

# 산수유의 유리자유기에 의한 간손상 보호효과

하기태 · 김영미 · 김철호<sup>1</sup> · 김동욱<sup>2</sup> · 최달영 · 김준기\*

동국대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 성균관대학교 자연과학부 생명과학과, 2: 목포대학교 생명공학부 생약자원전공

## Study on the Protective Effect of Corni Fructus against Free Radical Mediated Liver Damage

Ki Tae Ha, Young Mi Kim, Cheorl Ho Kim<sup>1</sup>, Dong Wook Kim<sup>2</sup>, Dall Yeong Choi, June Ki Kim\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,  
1: Molecular and Cellular Glycobiology Unit, Department of Biological Sciences, SungKyunKwan University,  
2: Department of Pharmacognostic Resources, College of Natural Science, Mokpo National University

Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver injury depends on a toxic agent that has to be metabolized by the liver NADPH-cytochrome P450 enzyme system to a highly reactive intermediate. Alternations in the activity of cytochrome P450 enzymes affect the susceptibility to hepatic injury from CCl<sub>4</sub>. In this study, we evaluated the potential protective activity of the traditional Korean medicinal herb, Corni fructus (CF), against an experimental model of hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub>. The CF exhibited a hepatoprotective activity against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in Sprague-Dawley (SD) rats, as measured by GOT, GPT, ALP and histological observation. The CF also showed significant decrease of malodialdehyde (MDA) and increase of glutathion (GSH), catalase activity in rat liver homogenate. In addition, the expression of CYP2E1, as measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis, was significantly decreased in the liver of CF treated SD rats. But CCl<sub>4</sub> and CF has no significant effect on 1A1 and 3A1 isoform of cytochrome P450. Based on these findings, it is suggested that hepatoprotective effects of CF possibly related to antioxidative effects and regulation of CYP2E1 expression.

Key words : Corni Fructus, cytochrome P450 2E1, carbon tetrachloride, hepatoprotection, antioxidative effect

### 서 론

사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)는 실험적인 간독성 유발에 전형적으로 사용되고 있는 약물로서 혈청내 transaminase의 증가 등 각종 효소활성에 변화를 초래하며<sup>1)</sup>, 급성적으로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽중심성 괴사 등이 일어나고 만성적으로는 간경변을 초래한다<sup>2)</sup>. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만, 간세포의 무과립 내형질세망에 들어있고 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 cytochrome P450에 의해 반응성이 높은 독성 free radical인 CCl<sub>3</sub>·로 전환되어<sup>3)</sup> 세포막의 인지질 과산화 및 내형질세망의 구조와 기능 파괴, 미토콘드리아 및 세포내 효소활성의 파괴 등 다양한 세포상해를 일으켜 세포의 괴사나 지방변성을 초래한다<sup>4,5)</sup>.

산수유(Corni Fructus)는 층층나무과의 낙엽성 관목인 산수

유(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)의 성숙한 과실의 씨앗을 제거한 과육을 건조한 것으로<sup>6)</sup>, 補肝腎하는 대표적인 약재로 사용되어 왔다. 肝腎으로 귀경하며 氣味는 酸澁, 微溫하며 補益肝腎, 澁精固脫하는 효능이 있어서, 眩暈耳鳴, 腰膝酸痛, 陽痿遺精, 遺尿, 小便頻數, 崩漏帶下, 大汗虛脫 등의 질환을 치료하는 처방에 다용되었으며<sup>7)</sup>, 溫肝, 補肝의 대표적인 약물로 분류되고 있다<sup>8)</sup>. 또한 최근 연구에 의하면 항당뇨<sup>9)</sup>, 항균 및 항산화성<sup>10,11)</sup>, 정자활동성 증가<sup>12)</sup> 등에 대한 보고가 있다.

이와같이 산수유는 補肝腎하는 효능이 있으며, 또한 항산화활성과 같은 약리작용이 보고되고 있으므로 간독성에 대한 보호작용을 할 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 산수유 열수추출물을 백서에 투여하여 GOT, GPT, ALP 및 조직학적 검사를 통한 간보호활성과 LPO, GSH, catalase를 통한 항산화성의 검증 및 사염화탄소의 대사과정에 핵심적인 작용을 하는 cytochrome P450의 발현에 대하여 실험하여 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 김준기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학

· E-mail : graywolf@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2650

· 접수 : 2007/10/27 · 채택 : 2007/11/30

## 재료 및 방법

### 1. 시료

실험에 사용된 산수유는 경북 경주지방에서 재배한 것으로, 성심한약재(경북 경주)에서 구입하여 동국대학교 본초학교실에 서 검증한 후 정선하여 사용하였다. 산수유 300 g에 증류수 1.5 l를 넣고 100℃에서 3시간 동안 가열한 후 여과하여 약 650 ml의 전탕액을 얻었으며, 이를 감압농축한 후 동결건조하여 6.3 g의 분말을 얻었으며 (수율 2.1%), -20℃에 보관하였다가 증류수에 녹인 후 실험에 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 처치

실험용 동물은 체중 150±20 g의 Sprague-Dawley (SD)계 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 4개의 군(정상군, 대조군, 전처리군, 후처리군)으로 나누었으며, 6마리를 한군으로 사용하였다. 정상군은 mouse용 고형사료와 물을 제한없이 공급하였으며, 대조군은 7일간 고형사료와 물을 제한없이 공급한 후 CCl<sub>4</sub>를 0.5 ml/kg/day 용량으로 복강주사하여 간독성을 유발시켰다. 산수유 전처리군은 CCl<sub>4</sub> 투여 7일전부터 10 mg/kg/day 용량으로 경구투여한 후 8일째에 CCl<sub>4</sub>를 0.5 ml/kg/day 용량으로 복강주사하여 간독성을 유발시키고, CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후에 심장천자를 통해 혈액을 채취하고 간을 적출하였다. 산수유 후처리군은 7일간 고형사료와 물을 제한없이 공급한 후 CCl<sub>4</sub>를 0.5 ml/kg/day의 용량으로 복강주사하여 간독성을 유발한 후 산수유를 10 mg/kg/day 용량으로 경구투여하여 48시간 후 심장천자를 통해 혈액을 채취하고 간을 적출하여 실험에 사용하였다.

