon Lee, Jae-Hwa Lee, Dong-Geun Lee, Eun Kyung Park and Chun Suk Nam. *Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea* – In this study, the effect of *Epimedii Herba* (EH) on the antioxidative enzymatic activity was investigated. EH (100 mg/kg) was intraperitoneally administered into rats for 2 weeks. On the last day, carbon tetrachloride (50% CCl_4, 3.3 ml/kg, i.p.) dissolved in olive oil was injected before 12 hours. EH-preadministered and CCl_4-treated (EC) group showed higher inhibitory effect in aminotransferase (AST, ALT) activity compared to CCl_4-treated (CT) group. Superoxide dismutase (SOD) and Catalase in EC group were increased compared to those of CT group. The activity of glutathione peroxidase (GPx) was significantly higher than those of CT group compared to EC group. These results suggest that EH has a hepatoprotective effect through scavenging the free radicals induced by CCl_4.

Key words – *Epimedii Herba*, CCl_4, Hepatotoxicity, Antioxidative enzyme, Histopathology

인체는 알코올, 약물, 화학물질 및 여러 가지 환경오염 물질 등이 유입되면 생체대사를 통해 이들을 이물질로 인식하여 체외로 배설시킴으로써 무독화하려는 방어체계를 가동시키며, 인체 기관 중에서 간은 무독화 변환과정이 일어나는 주요기관이다. 세포손상을 일으킬 수 있는 이러한 이물질들은 간의 약물대사 효소계에 의해 대사되어 체외로 배설되나 물질에 따라서는 활성화하여 약물대사 효소계의 작용을 통해 약물 대사를 지연 또는 촉진하여 약물의 약효 또는 독성에 영향을 미친다.

Carbon tetrachloride (CCl_4)는 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해서 trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals ($\cdot OOCCl_3$)을 생성하여 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격해서 지질과산화를 야기하여 간세포 괴사를 일으킨다[3, 18]. 또한, 이런 radicals는 microsome 지질의 불포화 지방산 측쇄의 methylene 결합을 공격하여 약물대사 효소 활성과 단백 활성을 저하시키고 간에서의 급성 지방 변성을 일으키며 lipoprotein의 생성과 유리를 차단하여 급속한 지방축적을 야기한다[5].

이러한 환경에 노출된 생명체는 활성산소종(reactive oxygen species)에 의한 조직 손상으로부터 스스로 보호하기 위한 방어체계를 갖추고 있다. 방어기전으로 catalase, glutathione peroxidase (GPx)와 같은 항산화 효소들과 glutathione (GSH), tocopherol 등의 항산화 물질인데 이 중 GSH는 동물 조직 중에서 nonprotein thiol의 대부분을 차지하며 활성 산소의 scavenger로서 H_2O_2 및 과산화지질을 대사시키는 GPx의 기질로 세포내 항산화제 중에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있다[19,21,23,24].

음양곽(淫羊藿, *Epimedii Herba*)은 삼지구엽초(Epimedium koreanum Nakai) 또는 기타 동속 근연식물(매자나무과 ; Berberidaceae)의 지상부를 건조한 생약으로서 한방에서는 강장 및 강정제로 사용된다. 성분으로는 icariin, quercetin, anhydroicaritin-3-*O*-*α*-rhamnoside, n-alkanes, phytosterols, phytosteryl glucosides, ikarisoside A, epimedoside C, epimedoside, icariside A, maltol, salidroside, epimedin I, icaritin-3-*O*-*α*-rhamnoside, ikarisoside A-F 등이 분리 보고 되었으며[12,13,16,22,26], icariin 및 epimedoside A에 대한 계절적 변동에 따른 함량변화, 채취시기 및 산지별 icariin 함량 분석, 열, 빛, 산소에 의한 icariin을 비롯한 flavonol glycoside의 함량 변화 및 icariin 함량 분석에 관한 연구가 보고 되었고 특히 주성분인 icariin은 간독성을 억제한다고 보고 된 바 있다[4,11-14,16,22,26].

본 연구에서는 실험동물에 음양곽을 투여한 후 CCl_4로 처리했을 때, 혈액 및 간 조직 중에서의 효소 활성에 미치는 영향과 병리조직학적 검사를 병행하여 CCl_4 투여로 유도되는 독성의 억제효과에 대하여 관찰하였다.

