

장기간의 부추식이 ICR 마우스의 간과 피부조직의 활성산소종 생성에 미치는 영향

문갑순[†] · 이민자

인제대학교 식품생명과학부, 바이오헬스 소재 연구센터

The Long Term Effect of *Buchu* (Chinese chives) Diet on ROS Formation in the Liver and Skin Tissue of ICR mice

Gap-Soon Moon[†] and Min-Ja Lee

Dept. of Food and Biotechnology,
Biohealth Products Research Center Supported by MOST & KOSEF and College of Biomedical
Science and Engineering School of Food Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

Abstract

To investigate the long term effect of *buchu* (Chinese chives) diet on ROS formation in the liver and skin tissue of ICR mice, one of control, 2% or 5% *buchu*-added diet was fed to ICR mice for 12 months. Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide(H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) contents were measured in cytosol, microsome, mitochondria of liver and skin of mice, respectively. *Buchu* diet showed a significant decrease of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical contents in liver and skin tissues compared to control diet, and this effect is especially higher at 5% than at 2% *buchu* diet level. ICR mice showed an age-dependent increase in ROS contents, while the group fed *buchu* diet decreased its ROS contents significantly and ROS contents of liver appeared to be 2 fold higher than skin. The results of the present study suggest that antioxidative components and sulfur-compounds in *buchu* diet appear to be responsible for the inhibition of ROS formation in ICR mice.

Key words: *buchu* (Chinese chives), ROS, superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, liver, skin

서 론

생물체가 호흡을 통하여 에너지를 만들어 낼 때 산소분자는 전자각에서의 전자배열의 특수성 때문에 반응성이 높은 산소라디칼들을 생성하게 된다. 이 활성산소종들은 반응성이 대단히 높아 세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산을 파괴하여 조직에 산화적 손상을 초래하게 되고 만성적인 산화적 손상은 세포의 기능저하뿐만 아니라 노화나 암과 같은 각종 만성질환을 유발하는 원인이 된다(1,2). 생체 내에서 생성되는 대표적인 활성산소종에는 $O_2^{\cdot-}$, 과산화수소, $OH\cdot$ 가 있으며 이들은 세포 내 미토콘드리아나 마이크로솜 같은 과립이나 시토솔에서 주로 생성된다.

이러한 활성산소종들은 정상 에너지 대사과정에서는 물론 그 외 여러 기전에 의해 끊임없이 생성되며 동시에 각종 효소 및 비효소적 항산화 물질에 의해 제거되어 정상 생체에서는 이들의 생성과 소거가 균형을 이루고 있다. 생체에 존재하는 효소적 항산화제로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), catalase 등이 있고 비효소적

항산화제에는 비타민 C, 토코페롤, 환원형 glutathione, 셀레늄, 요산, 합황화합물, 페놀, 카로테노이드, 만니톨 등이 알려져 있다(3,4). 특히 식물에 함유되어 있는 phytochemical 물질들의 유리기 소거 작용이 속속 규명되면서 식물체를 이용한 산화적 스트레스 억제에 관한 연구에 뜨거운 관심이 몰리고 있다(5,6).

부추(*Allium tuberosum R.*)는 우리나라 사람들이 즐겨먹는 향신채소류이다. 부추에는 클로로필, β -카로틴, 비타민 C 같은 영양성분뿐만 아니라 합황화합물, 플라보노이드류 등의 phytochemical 류가 다양하게 함유되어 있음이 밝혀지고 있고 이들 성분들의 항산화효과(7,8) 및 유해산소 소거작용(9,10)이 밝혀지고 있어 부추식이 활성산소 소거작용이 기대된다. 부추의 항산화효과에 관해서는 Kwak 등(11)과 Hwang 등(12)이 김해 부추 및 포항 부추에서 SOD 유사활성을 측정 한 바 있고 Lee 등(13,14)은 장기간의 부추섭취가 동물조직의 산화 및 노화를 확연히 억제하였고 자외선 조사시 피부노화를 억제하는 효과를 확인한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 부추 식이의 활성산소종 소거 효과를 규명하기 위하여 ICR

