

CCl₄로 誘發된 白鼠의 肝損傷에 대한 葛根의 肝保護作用 연구

현동환 · 정선영 · 정상신 · 하기태 · 김철호¹ · 김동욱² · 김준기 · 최달영*

동국대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 한의과대학 생화학교실, 2: 목포대학교 생물산업학부 생약자원학과

The Study of Protective Effect of Puerariae Radix against CCl₄-induced Hepatotoxicity

Dong Hwan Hyun, Sun Yeong Jung, Sang Shin Jung, Ki Tae Ha, Cheorl Ho Kim¹, Dong Wook Kim², June Ki Kim, Dall Yeong Choi*

Department of Pathology, 1: Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, 2: Department of Medicinal Plant Resources, Mok-po National University

In the present study, we investigated the protective effect of the Puerariae Radix water extract (PRE) against CCl₄-induced hepatotoxicity and the mechanism underlying these protective effects in the rats. The pretreatment of PRE has shown to possess a significant protective effect by lowering the serum alanine and aspartate aminotransferase (AST and ALT) and alkaline phosphatase (ALP). This hepatoprotective action was confirmed by histological observation. In addition, the pretreatment of PRE prevented the elevation of hepatic malondialdehyde (MDA) formation and the depletion of reduced glutathione (GSH) content and catalase activity in the liver of CCl₄-injected rats. The PRE also displayed hydroxide radical scavenging activity in a dose-dependent manner (IC₅₀ = 83.6 μg/ml), as assayed by electron spin resonance (ESR) spin-trapping technique. Moreover, the expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) mRNA, as measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), was significantly decreased in the liver of PRE-pretreated rats when compared with that in the liver of control group. Based on these results, it was suggested that the hepatoprotective effects of the PRE may be related to antioxidant effects and regulation of CYP2E1 gene expression

Key words : Puerariae Radix, CCl₄, hepatoprotective, CYP2E1, antioxidant, ESR, RT-PCR

서 론

갈근(Puerariae Radix)은 콩과의 다년생 덩굴성 목본인 취(*Pueraria thunbergiana* Benth.)의 뿌리를 약용 및 식용으로 사용한 것으로¹⁾ 한의학에서는 해기발표(解肌發表), 생진지갈(生津止渴) 및 개위하식(開胃下食) 등의 효능을 가진 것으로 인식되었으며²⁾, 최근에는 위궤양³⁾, 고혈압⁴⁾, 협심증⁵⁾, 당뇨병⁶⁻⁷⁾ 등과 관련된 연구 결과가 발표되었다. 또한 갈근은 항산화작용과 지방과산화 억제 작용이 있으며⁸⁻⁹⁾ 보간작용이 있는 것으로 알려진 coumarin 성분을 가지고 있다는 것으로 보아 간조직을 보호할 것으로 기대된다¹⁰⁾. 또한 근연종인 *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi나 *Pueraria*

thomsonii (Leguminosae)에 대하여 alcohol로 인한 간손상과 관련된 연구가 진행되고 있으며¹¹⁻¹²⁾, 최근에는 간손상과 관련된 면역학적 연구¹³⁾ 및 cytochrome P450 등 약물대사계 효소와 관련성¹⁴⁾도 제시되고 있다. 사염화탄소(CCl₄)는 실험적인 간독성 유발에 전형적으로 사용되고 있는데 혈청내 transaminase의 증가 등 각종 효소활성에 변화를 초래하며¹⁵⁾, 급성적으로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽중심성 괴사 등이 일어나고 만성적으로는 간경변을 초래한다¹⁶⁾. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만, 간세포의 무과립 내형질세망에 들어있고 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 Cytochrome P450에 의해 반응성이 높은 독성 Free Radical인 CCl₃로 전환되어¹⁷⁾ 세포막의 인지질 과산화 및 내형질세망의 구조와 기능 파괴, 미토콘드리아 및 세포내 효소활성의 파괴 등 다양한 세포 상해를 일으켜 세포의 괴사나 지방변성을 초래한다¹⁸⁻²⁰⁾.

* 교신저자 : 최달영, 경북 경주시 석장동 707번지, 동국대학교 한의과대학
· E-mail : cdydkom@dongguk.ac.kr Tel : 054-770-2650
· 접수 : 2003/01/09 · 수정 : 2003/02/10 · 채택 : 2003/03/20

따라서 본 연구는 갈근 열수추출물을 백서(Rat)에 일정기간 투여한 후 사염화탄소로 간손상을 유발하여 혈청내 효소검사, 조직염색, 항산화효소활성 및 항산화능의 측정 및 사염화탄소의 대사과정에 핵심적인 작용을 하는 Cytochrome P450의 유전자발현에 대한 실험을 통해 급성간손상에 대한 갈근의 간보호작용에 대하여 연구하여 유의한 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료

실험에 사용된 갈근(Puerariae Radix)은 경북 영천지방에서 자생하는 칩(Pueraria thunbergiana Benth.)의 뿌리를 채취한 것으로, 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 갈근 300g에 증류수 1.5 l 를 넣고 100℃에서 3시간 동안 가열한 후 여과하여 약 650ml의 전탕액을 얻었으며, 이를 4℃에 냉장보관하였다가 실험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 처치

실험용 동물은 체중 150±20g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하였으며, 7일간 동국대학교 한의과대학 동물실험실에서 일정한 조건(온도 : 20±2℃, 습도 : 60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

실험동물은 3개의 군(정상군, 대조군, 실험군)으로 나누었으며, 6마리를 한군으로 사용하였다. 정상군은 mouse용 고형사료와 물을 제한없이 공급하였으며, 대조군은 7일간 고형사료와 물을 제한없이 공급한 후 carbon tetrachloride(CCl₄)를 0.5ml/kg/day 용량으로 복강주사하여 간독성을 유발시켰다. 실험군은 약물처치를 7일전부터 10ml/kg/day 용량으로 응용시킨 후 8일째에 carbon tetrachloride(CCl₄)를 0.5ml/kg/day 용량으로 복강주사하여 간독성유발 시킨 다음, CCl₄ 투여 24시간 후에 심장천자를 통해 혈액을 채취하고 간을 적출하였다.

3. 시약

본 실험에 사용한 시약은 carbon tetrachloride(Junsei chem.co Ltd., Japan), bovine serum albumine, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), sodium dodecyl sulfate(SDS), thiobarbituric acid(TBA), sulfosalicylic acid, potassium phosphate, Malondialdehyde tetrabutylammonium salt 등은 Sigma사(U.S.A.)에서 구입하였으며, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) 및 glutamate pyruvate transaminase (GPT) 측정용 kit, alkaline phosphatase (ALP) 측정용 kit는 아산제약사(Korea)에서 구입하였다. Cartimox-14 RNA isolation kit, RNA PCR kit(AMV)는 takara사(Japan)에서 구입하여 사용하였으며, CYP2E1 primer는 보한바이오사(Korea)에 의뢰하여 합성하였다. Hydrogen peroxide 및 n-butanol, ethanol, methanol, acetic acid 등 그밖의 시약들은 Junsei Chem. Co. Ltd.(Japan)의 순정제품(ultra-pure)을 사용하였다.