재료 및 방법

재료

시판(부전시장 약재상)되고 있는 음양곽 건초를 10배의 증류수로 열수 추출하여 감압 농축기로 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

*Corresponding author
Tel : +82-51-999-5466, Fax : +82-51-999-5684
E-mail : bjha@silla.ac.kr

실험동물 및 식이

실험동물은 체중 150 g 내외의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 대구 효창 사이언스로부터 제공받았고 7일 동안 적응시켰다. 실험동물은 cage에 각각 분리시키고 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 했다. 실험동안 동물들은 22±1℃의 온도와 60±5℃ 상대습도로 유지시켰다.

총 28마리의 rat를 7마리씩 4군으로 나누었다(Table 1.). 정상군(NO group)과 CT 군(CCl_4-treated group)은 0.9% saline을, EH 군(*Epimedii Herba* group)과 EC 군(*Epimedii Herba* + CCl_4-treated group)은 음양곽 추출물(100 mg/kg)을 0.5 ml/kg씩 복강 내에 2주간 매일 투여했다.

CT 군과 EC 군에서 실험동물의 간 손상의 유도를 위해 사염화탄소를 olive oil에 1:1 비율로 용해시켜 체중 1 kg당 3.3 ml의 용량을 희생하기 24시간 전에 하루 2번 복강 내로 투여하여 각각 간 독성을 유발시켰다. 10시간 절식 후 혈액과 간을 채취하여 실험에 임하였다.

혈액 및 간 채취

실험 종료 후 실험동물을 ether 마취 하에서 개복한 후 심장에서 채혈하여 실온에서 30분 간 방치한 후, 800 ×g, 4℃에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 -70℃ deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였고, 간은 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하여 여지로 흡착한 후 -70℃ deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다.

간에 간 무게 10배의 solution (10 mM Tris, 0.07 M Saccharose, 0.1 mM EDTA, 0.2 M Mannitol, in dissolved 0.1 N HCl)을 넣어 균질화한 후, 600 ×g, 4℃에서 10 min 원심분리한 상등액을 다시 8,000 ×g, 4℃에서 10 min 원심분리하여 얻은 pellet에 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0) 5 ml 넣어 mitochondrial fraction으로 사용하였다.

혈청의 효소 활성 측정

혈청 중의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 활성은 Fuji Dri-Chem Clinical Chemistry Analyzer (Fuji Dri-Chem 3500, Fujifilm, Japan)로 측정하였다.

간 조직의 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry등의 방법[17]에 의해서 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 단백 시료를 Bovine Serum Albumin (BSA)으로 정량하였다.

간 조직의 지질과산화 함량 측정

간 1 g을 취하여 간 무게의 5배 용량인 5 ml의 1/20 M phosphate buffer (pH 7.4)에 homogenation 시킨 것과 mitochondrial fraction을 마개가 있는 시험관에 각각 0.5 ml씩 triple로 취하였다. Thiobarbituruce acid 변법[20]으로 7% sodium dodesyl sulfate (SDS)로 가용화시켜 여기에 0.67% (동량의 acetic acid 혼합시약) 2 ml를 가하여 95℃ 수욕상(water bath)에서 50분간 가온 후 즉시 급냉시켜 butanol 5 ml로 800 ×g에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 취한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직의 Superoxide Dismutase (SOD) 효소활성 측정

Beauchamp와 Fridovich의 방법[2]에 따라 0.2 M potassium-phosphate buffer (pH 7.4)를 672 μl, 1 mM xanthine 100 μl, 1% sodium deoxychlorate 30 μl, 1.5 mM KCN 30 μl, 0.2 mM cytochrome C 150 μl를 넣은 혼합에 sample 8 μl를 넣고, xanthine oxidase원액을 10 μl를 넣어 mixing한 후 Elisa에 이용하여 550 nm에서의 흡광도 변화를 2 min 동안 측정하였다. 효소의 활성도는 표준액으로 Sigma사의 superoxide dismutase standard를 사용하였다.