### 3. 생체시료의 제조

실험동물을 ethyl-ether로 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 (0.9% NaCl)로 관류시킨 간은 조직이 손상되지 않도록 주의하여 혈액이 충분히 제거될 때까지 생리식염수로 잘 씻어내고 whatman 여과지로 생리식염수를 제거한 후 -70℃에 동결 보존하여 사용하였다. Western blot 및 효소 활성도 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.

### 4. 혈청내 효소활성의 측정

#### 1) GOT 및 GPT의 활성측정

혈청 중 GOT 및 GPT 활성측정은 Reitman-Frankel의 방법<sup>13)</sup>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 표준 검량곡선에서 산출하였으며 혈청 1 ml 당 IU/ℓ로 나타내었다.

#### 2) ALP의 측정

혈청중 ALP 활성측정은 Petkova 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 조제된 시약 Kit(아산제약)를 사용하여 실시하였다. 기질액 2.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한 후 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 unit (20K-A unit)로 나타내었다.

### 5. 조직 절편의 제작 및 염색

간 조직을 10% 중성 포르말린에 2시간 이상 고정시킨 다음 automated tissue processing 후 embedding하여 paraffin block을 만든 다음 5 μm의 절편을 만들어 slide glass에 부착 후 xylene으로 탈파라핀화 한다. 그후 100%, 90%, 80%, 70%, 60% ethanol 순으로 흡수시키고 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.

### 6. 항산화활성에 대한 측정

#### 1) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradford의 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 등<sup>15)</sup>의 TBA법으로 측정하였다. 즉 조직 마쇄 균질액을 1,000 × g에서 원심분리한 후 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 ml을 가한 다음 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 Ellman<sup>16)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 간 조직 균질액을 1,000 × g에서 원심분리한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 sulf-hydryl group이 발색제인 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (1 mM DTNB) 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 Glutathion 함량은 protein 1 mg당 nmol로 나타내었다.

4) 간 조직의 Catalase 활성측정

조직내 catalase 활성도는 Aebi<sup>17)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소원 일정량을 넣고 기질로서 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액을 가하여 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 1분간 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

7. Cytochrome P450 isoform의 mRNA 발현 측정

1) Total RNA의 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 takara사의 catrimox-14TM RNA isolation kit ver 2.11을 사용하였다. Rat liver total RNA의 경우에는 -70℃에 보관중이던 간조직 1 g을 homogenizer를 이용하여 잘 분쇄한 다음 cartrimix-14 buffer 1 ml로 lysis시켜 실온에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리를 한다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 pellet에 DEPC 1 ml를 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 다시 원심분리를 한다. 상등액을 제거시킨 pellet에 guanidinium 0.5 ml 첨가하여 vortex한 후 phenol/chloroform/iso-amylalcohol (25:24:1)을 0.5 ml 첨가시켜 vortex하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리한 후 상등액을 취해 iso-propylalcohol을 equal 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 1 μg/μl가 되도록 0.1% DEPC 용액에 녹여 사용하였다.

2) cDNA 합성 및 RT-PCR

cDNA 합성은 RNA PCR kit (AMV)를 사용하였다. 본 실험에서는 total RNA 1 μg를 주형으로 사용하였으며, MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), 10X RNA PCR buffer, RNase free distilled H<sub>2</sub>O, dNTP (10 mM), AMV reverse transcriptioase XL, Oligo dT (2.5 pmol/μl)가 되게 넣고 total volume을 20 μl가 되게 해서 혼합한 후 RT 반응을 수행하였다. 즉 30℃에서 10분간 반응시키고 42℃에서 30분간 annaling시켜 신장할 수 있도록 만들어 주고 99℃에서 5분,

5℃에서 5분간 1 cycle을 실시한다. 합성된 cDNA는 sense 및 antisense primer(20 pmol) 각각 1 μl 첨가하고 10x PCR buffer 5 μl, 2.5 mM dNTP 1 μl, LA taq polymerase 1 μl를 첨가한 다음 sterile distilled H<sub>2</sub>O로 total volume 50 μl가 되도록 PCR tube에서 혼합한 후, 95℃에서 5분간 95℃에서 1분 간 denaturation 후 68℃에서 1분간 annaling시키고, 72℃에서 1분 30초 동안 35 cycle 반응시킨 다음 72℃에서 5분 동안 elongation한다. 각각의 PCR product는 10 μl 씩 1.2% ETBR stained agarose gel 상에서 loading하여 전기영동을 시행하여 분석하였다. Cytochrome P450 isoform 각각의 PCR을 위하여 사용된 sense, antisense primer는 아래의 표와 같다(Table 1).

Table 1. The primer sequences which were used in PCR reaction of three cytochrome P450 isoforms and β-Actin.