4. 생체시료의 제조

실험동물을 에테르(ether)로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 복부 대동맥에서 채혈하였으며 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 GOT, GPT, ALP 측정 효소원으로 사용하였다. 생리식염수(0.8% NaCl)로 관류시킨 간은 조직이 손상되지 않도록 주의하여 혈액이 제거될 때까지 생리식염수로 잘 씻어내고 whatman 여과지로 생리식염수를 제거한 후 -70℃에 동결 보존하여 사용하였다. 효소활성도 측정을 위해 전체 조직의 4배 용량의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 4℃에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 1000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액은 과산화지질 (lipid peroxide) 및 glutathion 함량을 측정하기 위한 시료로 사용하였고, 나머지 상층액은 600×g에서 15분간 원심분리하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아를 제거한 상층액을 catalase 활성도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 상기의 조작은 특별한 언급이 없는 경우는 모두 4℃에서 실시하였다(Fig. 1)

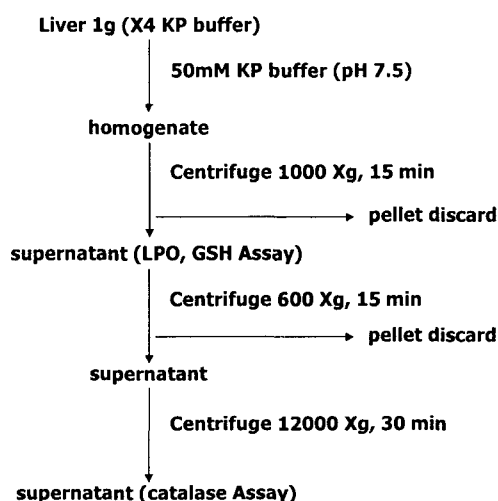


Fig. 1. Preparation of the sample fractions for enzyme studies.

5. 혈청내 효소활성의 측정

1) GOT 및 GPT의 활성측정

혈청중 GOT 및 GPT 활성측정은 Reitman-Frankel의 방법(21)에 따라 조제된 시약 Kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. GOT, GPT 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2 ml을 넣어 잘 혼합한 후 37℃에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 반응시킨 뒤 정색시액 1.0 ml을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4N NaOH 용액 10 ml을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 60분 이내에 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도 변화를 측정하였다. 혈청중 GOT, GPT의 활성도는 작성한 표준검량곡선에서 산출하였으며 혈청 1 ml 당 IU/ l 로 나타내었다.

2) ALP의 측정

혈청중 ALP 활성측정은 Petkova 등²²⁾의 방법에 따라 조제된 시약 Kit(아산제약)를 사용하여 실시하였다. 기질액 2.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한후 여기에 혈청 0.05 ml을 가하여 잘 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시켰다. 정색시약 2.0 ml을 넣고 충분히 잘 혼합한 후 실온에서 10분 이상 방치시키고 60분 이내에 500 nm에서 시약 blank를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 ALP의 활성도는 표준검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 King-Amstrong unit로 나타내었다.

6. 조직 절편의 제작 및 염색

간 조직을 10% 중성 포르말린에 2시간 이상 고정시킨 다음 automated tissue processing후 embedding하여 paraffin block을 만든 다음 5 μm의 절편을 만들어 slide glass에 부착 후 xylene으로 탈파라핀화 한다. 그후 100%, 90%, 80%, 70%, 60% ethanol 순으로 함수시키고 hematoxylin으로 핵을 염색한 후 1% HCl로 탈색한 다음 0.3% ammonia water로 중화를 시켰다. 세포질 염색을 위해 eosin으로 염색한 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol 순으로 탈수과정을 거쳤다. 청명과정으로 xylene I 및 II에 담갔다가 canada balsam으로 mounting하여 광학현미경으로 조직을 관찰하였다.

7. 항산화활성에 대한 측정

1) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradeford의 방법에 따라 Sigma사(USA)의 Bradford reagent를 이용하였으며, bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 산출하여 단백질을 측정하였다.

2) 간 조직의 Lipid peroxide(LPO) 함량측정

조직내 지질 과산화물의 함량 측정은 Ohkawa 등²³⁾의 TBA 법으로 측정하였다. 즉 조직 마쇄 균질액을 1,000×g에서 원심분리한후 20% 간조직 균질액 0.4 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5 ml와 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 1.5 ml를 가한다음 95℃ 항온수조에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 n-butanol: pyridine(15:1, v/v)의 혼합액 5 ml를 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 n-butanol c층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음, 검량표준 곡선에 준하여 과산화지질 함량을 간조직 1 mg당 생성된 malondialdehyde (MDA) 함량을 nmol로 나타내었다.

3) 간 조직의 Glutathion (GSH) 함량측정

간 조직중의 glutathione 함량은 Ellman²⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 간 조직 균질액을 1,000×g에서 원심분리 한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한후 1,000×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 sulf-hydryl group 이 발색제인 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (1 mM DTNB) 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 Glutathion 함량은 protein 1 mg당 nmol로 나타내었다.

4) 간 조직의 Catalase 활성측정

조직내 catalase 활성도는 Aebi²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH7.0)에 효소원 일정량을 넣고 기질로서 10 mM H₂O₂ 용액을 가하여 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 1분간 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 10 mM H₂O₂ 용액 대신에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)을 가해 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

5) ESR(Electron Spin Resonance)을 이용한 자유기소거효과 측정

갈근에 대한 OH radical scavenging 활성은 ESR (Electron spin resonance) spectrometer (JES-FA 100, JEOL 사, 동경, 일본)에 의해 측정을 하였다. OH radical의 발생은 H₂O₂와 FeSO₄의 Fenton반응에 의해 유발시켰으며, OH radical의 trapping제로서 DMPO(5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)를 사용하여 DMPO-OH adduct를 hyperfine splitting에 의해 나타나는 1:2:2:1의 peak중 가장 첫 번째의 peak height를 기준으로 평가하였다. peak ration는 내부표준물질 peak인 Mn²⁺의 peak와 DMPO-OH adduct peak의 첫 번째 peak의 height로서 구했다.

OH radical 소거 활성을 위한 반응액은 0.2 mM FeSO₄를 55 μl, 1 mM H₂O₂ 75 μl, 0.92 mM DMPO 20 μl와 50 μl의 검정생약을 첨가하여 10초간 vortex후, 반응액 200 μl를 수용성 radical측정용 cell (RST-LC09, Radical Research Co, Tokyo)이동시켰다. DMPO-OH spin adduct의 량은 최종 반응액 H₂O₂를 첨가 후 정확히 1분후에 측정하였다.

ESR기기의 측정 조건은 microwave frequency 9.4 GHz, microwave power 1.75 mW, modulation width 0.1 mT, sweep time 60 sec, time constant 0.1 sec, center field 335.8 mT, scan range 7.5 mT, modulation frequency 100 KHz, amplitude 320배에서 측정하였다.

8. Cytochrome P450(CYP2E1)의 mRNA 발현 측정

1) 간 조직 중 total RNA 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 Takara사의 Catrimox-14TM RNA isolation kit ver 2.11을 사용하였다. -70℃에 보관중이던 간조직 1 g을 homogenizer을 이용하여 잘 분쇄한 다음 Cartrimix-14 buffer 1 ml로 lysis시켜 실온에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리를 한다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 pellet에 DEPC 1 ml을 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 다시 원심분리를 한다. 상등액을 제거시킨 pellet에 guanidinium 0.5 ml 첨가하여 vortex한 후 phenol/chloroform/iso-amylalchol (25:24:1)을 0.5 ml 첨가시켜 vortex하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리한 후 상등액을 취해 iso-propylalcol을 equeal volume 넣어 잘 혼합한 후 -20℃에 30분간 방치시킨다. 다시 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 pellet을 70% 에탄올로 washing시키고 나서 진공하에 건조시켜 0.1% DEPC 용액 1 ml에 녹여 사용하였다.

