

카드뮴유발 흰쥐의 간손상에 대한 山査추출물의 보호효과

신정훈¹ · 조미정^{1,2} · 박상미^{1,2} · 박숙자^{1,2} · 김상찬^{1,2*}

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: 한방신약개발팀(BK21 Team)

Hepatoprotective Activity of Crataegii Fructus Water Extract against Cadmium-induced Toxicity in Rats

Jeong Hun Shin¹, Mi Jeong Jo^{1,2}, Sang Mi Park^{1,2}, Sook Jahr Park^{1,2}, Sang Chan Kim^{1,2*}

1: College of Oriental Medicine, 2: BK21 Team, Daegu Haany University

Crataegii Fructus is commonly used as a improving digestion, removing retention of food, promoting blood circulation and resolving blood stasis agent in East Asia. Cadmium (Cd) is widely distributed in the environment due to its use in industry. An exposure to Cd causes dysuria, polyuria, chest pain, hepatic and renal tubular diseases. The liver is the most important target organ when considering Cd-induced toxicity because Cd primarily accumulates in the liver. This study investigated the protective effect of Crataegii Fructus water extract against cadmium (CdCl₂, Cd)-induced liver toxicity in H4IIE cells, a rat hepatocyte-derived cell line and in rats. Cell viability was significantly reduced in Cd-treated H4IIE cells in a time and concentration-dependent manner. However, Crataegii Fructus water extract (CFE) protected the cells from Cd-induced cytotoxicity via inhibition of PARP cleavage. To induce acute toxicity in rats, Cd (4 mg/kg body weight) was dissolved in normal saline and intravenously injected into rats. The rats then received either a vehicle or silymarin (as a positive control) or CFE (50, 100 mg/kg/day) for 3 days, and were subsequently exposed to a single injection of Cd. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were significantly increased by Cd treatment. In contrast, pretreatment with CFE reduced ALT, AST and LDH. In histopathological analysis, CFE reduced the hepatic degenerative regions and the number of degenerative hepatocytes. These are considered as direct evidences that Crataegii Fructus has favorable inhibitory effects on the Cd-intoxicated liver damages. The efficacy of Crataegii Fructus shows slight lower than that of silymarin in the present study.

Key words : crataegii fructus, cadmium, hepatoprotection

서 론

山査는 (Crataegii Fructus)는 장미과(Rosaceae)에 속한 낙엽 교목인 山里紅 (Crataegus pinnatifida BGE. var. major N.E. BR) 山査 (C. pinnatifida BGE.) 또는 野山査 (C. cunaeta SIEB. et ZUCC.)의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 우리나라 각지에서 생산된다. 微溫無毒, 酸甘하고 주로 脾胃肝經으로 入하며 消食積, 散瘀血, 驅條蟲하는 효능이 있어 肉積, 癥瘕, 痰飲, 痞滿, 吞酸, 瀉痢, 腸風, 腰痛, 疝氣, 產後兒枕痛, 惡露不盡, 小兒乳食滯滯 등의 치료에 응용된다¹⁾.

山査에 대한 연구로는, norepinephrine으로 수축된 혈관에 대한 혈관이완효과²⁾, 에틸아세테이트, 에탄올, 물 등의 용매에 따른 항산화활성³⁻⁵⁾, 山査 항산화 유효 물질로서 caffeic acid, protocatechuic acid, pyrogallol, phloroglucinol 등의 성분 연구^{6,7)}, 항균작용⁸⁻¹⁰⁾, 山査藥液 또는 경구투여가 항비만 및 당뇨에 미치는 영향¹¹⁻¹³⁾, 항치매효과^{14,15)}, 알콜로 유도된 고지혈증 및 간손상의 억제효과¹⁶⁾ 등이 보고되고 있다.

카드뮴은 독성이 매우 강한 중금속의 하나로서 산업화와 식음료의 오염 및 흡연 등 각종 환경오염에 따라 카드뮴 중독이 심각한 문제로 대두되고 있다¹⁷⁾. 섭취 또는 흡입된 카드뮴은, 대부분은 肝臟, 腎臟, 精巢 및 腦 등에 장기간 축적되어¹⁸⁾ 체성장 감소¹⁹⁾, 헤모글로빈 농도 저하²⁰⁾, 혈중 글루코스농도 증가²¹⁾, 지질과산화촉진²²⁾, 항산화기전 억제²³⁾, 생식능감소²⁴⁾ 등 심각한 장애를

* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247

· 접수 : 2010/02/08 · 수정 : 2010/02/22 · 채택 : 2010/02/24

유도하는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서의 카드뮴 식이 섭취량에 대한 정확한 보고는 없으나 음식을 통한 카드뮴 섭취는 1인당 평균 55-84 ug/day 로 추정되고 있다^{25,26)}.

최근에는 카드뮴과 같은 중금속 오염에 대해 phytochemical compound를 이용한 중금속 연구가 다수 진행되고 있으며, 이중 綠茶잎에 다량으로 존재하는 catechin이 착물 형성 혹은 화학흡착에 의해 침전되어 카드뮴을 배설시킴으로써 중금속 독성으로부터 보호할 수 있음과²⁷⁾, 한의학에서 제반 약독을 해독하는 甘草의 flavonoid 성분인 liquiritigenin이 카드뮴의 간독성을 억제할 수 있음이 연구되었다²⁸⁾.

본 연구에서는 消食積, 散瘀血, 驅條蟲하는 山査의 물추출물이 간독성에 대한 보호효과를 평가하고자, in vitro에서 카드뮴에 의해 유도되는 H4IIE의 세포생존율 및 세포사와 관련된 단백질질을 평가하고, in vivo에서 카드뮴에 의해 유발되는 흰쥐의 간손상에 대한 山査의 간보호효과를 혈액화학적, 조직학적 평가를 통하여 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

山査는 대원약업사 (대구, 한국)에서 구입하여 관능평가를 한 후, 200 g을 물 1.5 L에 넣고 3시간 煎湯한 후 추출물을 거여즈로 1차 여과하고, 이를 3000×g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 조심스럽게 취하여 0.2 μm filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 ultra-Low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에 12시간 동안 넣어 동결시켰다. 동결된 山査 추출물을 동결건조기 (Labconco, USA)로 동결건조하여 山査추출물 89.62 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20℃에서 보관하였다. 山査 물추출물 (CFE; *Crataegii Fructus extract*)의 수율은 44.81%였으며 in vitro처리에는 세포배양배지 (DMEM)에 녹여 사용하였으며, in vivo실험에서는 H₂O에 녹여 사용하였다.

2. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 BioWhittaker사 (Walkersville, MD, USA)와 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였다. Penicillin 및 streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase), actin 등의 antibody는 Santacruz Biotechnology Inc. (Sanracruz, CA, USA) 및 Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다.

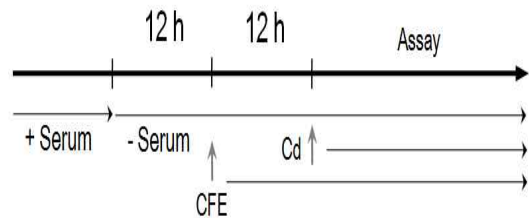
3. 세포배양

Rat 유래 hepatocyte cell line인 H4IIE 세포는 American

Type Culture Collection (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

H4IIE 세포를 96 well plate에 5×10⁴ cells/well로 분주 후 배양한 다음 CFE를 농도별로 처리하여, 세포의 생존율을 측정하였다. MTT는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 succinate dihydrogenase에 의해 formazan으로 변하며, 세포의 생존율이 적으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 세포에 0.01, 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml의 농도로 CFE를 12시간 전처리한 다음, 카드뮴 10 μM을 6, 12, 24 시간 처리하여 37℃, 5% CO₂의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 6, 12, 24 시간 배양 후 배지가 들어 있는 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml PBS)를 50 μl 넣고 4시간 더 배양한 후, 세포에 영향을 주지 않게 조심스럽게 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 완전히 녹인 다음 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control 세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100×/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].



Scheme 1. Schedule of the in vitro study.

5. 핵분획의 준비

핵분획은 Cho등의²⁹⁾ 방법에 따라 제조하였다. 즉, 배양된 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, 세포를 수거하여, 2 ml tube에 담고, 4℃에서 3,000×g로 3분간 원심 분리하여 PBS를 제거하였다. 세포에 10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유한 buffer를 100 μl 넣어 vortex하고 10분간 얼음 위에서 배양한 후 4℃에서 7,600×g로 6분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 핵이 포함된 침전물에 20 mM Hepes (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유한 buffer를 50 μl 넣은 후 현탁시키고, 얼음 위에서 1시간 배양하였다. 배양 후 4℃에서 15,000×g로 10분간 원심분리하여 핵분획인 상층액을 얻었다. 핵분획물은 사용시까지 -70℃에 보관하였다.

6. 단백질의 분석

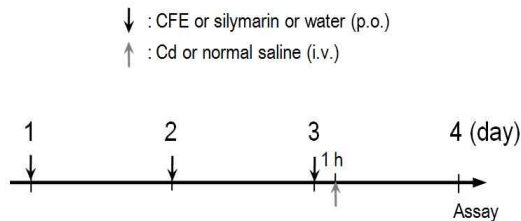
단백질의 발현을 관찰하기 위하여, 정량화된 nuclear fraction을 동일하게 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, amido black 염색으로 최종보정하였다. 보정 후의 용량으로 다시 SDS-PAGE로 분리한 후, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 제거하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS 용액)로 1시간 blocking한 후, PARP, actin의 항체를 PBS에 희석하여 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 PBST 용액으로 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL western blotting detection reagents (Amersham)로 반응시킨 후 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 단백질의 발현을 평가하였다.

7. 실험동물의 사육

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 흰쥐 (140-160 g) 수컷을 Samtaco Bio Korea (오산, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23℃, 습도 50%, 12시간 간격으로 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

8. 실험동물의 처치

실험은 아무런 처치를 하지 않은 군을 normal군으로 하고 꼬리정맥을 통해 녹인 카드뮴을 4 mg/kg으로³⁰⁾ 간독성을 유발한 군은 Cd군으로 하였다. 카드뮴은 normal saline에 용해하고, 이를 다시 0.2 μm filter로 여과한 후 사용하였다. 양성대조군으로는 카드뮴처치전 Srivastava등과³¹⁾ 같이 silymarin을 100 mg/kg로 3일간 투여하고 카드뮴을 처치한 군을 SLM군으로 하였으며, 카드뮴처치전 CFE를 50, 100 mg/kg로 3일간 투여하고 카드뮴을 처치한 군을 각각 CFE 50, CFE 100군으로 하였다. 카드뮴 대신 꼬리 정맥으로 생리식염수를 투여하고, silymarin이나, CFE대신 물을 투여한 군을 control군으로 하였다.



Scheme 2. Schedule of the in vivo study.

9. 혈액생화학적 검사

실험동물은 ethyl ether로 마취한 후, 복대정맥으로부터 혈액을 채취하고, 이를 3,000×g, 4℃에서 10 분간 원심분리하여 상등액의 혈청을 얻었다. 혈청중 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) lactate dehydrogenase

(LDH)는 Analysis kits (Pointe Scientific Inc., Canton, MI, USA)와 Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 사용하여 분석하였다.

10. 조직학적 평가

혈액을 채취한 후, 간 실질조직의 동일 부위를 일부 적출하여 50 mM의 phosphate buffer에 10% 중성포르말린으로 고정시킨 다음 일반적인 방법으로 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μm의 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시한 후 광학현미경하 (Nikon, Japan)에서 관찰하였다. 간 실질 중 변성 부위의 비율 (%/mm² of hepatic parenchyma) 및 변성 간세포의 수 (N/1000 hepatocytes)를 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 각각 평가하였다.

11. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Tukey test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

결 과

1. CFE가 Cadmium으로 유도된 세포독성에 미치는 영향

CFE가 카드뮴으로 유발되는 세포독성의 보호효과를 MTT assay로 관찰하였다. 12시간 동안 serum을 고갈한 배지에서 세포를 배양한 후, CFE를 12시간 농도별로 처치하고, 이후 카드뮴을 10 μM로 6, 12, 24시간 처치하였다. 카드뮴군의 생존율은 6, 12, 24시간에 48 ± 3.72, 27.42 ± 4.03, 3.62 ± 0.13%로서 control에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내었다. CFE를 0.01과 0.03 mg/ml을 처리한 군에서는, 0.01 mg/ml 24시간을 제외하고는 모두 카드뮴군의 세포생존율보다 증가하였으나, 유의성있는 결과를 나타내지 못하였으며, CFE 0.10 mg/ml을 처치한 군에서는 6, 12, 24시간에서 66.97 ± 6.43, 41.58 ± 5.78, 10.45 ± 0.55%로 카드뮴 단독처리군에 비교하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였으며, CFE 0.30 mg/ml을 처치한 군에서는, 81.47 ± 6.3, 48.87 ± 4.63, 20.84 ± 1.23%를 나타내어 세포독성을 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

2. CFE가 Cadmium으로 유도된 PARP의 발현에 미치는 영향

일반적으로 카드뮴은, 노출정도 및 실험모델에 따라서 necrosis와 apoptosis 모두를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다³²⁾. Apoptosis시 세포의 핵내에서는 Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP)의 분할이 일어나고, 이러한 PARP의 분할은 DNA fragmentation과 chromosome condensation을 유도하면서, 세포 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다³³⁾. 본 연구에서는 카드뮴이 유도하는 PARP의 분할의 유도에 대한 CFE의 효과를 평가하였다. Con에서는 116 kDa의 PARP가 다량발현되어 있음이 관찰되

었으나, 카드뮴을 처치한 군에서는 116 kDa PARP가 현저히 감소하였으며, CFE 0.03, 0.10, 0.30 mg/ml은 카드뮴에 의하여 감소된 116 kDa PARP의 발현량을 점진적으로 증가시켰다(Fig. 2). 이러한 결과는 카드뮴이 일정부분 apoptosis를 유도하고 CFE는 이를 유효하게 억제함을 의미한다.

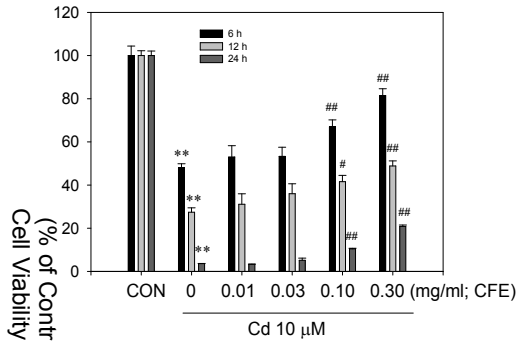


Fig. 1. Increase in viability of H4IIE cells exposed to Cd by CFE. H4IIE cells pre-treated with CFE for 12 h and further incubated with CFE+Cd (10 μM) for the next 6, 12, 24 h. Cell viability was assessed by MTT assay as described in the materials and methods. Data represent the mean ± SD of eight separate experiments. One-way ANOVA was used to compare the multiple group means followed by tukey test. (* significant as compared to control, **P<0.01; # significant as compared to Cd alone, #P<0.05, ##P<0.01)

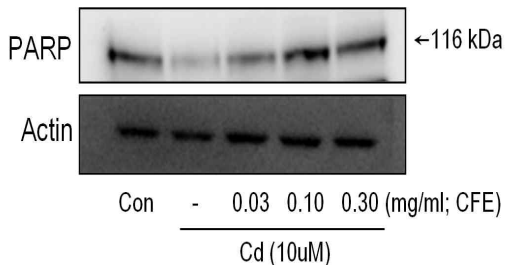


Fig. 2. Effect of CFE on the expression of PARP proteins. H4IIE cells pre-treated with CFE for 12 h and further incubated with CFE + Cd (10 μM) for the next 24 h. The proteins were monitored by immunoblot analysis. Equal loading of proteins was verified by actin protein immunoblotting.

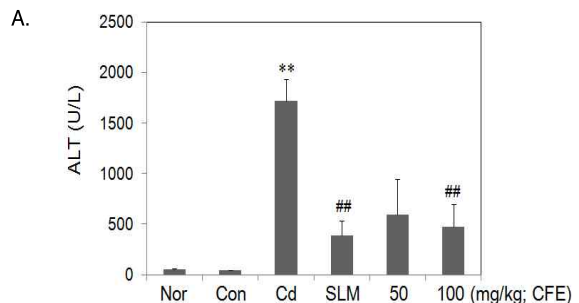
3. CFE가 Cadmium으로 유도된 간기능저하에 미치는 영향

ALT는 aminotransferase 중의 하나로, serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT)로도 불리며, 혈청 ALT는 장기들 중에서도 간세포변성과 괴사를 예민하게 반영하여, ALT의 상승이 간손상의 존재를 가장 의미있게 반영한다. ALT는 간손상을 탐색하는 가장 이상적인 지표로서, 간손상에 대한 민감도 (94.5%), 특이성 (86.4%), 양성예측치 (89.7%) 및 음성예측치 (92.7%)가 매우 높은 것으로 보고되고 있다³⁴). 본 연구에서 normal군과 control군은 각각 54.93 ± 5.18, 40.68 ± 2.41 U/L를 나타내었으며, 카드뮴군은 1715.03 ± 218.57 U/L을 나타내어 유의한 간독성이 유발되었다. 그러나, 이러한 ALT의 증가는 SLM군에서 390.53 ± 139.77 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 50, 100 군에서는 각각 597.51 ± 349.05, 473.90 ± 220.03 U/L로 유의하게 감소하였다(Fig. 3A). AST는 serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT)로도 불리며, ALT와 함께 심근, 간, 골격근 및 신 등에 많이 존재하지만, 혈중에는 극히 미량이 존재할 뿐이