간 조직의 Catalase의 활성 측정

Aebi의 방법[1]을 이용하여 phosphate buffer (0.05 M pH 7.0) 1.9 ml에 sample (homogenate와 mitochondrial fraction을 800 ×g에서 20 min 원심분리한 상등액 100 μl를 buffer로 10, 20, 40, 80배 희석) 0.1 ml와 과산화수소 용액 1 ml를 혼합하여 240 nm에서 90 sec 동안 흡광도 감소를 측정 하였다.

간 조직의 GSH-peroxidase (GPx)의 활성 측정

Lawrence등의 방법[15]에 준하여 0.1 M phosphate buffer (4 mM EDTA) 400 μl, 0.01 M NaN_3 70 μl, 0.01 M GSH 70

Table 1. Experimental design of CCl_4-treated rats

Experimental group	1st ~ 14th	15th
	Sample (1.5 ml/kg, i.p.)	Damage sample
NO (7)	0.9% saline	Vehicle
EH (7)	100 mg/kg of *Epimedii Herba*	
CT (7)	0.9% saline	3.3 ml/kg of CCl_4 (dissolved in equal vol. olive oil, i.p.)
EC (7)	100 mg/kg of *Epimedii Herba*	

NO: Normal group, EH: *Epimedii Herba* group, CT: CCl_4-treated group, EC: *Epimedii Herba* + CCl_4-treated group
The number of experiment animals is given in parenthesis.

μl, 1.5 mM NADPH 70 μl, H_2O 360 μl, GSSG-reductase (1.8 U/ml) 20 μl, sample 10 μl를 혼합하여 상온에서 1분간 방치한 후 5 mM H_2O_2 100 μl를 가해 잘 섞은 후 340 nm에서 90 sec 동안 흡광도 감소 측정을 하였다.

간 조직의 병리학적 측정

간 조직을 10% formaldehyde-phosphate buffer로 하루 정도 고정시킨 후, 70% alcohol에서 100% alcohol까지 순차적으로 탈수하였다. 100% xylene 처리 후, paraffin으로 포매하여 microtome을 이용하여 5 μm의 조직 절편을 제작하였다. 이 절편을 hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청의 Asparate aminotransferase (AST) 및 Alanine aminotransferase (ALT)의 활성도 변화

간 조직의 손상은 세포 내부에 존재하는 효소가 혈액으로 유출되는 것을 측정하거나 pericentral necrosis를 관찰함으로써 확인할 수 있다. 따라서 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소 활성도 측정은 간 손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나이며, 특히 혈장 중 AST와 ALT 등의 효소 활성도의 상승은 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이므로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 된다[9].

Aminotransferase는 α-amino acid에서 α-keto acid까지 α-amino group의 전달에 촉매 작용을 한다. 또한, transaminase라고 불리는 이 효소는 일반적으로 NH_4^+로 전환하기 위해 여러 가지 아미노산에서 α-ketoglutarate까지 α-amino group들을 보낸다. AST는 이 효소들 중에서 α-ketoglutarate에 aspartate의 amino group을 전달하는 촉매작용을 한다. ALT는 α-ketoglutarate에 alanine의 아미노기를 전달하는 촉매작용을 한다[19].

Table 2는 혈청 중 AST 및 ALT 활성정도를 나타낸 것이다. CCl_4를 투여한 군에서 혈청 AST, ALT 활성이 증가하는 경향은 CCl_4에 의한 간 손상 유발물질이 간의 대사이상을 초래하여 간세포손상이 초래되기 때문인 것으로 사료된다고 보고하고 있다[24].

본 실험에서 AST 활성의 경우, 정상군에 비해 CCl_4투여군에서 CCl_4의 간 장애 유발로 인해 효소 활성이 약 7배 증가하여 Takaharu와 Kiyonori의 보고[24]와 일치하였으며, 음양곽과 CCl_4투여 군에서는 54.28% 감소하여 음양곽의 활성 감소 효과를 확인할 수 있었다.

ALT의 경우 AST의 활성 변동과 유사한 결과를 보였으며 음양곽만 투여한 군에서는 혈중 AST, ALT의 활성에는 별다른 영향이 없었다.