[†]Corresponding author. E-mail: fdsnmoon@ijnc.inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3234. Fax: 82-55-321-0691

마우스에 부추를 장기간 투여하고 간 및 피부조직에서 생성되는 활성산소종의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 부추는 경남 김해시 대동면에서 5월에 수확한 3벌 부추로서 동결건조하고 분말화한 후, -70°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험동물의 사육

실험 동물은 체중 19.5~21.0 g 가량의 ICR 마우스 수컷을 실험동물센터(대전)에서 구입하여 실험 시작하기 전 시판 고형사료를 먹이면서 7일 간 환경에 적응시킨 후 완전임의배치법(completely randomized design)에 의해 평균 체중이 유사하도록 대조군, 부추 2% 첨가식이군, 부추 5% 첨가식이군의 세 그룹으로 나누어 한 그룹당 6마리씩 사육용 cage속에 넣어 12개월간 식이를 급여한 후에 희생시켰다. 대조군에는 부추가 첨가되지 않은 AIN-76 식이를 제공하였으며, 실험군은 AIN-76 식이에 부추 분말을 2% 및 5% 첨가한 부추 첨가식을 12개월 간 공급하였다. 대조군 및 실험군의 식이조성은 Table 1에 나타내었다. 동결건조부추는 AOAC의 방법(15)에 따라 일반성분과 총 식이섬유함량을 분석하였으며 식이에 첨가시 단백질, 지질, 식이섬유량이 동일하도록 casein, corn oil, cellulose의 양을 조정하였다. 사육기간동안 식수로 지하수를 주 3회 공급하였고 식이는 매일 공급하였으며 체중증가량은 매주 1회 측정하였다. 사육실의 온도는 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였으며 12시간 간격으로 조명을 점등 및 소등하였다.

실험 동물의 희생 및 시료의 채취

실험 동물을 한 마리씩 테시케이터에 넣어 드라이 아이스로 마취시켜 개복하였으며, 개복 후 EDTA를 10 mg씩 넣은 3 mL용 주사기를 이용하여 심장에서 채혈하였고 피부는 털을 전기 면도기로 깎은 다음 표피와 진피를 포함하는 조직을 떼어내어 0.9% 생리 식염수로 씻어 털과 혈액 등을 제거하고 여과지로 염용액을 제거한 뒤 무게를 측정하고 -70°C 냉동

Table 1. Composition of experimental diet (%)

Ingredient	Control ¹⁾	2% buchu diet	5% buchu diet
Casein	20.00	19.56	18.90
D,L-Methionine	0.30	0.30	0.30
Corn starch	65.00	64.21	63.04
Cellulose	5.00	4.31	3.27
Corn oil	5.00	4.92	4.79
AIN-76 vitamin mixture	1.00	1.00	1.00
AIN-76 mineral mixture	3.50	3.50	3.50
Choline	0.20	0.20	0.20
Buchu powder	-	2.00	5.00

¹⁾Control diet was prepared following AIN-76 B-65 guidelines for mouse experiment.

고에 보관하면서 실험하였다.

간조직은 1.15% KCl-10 mM 인산완충액(pH 7.4)에 5 mM EDTA를 첨가한 용액으로 균질화한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 얻었다. 이를 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 미토콘드리아 분획을 취하였으며, 분리된 상층액을 40,000 rpm에서 60분간 원심분리하여 시토솔 분획과 마이크로솜 분획을 취하였다. 시토솔 분획은 수퍼옥사이드 아니온 함량 측정에 사용하였고, 마이크로솜 분획은 과산화수소 함량 측정에 사용하였다.

시토솔 분획에서의 수퍼옥사이드 아니온($\text{O}_2^{\cdot-}$) 측정

시토솔 분획에서의 수퍼옥사이드 아니온 함량은 Choi 등(16)의 변형된 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 300 μL 를 취하고 0.1 mM EDTA를 함유한 0.3 M 인산완충액(pH 7.4) 36 mL, 3 mM potassium cyanide 680 μL , 0.1 mM cytochrome C 4 mL을 혼합한 혼합용액을 2 mL 첨가한 후 진탕하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 과정은 얼음 위에서 실시하였다.