2) cDNA 합성 및 RT-PCR

cDNA 합성은 RNA PCR kit(AMV)를 사용하였다. 본 실험에서는 Total RNA 1 ug/ul를 사용하였으며, MgCl₂(2.5 mM), 10xRNA PCR buffer, RNase free dH₂O, dNTP(10 mM), AMV reverse transcriptioase XL, Oligo dT(2.5 pmol/ul)가 되게 넣고 total volume을 20 μl가 되게 해서 혼합한 후 mineral oil을 50 μl 증충하여 PCR을 수행하였다. 즉 30℃에서 10분간 반응시키고 42℃에서 30분간 *annaling*시켜 신장할 수 있도록 만들어 주고 99℃에서 5분, 5℃에서 5분간 1 cycle을 실시한다. 합성된 cDNA는 CYP2E1 primer(100 pmol) 각각 0.5 μl 첨가하고 10x PCR buffer 5 μl, 2.5 mM dNTP 1 μl, sterile DDW 및 taq polymerase 1 μl, 2% DMSO를 첨가시켜 total volume 50 μl가 되게 PCR tube 상에 혼합한후 mineral oil을 50 μl 증충하여 PCR을 수행한다. PCR 반응은 94℃에서 5분간 95℃에서 1분간 denaturation 후 68℃에서 1분간 *annaling*시키고, 72℃에서 1분 30초 동안 35 cycle 반응시킨 다음 72℃에서 5분 동안 elongation 한다. 각각의 PCR product는 10 μl씩 1.2% agarouse gel 상에서 loading하여 전기영동을 시행하여 분석하였다. CYP2E1의 RT-PCR에 사용된 sense, antisense primer의 제작은 아래에 표시한 것과 같다.(Fig. 2)

```

901 actgagacca ccagcacaac tctgagatat gggctcctga tccatcatgaa ataccagaa
      sense →
961 attgaagaga aacttcatga agaattgac agggttattg ggccaagcgg cgtccctgct
1021 gtcagagaca gactggatat gccctacatg gatgctgtgg tgcagagat ccagagattc
1081 atcaatcttg tcccttccaa cctaccocat gaagcaacca gagatactgt gttccaagga
1141 tatgtcatcc ccaaggttac agttgtgatt ccaactctgg actccctctt atatgacagc
1201 catgagtttc cagatccaga gaagttaaaa cctgagcatt tccatgaatga aatgggaag
1261 ttaacagata gtgactatct caagcatttt tctgaggaa agcgtgtgtg tgttgagaa
1321 ggctggccc gcatggaatt gtttctgctc ctgtctgcta ttctgagca ttttaacctg
      ← antisense
1381 aagtctctgg ttgaccctaa ggatattgac ctgctcctg tcacagtgg ctttggcagt
1441 atccccccc aatttaaact ctgtgtcatt ccccttcat ga
    
```

Fig. 2. Rat CYP2E1 nucleotide sequence and design of PCR primer. PCR primers were designed based on GeneBank Nucleotide Sequence Database (accession No. M20131). A forward primer corresponding to base 907-932 (relative to the transcription start site) of rat CYP2E1 and reverse primer corresponding to bases 1315-1341 were used to amplify 435bp fragment. Each primers sequences are shown as below : sense oligonucleotide, 5' - ACCACCAGCACAACTCTGAGATATGG - 3', antisense oligonucleotide, 5' - CAATCCATGCGGGCCAGGCTTCTCC - 3'

9. 실험 성적의 통계처리

실험 결과에 대한 통계적인 분석은 SAS (The SAS System for Windows, version 6.12, SAS Institute, U.S.A.)을 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험군간의 유의성을 검증할 때에는 student's t-test로 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈청내 GOT에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 혈액을 채취한 후 혈청을 분리한 후 GOT를 측정한다

과, normal 군은 32.1±2.8 IU/ l인데 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 41.9±9.7 IU/ l로 증가하였다. 또한 갈근을 7일간 투여한 후 CCl₄로 간독성을 유발한 실험군에서는 26.2±1.5 IU/ l로 활성이 감소함을 알 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3)

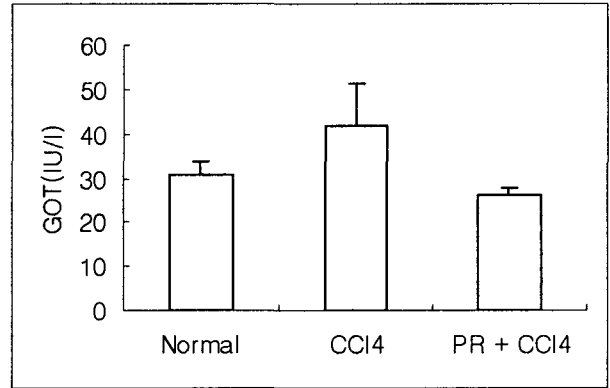


Fig. 3. The effect of the hot water extracts of Puerariae Radix on serum GOT levels with hepatic damage induced by carbon tetrachloride(CCl₄)

2. 혈청내 GPT에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 혈액을 채취한 후 혈청을 분리한 후 GPT를 측정한다 결과, normal 군은 21.5±1.0 IU/ l인데 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 45.2±8.4 IU/ l로 유의성 있게(P < 0.05) 증가하였다. 또한 갈근을 7일간 투여한 후 CCl₄로 간독성을 유발한 실험군에서는 19.0±0.4 IU/ l로 활성이 유의하게(P<0.01) 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4.)

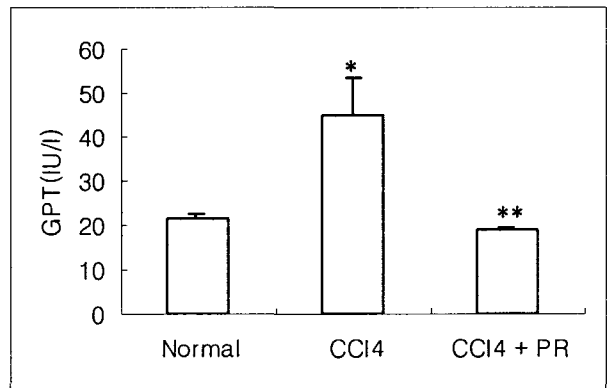


Fig. 4. The effect of the hot water extracts of Puerariae Radix on serum GPT levels with hepatic damage induced by carbon tetrachloride(CCl₄) (* : P < 0.05, ** : P < 0.01)

3. 혈청내 ALP에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 혈액을 채취한 후 혈청을 분리한 후 ALP를 측정한다 결과, normal 군은 13.2±1.7 20K-A unit/dl인데 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 40.9±3.4 20K-A unit/dl로 유의성 있게(P<0.01) 증가하였다. 또한 갈근을 7일간 투여한 후 CCl₄로 간독성을 유발

한 실험군에서는 16.8 ± 4.3 20K-A unit/dl로 활성이 유의성있게 ($P < 0.01$) 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5)

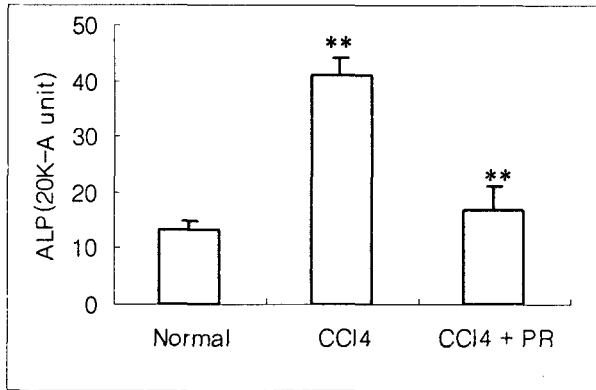


Fig. 5. The effect of the hot water extracts of Puerariae Radix on serum ALP levels with hepatic damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄). (** : $P < 0.01$)