Gene	sense primer	antisense primer	product size
CYP1A1	GTTCCCAAAGGTCTGAAGA G	CATATGGCACAGATGAC ATTGG	509 bp
CYP3A1	GGAAATTCGATGTGGAGTG C	AGGTTTGCCCTTCTCTTG CC	329 bp
CYP2E1	ACCACCAGCACAACTCTGA GATATGG	CAATCCATGCGGGCCA GGCCTTCTCC	435 bp
β-Actin	GCTGCCTGACGGTCAGGT CA	CTTGCCTCAGGAGGAG CAA	266 bp

8. Cytochrome P450의 단백질발현 측정

생리식염수 (0.9% NaCl)로 관류시킨 후 -70℃에 동결 보존한 간조직 1 g을 전체 조직의 4배 용량의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 4℃에서 homogenizer로 4분간 균질화한 다음, 4℃ 12,000 rpm에서 10 min간 원심분리를 하여 supernatent만 모아서 -70℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 단백질의 정량은 앞에서 언급한 바와 같이 Bradford의 방법에 따라 시행하였다. 냉동보관한 단백질을 얼음위에서 녹여 20 μg이 되도록 계산하여 loading한 후 10% SDS-PAGE로 전기영동하여 분리시켰다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 transfer시킨 후, 5% skim milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS)를 이용하여 상온에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하였다. TBS-T로 10분간 2회 washing 후 0.5% BSA가 첨가된 TBS-T에 1:1,000으로 희석한 anti-CYP1A1, CYP3A1 및 CYP2E1 antibody (Chemicon, USA)를 primary antibody로 하여 4℃에서 overnight incubation하여 항원항체 반응을 일으킨 후, TBS-T로 10분간 2회 washing하고 2차 항체로 0.5% BSA가 첨가된 TBS-T에 1:2,000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit IgG를 사용하여 상온에서 1시간 incubation한 다음 ECL solution을 사용하여 암실에서 X-ray film에 약 30분 감광시킨 후 develop하여 단백질의 발현양상을 분석하였다. 또한 cytochrome P450의 단백질 발현을 분석한 것과 동일한 방법으로 GAPDH에 대한 western blot을 시행하여 단백질의 발현을 정량하였다.

9. 실험 성적의 통계처리

실험 결과에 대한 통계적인 분석은 SAS (SAS Institute, USA)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. Rat 혈청 GOT, GPT 및 ALP에 대한 산수유의 영향

각각 실험군의 Rat를 희생시켜 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 GOT, GPT 및 ALP 활성을 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. GOT, GPT, ALP 모두 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군은 증가하였으며, 산수유추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군과 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 산수유추출물을 투여한 후처리군에서 모두 감소하였다. 특히 GPT와 ALP는 전처리군과 후처리군 모두에서 유의한 감소를 나타내었으나, GOT의 경우에는 전처리군에서는 유의한 감소를 나타내었으나 후처리군에서는 통계적 유의성은 없었다. 전체적으로 산수유의 전처리가 후처리에 비하여 간보호활성이 뛰어난 것으로 나타났다.

Table 2. The effect of the hot water extract of Cornus Fructus (CF) on serum GOT, GPT and ALP levels with hepatic damage induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>).

	GOT (IU/ℓ)	GPT (IU/ℓ)	ALP (20K-A unit)
Control	24.2±1.54	32.84±4.41	9.65±0.6
CCl <sub>4</sub>	104.36±4.81	98.08±2.26	34.61±2.95
CF + CCl <sub>4</sub>	30.16±7.79 <sup>a)</sup>	38.15±5.59 <sup>a)</sup>	10.43±1.07 <sup>a)</sup>
CCl <sub>4</sub> + CF	58.94±15.21	56.94±8.55 <sup>b)</sup>	10.61±0.68 <sup>b)</sup>

Each value represents the mean±S.D. of 6 rats <sup>a)</sup> Significantly different from the CCl<sub>4</sub> group (\* : P < 0.05) <sup>b)</sup> Significantly different from the CCl<sub>4</sub> group (\* : P < 0.05)

### 2. Rat liver의 조직소견에 미치는 산수유의 영향

각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 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. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 정상대조군은 간세포들이 central vein을 중심으로 정상적인 소엽구조를 유지하면서 잘 배열되어 있으며, 기타의 조직학적인 구조 또한 정상으로 나타났다(Fig. 1A). CCl<sub>4</sub>를 처리하여 간독성을 유발한 대조군의 간조직은 간소엽의 정상적인 구조가 명확하지 않으며, 세포질 내에 많은 액포(vacuole)와 central vein 주위에서는 중성구의 침윤과 간세포의 종창이 관찰되다(Fig. 1B). CCl<sub>4</sub>를 처리하기 7일 전부터 산수유추출물을 투여한 전처리군 및 CCl<sub>4</sub>를 처리한 후 2일간 산수유추출물을 투여한 후처리군에서는 정상군과 마찬가지로 central vein을 중심으로 간세포가 정상적인 소엽구조를 이루면서 배열되어 있으며, 일부 세포에서 액포가 발견되고 있으나 CCl<sub>4</sub>만 처리한 군에 비하면 현저한 감소를 나타내었다(Fig. 1C, D).

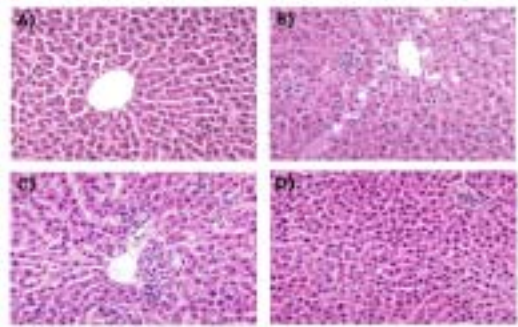


Fig. 1. Light micrograph of paraffin-embedded mouse liver tissues. All section were stained with hematoxylin and eosin. (A) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of normal control rat treated with olive oil. (B) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day). (C) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) after administration with CF (10 mg/kg/day) for 7 days. (D) Photomicrograph (X 100) of a section taken from the liver of rat treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) and then treated with CF (10 mg/kg/day) for 2 days.