마이크로솜 분획에서의 과산화수소(H_2O_2) 측정

마이크로솜 분획에서의 과산화수소 함량은 Choi 등(16)의 변형된 방법에 따라 측정하였다. 즉, 400 mM potassium 인산완충액(pH 7.4) 400 μL , 200 mM nicotinamide 200 μL , 100 mM MgCl_2 , 50 mM sodium azide 200 μL , 60 mM NADPH 200 μL , 시료, 증류수를 혼합하여 전체 부피가 2 mL가 되도록 한 다음 이 혼합액을 37°C 에서 15분간 배양하여 1 mL 취하고 1.2 M TCA 1 mL을 첨가하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 1 mL 취하였다. 10 mM ferrous ammonium sulfate 0.2 mL, 2.5 M KSCN 0.1 mL를 첨가하고 실온에 10분간 방치한 다음 480 nm에서 흡광도를 측정하였다.

미토콘드리아 분획에서의 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) 측정

미토콘드리아 분획에서의 hydroxyl radical 함량은 Choi 등(16)의 변형된 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.1 M potassium 인산완충액(pH 7.4), 10 mM NaN_3 , 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate, 0.54 M NaCl 33.3 μL 를 취한 후 이 혼합액을 37°C 에서 15분간 배양시킨 후 혼합액에 8.1% SDS 75 μL , 20% acetic acid 500 μL , 증류수 25 μL 를 첨가하고 1.2% TBA 333 μL 를 첨가하여 30분간 끓인 후 실온에서 식혀 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시키고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 함량의 측정

Lowry 등(17)의 방법에 의해 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 mean \pm SD로 표시하였고, SPSS program을 이용하여 one-way ANOVA로 처리한 뒤 유의차가 나타날 경우 Turkey test로 각 군간의 유의성을 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

간과 피부조직의 수퍼옥사이드 아니온(O₂⁻·) 함량의 변화

Fig. 1에 간에서 분리한 시토솔 분획에서의 수퍼옥사이드 아니온의 함량을 나타내었다. 대조군의 수퍼옥사이드 아니온 함량은 1개월에 1.52±0.37 nmol/mg protein이었으나 가령에 따라 점차 증가하여 7개월에 3.38±1.13 nmol/mg protein, 13개월에 4.84±1.45 nmol/mg protein으로 300% 이상 증가하였다. 2% 첨가 식이군의 경우 7개월까지는 수퍼옥사이드 아니온 함량이 약간 증가하였으나 그 이후에는 소량 감소하였고 대조군에 비해서는 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 5% 첨가 식이군은 연령이 증가하여도 거의 수퍼옥사이드 아니온 값이 증가하지 않아 대조군과 2% 첨가 식이군에 비해 현저히 낮은 함량을 나타내었다.

피부에서 분리한 시토솔 분획물 중의 수퍼옥사이드 아니온 함량을 Fig. 2에 나타내었다. 1개월된 동물 피부조직 중의

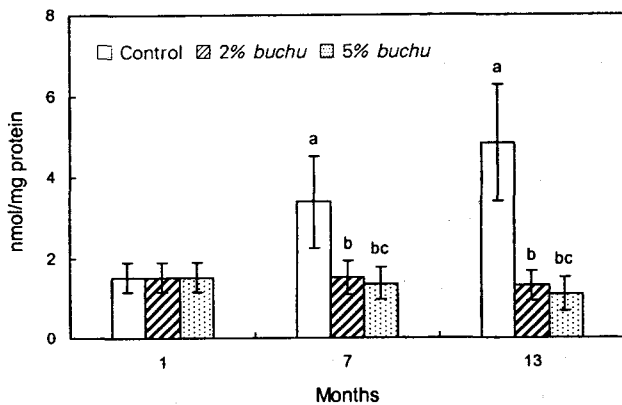


Fig. 1. Age-related superoxide anion contents of liver of mice fed buchur diet.