4. Rat Liver의 병리조직학적 소견에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 24시간 후에 희생시켜 간조직을 적출하여 생리식염수(0.8% NaCl)로 관류시키고 잘 씻은 다음 -70℃에 동결 보존하였다가 포르말린 고정 및 파라핀 포매 등의 조작을 통하여 조직절편을 제작하였으며, hematoxylin and eosin 방법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

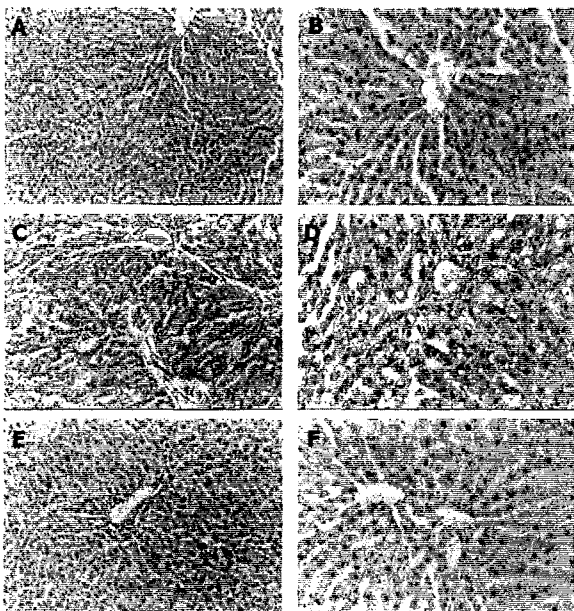


Fig. 6. Light micrograph of paraffin-embedded mouse liver. All section were stained with hematoxylin and eosin. (A) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of normal control rat treated with olive oil. (B) Higher magnification (X 200) of the same sample. (C) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl₄ (0.5 ml/kg). (D) Higher magnification (X 200) of the same sample. (E) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl₄ (0.5 ml/kg) after administration of Puerariae Radix (10 ml/kg) for 7 days. (F) Higher magnification (X 200) of the same sample.

CCl₄를 처리하지 않은 정상대조군은 간세포들이 central vein을 중심으로 정상적인 소엽구조를 유지하면서 잘 배열되어 있으며, 기타의 조직화적인 구조 또한 정상으로 나타났다.(Fig. 6A, B) CCl₄를 처리하여 간독성을 유발한 대조군의 간조직은 간소엽의 정상적인 구조가 명확하지 않으며, 간세포는 less eosinophilic하며 세포질 내에 많은 액포(vacuole)가 관찰되었다. 또한 central vein 주위에서는 중성구의 침윤과 간세포의 종창이 관찰되었으며, hepatic sinusoid의 구조 또한 붕괴되었고 pyknotic nucleus를 포함한 퇴행성 세포가 혈관주위 구역에서 발견되고 있다(Fig. 6C, D). CCl₄를 처리하기 7일 전부터 갈근을 투여한 실험군에서는 정상군과 마찬가지로 central vein을 중심으로 간세포가 정상적인 소엽구조를 이루면서 배열되어 있으며, 간세포의 조직화적 구조 또한 정상으로 나타났다(Fig. 6E, F).

5. 간조직내 LPO 함량에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 지질과산화물(LPO)을 측정할 결과, normal 군은 1.98 ± 0.4 nmol/mg인데 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 3.78 ± 1.0 nmol/mg로 증가하였다. 또한 갈근을 7일간 투여한 후 CCl₄로 간독성을 유발한 실험군에서는 2.72 ± 0.05 nmol/mg로 활성이 감소함을 알 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 7).

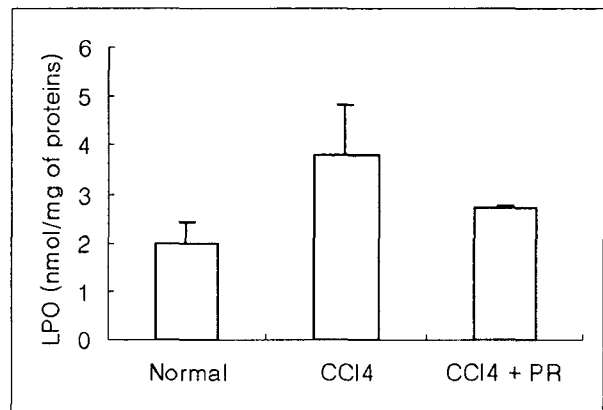


Fig. 7. The effect of the hot water extracts of Puerariae Radix on lipid peroxidation levels with hepatic damage induced by carbon tetrachloride(CCl₄)

6. 간조직내 GSH 함량에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 GSH를 측정할 결과, normal 군은 2.78 ± 0.07 nmol/mg인데 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 1.86 ± 0.54 nmol/mg로 유의하게 ($P < 0.05$) 감소하였다.

또한 갈근을 7일간 투여한 후 CCl₄로 간독성을 유발한 실험군에서는 4.49 ± 0.98 nmol/mg로 증가함을 알 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 8).

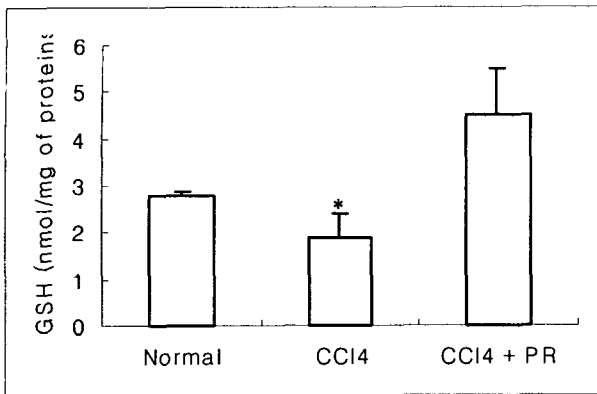


Fig. 8. The effect of the hot water extracts of Puerariae Radix on GSH contents with hepatic damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄). (* : P < 0.05)

7. 간조직내 Catalase 활성에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 catalase 활성을 측정 한 결과, normal 군은 21.6±0.63 unit/ng인데 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 17.8±1.95 unit/ng으로 유의하게(P<0.05) 감소하였다. 또한 갈근을 7일간 투여한 후 CCl₄로 간독성을 유발한 실험군에서는 29.1±1.64 unit/ng으로 유의성 있게(P<0.05) 증가함을 알 수 있었다(Fig. 9).

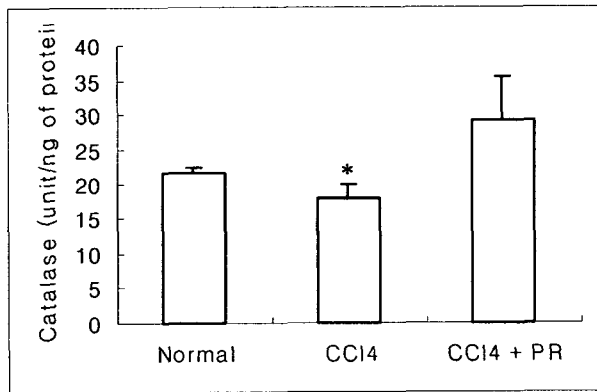


Fig. 9. The effect of the hot water extracts of Puerariae Radix on catalase activity with hepatic damage induced by carbon tetrachloride(CCl₄). (* : P < 0.05)

8. ESR에 의한 OH radical에 대한 효과

Fig. 10.에서 나타난 바와 같이 DMPO-OH adduct의 peak는 1:2:2:1의 양식을 나타냈고, control에 있어 1:2:2:1의 peak 중 첫 번째 peak와 Mn²⁺의 peak ratio는 약 8.91을 나타냈으나, Puerariae Radix(갈근)의 처리에 의해 DMPO-OH adduct의 량은 감소하였다.