### 3. Rat liver의 항산화 활성에 대한 산수유의 영향

각각의 실험군의 Rat를 희생시켜 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 지질과산화, GSH 및 catalase를 측정된 결과는 Table 3과 같다. MDA 방법으로 지질과산화도를 측정된 결과 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 군에서 지질과산화도가 증가하였으며, 산수유추출물을 7일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 전처리군에서는 지질과산화도가 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었으며, CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 2일간 산수유추출물을 투여한 후처리군에서는 유의성있는 감소를 나타내었다. GSH의 함량 및 catalase의 활성을 측정된 결과, 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 군에서는 감소하였으며, 전처리군 및 후처리군 모두에서 현저한 증가를 나타내었다.

Table 3. The effect of CF on lipid peroxidation(LPO), GSH and catalase levels with hepatic damage induced by CCl<sub>4</sub>.

	LPO (nmol/g)	GSH (nmol/g)	Catalase (unit/mg)
Control	6.62±1.05	2.63±0.18	15.69±0.6
CCl <sub>4</sub>	15.35±2.39	1.67±0.21	7.99±0.68
CF + CCl <sub>4</sub>	7.43±1.9	2.76±0.36 <sup>a)</sup>	13.29±0.63 <sup>a)</sup>
CCl <sub>4</sub> + CF	5.44±0.23 <sup>b)</sup>	2.39±0.26 <sup>b)</sup>	18.31±0.8 <sup>b)</sup>

Each value represents the mean±S.D. of 6 rats <sup>a)</sup> Significantly different from the CCl<sub>4</sub> group (\* : P < 0.05) <sup>b)</sup> Significantly different from the CCl<sub>4</sub> group (\* : P < 0.05)

### 4. Rat liver의 cytochrome P450 유전자 발현에 대한 산수유의 영향

각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Table 1에서 언급한 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이, 정상대조군과 비교했을 때 CCl<sub>4</sub>의 처리에 의하여 CYP2E1의 유전자 발현은 현저히 증가하였으나, CYP1A1 및 3A1 type의 경우에는 CCl<sub>4</sub>의 처리에 의하여 유전자 발현에 영향을 받지 않았다(Lane 1, 2). 또한 산수유추출물을 전처리한 군에서는 CYP1A1, CYP3A1 및 CYP2E1 type이 모두 유전자 발현이 감소함을 확인하였으며, 산수유추출물을 후처리한 군에서는 CYP3A1 및 CYP2E1 type에서 현저한 감소를 확인하였다. 이것으로 보아 CYP2E1의 mRNA

발현량은 CCl<sub>4</sub>에 의하여 특이적으로 증가하며, 산수유추출물의 전처리 및 후처리에 의해서 발현량이 억제되는 것을 알 수 있다.

특이적으로 증가하며, 산수유추출물의 전처리 및 후처리에 의해서 발현량이 억제되는 것을 알 수 있다.

## 고 찰

간손상의 실험적인 모델로는 CCl<sub>4</sub>, D-galactosamine, thioacetamide ethionine 등을 이용한 독성 동물모형과 담관결찰을 통한 수술적인 방법 등이 사용되고 있다<sup>18)</sup>. 이 가운데 CCl<sub>4</sub>는 free radical에 의한 대표적인 세포손상으로서 실험적인 간실질 장애를 유도하기 위해서 많이 사용된다<sup>19)</sup>. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만 간세포의 무과립 내형질세망에 존재하는 약물대사효소인 cytochrome P450에 의하여 반응성이 높은 독성 free radical인 CCl<sub>3</sub>로 전환되어 세포 상해를 일으킨다<sup>20)</sup>. CCl<sub>3</sub>는 OH<sup>-</sup>처럼 지질과산화물을 일으키는 강력한 물질로서, 세포막의 인지질 내에 있는 불포화지방산에서 수소원자를 공여받아 자신은 CHCl<sub>3</sub>로 변하고 불포화지방산에 여분의 전자를 제공함으로써 지질의 free radical화를 유발하고, 이 radical이 산소와 반응(peroxidation)하여 유기 과산화물(organic peroxide)을 형성한다. 이러한 유기 과산화물은 그 자체가 free radical로 작용하여 새로운 free radical을 형성하며, 따라서 인지질의 과산화는 더욱 가속화된다<sup>21)</sup>.