Values are mean±SD (n=6).

^{a-c}Values with different alphabets in the same column are significantly different analyzed by one-way Anova followed Turkey's test at the level of 0.05.

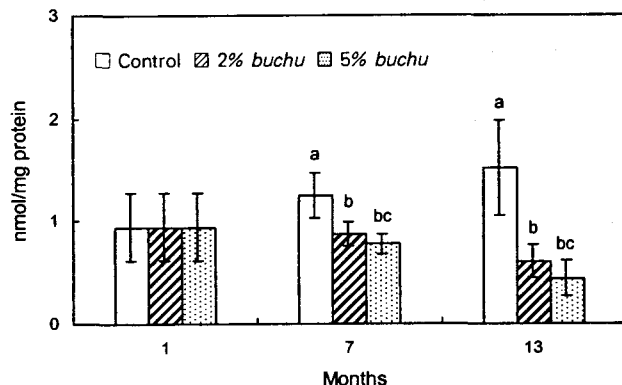


Fig. 2. Age-related superoxide anion contents of skin of mice fed buchur diet.

Values are mean±SD (n=6).

^{a-c}Values with different alphabets in the same column are significantly different analyzed by one-way Anova followed Turkey's test at the level of 0.05.

수퍼옥사이드 아니온 함량은 간조직의 62% 정도로 나타났고 가령에 따른 증가도 완만하여 13개월 때에는 간조직의 31% 정도로 낮았다. 2% 첨가 식이군에서는 시토솔의 수퍼옥사이드 아니온 함량을 대조군에 비해 7개월에 30% 가량 저하시켰으나 13개월에서는 60% 가량 저하시켜 부추의 섭취기간이 늘어날수록 활성산소 억제효과가 커짐을 알 수 있었다. 이러한 경향은 5% 첨가 식이군에서 더욱 분명하여 시토솔의 수퍼옥사이드 아니온 생성을 거의 억제하였고 7개월보다 13개월에서 그 효과가 더욱 확실하였다.

수퍼옥사이드 아니온은 호흡연쇄계에서 삼중항산소가 전자를 얻어 생성된다. 이것은 비교적 수명이 긴 활성산소종으로서 이의 축적은 미토콘드리아 내 DNA 손상을 일으키는 원인이 된다. 손상된 미토콘드리아 DNA는 쉽게 수복되지 않으므로 세포변이를 일으키고 이것이 다음 세대로 전이되면서 기관의 기능을 손상하여 노화를 유발하게 된다. Auclair 등(18)은 늙은 쥐의 미토콘드리아에서 수퍼옥사이드 아니온이 형성됨을 처음 보고하였고 Lavie 등(19)은 노화시 뇌, 심장, 간 등의 원형질막의 수퍼옥사이드 아니온이 증가함을 보고하였다. 생체에 존재하는 superoxide dismutase(SOD)는 수퍼옥사이드 아니온을 소거하여 과산화수소로 변환시키는 대표적인 항산화효소계이다. William과 Rajindar(20)는 초파리의 Cu, Zn-SOD의 과발현은 수명을 연장시키고 노화와 관련된 생화학적, 기능적 변화를 지연시켰음을 보고하였다.

부추는 항산화효과가 대단히 높은 채소류로서 *in vitro*에서도 높은 항산화활성을 나타내었을 뿐만 아니라 동물에 대한 장기간의 투여는 조직의 지질과 단백질 산화를 억제하였으며 항산화 효소계를 활성화시켰다(13,14). 또한 Kwak 등(11)과 Hwang 등(12)의 연구에 의하면 부추는 강한 SOD유사활성을 나타내었으므로 이러한 효과들이 부추 식이의 수퍼옥사이드 아니온 소거작용으로 나타난 것으로 여겨진다.