간 조직의 Malonedialdehyde (MDA)의 정량

과산화지질은 oxygen radicals에 의해 불포화지방산에서 일어나는 연쇄반응으로 oxygen radicals의 직접적인 작용보다는 철 이온 존재 하에 superoxide와 H_2O_2의 상호작용에 의해 형성되는 OH°에 의해 간접적으로 일어나며, 이의 주된 손상장소가 DNA나 세포막이다[7].

체내 과산화지질의 생성정도를 알 수 있는 MDA 함량을 Table 3에 나타내었다.

CCl_4로 간 손상이 초래된 CCl_4 투여군은 지질과산화물인 MDA 량이 정상군보다 간의 총 균질화는 약 3배, 미토콘드리아 분획은 약 4배 증가하는 경향을 나타내었다. 음양곽만을 투여한 군은 간의 총 균질화와 미토콘드리아 분획에서 정상군과 유사하였다.

음양곽과 CCl_4를 투여한 군의 MDA 함량은 간의 총 균질화에서는 64.02%, 미토콘드리아 분획에서는 67.50%의 억제 효과를 나타내어 정상군 수준으로 회복됨을 나타내었다.

간 조직 중 Superoxide dismutase (SOD), Catalase 효소활성 측정

생체에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화

Table 2. Effects of water extract of *Epimedii Herba* on aminotransferase (ASL, ALT) activities in female rat serum

Experimental group	AST (U/L)	ALT (U/L)
NO	71.75±12.14	28.43±5.86
EH	76.00±21.21	17.92±4.09
CT	504.67±118.14	505.25±83.26
EC	269.67±69.75*	187.25±76.72*

NO: Normal group, EH: *Epimedii Herba* group, CT: CCl_4-treated group, EC: *Epimedii Herba* + CCl_4-treated group
*$p<0.001$, values are mean ± SE (n=7).
AST : aspartate aminotransferase
ALT : alanine aminotransferase

를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성산소를 분해시키는 역할을 하는 효소가 바로 SOD이다. 생체 내의 항산화 방어기구 중에서 효소적 방어 계의 하나로 superoxide radical을 환원하여 H_2O_2로 전환시켜 산소 독으로부터 생체를 보호한다[21,23].

간 조직 중의 SOD의 활성변화를 관찰한 결과는 Table 4와 같다. 간 조직에서의 SOD 활성정도는 CCl_4 투여군의 효소활성이 정상군에 비해서 간의 총 균질화와 미토콘드리아 분획에서 각각 2배 정도로 낮게 나타났다. 음양곽만 투여한 군의 SOD 활성은 정상군보다 각각 1.2배(간의 총 균질화), 약 1.1배(미토콘드리아 분획) 높게 나타나는 경향을 보였다. 또한, 음양곽과 CCl_4를 투여한 군에서의 SOD 활성수치는 CCl_4 투여군보다 각각 44.07%(간의 총 균질화), 38.52%(미토콘드리아 분획) 높게 나타났다.

생체 내 생명 현상에서 필수적인 산화환원반응의 일종으로 생성되는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소 중 하나가 catalase이다. Catalase는 다수의 과산화수소 생성효소들과 복합체를 형성하여 peroxisome에 주로 분포하고 과산화수소 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효과가 있다고 알려져 있다[10,27]. 그리고, catalase는 방사선 조사, 약물투여 및 환경의 변화 등 생체 내에서의 oxygen free radicals 생성을 증가시키는 조건에서 catalase 활성도가 증가되며, 또한 catalase를 투여하면 oxygen free radical의 과다생성으로 인한 조직손상을 방어할 수 있다고 하였다[6].

Catalase는 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감한 것으로 사료되며, 항산화계 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성산소 종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며, 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있다고 보고하고 있다[8,25].

Table 4.에서 보면 CCl_4 투여군에서의 catalase 활성치는 정상군과 비교했을 때 약 3배(간의 총 균질화), 약 2배(미토콘드리아 분획) 감소를 보였다. 음양곽과 CCl_4를 투여군에서의 catalase 활성은 CCl_4 투여군에서보다 각각 61.19%(간의 총 균질화), 36.88%(미토콘드리아 분획) 높게 나타났다.

따라서 CCl_4의 free radical 생성 촉진으로부터 음양곽 추출물이 항산화계의 효소활성을 증가시킴으로써 CCl_4에 의한 조직손상을 방어하는 것으로 생각된다.