이 반응은 세포막에서 가까운 내형질세망으로 급속히 진행되어 세포내 소기관 중 내형질세망의 구조와 기능이 먼저 파괴되며, CCl<sub>4</sub> 투여 후 30분 이내에 간세포의 단백질 합성이 저하되며 2시간 이내에 전자현미경으로 내형질세망의 중창과 리보솜의 탈락, 그리고 폴리솜의 해리를 관찰할 수 있다고 보고되었다<sup>22,23)</sup>. 세포손상이 진행됨에 따라 지질이 내형질세망에서부터 축적되기 시작하여 세포질로 확산되는데, 지질의 축적은 간세포의 단백질 합성이 저하되어 지질수용단백질의 합성까지 장애를 받기 때문이다. 즉 간세포가 tryglyceride를 분비하기 위해서는 지질수용단백질과 tryglyceride가 결합한 지질단백의 형태를 만들어야 하는데, 간세포에서 지질수용단백질이 생산되지 않기 때문에 지질단백을 형성할 수 없게 된다. 따라서 세포질 내에 tryglyceride가 다량으로 축적되어 CCl<sub>4</sub> 중독의 특징인 지방간이 된다<sup>24)</sup>. 내형질세망의 지질과산화 과정 중 작은 조각으로 잘린 비교적 안정된 fatty aldehyde가 생겨나는데, fatty aldehyde는 주위로 확산되어 세포막이나 미토콘드리아 등에 손상을 일으킨다고 보고되고 있다. 따라서 내형질세망에 이어서 미토콘드리아가 손상되므로 세포막의 이온채널의 에너지원이 되는 ATP가 감소되어 세포막의 투과성이 증가되고 세포 전체의 중창이 일어난다. 세포막의 손상은 다량의 칼슘을 세포내로 들어오게 하여 칼슘이 미토콘드리아 내에 축적되어 미토콘드리아의 기능이 소실된다. 이후의 세포변화는 허혈성 손상에서와 비슷하게 진행되어 결국 세포의 괴사로 이어진다<sup>25)</sup>.

산수유(Corni Fructus)는 층층나무과의 낙엽성 관목인 산수유(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)의 성숙한 과실의 씨앗을 제거한 과육을 건조한 것으로, 肝腎으로 귀경하며 氣味는 酸澁, 微溫하며 補益肝腎, 澁精固脫하는 효능이 있어서 補肝腎하는 약재로 사용되었다<sup>1)</sup>. 대표적인 주치증으로는 眩暈耳鳴, 腰膝酸痛, 陽痿遺精, 遺尿, 小便頻數, 崩漏帶下, 大汗虛脫 등이 있어서<sup>2)</sup>, 六味地

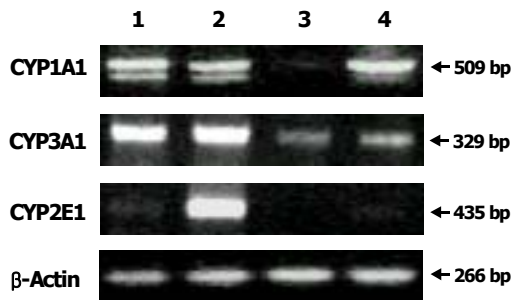


Fig. 2. The cytochrome P450 mRNA expression levels of CCl<sub>4</sub> and CF treated rat liver. The RT-PCR product of CYP1A1 (509bp), CYP3A1 (329bp) and CYP2E1 (435bp) were loaded in 1.5% ETBR-stained agarose gel. The templates of the reaction were total mRNAs from the liver of rats which were treated with olive oil (0.5 ml/kg) as normal control (lane 1), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) as positive control (lane 2), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) after administration of CF (10 mg/kg/day) for 7 days (lane 3) and treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) before administration of CF (10 mg/kg/day) for 2 days. (lane 4)

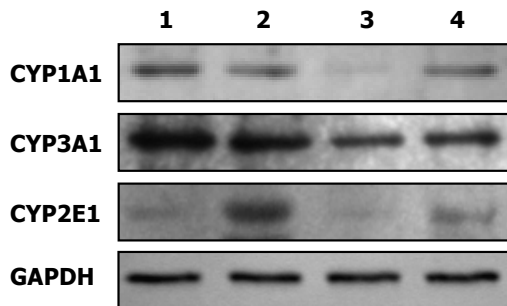


Fig. 3. The cytochrome P450 protein expression levels of CCl<sub>4</sub> and CF treated rat liver. Western blot analysis was carried out by using rat CYP1A1, CYP3A1 and CYP2E1 specific polyclonal antibody. The sample of the SDS-PAGE were total proteins from the liver of rats which were treated with olive oil (0.5 ml/kg/day) as normal control (lane 1), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) as positive control (lane 2), treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) after administration of CF (10 mg/kg/day) for 7 days (lane 3) and treated with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg/day) before administration of CF (10 mg/kg/day) for 2 days. (lane 4)

7. Rat liver의 cytochrome P450 단백질 발현에 대한 산수유의 영향  
각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 희생시켜 간조직을 채취하여 단백질을 추출하여 전기영동하여 nitro-cellulose membrane에 이동시킨 다음, CYP1A1, CYP3A1 및 CYP2E1에 특이적인 1차 항체와 anti-rabbit IgG를 이용하여 Western blot analysis를 시행하여 Fig. 3의 결과를 얻었다. RT-PCR의 결과와 같이 정상대조군과 비교했을 때 CCl<sub>4</sub>의 처리에 의하여 CYP2E1의 단백질 발현은 현저히 증가하였으나 CYP1A1 및 3A1 type의 경우에는 CCl<sub>4</sub>의 처리에 의하여 유전자 발현에 영향을 받지 않았으며 (Lane 1, 2), 산수유추출물을 전처리한 군에서는 CYP1A1, CYP3A1 및 CYP2E1 type이 모두 유전자 발현이 감소하였으나 후처리한 군에서는 CYP3A1 및 CYP2E1 type에서만 현저한 감소가 확인되었다. 이것으로 보아 CYP2E1 단백질은 CCl<sub>4</sub>에 의하여