간과 피부조직의 과산화수소(H₂O₂) 함량의 변화

Fig. 3에는 간에서 분리한 마이크로솜 분획 중의 과산화수소 함량을 나타내었다. 마우스 간조직의 과산화수소 함량은 1개월령에서 약 1.94±0.45 nmol/mg protein이었으나 가령과 함께 지속적으로 증가하여 7개월령에서 2.56±0.34 nmol/mg protein, 13개월령에서 2.93±0.56 nmol/mg protein으로 증가하였다. 부추 첨가 식이군은 과산화수소 생성을 유의하게 억제하여서 연령이 증가하여도 그 함량이 증가하지 않고 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었으며 대조군에 비해서는 농도 의존적으로 과산화수소생성을 억제하였다.

Fig. 4에는 피부 마이크로솜 분획에서의 과산화수소 함량을 나타내었다. 1개월령 마우스 피부조직 중의 과산화수소 함량은 간조직의 절반 가량 함유되어 있었고 가령과 더불어 증가하였으나 그 함량은 간조직보다는 크게 낮은 수준이었다. 부추식은 역시 피부조직의 과산화수소 증가를 억제하였는데 2%보다는 5% 첨가식의 효과가 유의하게 높았다. 부추식의 활성산소소거효과는 7개월령에서도 유의하게

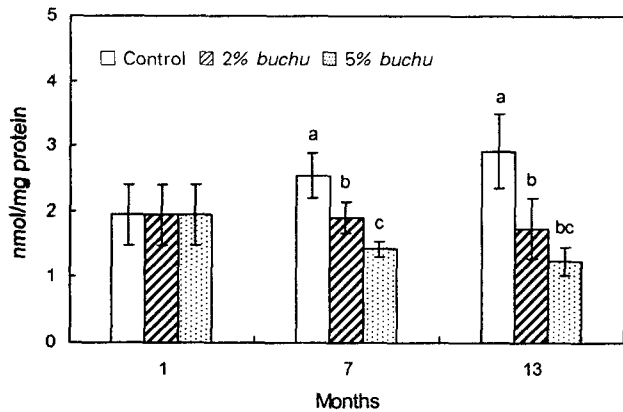


Fig. 3. Age-related hydrogen peroxide contents of liver of mice fed buchur diet. Values are mean \pm SD (n=6). ^{a-c}Values with different alphabets in the same column are significantly different analyzed by one-way Anova followed Turkey's test at the level of 0.05.

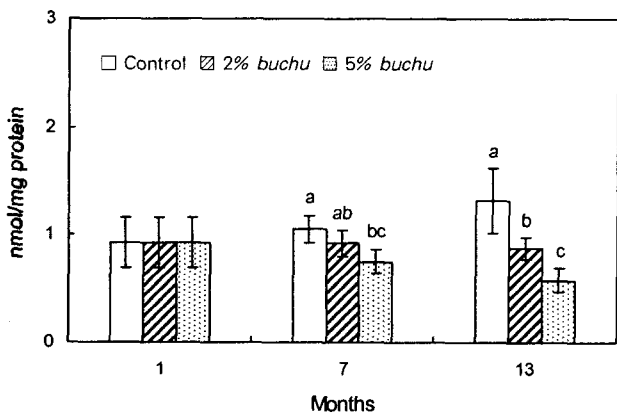


Fig. 4. Age-related hydrogen peroxide contents of skin of mice fed buchur diet. Values are mean \pm SD (n=6). ^{a-c}Values with different alphabets in the same column are significantly different analyzed by one-way Anova followed Turkey's test at the level of 0.05.

농도의존적인 효과를 나타내었지만 13개월령에서 그 효과가 더 분명하였다.