간 조직의 glutathione peroxidase (GPx)의 활성도 변화

Glutathione은 aerobic life에서 해로운 부산물인 hydrogen peroxide와 organic peroxide와 함께 반응함으로써 해독 작용에서 중요한 역할을 수행한다. 이 반응에서 촉매 효소인 Glutathione peroxidase는 selenium 원자에 부착되어 공유적으로 결합하는 것이 주목할 만하다[21].

Table 5에서 보면 GPx 활성이 음양곽과 CCl_4를 투여한 군에서 간의 총 균질화에서는 73.37%, 미토콘드리아 분획에서는 53.62% 증가되는 유의적인 변화가 있는 것으로 나타났다. 음양곽만 투여한 군에서는 정상군 보다 간의 총 균질화에서는 약 1.1배 증가하였고, 미토콘드리아 분획에서는 정상군과 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 3. Effect of water extract of *Epimedii Herba* on MDA contents in female rat liver

Experimental group	Homogenate (nmol/mg protein)		Mitochondrial fraction (nmol/mg protein)	
	MDA contents	Inhibition (%)	MDA contents	Inhibition (%)
NO	7.13±0.63	-	4.12±0.71	-
EH	7.05±0.38	-	4.47±0.41	-
CT	22.22±1.69	-	15.66±0.99	-
EC	12.56±0.31*	64.02	7.87±0.13*	67.50

NO: Normal group, EH: *Epimedii Herba* group, CT: CCl_4-treated group, EC: *Epimedii Herba* + CCl_4-treated group
*$p<0.001$, values are mean ± SE (n=7).
MDA : malondialdehyde

Table 4. Effects of water extract of *Epimedii Herba* on SOD and catalase activities in female rat liver

Experimental group	SOD (U/mg protein)		Catalase (mU/mg protein)	
	Homogenate	Mitochondrial fraction	Homogenate	Mitochondrial fraction
NO	17.62±0.48	24.63±0.81	167.81±7.40	99.94±4.61
EH	21.38±1.01	27.10±1.07	162.78±3.82	92.46±2.67
CT	10.54±0.28	14.87±0.32	55.42±2.57	45.95±4.02
EC	13.66±1.17*	18.63±0.71*	124.19±1.82*	65.86±2.39*

NO: Normal group, EH: *Epimedii Herba* group, CT: CCl_4-treated group, EC: *Epimedii Herba* + CCl_4-treated group
*$p<0.001$, values are mean ± SE (n=7).
SOD : superoxide dismutase

간 조직에서의 병리학적 관찰

정상군과 음양곽 만을 투여한 군에서 동물의 간 조직은 중심정맥(central veins)을 중심으로 전형적인 6각형의 방사형 hepatocytic cords를 보여 주었으나(Fig. 1-A, 1-B), CCl_4를 투여한 군의 간 조직은 중심정맥 주위의 울혈(cnetrilobular congestion)이 특징적이었다(Fig. 1-C). 특히 이 부위에서는 간세포 변성(hepatocytic degeneration)으로 hepatocytic cords가 와해되어 형태가 유지되지 않았다. 또한 손상부위에 염증세포의 침윤(infiltration)과 주위로 lipid droplets가 산재되어 관찰되었다.

이에 비해 음양곽과 CCl_4를 투여한 군에서는 centrilobular congestion과 hepatocytic degeneration이 완화되어 간세포 변성면적이 작아짐으로써 지방과립과 염증세포 침윤이 국소적으로 중심정맥 주변으로 분포하여(Fig. 1-D) CCl_4 투여군보다 상당히 개선되었음을 보여 주었다. 이러한 조직병리학적 소견에 있어서의 경향은 항산화계의 효소 활성의 변동을 뒷받침하는 것으로 사료되며 앞으로 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 5. Effect of water extract of *Epimedii Herba* on GPx activity in female rat liver

Experimental group	Homogenate (mU/mg protein)	Mitochondrial fraction (mU/mg protein)
NO	194.69±4.54	192.57±5.60
EH	204.69±1.87	190.38±8.55
CT	86.75±2.61	86.91±2.05
EC	169.18±6.33*	143.57±2.81*