黃丸와 地黃飲子<sup>26)</sup>, 補肝散<sup>27)</sup> 등의 처방에 사용되었다. 또한 □□東醫寶鑑□□『湯液』에서는 五臟補瀉의 肝 편에서 “補用木瓜·阿膠·川芎·黃芪·山茱萸·酸棗仁·五加皮”<sup>28)</sup>라고 하여 간을 補하는 약물로 분류하고 있으며, 清代 王泰林은 □□西溪書屋夜話錄□□에서 산수유를 溫肝, 補肝의 대표적인 약물로 분류하였다<sup>29)</sup>. 산수유에 대한 최근의 연구를 살펴보면 먼저 국내에서는 박<sup>4)</sup>이 streptozotocin으로 유발된 고혈당 백서에 대한 항당뇨효과를 보고하였으며, 박<sup>5)</sup>은 산수유 약침의 항산화작용에 대하여 보고하였다. 또한 국외에서도 Mau 등<sup>6)</sup>이 항균작용에 대하여 보고하였으며, 또한 Jeng 등<sup>7)</sup>은 정자활동성 증가에 대하여 보고하였다.

현재까지 발표된 문헌에는 산수유의 간독성 보호작용에 대한 보고가 없지만, 산수유가 補肝腎하는 효능이 있고 補肝하는 약물로 분류되었으며 또한 항산화활성 등 여러가지 약리작용이 보고되고 있어서 간독성에 대한 보호작용을 할 것으로 기대되어 본 연구를 진행하게 되었다.

간세포의 손상을 검사하기 위하여 임상적으로 흔히 혈청내의 GOT, GPT 및 ALP와 같은 효소의 활성도를 검사하는데<sup>30)</sup>, 혈청내에서의 GOT와 GPT의 활성치 증가는 간세포의 장애 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐 아니라, 간에서 혈액으로 유출되는 다른 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 있다<sup>13)</sup>. 또한 ALP는 생체내에서 널리 분포하지만 혈청에 출현하는 것은 한정된 장기의 ALP에 의한 것이다. 즉 흡수, 분비가 활발한 부위인 간에서는 ALP가 풍부하여 통상 밖으로 배설되고 있는데, 간염, 간경변, 폐쇄성 황달, 기타 간담도계질환 등이 있을 때 증가한다<sup>31)</sup>.

본 연구에서는 이러한 효소활성을 in vivo와 in vitro에서 실험하여 간손상의 정도를 간접적으로 측정하였다. 먼저 동물실험의 경우 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 전처리군은 24시간, 후처리군은 48시간 후에 희생시켜 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 GOT, GPT, ALP 모두 정상대조군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만 처리한 대조군에서 증가하였으며, 산수유추출물을 7일간 전투여한 실험군에서는 각 효소의 활성이 모두 유의성있게 억제되었다. 후처리군에서는 GPT 및 ALP는 유의하게 감소하였으며 GOT의 경우 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 또한 각각의 실험군에서 적출한 간조직을 절편으로 제작하여 hematoxylin and eosin 방법으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과, 혈청효소치에서 나타난 바와 같은 간보호작용을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

따라서 산수유 추출물이 CCl<sub>4</sub>로 유도된 실험적 간손상에 있어서 간보호활성을 가짐을 확인할 수 있었으며, 그 기전을 확인하기 위하여 rat의 간조직에서 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상의 경로로 알려진 산화적 손상기전과 연관된 지질과산화(LPO), 생체내 천연 항산화물질인 GSH 및 항산화효소인 catalase의 활성을 검사하였으며, 또한 in vivo 및 in vitro에서 CCl<sub>4</sub>를 CCl<sub>3</sub>로 전환하는 효소인 cytochrome P450의 발현조절에 대하여 실험하였다.

지질과산화(Lipid Peroxidation; LPO)는 식물 및 동물에서 잘

정립된 세포 상해기전으로 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-hydroxyalkenals을 분해산물로 생성하는데, Malonaldehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals의 측정은 지질과산화의 지표로 사용되고 있다<sup>32)</sup>. 본 연구에서는 각각의 실험군에서 채취한 간조직을 균질화하여 원심분리한 후 지질과산화물인 MDA를 측정할 결과, 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 대조군에서 증가하였으나 산수유추출물을 전처리한 실험군에서는 MDA의 생성이 억제되었으나 통계적인 유의성은 없었으며, 후처리한 군에서는 유의성있게 억제됨을 알 수 있었다.

Glutathione (gamma-glutamylcysteinylglycine or GSH)은 핵친화적이고 대부분의 호기성 세포의 항산화 시스템뿐만 아니라 대사과정에 있어서도 중심적인 역할을 하는 자연 발생적인 tripeptide이다<sup>33)</sup>. GSH는 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and thiol transferase 등 여러 가지 효소에 중요한 역할을 하는 조효소(coenzyme)로 작용한다. 그리고 약물대사와 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 1~10 mM의 범위를 유지하고 있다<sup>34)</sup>. 본 실험에서는 GSH를 측정할 결과 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 대조군에서 유의하게 감소하였으며, 산수유추출물을 전처리한 군 및 후처리군에서 모두 유의성있게 증가함을 알 수 있었다.

세포내의 효소성 항산화제로는 SOD, catalase, glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione reductase 등이 있다. 이러한 항산화효소들은 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고 유기 peroxide, OH 라디칼 등의 독성을 탈독성화하거나 약화시키는데, 이들 항산화제 중 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등에 대하여 많은 연구가 시행되고 있다<sup>35)</sup>. 활성산소종의 하나인 과산화수소는 정상적인 호기성 대사과정 및 병리적인 활성산소종의 생산에 의한 독성 산물이다. Catalase (EC1.11.1.6, 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase)는 dismutation을 통해서 또한 peroxidatic activity를 나타냄으로써 과산화수소를 파괴하는 효소이다<sup>36)</sup>. 본 연구에서는 각각의 실험군에서 catalase 활성을 측정할 결과 정상군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 대조군에서는 유의하게 감소하였고, 산수유추출물을 7일간 전처리한 군 및 2일간 후처리한 군에서 유의성있는 증가를 나타내었다.