다. 따라서 혈중에 AST와 ALT가 상승하면 이들이 분포하고 있는 장기의 세포 변성 및 괴사를 반영하며, 특히 간질환과 심질환의 유력한 지표로 널리 이용되고 있다³⁵). 본 연구에서 normal군과 control군은 각각 52.51 ± 3.13, 49.66 ± 5.83 U/L를 나타내었으며, 카드뮴군은 3625.70 ± 845.54 U/L을 나타내어 유의한 간독성이 유발되었다. 그러나, 이러한 AST의 증가는 SLM군에서 397.35 ± 129.78 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 50, 100 군에서는 각각 2110.62 ± 694.35, 590.53 ± 312.48 U/L로 감소하였으며, CFE 100은 유의한 AST의 감소를 나타내었다(Fig. 3B). LDH는 체내의 각 조직에 널리 분포하고 있으며, 특히 심, 간, 신, 근육에 많이 존재한다. 급성 간염에서는 aminotransferase와 동일하게 간세포로부터 빠져나와서 초기에 상승을 나타낸다³⁶). 본 연구에서 normal군과 control군은 각각 86.25 ± 10.72, 67.20 ± 10.73 U/L를 나타내었으며, 카드뮴군은 3522.25 ± 987.76 U/L을 나타내어 유의한 간독성이 유발되었다. 그러나, 이러한 LDH의 증가는 SLM군에서 582.29 ± 229.93 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 50, 100 군에서는 각각 1490.00 ± 760.87, 644.72 ± 253.34 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 100은 유의한 LDH의 감소를 나타내었다(Fig. 3C).

4. CFE가 Cadmium으로 유도된 간의 조직학적 변화에 미치는 영향

카드뮴에 의해 유도된 간독성에 미치는 CFE의 효과를 조직학적 평가를 하였다. 일반적으로 카드뮴 중독성 간손상은 조직병리학적 소견 중심성 괴사와 함께 괴사 조직 주변성 충혈 및 출혈이 인정되므로³⁷), 이러한 조직병리학적 변화를 통해 다양한 해독물질들의 약리작용이 평가되어 왔다³⁸). 간 변성율은 normal군과 control군에서 각각 2.95 ± 1.84, 2.61 ± 2.12%를 나타내었으며, 카드뮴에 의해서는 간 변성율이 65.98 ± 6.89%로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 간 변성율의 증가는 SLM군에서 18.95 ± 3.05% (-71.28%)로 유의하게 감소되었으며, CFE 50, 100 mg/kg는 41.30 ± 9.39, 31.08 ± 7.99 (-37.41 및 -52.90%)로 유의하게 감소시켰다. 변성 간세포의 수는 normal군과 control군에서 잘 나타나지 않았으며, 카드뮴에 의해서는 변성 간세포의 수가 639.2 ± 133.7개로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 변성 간세포의 수의 증가는 SLM군에서 185.2 ± 46.7개 (-71.03%)로 유의하게 감소되었으며, CFE 50, 100 mg/kg는 409.8 ± 72.5, 258.6 ± 107.0개 (-35.89 및 -59.54%)로 유의하게 감소시켰다(Fig. 4A, B & Fig. 5).



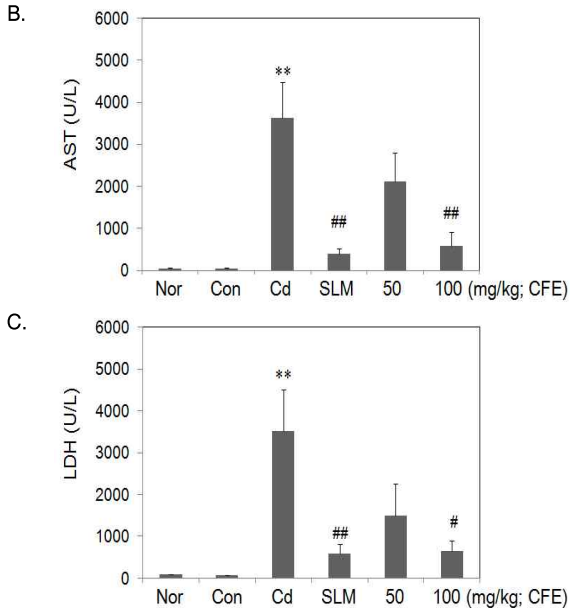


Fig. 3. Effect of CFE on ALT, AST and LDH levels in Cd-induced liver toxicity. ALT, AST and LDH activities were monitored in the serum of rats that had been orally pretreated with CFE (50 or 100 mg/kg for 3 days, injected with Cd (CdCl₂, 4 mg/kg body weight, i.v.) treatment. Blood samples were obtained 23 h after Cd treatment. Values represent mean ± SD (n = 5). One-way ANOVA was used to compare the multiple group means followed by tukey test. (* significant as compared to normal, **P<0.01; # significant as compared to Cd alone, ##P<0.01, #P<0.05)