NO: Normal group, EH: *Epimedii Herba* group, CT: CCl_4-treated group, EC: *Epimedii Herba* + CCl_4-treated group
*$p<0.001$, values are mean ± SE (n=7).
GPx : glutathione peroxidase

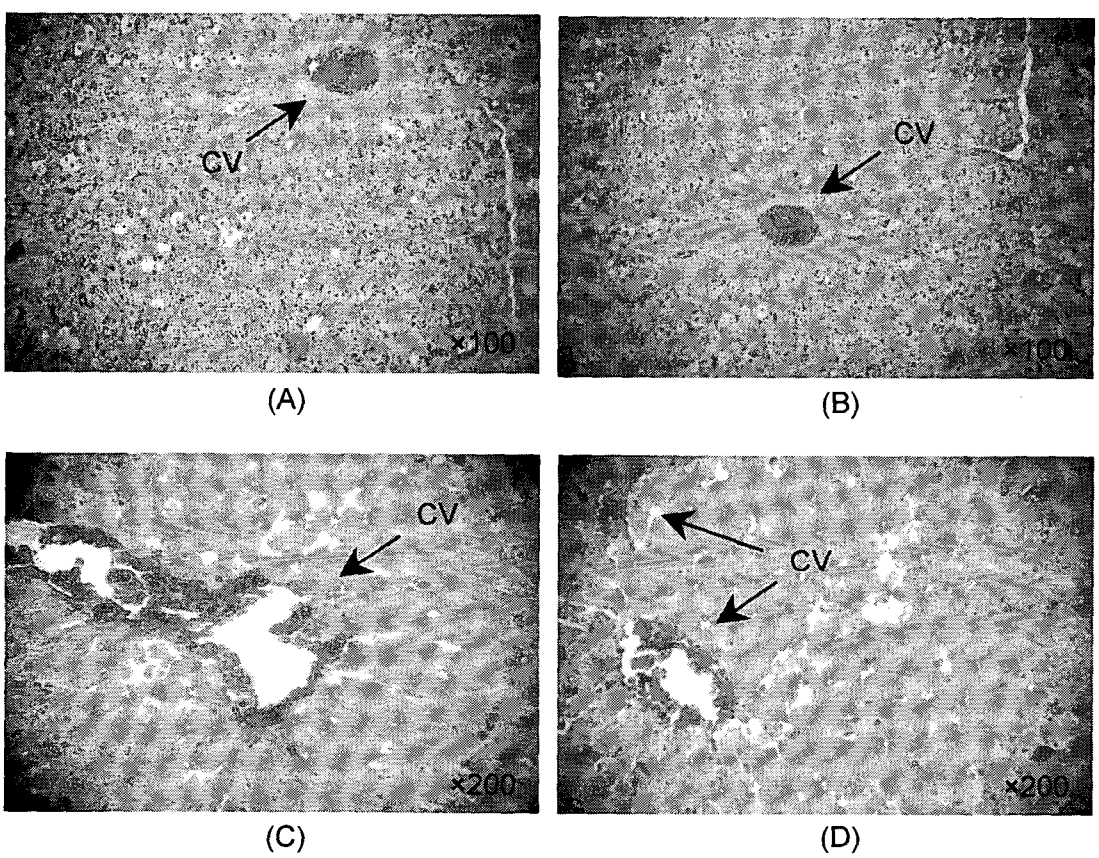

Fig. 1. Histopathologic examination of various experimental group in hepatotoxicity (H&E)
(A) NO : Normal group
(B) EH : *Epimedii Herba* group
(C) CT : CCl_4-treated group
(D) EC : *Epimedii Herba* + CCl_4-treated group