Cytochrome P450은 체외에서 들어오는 환경물질을 대사하는 중추적인 역할을 하는 효소로서, 간, 폐, 신장, 뇌, 피부 및 태반 등 전반적인 기관의 내형질세포망(endoplasmic reticulum; ER)에 존재하며 특히 간에서 다량으로 발현하는 것으로 알려져 있다<sup>37,38)</sup>. Cytochrome P450에는 여러 가지 다양한 isozyme이 존재하는데, 그 중에서 gene subfamily 1, 2, 3, 4의 isoform이 약물대사와 관련되어 흔히 발현하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 특히 ethanol에 의해서 유도되는 2E1 isoform이 사염화탄소로 인한 간

손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있으며<sup>40)</sup>, 1A1 isoform도 3-methylcholanthrene (MC)와 사염화탄소의 동시투여에서 3-MC의 단독투여보다 더 높은 발현을 보인다는 보고가 있었다<sup>41)</sup>. 또한 ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs)에 의한 rat의 간독성모델에서 1A1/2 및 3A isoenzyme의 발현이 증가한다는 보고가 있었다<sup>42)</sup>. 따라서 본 연구에서는 산수유추출물이 사염화탄소를 통하여 유발되는 cytochrome P450 isoform 중 간독성모델과 관련있는 것으로 알려진 1A1, 3A1 및 2E1의 발현을 조절하는지 살펴보기 위하여 RT-PCR과 western blot을 이용하여 mRNA 및 단백질의 발현정도를 비교하였다. 먼저 동물 실험에서는 각각의 실험군을 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발한 후 산수유추출물 전처리군은 24시간 후, 후처리군은 48시간 후에 희생시켜 간조직을 채취하여 mRNA를 추출한 다음 Table 1에서 언급한 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다. CYP1A1의 경우에는 CCl<sub>4</sub>를 처리하였을 때 정상군과 mRNA의 발현정도에 큰 차이를 보이지 않았으나, 산수유추출물의 전처리군에 의하여 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. CYP3A1은 CCl<sub>4</sub> 처리에 의하여 발현이 변화하지는 않으나 산수유추출물의 전처리, 후처리에 의하여 발현량이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 2E1 isoform의 경우 정상군에서는 매우 낮은 농도로 발현하고 있으나 CCl<sub>4</sub>를 처리한 대조군에서는 매우 높은 농도로 발현하였으며, 산수유추출물을 전처리한 실험군과 후처리한 군에서는 매우 낮은 농도로 발현되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 western blot을 통하여 CYP1A1, 3A1 및 2E1 단백질의 발현을 확인한 결과 RT-PCR과 일치하는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 Wong 등<sup>43)</sup>이 CYP2E1 유전자를 결실시킨 생쥐에는 사염화탄소를 투여하여도 정상대조군과는 달리 GOT, GPT 수치가 증가하지 않으며 간손상이 발생하지 않음을 보고한 것과 일치하는 것으로 CCl<sub>4</sub>를 통하여 유도된 간손상모델에서는 cytochrome P450 isoform 중에서 2E1이 핵심적인 역할을 하는 것을 알 수 있으며, 산수유추출물이 2E1의 발현을 억제함으로써 간보호작용을 나타내는 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 산수유는 CCl<sub>4</sub>로 유발된 실험적 간손상 모델에서 간보호활성을 가지고 있음을 확인하였으며, 그 기전으로는 간세포내 항산화계 활성증가와 CCl<sub>4</sub>의 CCl<sub>3</sub>로의 전환에 관여하는 cytochrome P450 특히 2E1 isoform의 발현조절과 관련된 것임을 시사한다.

## 결 론

사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)로 유발된 간손상 모델을 통하여 산수유의 간보호활성 및 사염화탄소의 활성화에 관여하는 효소인 cytochrome P450의 발현조절에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻게 되었다. 간손상의 혈청학적 지표인 GOT, GPT, ALP를 검사한 결과 모두 CCl<sub>4</sub>를 투여한 군에 비하여 산수유를 처리한 군에서 유의성있는 감소가 나타났으며, 특히 후처리군에 비하여 전처리군에서 더 유의성있는 감소가 나타났다. 또한 간조직에

대한 병리조직학적 검사에서는 CCl<sub>4</sub>로 유발된 간조직의 파괴가 산수유의 처리에 의하여 회복되는 것을 확인하였다. 지질과산화물(MDA)의 함량은 CCl<sub>4</sub>를 투여한 대조군에 비하여 산수유를 처리한 군 특히 후처리군에서 현저히 감소하였으며, 간조직 내 GSH 함량 및 catalase 활성은 CCl<sub>4</sub>를 처리한 군에 비하여 산수유를 처리한 군에서 전처리 및 후처리군 모두에서 증가하였다. Cytochrome P450의 mRNA 및 단백질발현을 살펴본 결과 1A1 및 3A1은 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상 모델과는 큰 관련성이 없었으며, 2E1 type은 CCl<sub>4</sub>에 의하여 증가되었으나 산수유추출물의 투여에 의하여 전처리 및 후처리군에서 유의한 감소를 나타내었다.