9. ESR에 의한 OH radical 소거활성

갈근의 DMPO-OH radical의 scavenging activity는 Fig. 11.에 나타냈다. 갈근은 농도의 증가에 따른 농도의존적 경향을 나타냈

으며, 1000 μg/ml의 처리에서 87%정도의 억제 경향이 나타났다. Scavenging activity의 IC₅₀은 갈근(Puerariae Radix)은 24.5 μg/ml을 나타냈다.

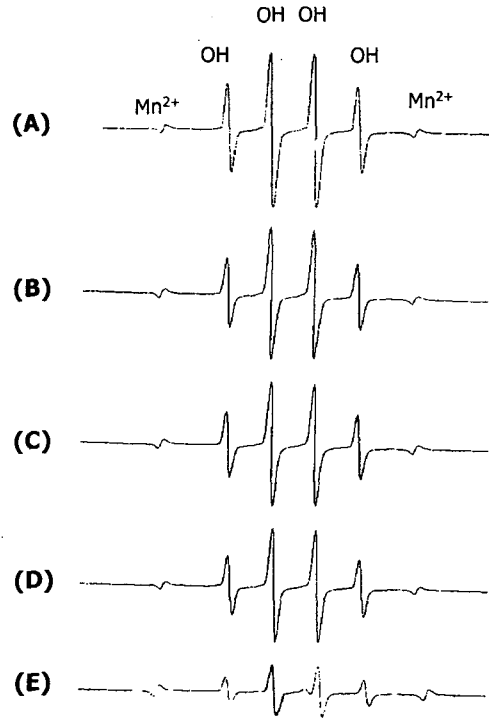


Fig. 10. Effect of aqueous extract of Puerariae Radix on OH radical determined by ESR spectrometry. OH radical was generated by 1.0 mM H₂O₂ and 0.2 mM FeSO₄ in the presence of 0.92 mM DMPO. (A) control; (B) PRE 1 μg/ml; (C) PRE 10 μg/ml; (D) PRE 100 μg/ml; (E) PRE 1000 μg/ml. PRE : Puerariae Radix Extract.

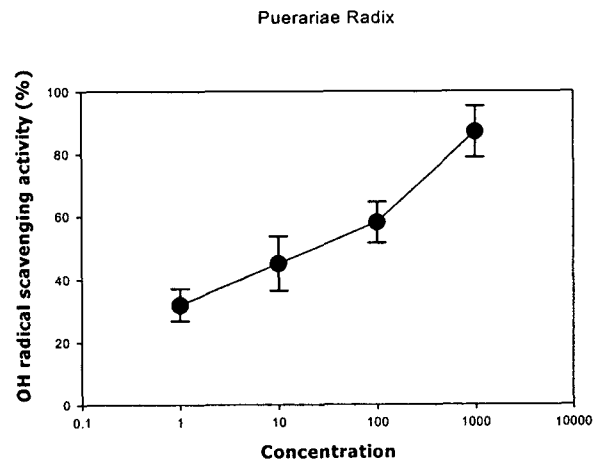


Fig. 11. OH radical scavenging activity of Puerariae Radix determined from the difference in intensities of the ESR signals in Fig. 8., relative to that without Puerariae Radix extract. Means (+/-S.D.) of at least three separate experiments are shown.

10. Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)의 mRNA 발현에 대한 효과

각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에

희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Scheme 2.에서 언급한 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 12.). CCl₄를 처리하지 않은 정상 대조군에서는 cytochrome P450 2E1(CYP2E1)이 낮은 농도로 발현하고 있으나(Lane 1.), CCl₄를 처리한 대조군에서는 매우 높은 농도로 발현하고 있다(Lane 2.). 이에 비하여 갈근을 7일간 투여한 후에 CCl₄로 간독성을 유발한 군에서는 CYP2E1이 거의 발현하지 않음을 알 수 있다(Lane 3.).

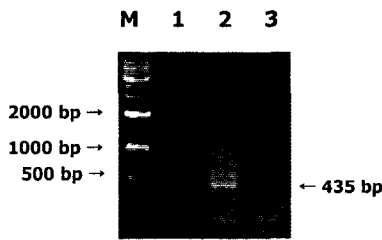


Fig. 12. Rat CYP2E1 (right arrow, 435bp) polymerase chain reaction (PCR) product. Ethidium bromide-stained agarose gel containing reverse transcriptase (RT)-PCR products with template CYP2E1 mRNA from the liver of normal control rat treated with olive oil (lane 1), treated with CCl₄ (0.5 ml/kg) (lane 2) and treated with CCl₄ (0.5 ml/kg) after administration of Puerariae Radix (10 ml/kg) for 7 days (lane 3).

고찰

간장해는 간실질 장애와 담즙분비 장애의 2가지로 대별되는데, 간실질 장애는 실험적으로 사염화탄소(CCl₄), D-galactosamine, thioacetamide ethionine 등을 이용하여 독성 동물모형을 만들 수 있다. 이중 사염화탄소는 세탁소에서 많이 이용되며 Free Radical에 의한 대표적인 세포손상으로서 실험적인 간실질 장애를 유도하기 위해서 많이 사용된다²⁵. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만 간세포의 무과립 내형질세망에 들어있고 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 Cytochrome P450에 의해 반응성이 높은 독성 Free Radical인 CCl₃로 전환되어 세포 상해를 일으킨다²⁶. CCl₃는 OH⁻처럼 지질과산화물을 일으키는 강력한 물질로서, 세포막의 인지질 내에 있는 불포화지방산에서 수소원자를 뺏아와 자신은 CHCl₃로 변하고 불포화지방산에 여분의 전자들을 줌으로써 지질의 Free Radical화를 유발하고, 이 Radical이 산소와 반응(peroxidation)하여 유기 과산화물(organic peroxide)을 형성한다. 유기 과산화물은 그 자체가 Free Radical로 작용하여 새로운 Free Radical을 형성하며, 따라서 인지질은 빠르게 과산화된다²⁸. 이 반응은 가까운 내형질세망으로 빠르게 진행되어 내형질세망의 구조와 기능이 먼저 파괴된다. CCl₄ 투여 후 30분 이내에 간세포의 단백질 합성이 저하되며 2시간 이내에 전자현미경으로 내형질세망의 종창과 리보솜의 탈락, 그리고 폴리솜의 해리를 관찰할 수 있다^{29,30}. 점차 지질이 내형질세망 내에서부터 축적되기 시작하여 세포질로 확산된다. 지질 축적은 간세포의 단백질 합성이 저하되어 지질수용 단백질의 합성까지 장애를 받기 때문이다. 즉 간세포가 tryglyceride를 분비하기 위해서는 지질수용 단백질과 tryglyceride가 결합한 지질단백의 형태를 만들어야 하는데,

간세포에서 지질수용 단백질이 생산되지 않기 때문에 지질단백을 형성할 수 없게 된다. 따라서 세포질 내에 tryglyceride가 다량으로 축적되어 CCl₄ 중독의 특징인 지방간이 된다³¹. 이어서 미토콘드리아가 손상되며 ATP가 감소되므로 세포막의 투과성이 증가되고 세포 전체의 종창이 일어난다. 내형질세망의 지질과산화과정 중 작은 조각으로 잘린 비교적 안정된 fatty aldehyde가 생겨나는데, fatty aldehyde는 주위로 확산되어 세포막이나 미토콘드리아 등에 손상을 일으킨다고 여겨지고 있다. 세포막의 손상은 다량의 칼슘을 세포내로 들어오게 하여 칼슘이 미토콘드리아 내에 축적되어 미토콘드리아의 기능이 소실된다. 이후의 세포변화는 허혈성 손상에서와 비슷하게 진행되어 결국 세포의 괴사로 이어진다³².