요 약

음양곽의 항산화 효과를 규명하기 위하여 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 사용하여 음양곽 추출물을 2주간 복강내로 투여하고 CCl_4에 의한 간독성 경감기전을 혈액 및 간 조직에서의 효소 변동과 간 조직을 병리학적으로 관찰하였다. CCl_4의 투여로 AST, ALT, MDA가 증가하였으나 음양곽을 전처리하고 CCl_4를 후 투여한 경우에는 AST, ALT, MDA가 감소하였다. CCl_4의 투여로 SOD, catalase, GPx가 감소하였으나 음양곽 전처리한 후 CCl_4를 투여한 경우에는 SOD, catalase, GPx가 증가하였다. 음양곽은 CCl_4로 유도된 free radicals를 scavenging함으로써 간독성을 경감시키는 것으로 사료된다. 위의 생리활성과 항산화계 변화 지표에서 나타난 음양곽의 간기능 보호효과를 형태학적으로 확인하기 위한 조직병리학적 검사결과 음양곽이 세포막의 소기관들을 과산화로부터 보호함으로써 효소활성의 최적구조를 유지시켜 간 손상을 완화시키는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, Methods. *Enzymology* **105**, 121-126.
2. Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal Biochem.* **44**, 276-287.
3. Butler, T. C. 1990. Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissues and tissues constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **134**, 311-319.
4. C. A. Rice-Evans and N. J. Miller, in : C. A. Rice-Evans, L. Packer (eds.). 1998. Flavonoids in Health and Disease. *Marcel Dekker, Inc., New York*, pp. 199-218.
5. C. S. Jeong, K. W. Jung and J. S. Jeong. 1999. 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(2)**, 172-178.
6. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
7. Fred, J., Yost, J. and Fridovich, I. 1976. Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 514-518.
8. Fridovich, I. 1986. Biologic effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophysm* **247**, 1-15.
9. Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt. 1982. Hayes : Principles and Methods of Toxicology. *Raben Press*, pp. 407-445.
10. Gutteridge, J. M. C., Beard, A. P. C and Quinlan, G. J. 1983. Superoxide-dependent lipid peroxidation. Problem with the use of catalase as a specific probe for Fenton-derived hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 901-907.
11. H. Mao, L. Zhang, Y. Wang and X. Li. 2000. Experimental studies of icariin on anticancer mechanism. *Zhong Yao Cai.* **23(9)**, 554-556.
12. H. R. Ling, H. Sirén, M. L. Riekkola, P. Vuorela, H. Vuorela and R. Hiltunen. 1996. Optimized separation of pharmacologically active flavonoids from Epimedium species by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **746**, 123-129.
13. H. I. Choi, S. I. Lee, D. K. Ahn and H. C. Kim. 1997. A Study on the Antihypertensive Effect of Epimedii Herba. *J. of Herbology* **12(1)**, 35-44.
14. L. Tian, Z. C. Xin, Y. M. Yuan, J. Fu, W. J. Liu and L. L. Wang. 2004. Effects of icariin on intracavernosal pressure and systematic arterial blood pressure of rat. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **84(2)**, 142-145.
15. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958.
16. M. K. Lee, Y. J. Choi, S. H. Sung, D. I. Shin, J. W. Kim and Y. C. Kim 1995. Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum. Plnata Med.* **61(6)**, 523-526.
17. Lowry, O. H., Rosenbrough. N. J., Farr, A. S. and Randall, R. J. 1951. Protein Measurenment with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-261.
18. McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M. and Janzen, E. G. 1984. Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol, Chem..* **259**, 2135-2143.
19. McPhalen, C. A., Vincent, M. G. and Jansonius, J. N. 1992. X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **225**, 495-517.
20. Ohkawa, A. and Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* **95**, 351-358.
21. Rosen, D. R., etal. 1993. Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
22. S. S. Kang, J. S. Kim, Y. J. Kang and H. K. Han. 1990. Phytochemical studies on Epimedii Herba (II). *Kor. J. Pharmacogn.* **21(1)**, 56-59.
23. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. 1983. Structure and mechanism of Cu, Zn, superoxide dismutase. *Nature* **306**, 274-287.
24. Takaharu Nomura and Kiyonori Yamaoka. 1999. Low-dose γ-ray irradiation reduces oxidative damage induced by CCl_4 in mouse liver. *Free Radical Biology & Medicine.* **27(11/12)**, 1324-1333.
25. Von, Sonntag. 1987. In "The Chemical Basis of Radiation of biology" Tylor and Francis.(ed.). London. pp. 31.
26. W. K. Li, P. G. Xiao, G. Z. Tu, L. B. Ma and R. Y. Zhang 1995. Flavonol Glycosides from *Epimedium koreanum. Phytochemistry* **38(1)**, 263-265.
27. Yosjikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N., Seto, O. and Kondo, M. 1983. Effects of superoxide dimutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas* **50**, 869-872.