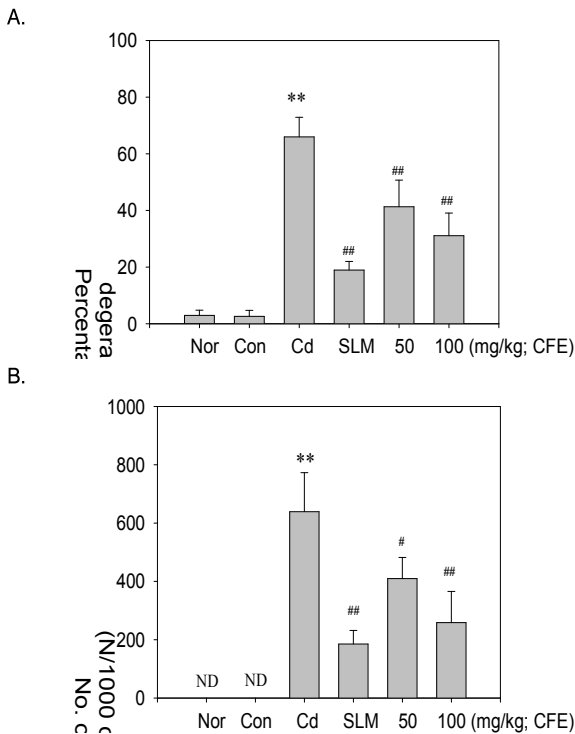


Fig. 4. Effect of CFE on hepatopathies in Cd-induced liver toxicity. Hepatopathies were observed in the liver of rats that had been orally pretreated with CFE (50 or 100 mg/kg for 3 days, injected with Cd (CdCl₂, 4 mg/kg body weight, i.v.) treatment. The liver samples were obtained 23 h after Cd treatment. (A) Percentage of hepatic degenerative regions (%), (B) Number of degenerative hepatocytes (N/1000 cells) Values represent mean ± SD (n = 5). One-way ANOVA was used to compare the multiple group means followed by tukey test. (* significant as compared to normal, **P<0.01; # significant as compared to Cd alone, #P<0.05, ##P<0.01)

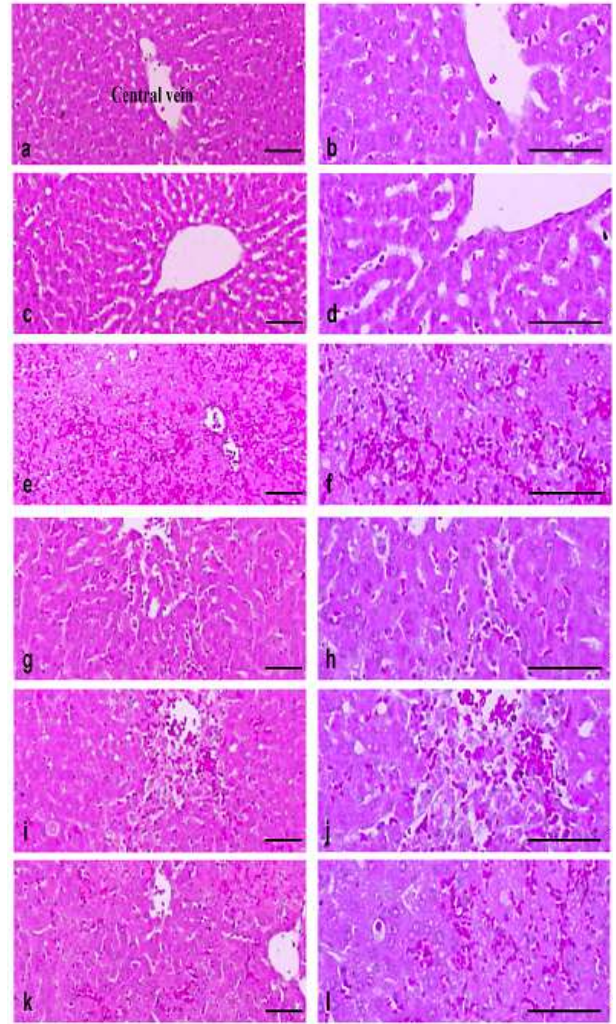


Fig. 5. Changes on Histological Profiles. Note that centrolobular necrosis with peripheral hemorrhages/congestions were detected in Cd control, but they were inhibited by treatment of dosages of CFE in the present study these are considered as direct evidences that CFE has favorable inhibitory effects on the Cd-intoxicated liver damages. Normal (a, b), control (c, d), Cd (e, f), Silymarin (g, h), CFE 50 (i, j), 100 (k, l). All HE stain; Scale bars = 160 μm.

고찰

본 연구는 消食積, 散瘀血, 驅條蟲하는 山査의 물추출물이 카드뮴에 의해 유도되는 간독성에 대한 보호효과를 평가하고자 *in vitro*와 *in vivo*에서 간손상에 대한 山査의 간보호효과를 평가하였다.

카드뮴 (cadmium)은 독성이 매우 강한 유해 중금속의 하나로, 산업의 발달로 카드뮴, 수은 등의 중금속 오염이 급증하고 있고 이로 인해 국내외적으로 심각한 문제로 대두되고 있다³⁹⁾.

카드뮴은 섭취 또는 흡입에 의해 체내로 쉽게 유입되며, 대표적인 중독 증세는 신장장애, 간조직 손상, 중추신경장애, 고혈압 및 골격계 장애 등이 있으며, 특히 골격계 장애는 만성적인 카드뮴 중독시 초래될 수 있는 질환으로 대표적인 예로 이파이 이파이 병을 들 수 있다⁴⁰⁾.

최근에는 카드뮴과 같은 중금속 오염에 대해 phytochemical compound를 이용한 중금속 연구가 다수 진행되고 있으며, 이

중 녹차잎에 다량으로 존재하는 catechin이 착물 형성 혹은 화학 흡착에 의해 침전되어 카드뮴을 그대로 배설시킴으로써 중금속 독성으로부터 보호할 수 있음과²⁷⁾, 녹차 catechin이 해독기구인 간장과 신장조직에서 metallothionein의 합성을 증가시켜 카드뮴의 축적을 억제하는 연구⁴¹⁾, 한의학에서 諸般 藥毒을 해독하는 甘草의 flavonoid 성분인 liquiritigenin이 카드뮴의 간독성을 억제할 수 있음이 연구 보고되고 있으며²⁸⁾, genistein의 투여가 urinary Cd와 fecal Cd를 증가시키는 보고¹⁷⁾, 셀레늄 (0.1, 1.0 ppm)이 100 μM의 카드뮴으로 유도된 GOT의 활성을 억제하는 연구⁴²⁾, glutathione 및 glutathione peroxidase를 조절하여 카드뮴의 독성을 억제하는 茵陳蒿에 대한 연구⁴³⁾, vitamin E는 간장과 신장조직에서 metallothionein의 합성을 촉진시켜 카드뮴의 축적량을 감소시키는 연구⁴⁴⁾ 등이 보고되고 있다.

한편, 山査에 대한 연구로는, 혈관이완효과²⁾, 항산화활성^{3,7)}, 항균작용⁸⁻¹⁰⁾, 항비만¹¹⁻¹³⁾, 항치매효과^{14,15)}, 간손상의 억제효과¹⁶⁾ 등이 보고되고 있다.