과산화수소는 체내에서 생성된 수퍼옥사이드 아니온이 비효소적으로 또는 SOD 촉매작용을 거침으로서 만들어지게 되고 amino acid oxidase와 xanthine oxidase를 포함하는 몇몇 산화효소의 작용에 의해서도 생성된다. 항산화효소계인 catalase는 과산화수소를 물과 산소로 전환시킨다. Catalase는 포유동물세포의 peroxisome에 존재하여 같은 곳에 존재하는 산화효소에 의하여 생성된 과산화수소를 파괴시키는 역할을 한다. 그러나 포유동물세포에 존재하는 과산화수소 제거효소는 glutathione peroxidase인 것으로 보이며 이 효소는 활성부위에 셀레늄을 함유하고 있다. Glutathione peroxidase는 과산화수소와 반응하여 GSH를 GSSG로 산화시킨다(21).

전보(13,14)에서 수퍼옥사이드 아니온을 일차적으로 과산

화수소로 분해시키는 SOD 활성화와 세포독성을 유발하는 과산화수소를 다시 산소와 물로 전환시키는 catalase 활성화 및 glutathione peroxidase 활성화가 대조군에 비해 부추 첨가식이군 특히, 5% 부추 식이군에서 현저히 높았던 것으로 미루어 항산화 효소계의 활성화 증가로 인해 과산화수소가 소거된 것으로 사료되어지며 또한 부추 속에 풍부하게 함유되어 있는 유리기 소거제들의 역할에 의한 것으로 추정된다. 부추 속에 다량 함유되어 있는 비타민 C나 클로로필, β -카로틴, glutathione도 항산화작용에 관여하며 특히, 부추에 풍부히 함유되어 있는 함유물질들이 부추를 섭취한 동물조직의 glutathione 함량을 증진시킴이 전보(13,14)에서 밝혀진 바 있다.

간과 피부조직의 hydroxyl radical(\cdot OH)함량의 변화

Fig. 5에는 연령 증가에 따른 마우스의 간 미토콘드리아 분획 중의 hydroxyl radical 함량을 나타내었다. 대조군의 경우 연령이 1개월에서 13개월로 증가함에 따라 hydroxyl radical 함량이 점차 증가하여서 마우스의 연령 증가와 더불어 활성산소가 간조직에 축적됨을 알 수 있었다. 이에 비해 부추 첨가 식이군에서는 hydroxyl radical 함량이 연령증가에도 불구하고 점차 감소하는 경향을 나타내었고 2% 첨가군보다 5% 첨가군에서 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다.

Fig. 6에는 피부에서 분리한 미토콘드리아 분획 중의 hydroxyl radical 함량을 나타내었다. 피부조직 중의 hydroxyl radical 생성량은 간조직의 절반 가량이었지만 간에서와 마찬가지로 연령증가와 더불어 증가하여서 7개월째에는 1개월보다 약간 증가하였으나 13개월째에는 급격히 증가하여 초기값의 약 2배 가량의 값을 나타내었다. 2% 첨가 식이군은 대조군보다 낮은 활성 산소량이 생성되었고 7개월과 13개월에서 유사한 생성량을 나타내었다. 그러나 5% 첨가 식이군은 연령이 증가함에 따라 활성산소 생성량이 급격히 감소하였다.

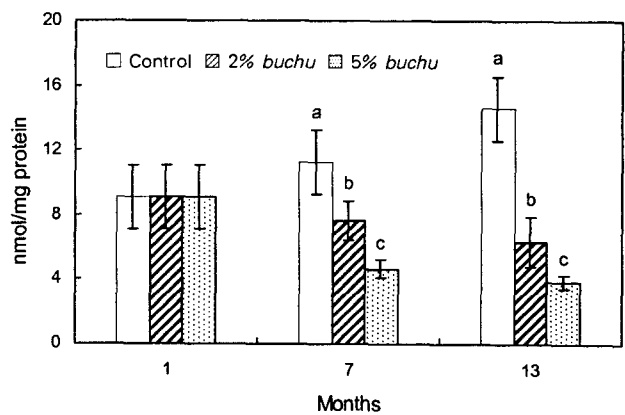


Fig. 5. Age-related hydroxyl radical contents of liver of mice fed buchur diet. Values are mean \pm SD (n=6). ^{a-c}Values with different alphabets in the same column are significantly different analyzed by one-way Anova followed Turkey's test at the level of 0.05.