이상의 결과에서 산수유는 CCl<sub>4</sub>로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있음을 확인할 수 있었으며, 그 기전은 간세포내 항산화계의 활성화 및 CYP2E1의 발현억제에 의한 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 조병권. 사염화탄소 투여로 인한 血清內 各種酵素의 活性變動에 關하여, 경북대학교 대학원 박사학위논문, 1984.
2. 서혜진. 사염화탄소의 반복투여가 백서 간장에 미치는 병리조직학적 연구, 영남대학교 대학원 석사학위논문, 1987.
3. Fernandez, G., Villarruel, M.C., de Toranzo, E.G., Castro, J.A. 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):283-290, 1982.
4. Tomasi, A., Albano, E., Banni, S., Botti, B., Corongiu, F., Dessi, M.A., Iannone, A., Vannini, V., Dianzani, M.U. Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation. Biochem. J. 246(2):313-317, 1987.
5. Le Page, R.N., Cheeseman, K.H., Osman, N., Slater, T.F. 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.
6. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典(III). 東京, 講談社, p 208, 1982.
7. 전국한의과대학 본초학교수 공편. 본초학. 서울, 영림사, pp 626-627, 1991.
8. 王旭高. 西溪書屋夜話錄·王旭高醫書六種. 北京, 學苑出版社, p 110, 1996.
9. 朴瑛卿. 山茱萸 種子의 抗糖尿 效果-Streptozotocin 유발 고혈당 흰쥐에 미치는 영향. 中央大 大學院, 석사학위논문, 1991.
10. 朴炫宣. 산수유 약침의 항산화 작용에 관한 실험적 연구. 大田大 大學院, 석사학위논문, 1998.
11. Mau, J., Chen, C., Hsieh, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus. J Agric Food Chem. 49(1):183-188, 2001.
12. Jeng, H., Wu, C.M., Su, S.J., Chang, W.C. A substance isolated from Cornus officinalis enhances the motility of

- human sperm. *Am J Chin Med.* 25(3-4):301-306, 1997.
13. 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.
  14. Petkova, J., Popova, N., Kemileva, Z. Changes of enzyme activity in some organs following thymectomy. *Agressologie.* 14(5):323-326, 1973.
  15. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2):351-358, 1979.
  16. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77, 1959.
  17. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126, 1984.
  18. Poli, G. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull.* 49(3):604-620, 1993.
  19. 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.
  20. Noguchi, T., Fong, K.L., Lai, E.K., Olson, L., and McCay, P.B. Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl<sub>4</sub>-treated rats. Relationship to cytochrome P-450 content. *Biochem. Pharmacol.* 31(5):609-614, 1982.
  21. 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):4973-4978, 1976.
  22. Clawson, G.A., Sesno, J., Milam, K., Wang, Y.F., Gabriel, C. The hepatocyte protein synthesis defect induced by galactosamine involves hypomethylation of ribosomal RNA. *Hepatology* 11(3):428-434, 1990.
  23. 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):320-327, 1978.
  24. Poli, G., Chiarpotto, E., Albano, E., Cottalasso, D., Nanni, G., Marinari, U.M., Bassi, A.M., Dianzani, M.U. Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of Golgi apparatus in the early phases of such injury. *Life Sci.* 36(6):533-539, 1985.
  25. Biasi, F., Albano, E., Chiarpotto, E., Corongiu, F.P., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Parola, M., Dianzani, M.U., 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.* 9(2):111-118, 1991.
  26. 黃度淵. 方藥合編. 서울, 南山堂, p 121, 166, 1996.
  27. 張介賓. 景岳全書. 北京, 人民衛生出版社, p 1650, 1992.
  28. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 971, 1992.
  29. 王旭高. 西溪書屋夜話錄·王旭高醫書六種. 北京, 學苑出版社, p 110, 1996.
  30. Chenoweth, M.B. and Hake, C.L. The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. *Ann. Rev. Pharmac.* 2: 363-398, 1962.
  31. Melen, K., Hultberg, B., Hagerstrand, I., Isaksson, A., Joelsson, B., Bengmark, S. Lysosomal enzymes in plasma, liver and spleen from rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Enzyme.* 33(2):84-88, 1985.
  32. 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.
  33. Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., Eds. Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Vols A & B, J. WILEY and Sons, 1989.
  34. 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.
  35. Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37(9-10):949-962, 1999.
  36. Deisseroth, A. & Dounce, A.L. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role, *Physiol. Rev.* 50: 319-375, 1970.
  37. Biasi, F., Albano, E., Chiarpotto, E., Corongiu, F.P., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Parola, M., Dianzani, M.U., 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.* 9(2):111-118, 1991.
  38. Gwebu, E.T., Ttewyn, R.W., Cornwell, D.G. and Panganamala, R.V. Vitamin E and inhibition of platelet lipooxygenase. *Res. Common. Chem. Pathol. Pharmacol.* 28: 361-369, 1980.
  39. Rogers, J.F., Nafziger, A.N., Bertino, J.S. Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med.* 113(9):746-750, 2002.
  40. Koop, D.R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 6(2):724-730, 1992.
  41. Degawa, M., Mikami, K., Namiki, M., Hashimoto, Y. Inhibition of the induction and activity of hepatic P450IA isozymes by in vivo administration of carbon tetrachloride to rats. *Biol Pharm Bull.* 16(12):1248-1250, 1993.



42. Ronis, M.J., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M. Induction, suppression and inhibition of multiple hepatic cytochrome P450 isozymes in the male rat and bobwhite quail (*Colinus virginianus*) by ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs). *Biochem Pharmacol.* 48(10): 1953-1965, 1994.
43. Wong, F.W., Chan, W.Y., Lee, S.S. Resistance to carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153(1):109-118, 1998.