배 등은²⁾ 韓國山査 및 中國山査는 norepinephrine으로 수축된 혈관에 대하여 이완효과를 나타냄을 보고하였고, 항산화활성으로서 송 등은³⁾ 山査 에틸아세테이트추출물, 최 등은⁴⁾ 山査의 에탄올추출물이 우수한 DPPH radical 소거활성을 나타냄을 보고하였으며, 박 등은⁵⁾ 山査의 물추출물과 70% 에탄올 추출물이 우수한 전자공여능과 아질산염소거능을 나타냄을 보고하였고, 김 등은^{6,7)} 山査의 항산화 물질로서 caffeic acid, protocatechuic acid, pyrogallol, phloroglucinol 등을 동정하였다.

항균작용에 대한 연구로, 오 등은⁸⁾ Gram 음성균 (*Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) 및 Gram 양성균 (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*)에 대하여 항균작용을 가짐을 보고하였고, 박 등⁹⁾과 최 등¹⁰⁾ 山査 MeOH 추출물이 Gram 양성균인 *Staphylococcus aureus*에 대해서 강한 항균활성을 나타내므로, 천연보존료로서의 개발 가능성을 제시하였다.

또한, 항비만연구로서 정 등¹¹⁾은 山査藥鍼液을 고지방식이 肥滿 白鼠의 胃俞 (BL21)에 처치한 결과 cholesterol, triglyceride의 저하에 유의함을 보고하였고, 반¹²⁾은 山査물추출물의 경구투여가 고지방식으로 유도된 흰쥐의 triglyceride 및 free fat acid를 유의하게 감소시킴을 보고하였고, 서¹⁶⁾는 山査물추출물이 알콜로 유도된 고지혈증 및 간손상에 유의함을 보고하였다. 김 등¹³⁾은 山査추출물로부터 분리한 phenolic compound가, 탄수화물의 α-D-(1,4)-glucan의 결합을 분해하는 α-amylase 및 이당류의 소화 흡수에 관여하는 α-glucosidase의 활성을 억제하여, 항당뇨식이로서의 가능성을 제시하였으나, 山査 추출물이 중금속 독성에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는, 먼저 CFE가 카드뮴으로 유발되는 세포독성의 보호효과를 MTT assay로 관찰하였다. MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium이 생존세포의 미토콘드리아 succinate dihydrogenase에 의해 보라색의 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 것으로, 미토콘드리아의 활성 또는 세포생존율측정의 지표로 다용되고 있다.

Control군이 100 %일 경우, 카드뮴군의 생존율은 6, 12, 24시간에 48 ± 3.72, 27.42 ± 4.03, 3.62 ± 0.13 %로서 control에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내었으나, CFE를 CFE 0.10 mg/ml을 처치한 군에서는 6, 12, 24시간에서 66.97 ± 6.43, 41.58 ± 5.78, 10.45 ± 0.55 %로 카드뮴 단독처리군에 비교하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였으며, CFE 0.30 mg/ml을 처치한 군에서는, 81.47 ± 6.3, 48.87 ± 4.63, 20.84 ± 1.23 %를 나타내어 세포독성을 유의하게 억제하였다.

본 연구실을 포함한 이전의 연구결과들을 볼 때, cadmium은 human T cells, mouse thymocytes, human mononuclear cells, kidney cell lines, myocardial cells, smooth muscle cells, mouse liver cells, C6 glioma cells 등에서 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

일반적으로 카드뮴이 유도하는 세포독성은 처치시간 및 농도⁴⁵⁾ 등의 카드뮴 노출정도 및 실험에 사용된 모델에 따라서 necrosis와 apoptosis의 2가지 세포독성을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다³²⁾. 최근의 연구결과에 의하면, 세포의 죽음에는 세포내 MPT (mitochondrial permeability transition)가 중요한 역할을 하여, ATP 생산이 적절하게 이루어지면 apoptosis의 유도가 많이 되고, ATP가 고갈되면 apoptotic pathway를 억제하여 necrotic cell death가 많이 유도되는 것으로 받아들여지고 있다⁴⁶⁾.

일반적으로 Necrotic cell death는 apoptotic processes처럼 그 특징이 많이 밝혀져 있지는 않으나, mitochondria의 종창, electrondensity의 소실, plasma membrane 파괴 및 이로 인한 국소 염증의 유도로 특징지워 진다⁴⁷⁾.

Apoptosis는 원래 가지고 있던 세포사멸의 경로가 활성화되어 그 세포가 자발적으로 사멸함으로써 개체의 항상성 유지와 손상된 세포의 제거를 효율적으로 수행하는 기전이다⁴⁸⁾. 이러한 세포사멸사는, 세포의 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전 과정을 통하여 세포생존과 사멸의 균형을 이루며, 개체의 항상성을 유지하게 한다⁴⁹⁾.

즉, apoptosis는 다세포 기관의 정상발달과 항상성에 필수적인 세포사를 말하는 것으로, 과소 또는 과다한 세포사멸은 생물학적 부작용을 초래하게 된다⁵⁰⁾. 즉 류마티스성 관절염과 암종은 과소사멸의 예이며, 허혈성 심근질환 AIDS 그리고 퇴행성 신경질환 (Alzheimer병, 파킨슨씨병) 등은 과도한 세포사멸의 예이다^{50,51)}.

본 연구에서는 CFE가 카드뮴에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 영향을 평가하였다. 일반적으로 apoptosis가 진행되면 PARP분할이 진행되는 것으로 잘 알려져 있으므로⁵²⁾, 본 연구에서도 카드뮴은 PARP의 분할을 유도하였고, CFE는 PARP의 분할을 억제하였다.

CFE가 in vitro에서 카드뮴으로 유도되는 세포독성을 억제함을 확인하고, in vivo에서 카드뮴으로 유도된 간손상에 미치는 CFE의 영향을 평가하였다.