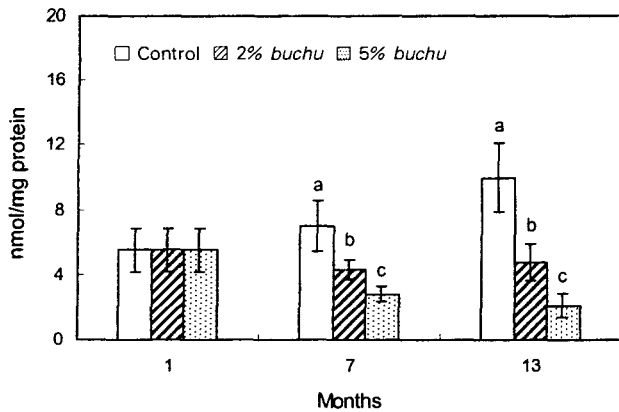


Fig. 6. Age-related hydroxyl radical contents of skin of mice fed buchu diet.

Values are mean \pm SD (n=6).

^{a-c}Values with different alphabets in the same column are significantly different analyzed by one-way Anova followed Turkey's test at the level of 0.05.

Hydroxyl radical은 수퍼옥사이드 아니온과 과산화수소로부터 Haber-Weiss, Fenton reaction을 통해 형성되는 활성산소종으로서 반감기가 가장 짧아 반응성이 가장 크므로 주위의 생물조직을 공격하여 치명적인 손상을 유발하며 심지어 정상세포까지도 파괴시킨다(22). 요산, 비타민 C, glutathione, 토코페롤은 생체 내 hydroxyl radical의 강력한 소거제로 추정되고 있다(23-27). 또한 허브와 양념채소류에서 최근 수많은 페놀화합물 등이 발견되었고 이들의 활성산소 소거활성이 평가되고 있다. Zhao 등(28)은 polymorphonuclear leukocyte 모델계에서 활성산소에 대한 녹차 추출물의 소거효과를 확인한 바 있고 Chung 등(29)은 세계에 널리 분포하는 양념류의 hydroxyl radical 소거효과를 보고하였는데 특히, 강력한 hydroxyl radical 소거제인 3, 5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid methyl ester를 흑겨자로부터 추출하였다.

전보(13,14)에서 부추식이군의 항산화효소계 활성이 높았고 또한 부추에 다량 존재하는 비효소적 항산화제인 비타민 C, 환원형 glutathione, 셀레늄, 요산, 함황화합물, 페놀물질, 카로테노이드 등이 동물의 간과 피부조직에서 hydroxyl radical을 소거하여 산화를 현저히 억제한 것으로 사료된다.

요 약

부추식이의 활성산소종 소거 효과를 규명하기 위하여 ICR 마우스를 12개월간 사육하면서 2%, 5% 부추식을 투여하고 간과 피부조직의 시토크솔, 마이크로솜 및 미토콘드리아를 분리하여 가령에 따른 활성산소종인 수퍼옥사이드 아니온, 과산화수소 및 hydroxy radical 함량을 측정하였다. 이들 활성산소종들의 함량은 간에 피부조직의 2배 이상이 함유되어 있었고 가령에 따라 활성산소종의 함량은 증가하였다. 항산화효과가 큰 부추를 식이에 첨가시켰을 때 활성산소종들의