갈근(Puerariae Radix)은 콩과의 다년생 덩굴성 목본인 허(Pueraria thunbergiana Benth.)의 뿌리를 약용 및 식용으로 사용한 것으로, 일본과 중국에서는 주로 Pueraria lobata (Wild.) Ohwi의 근경을 갈근으로 사용하고 있는데 우리나라에서 자생하는 Pueraria thunbergiana Benth.와는 같은 Leguminosae과에 속한다³³. 중국에서는 이외에도 Pueraria edulis Pamp., Pueraria omensis Wang et Tang, Pueraria thomsonii Benth., Pueraria phaseoloides (Roxb.) Benth. 등의 근연식물을 갈근으로 사용하기도 한다³⁴. 한의학에서는 갈근을 성미가 감평(甘平)하고 비위경(脾胃經)으로 귀경하며 해기발표(解肌發表), 생진지갈(生津止渴) 및 개위하식(開胃下食) 등의 효능을 가진 것으로 인식하고 있다³. 최근에는 위계양³, 고혈압⁴, 협심증⁵, 당뇨병^{6,7} 등과 관련된 연구 결과가 발표되었다. 또한 갈근은 항산화작용과 지방과산화 억제작용이 있으며^{8,9} 보간작용이 있는 것으로 알려진 coumarin 성분을 가지고 있다는 것으로 보아 간조직을 보호할 것으로 기대된다¹⁰. 또한 근연종인 Pueraria lobata (Wild.) Ohwi나 Pueraria thomsonii (Leguminosae)에 대하여 alcohol로 인한 간손상과 관련된 연구가 진행되고 있으며¹¹⁻¹², 최근에는 간손상과 관련된 면역학적 연구¹³ 및 cytochrome P450 등 약물대사계 효소와 관련성¹⁴도 제시되고 있다.

GOT와 GPT의 활성치 증가는 세포장애의 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐 아니라 다른 혈중 유출 효소에 비하여 예민하게 변동한다. 또한 다른 조직보다 간은 Transaminase의 조직내 농도가 현저하게 높고 혈중으로 유출이 쉬운 혈행구조를 갖고 있기 때문에 GOT와 GPT의 혈중농도를 간질환의 진단에 널리 이용하고 있다²¹. 또한 ALP는 생체내에서 널리 분포하지만 혈중에 출현하는 것은 한정된 장기의 ALP에 의한 것이다. 흡수, 분비가 활발한 부위에서는 ALP가 풍부하여 통상 밖으로 배설되고 있다. ALP에는 isoenzyme이 존재하며 간염, 간경변, 폐쇄성 황달, 기타 간담도계질환이나 골질환 등의 질병이 있을 때 증가하며, 임상적 의의가 크다³⁷. 본 실험에서는 각각의 실험군을 CCl₄로 간독성을 유발한 후 24시간 후에 희생시켜 혈액을 채취한 후 혈청을 분리한 후 효소활성을 측정하였다. GOT의 경우 정상군에 하여 CCl₄만 처리한 대조군에서 증가하였으며, 갈근을 전투여한 실험군에서는 활성이 억제하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 3.). GPT는 정상군에 비하여 CCl₄만 처리한 대조군에서 증

가하였으며, 갈근을 전처리한 실험군에서는 활성이 유의하게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4). ALP는 정상군에 비하여 CCl₄만 처리한 대조군에서 증가하였으며, 갈근을 전처리한 실험군에서는 활성이 유의성있게 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 5). CCl₄에 의한 간손상은 주로 간세포괴사 및 간섬유화 및 간경변증의 형태로 나타나며, 간세포괴사는 간세포의 특정부위에 국한하여 초래되거나 아광역 또는 광역괴사의 형태로 나타나며, 지방변성이 동시에 초래되는 예가 많다³⁷. 본 실험에서는 각각의 실험군에서 적출된 간조직의 표본을 hematoxylin and eosin 방법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 정상군은 조직학적인 구조가 정상으로 나타났으나(Fig. 6A, B), CCl₄를 처리한 대조군에서는 조직의 정상적인 구조가 파괴되어 있었다(Fig. 6C, D). 그러나 갈근을 전처리한 실험군에서는 정상군과 유사하게 정상적인 조직학적 구조를 나타내었다(Fig. 6E, F).

이상의 혈청내 간손상관련 효소활성 및 간조직의 형태학적인 측면에서 볼 때 갈근은 CCl₄로 유발된 간손상을 방어하는 작용이 있음을 알 수 있으며, 그 기전은 CCl₃로 인한 산화적 손상에 대한 방어기전 또는 CCl₄를 CCl₃로 전환하는 Cytochrome P450에 대한 작용으로 추측할 수 있다.

세포 내의 효소성 항산화제의 방호는 SOD, catalase, glutathion peroxides(GSH-PX), glutathione reductase에 의해 수행된다. 이들 항산화효소들은 O₂, H₂O₂ 그리고 유기 peroxide, OH 라디칼 등의 독성을 탈독성화하거나 약화시킴으로서 그 기능을 나타낸다. 이들 항산화제 중 SOD, catalase, glutathion peroxide는 많은 연구가 시행되고 있다³⁸. 본 연구에서는 CCl₄ 투여에 따른 세포막 지질의 과산화와 그에 관련된 항산화효소의 활성을 알아보기 위하여 지질과산화물(LPO) 및 항산화효소인 catalase의 활성을 측정하였으며, 생체내에 존재하는 수용성 항산화제인 GSH의 양을 측정하였다. 또한 갈근 자체가 가지는 항산화제로서의 활성을 ESR 방법을 사용하여 검증하였다.

지질과산화(Lipid Peroxidation; LPO)는 식물 및 동물에서 잘 정립된 세포 상해기전으로서, 세포나 조직에 있어서 산화적 스트레스의 지표로서 사용되고 있다. 과산화지질은 불안정하며 반응성 carbonyl 화합물을 포함하는 여러 가지 화합물의 복합물로 분해된다. 불포화지방산이 과산화되면 malonaldehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals를 분해산물로 생성하는데, Malonaldehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals의 측정은 지질과산화의 지표로 사용되고 있다³⁹. 본 실험에서는 각각의 실험군에서 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 지질과산화물(LPO)을 측정된 결과, 정상군에 비하여 CCl₄만 처리한 대조군은 증가하였으며, 갈근을 전처리한 실험군에서는 활성이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

Glutathione(gamma-glutamylcysteinylglycine or GSH)은 핵친화적이고 대부분의 호기성 세포의 항산화 시스템뿐만 아니라 대사과정에 있어서도 중심적인 역할을 하는 자연 발생적인 tripeptide이다⁴⁰. GSH는 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and thiol transferase 등 여러 가지 효소에 중요한 역할을 하는 조효소(coenzyme)으로 작용한다. 그리고 약물대사

와 칼슘대사, gamma-glutamyl cycle, 혈소판 및 세포막 기능에 있어 주된 역할을 한다. 또한 GSH는 생체 이물질의 독성제거 및 단백질의 -SH기 레벨의 유지, thiol-disulfide의 교환, 과산화물과 free radical의 제거, 세포막에서 아미노산의 통과 등 여러 가지 생명현상에 있어서 핵심적인 역할을 한다. 세포내 GSH의 생리적인 수치는 대체로 1~10mM의 범위를 유지하고 있다⁴¹. 본 실험에서는 각각의 실험군에서 GSH를 측정된 결과, 정상군에 비하여 CCl₄만 처리한 대조군에서 감소하였으나 갈근을 전처리한 실험군에서는 증가하는 경향을 보였다(Fig. 8).