카드뮴으로 인한 간독성을 유발하기 위하여서는, Sauer 등³⁰⁾과 같이, 카드뮴을 normal saline에 용해하여 4 mg/kg의 용량으로 꼬리정맥을 통해 투여하였으며, 양성대조군으로는 Srivastava 등³¹⁾ 같이 silymarin을 100 mg/kg로 투여하였다.

Aminotransferase는 아미노산과 α -keto acid사이의 아미노기 전이를 촉매하는 효소의 총칭으로서 임상적으로는 AST와 ALT의 2종류가 중요시되고 있다. AST와 ALT는 심근, 간, 골격근 및 신 등에 많이 존재하지만, 혈중에는 극히 미량이 존재할 뿐이다. 따라서 혈중에 AST와 ALT가 상승하면 이들이 분포하고 있는 장기의 세포 변성 및 괴사를 반영하며, 특히 간질환과 심질환의 유력한 지표로 널리 이용되고 있다³⁵⁾. 일반적으로 간손상시에는 다량의 ALT, AST, LDH 등의 enzyme이 혈중으로 release된다⁵³⁾.

ALT는 aminotransferase 중의 하나로 pyruvate + glutamate \rightleftharpoons alanine + α -ketoglutarate에 관여하며, 간, 신, 심근, 골격근 등에 많이 존재하지만, AST에 비교하여서는 상대적으로 적은 양이 존재한다. 체내에서 가장 많은 양의 ALT를 저장하고 있는 간에서도 AST의 1/3에 불과하다. 그러므로, 혈청 ALT는 장기들 중에서도 간세포변성과 괴사를 예민하게 반영하여 상승하기 때문에 특히 간담도질환의 특징적 지표로 이용되고 있다³⁵⁾.

본 연구에서 normal군과 control군은 각각 54.93 ± 5.18 , 40.68 ± 2.41 U/L를 나타내었으며, 카드뮴군은 이전의 연구들과 같이⁵⁴⁾ 1715.03 ± 218.57 U/L을 나타내어 유의한 간독성이 유발되었다. 그러나, 이러한 ALT의 증가는 SLM군에서 390.53 ± 139.77 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 50, 100 군에서는 각각 597.51 ± 349.05 , 473.90 ± 220.03 U/L로 감소하였으며, CFE 100은 유의한 ALT의 억제를 나타내었다.

Oxaloacetate + glutamate \rightleftharpoons aspartate + α -ketoglutarate에 매개하는 AST는 ALT, AST/ALT와 함께 급성 간염의 조기진단, 만성 간염의 경과 관찰 등 각종 간질환에서 일정한 경향을 나타내는 경우가 많기 때문에 감별 검사상 유력한 지표가 된다³⁵⁾.

본 연구에서 카드뮴군은 3625.70 ± 845.54 U/L을 나타내어 유의한 간독성이 유발되었으며, SLM군에서 397.35 ± 129.78 U/L로 유의하게 감소하였다. CFE 50, 100 군에서는 각각 2110.62 ± 694.35 , 590.53 ± 312.48 U/L로 감소하였으며, CFE 100은 유의한 AST의 감소를 나타내었다.

LDH는 해당계 효소로서 체내의 각 조직에 널리 분포하고 있으며, 특히 심, 간, 신, 근육에 많이 존재한다. 그러나 혈중에는 미량 존재하며, 혈청 중 LDH는 심질환, 간질환, 악성 종양, 백혈병 등에서 상승하지만 특이성이 적기 때문에 진단적 가치는 그렇게 높지 않다. 급성 간염에서는 aminotransferase와 동일하게 간세포로부터 빠져나와서 초기에 상승을 나타낸다³⁶⁾.

본 연구에서 카드뮴군은 3522.25 ± 987.76 U/L을 나타내어 유의한 간독성이 유발되었으며, 이러한 LDH의 증가는 SLM군에서 582.29 ± 229.93 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 50, 100 군에서는 각각 1490.00 ± 760.87 , 644.72 ± 253.34 U/L로 유의하게 감소하였으며, CFE 100은 유의한 LDH의 감소를 나타내었다.

또한, 카드뮴에 의해 유도된 간독성에 미치는 CFE의 효과를 조직학적 평가를 하였다. 일반적으로 카드뮴 중독성 간손상은 조직병리학적으로 소엽 중심성 괴사와 함께 괴사 조직 주변성 충출혈이 인정되므로³⁷⁾, 이러한 조직병리학적 변화를 통해 다양한 해독물질들의 약리작용이 평가되어 왔다³⁸⁾.

본 연구의 조직학적 평가에서도 이전의 연구결과⁵⁵⁾와 같이 카드뮴의 투여에 의해 소엽 중심성 간세포의 괴사, 충출 및 염색세포의 침윤을 특징으로 하는 간 손상소견이 인정되었으며, normal 및 control에 비해 카드뮴 투여군에서는 현저한 간 변성을 및 변성 간세포의 증가가 인정되었다. 간 변성율은 normal군과 control군에서 각각 2.95 ± 1.84 , 2.61 ± 2.12 %를 나타내었으나, 카드뮴에 의해서는 간 변성율이 65.98 ± 6.89 %로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 간 변성율의 증가는 SLM군에서 18.95 ± 3.05 % (-71.28%)로 유의하게 감소되었으며, CFE 50, 100 mg/kg는 41.30 ± 9.39 , 31.08 ± 7.99 (-37.41 및 -52.90%)로 유의하게 감소되었다. 변성 간세포의 수는 normal군과 control군에서는 잘 관찰되지 않았으며, 카드뮴에 의해서는 변성 간세포의 수가 639.20 ± 133.68 개로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 변성 간세포의 수의 증가는 SLM군에서 185.20 ± 46.65 개 (-71.03%)로 유의하게 감소시켰으며, CFE 50, 100 mg/kg는 409.80 ± 72.51 , 258.60 ± 107.02 개 (-35.89 및 -59.54%)로 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 山査 추출물이 카드뮴 중독성 간 손상을 효과적으로 예방할 수 있는 직접적인 증거로 판단된다.