생성을 현저히 억제하였고 2%보다는 5% 부추 첨가식이군에서 농도의존적으로 유의한 활성산소종 감소효과가 얻어졌다. 이는 부추에 다량 함유되어 있는 항산화 관련 물질들이 조직의 산화를 막고 활성산소종들을 처리하는 항산화효소계 활성을 높였기 때문으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재연구센터(Biohealth Products Research Center) 및 농림부의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Aust SD, Chignell, CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. 1993. Free radicals in toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 120: 168-178.
2. Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 47: 412-426.
3. Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging* 18: 685-716.
4. Andrew PW. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology* 128: 379-391.
5. Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *The Journal of Nutrition* 131: 1010S-1015S.
6. Kuresh AY, James AJ. 2001. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunction: A multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 583-594.
7. Anatol K, Ulrike M, Sonke A, Amaar U, Charlotte L, Tomas MT, Ulrike B. 2001. Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 345-354.
8. Rakesh PP, Brenda JB, Jack HC, Neil H, Marion K, Balaraman K, Dale AP, Stephen B, Victor DU. 2001. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 1570-1581.
9. Mortensen A, Skibsted LH, Sampson J, Rice-Evans C, Everett, SA. 1997. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Letters* 418: 91-97.
10. Yamaguchi F, Yoshimura Y, Nakazawa H, Ariga T. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *J Agric Food Chem* 47: 2544-2548.
11. Kwak YJ, Chun HJ, Kim JS. 1998. Chlorophyll, mineral contents and SOD-like activities of leeks harvested at different times. *Kor J Soc Food Sci* 14: 513-515.
12. Hwang CW, Shin HK, Do MS, Kim YJ, Park JH, Choi YS, Joo WH. 2001. The various biofunctional effects (anticarcinogenic, antioxidative and lypolytic activity) of Pohang buchu. *Kor J Food Sci Tech* 33: 279-281.
13. Lee MJ, Ryu BM, Lee YS, Moon GS. 2002. Effect of long term buchu (Chinese chives) diet on antioxidative system of ICR mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 834-839.

14. Lee MJ, Ryu BM, Kim MH, Lee YS, Moon GS. 2002. Protective effect of diet *buchu* (Chinese chives) against oxidative damage from aging and ultraviolet irradiation in ICR mice skin. *Nutraceuticals & Food* 7: 238-244.
15. AOAC. 1980. *Official Methods of Analysis*. 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. p 31.
16. Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Kim HS. 1999. Investigation of anti-aging effect and determination of chemical structures of pine needle extract (PNE) through the animal experiments. 1. Effects of PNE on oxygen radicals and their scavenger enzymes in liver of SD rats. *Korean J Life Science* 9: 466-472.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
18. Auclair C, Prost D, Hakim J. 1978. Superoxide anion production by liver microsomes from phenobarbital treated rat. *Biochemical Pharmacology* 27: 355-358.
19. Lavie L, Weinreb O, Gershon D. 1992. Age-related alterations in superoxide anion generation in mouse peritoneal macrophages studied by repeated stimulations and heat shock treatment. *J Cellular Physiology* 152: 382-388.
20. William CO, Rajindar SS. 2003. Does overexpression of Cu, Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? *Experimental Gerontology* 38: 227-230.
21. Tatsuo N, Takashi W, Yusaku N, Kazuo Y. 2002. Mutagenic target for hydroxyl radicals generated in *Escherichia coli* mutant deficient in Mn⁺ and Fe-superoxide dismutases and Fur, a repressor for iron-uptake systems. *DNA Repair* 1: 411-418.
22. Harman D. 1984. Free radical theory of aging: The free radical disease. *Aging* 7: 111-131.
23. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. 2001. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J Cardiovascular Pharmacology* 38: 365-371.
24. Yen GC, Chung DY. 1999. Antioxidant effects of extracts from *Cassia tora L.* prepared under different degrees of roasting on the oxidative damage to biomolecules. *J Agric Food Chem* 47: 1326-1332.
25. Burkitt MJ, Duncan J. 2000. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys* 381: 253-263.
26. Burkitt MJ, Milne L. 1996. Hydroxyl radical formation from Cu(II)-trolox mixtures: insights into the pro-oxidant properties of alpha-tocopherol. *FEBS Letters* 379: 51-54.
27. Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.
28. Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. 1989. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics* 14: 175-185.
29. Chung FL, Juchatz A, Vitarius J, Reiss B, Hecht SS. 1984. Inhibition of target tissue activation of N'-nitrosornicotine and N-nitrosopyrrolidine by dietary components. *IARC Scientific Publications* 57: 797-804.

(2003년 2월 13일 접수; 2003년 4월 10일 채택)