활성산소종의 하나인 과산화수소는 정상적인 호기성 대사과정 및 병리적인 ROS 생산에 의한 독성 산물이다. Catalase (EC1.11.1.6, 2H₂O₂ oxidoreductase)는 dismutation을 통해서 또한 peroxidatic activity를 나타냄으로써 과산화수소를 파괴하는 효소이다⁴². 과산화반응에 있어서는 저분자의 알콜류가 전자 제공자로서 작용하며, 과산화 활성의 생리적인 의의에 대해서는 아직까지 논쟁의 여지가 있다⁴³. 본 실험에서는 각각의 실험군에서 GSH를 측정된 결과 정상군에 비하여 CCl₄만 처리한 대조군에서 감소하였으며, 갈근을 전처리한 실험군에서는 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 9).

전자스핀공명법(Electro Spin Resonance; ESR)은 부대 전자를 갖고 있는 분자를 검출하고 그 구조를 결정하는 분광학적 방법으로, EPR(Electron Paramagnetic Resonance), SWR(Spin Wave Resonance), FMR(Ferromagnetic Resonance)등으로도 불린다. 실험에 사용하는 기기를 전자자기공명분광기(Electro Spin Resonance Spectrophotometer)라고 부르며, 생물학 분야에서는 생체내의 라디칼의 농도, 운동상태, 단백질의 구조분석 등에 이용되고 있으며⁴⁴, 약물의 항산화능을 검증하는 방법으로도 응용되고 있다⁴⁵. ESR spectroscopy를 이용한 spin trapping은 활성산소종에 가장 반응성이 크고 수명이 짧은 OH·를 측정하기 위해 가장 널리 이용되어 온 방법이다. 이것은 DMPO와 같은 nitrones 들을 spin trap으로 사용하여 OH·와 반응시킨다. 이렇게 생성된 spin adduct들은 비교적 안정적이고 수명이 길어서 ESR 스펙트럼 분석을 통한 OH·의 측정을 가능하게 한다^{47,48}. 본 연구에서는 Fig. 10.에서 나타난 바와 같이 갈근 추출물의 처리에 의해 OH radical의 양이 농도의존적인 감소를 나타내었으며, 1000 mg/ml의 처리에서 87%정도가 억제되었고 저해활성의 IC₅₀은 약 24.5 µg/ml로 나타났다.(Fig. 11.)

간, 폐, 신장, 뇌, 피부 및 태반 등 전반적인 기관의 내형질세포망(endoplasmic reticulum; ER)에 존재하는 Cytochrome P450은 체외에서 들어오는 환경물질을 대사하는 중추적인 역할을 하는 효소로서 대사과정 중 산소 radical이나 H₂O₂를 생성한다^{27,48}. Cytochrome P450에는 여러 가지 다양한 isozyme이 존재하는데, 그 중에서 ethanol에 의해서 유도되는 Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)이 사염화탄소로 인한 간손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. 이에 대하여는 Wong 등⁴⁹은 CYP2E1 유전자를 결실시킨 생쥐에는 사염화탄소를 투여하여도 정상군과는 달리 GOT, GPT 수치가 증가하지 않으며 간손상이 발생하지 않음을 보고하여 CYP2E1이 사염화탄소로 인한 간손상에 핵심적인

인자임을 증명하였다. 따라서 본 실험에서는 갈근이 사염화탄소를 통하여 유발되는 CYP2E1 유전자의 발현에 영향을 주는지에 대해 RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) 방법을 이용하여 살펴보았다. 그 결과 CCl₄를 처리하지 않은 정상군에서는 CYP2E1이 낮은 농도로 발현하였고 CCl₄를 처리한 대조군에서는 매우 높은 농도로 발현하고 있으며, 이에 비하여 갈근을 전처리한 실험군에서는 CYP2E1이 거의 발현하지 않았다.

이상의 결과는 갈근이 CCl₄로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있으며, 그 기전은 항산화효소의 활성증강과 약물 자체의 항산화작용 및 CCl₄를 독성라디칼인 CCl₃로 전환하는 효소인 Cytochrome P450 2E1의 전사 억제와 관련된 것임을 시사한다.

결 론

백서(Rat)에 갈근 열수추출물을 7일간 투여한 후 사염화탄소(CCl₄)로 간손상을 유발하여 간손상과 관련된 혈청내 효소검사를 실시한 결과 갈근을 전처리한 군에서 GOT의 수치는 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었으며, GPT의 수치 및 ALP의 수치는 모두 유의성 있는 감소가 나타났다. 또한 간조직에 대한 병리조직학적 검사에서는 CCl₄로 유발된 정상 간소엽구조의 파괴와 세포질내의 액포, 간세포의 종창, 중성구의 침윤 등의 소견이 갈근을 전처리한 군에서는 나타나지 않았다.

갈근의 간보호작용의 기전에 대해 연구하기 위하여 간조직내의 항산화계에 대하여 실험한 결과 갈근을 전처리한 군이 CCl₄만을 처리한 군에 비하여 지질과산화물(LPO)의 함량이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었으며, GSH의 함량과 catalase 활성도 증가하였으나 유의성은 없었다. 또한 ESR을 통한 갈근의 항산화능을 측정한 결과 농도에 의존적으로 OH radical의 양이 감소하였으며, OH radical의 소거활성의 IC₅₀은 약 24.5 µg/ml로 나타났다. CCl₄를 독성라디칼로 전환시키는 효소인 Cytochrome P450 2E1의 mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 실험한 결과 갈근을 투여한 군에서 CYP2E1의 전사가 억제되고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과는 갈근이 CCl₄로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있으며, 그 기전은 항산화효소의 활성증강과 약물 자체의 항산화작용 및 CCl₄를 독성라디칼인 CCl₃로 전환하는 효소인 Cytochrome P450 2E1의 전사 억제와 관련된 것임을 시사한다.

참고문헌

1. 李時珍 : 本草綱目, 서울 : 고문사, vol. 18, p.537, 1984.
2. 陳存仁 : 圖說漢方醫藥大辭典, 第1卷, 東京 : 講談社, pp.68-69, 1982.
3. 엄기진 : 갈근 Ethanol 엑기스의 실험적 위궤양에 미치는 영향, 조선대학교 대학원 석사학위논문, 1981.
4. Fang CC, Lin M, Sun CM, Liu HM, Lang HY. Studies on flavones of Radix puerariae. Zhonghua Yi Xue Za Zhi.

- 5:271-4, 1974.
5. Fan LL, O'Keefe DD, Powell WW Jr. Pharmacologic studies on radix puerariae: effect of puerarin on regional myocardial blood flow and cardiac hemodynamics in dogs with acute myocardial ischemia. Chin. Med. J. (Engl). 98(11):821-32, 1985.
6. 조재선 : 한국산 야생 식물 식물이 당뇨 유발 흰쥐의 혈당 수준에 미치는 영향 : 갈근, 산수유, 오미자, 용규 및 치자를 중심으로, 덕성여자대학교 대학원 석사학위논문, 1995.
7. 홍자형 : 葛根抽出物이 Alloxan으로誘發된 家兔의 高血糖에 미치는 영향, 조선대학교 대학원 석사학위논문, 1989.
8. 박창훈 : 갈근의 항산화성분 및 구조-활성 상관관계, 경성대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
9. 김은실 : 갈근 추출물이 에탄올을 투여한 흰쥐의 지질과산화에 미치는 영향, 동아대학교 대학원 석사학위논문, 1998.
10. Yasuda T, Momma N, Ohsawa K. A simultaneous determination of daidzin and puerarin and determination of daidzein in Oriental pharmaceutical decoctions containing puerariae radix by ion-pair high-performance liquid chromatography. Yakugaku Zasshi. 113(12):881-9. (Japanese.), 1993.
11. Keung WM. Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from Radix puerariae. Alcohol. Clin. Exp. Res. 17(6):1254-60, 1993.
12. Keung WM, Vallee BL. Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(21):10008-12, 1993.
13. Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T. Preventive effects of saponins from the Pueraria lobata root on in vitro immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. Planta Med. 64(5):413-6, 1998.
14. Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Mirasoli M, Cantelli-Forti G, Paolini M. Comparison between chinese medical herb Pueraria lobata crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. Life Sci. 67(24):2997-3006, 2000.
15. 조병권 : 사염화탄소 투여로 인한 血清內 各種酵素의 活性變動에 關하여, 경북대학교 대학원 박사학위논문, 1984.
16. 서혜진 : 사염화탄소의 반복투여가 백서 간장에 미치는 병리조직학적 연구, 영남대학교 대학원 석사학위논문, 1987.
17. Fernandez G, Villarruel MC, de Toranzo EG, Castro JA. Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to the heme moiety of cytochrome P-450 and its degradation products. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35(2):283-90, 1982.
18. Tomasi A, Albano E, Banni S, Botti B, Corongiu F, Dessi

- MA, Iannone A, Vannini V, Dianzani MU. Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation. *Biochem. J.* 246(2):313-7, 1987.
19. Le Page RN, Cheeseman KH, Osman N, Slater TF. Lipid peroxidation in purified plasma membrane fractions of rat liver in relation to the hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Cell. Biochem. Funct.* 6(2):87-99, 1988.
 20. Srivastava SP, Chen NQ, Holtzman JL. The in vitro NADPH-dependent inhibition by CCl₄ of the ATP-dependent calcium uptake of hepatic microsomes from male rats. Studies on the mechanism of the inactivation of the hepatic microsomal calcium pump by the CCl₃ radical. *J. Biol. Chem.* 265(15):8392-9, 1990.
 21. Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.* 28:58-63, 1957.
 22. Petkova J, Popova N, Kemileva Z. Changes of enzyme activity in some organs following thymectomy. *Agressologie.* 14(5):323-6, 1973.
 23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2):351-8, 1979.
 24. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77, 1959.
 25. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-6, 1984.
 26. Kamokawa, A., Ohta, S., Tatsugi, A., Kumasaka, M., and Shinoda, M. Experimental Production of Various Types of Cholestasis and the Effects of Cystemine. *YAKUGAKU ZASSHI.* 106(8):709, 1986.
 27. Noguchi, T., Fong, K. L., Lai, E. K., Olson, L., and McCay, P. B. Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl₄-treated rats. Relationship to cytochrome P-450 content. *Biochem. Pharmacol.* 31(5):609-14, 1982.
 28. Weddle, C. C., Hornbrook, K. R., and McCay, P. B. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *J. Biol. Chem.* 251(16):4973-8, 1976.
 29. Clawson GA, Sesno J, Milam K, Wang YF, Gabriel C. The hepatocyte protein synthesis defect induced by galactosamine involves hypomethylation of ribosomal RNA. *Hepatology* 11(3):428-34, 1990.
 30. Watanabe A, Akamatsu K, Takesue A, Taketa K. Dysregulation of protein synthesis in injured liver. A comparative study on microsomal and cytosole enzyme activities, microsomal lipoperoxidation and polysomal pattern in D-galactosamine and carbon tetrachloride-injured livers. *Enzyme.* 23(5):320-7, 1978.
 31. Poli G, Chiarpotto E, Albano E, Cottalasso D, Nanni G, Marinari UM, Bassi AM, Dianzani MU. Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of Golgi apparatus in the early phases of such injury. *Life Sci.* 36(6):533-9, 1985.
 32. Biasi F, Albano E, Chiarpotto E, Corongiu FP, Pronzato MA, Marinari UM, Parola M, Dianzani MU, Poli G. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. *Cell Biochem Funct.* 1991 Apr;9(2): 111-8, 1991.
 33. 이상인 : 개정정보관 본초학, 서울 : 수서원, p.197, 1981.
 34. 신권중약대사전, 중권, pp.2236-2237
 35. Retman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvate transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.* 28:58-63, 1957.
 36. Higashi, T., Tateishi, N. and sakamoto, Y. Liver glutathione as a reservoir of L-cystine. In : *Sulfur Amino Acids, : Biochemical and Clinical Aspects*, Alan R. Liss, New York, 397-410, 1983.
 37. de Toranzo EG, Gomez MI, Castro JA. Carbon tetrachloride activation, lipid peroxidation and liver necrosis in different strains of mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 19(2):347-52, 1978.
 38. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37(9-10):949-62, 1999.
 39. ESTERBAUER H., SCHAUR R.J., ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine ;* 11:81-128, 1991.
 40. DOLPHIN D., POULSON R. and AVRAMOVIC O., Eds., *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, Vols A & B, J. WILEY and Sons, 1989.
 41. ANDERSON M.E., *Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione*; In: *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*, Vol. A, DOLPHIN D., POULSON R. and AVRAMOVIC O. Eds., John WILEY and Sons, pp.339-365, 1989.
 42. Deisseroth, A. & Dounce, A.L., *Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role*, *Physiol. Rev.* 50, 319-375, 1970.
 43. Zamocky, M. & Koller, F. *Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and In Vitro Mutagenesis*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 19-66, 1999.

44. Mason RP, Knecht KT. In vivo detection of radical adducts by electron spin resonance. *Methods Enzymol.* 233:112-7, 1994.
45. Lin CC, Yen MH, Lo TS, Lin JM. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activity of *Boehmeria nivea* var. *nivea* and *B. nivea* var. *tenacissima*. *J Ethnopharmacol.* 60(1):9-17, 1998.
46. Rosen GM, Rauckman EJ. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.* 105:198-209, 1984.
47. Zhu BZ, Zhao HT, Kalyanaraman B, Frei B. Metal-independent production of hydroxyl radicals by halogenated quinones and hydrogen peroxide: an ESR spin trapping study. *Free Radic Biol Med.* 32(5):465-473. 2002.
48. Gwebu, E. T., Ttewyn, R. W., Cornwell, D. G. and Panganamala, R. V. Vitamin E and inhibition of platelet lipoxxygenase. *Res. Common. Chem. Pathol. Pharmacol.* 28:361-369, 1980.
49. Gwebu, E. T., Ttewyn, R. W., Cornwell, D. G. and Panganamala, R. V. Vitamin E and inhibition of platelet lipoxxygenase. *Res. Common. Chem. Pathol. Pharmacol.* 28:361-369, 1980.
50. Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153(1):109-18, 1998.