결론

山査의 물추출물이 간독성에 대한 보호효과를 평가하고자, in vitro에서 카드뮴에 의해 유도되는 H4IIE의 세포생존율 및 세포사멸과 관련된 단백질을 평가하고, in vivo에서 카드뮴에 의해 유발되는 흰쥐의 간손상에 대한 山査의 간보호효과를 혈액화학적, 조직학적 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

카드뮴 10 μ M은 유의한 세포독성을 나타내었으나, 山査 추출물은 0.10, 0.30 mg/ml의 농도에서 유의한 세포독성의 억제를 나타내었다. 카드뮴의 세포독성에 대한 山査의 세포보호효과는 PARP분해의 억제에서 기인한다. 카드뮴은 ALT, AST, LDH를 유의하게 증가시켰으며, 山査추출물은 100 mg/kg에서 유의하게 감소시켰다. 카드뮴에 의한 간 변성을 및 변성 간세포의 수는 유의하게 증가되었으나, 山査 추출물은 이러한 간세포의 변성을 유의하게 감소시켰다.

이러한 결과는 山査가 급성 간손상에 대한 예방 및 치료에 적극 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울, 영림사, pp 369-370, 1992.
2. 배명효, 김호현. 산사의 내피세포 의존성 혈관이완효과 기전에 대한 연구. 대한본초학회지 18: 269-180, 2003.

3. 송정춘, 박남규, 허한순, 방면호, 백남인. 국내산 약용식물의 항산화물질 탐색 및 분리. 한국약용작물학회지 8: 94-101, 2000.
4. 최수임, 이윤미, 허태련. 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 탐색. 대한생물공학학회지 18: 282-288, 2003.
5. 박찬성, 양경미, 김미립. 한방식재료 추출물의 기능성. 한국조리과학회지 22: 720-727, 2006.
6. 김정숙, 이기동, 권동호, 윤형식. 산사 항산화성 물질의 분리 및 동정. 한국농화학회지 36: 154-157, 1993.
7. 김정숙, 이기동, 권동호, 윤형식. 산사 및 가자 에테르 추출물의 항산화 효과. 한국농화학회지 36: 203-207, 1993.
8. 오덕환, 함승시, 박부길, 안철, 유진영. 식품부패 및 병원미생물에 대한 천연약용식물 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지 30: 957-963, 1998.
9. 박춘근, 방경환, 이승은, 차문석, 성정숙, 박희운, 성낙술. 수종 한약재 추출물의 Staphylococcus aureus에 대한 항균활성. 한국약용작물학회지 9: 251-258, 2001.
10. 최원근, 김용성, 조규성, 성창근. 국내산 식물의 항균활성 검색. 한국식품영양학회지 15: 300-306, 2002.
11. 정영표, 윤여충, 윤대환. 위유의 산사 약침이 고지방 식이로 유발된 비만백서에 미치는 영향. 대한침구학회지 24: 55-68, 2007.
12. 반상석. 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐에 인진, 지실, 산사가 미치는 영향. 대구한의대학교 대학원, 박사학위논문, 2006.
13. 김정환, 김명옥, 조영체. 산사(Crataegi Fructus) 추출물로부터 α -amylase와 α -glucosidase 저해 물질 분리 및 동정. 한국응용생명화학회지 50: 204-209, 2007.
14. 채종길, 정인철, 이상용. 산사육이 CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태모델에 미치는 영향. 신경정신과학회지 13: 79-115, 2002.
15. 정인철, 이상용. 산사육이 Alzheimer's Disease 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 16: 279-288, 2002.
16. 서부일. 산사가 알콜 투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상의 예방에 미치는 영향. 대한분초학회지 20: 35-43, 2005.
17. 심재영, 조영미, 김영경, 이현옥, 엄애선. 대두 이소플라본의 카드뮴 독성 완화작용에 미치는 영향. 한국콩연구회지 22: 19-24, 2005.
18. Samarawickrama, G.P. Biological effects of cadmium in mammals, In Webb M(ed): "The chemistry, biochemistry and biology of cadmium", Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 341-422, 1979.
19. Rajanna, B., Hobson, M., Reese, J., Sample, E. and Chatpatwala, K.D. Chronic Hepatic and renal toxicity by cadmium in rats, Drug Chem. Toxicol 7: 229-241, 1984.
20. Kunimoto, M., Miysaka, K. and Miura, T. Changes in membrane properties of rat blood cells induced by cadmium accumulating in the membrane fraction, J. Biochem 99: 397-406, 1986.
21. Chatpatwala, K.D., Rajanna, B. and Desai, D. Cadmium-induced changes in gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver, Drug Chem. Toxicol 3: 407-420, 1980.
22. Manca, D., Ricard, A.C., Trottier, B. and Chevalier, G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride, Toxicology 67: 303-323, 1991.
23. Sarkar, S., Yadav, P., Trivedi, R., Bansal, A.K. and Bhatnagar, D. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues, J. Trace Element Med. Biol 9: 144-149, 1995.
24. Dalton, T., Fu, K., Enders, G.C., Palmiter, R.D. and Andrews, G.K. Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium, Environ. Health Persp 104: 68-76, 1996.
25. Kim, J.H., Chough, N.J. and Park, S.B. Studies on the heavy metals of common restaurant meals. J. Korean Soc. Food Nutr 18: 316-320, 1989.
26. Song, M.R. and Lee, S.R. Assessment of total dietary intake of some heavy metals from common restaurant meals in Seoul area. Korean J. Food Sci. Technol 18: 458-467, 1986.
27. Whelton, B.D., Peterson, D.P., Moretti, E.S., Mauser, R.W. and Bhattacharyya, M.H. Hepatic levels of cadmium, zinc and copper in multiparous, nulliparous and ovariectomized mice fed either a nutrient-sufficient or-deficient diet containing cadmium. Toxicology 119: 141-153, 1997.
28. Kim, S.C., Byun, S.H., Yang, C.H., Kim, C.Y., Kim, J.W., Kim, S.G. Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). Toxicology 197: 239-251, 2004.
29. Cho, M.K., Suh, S.H., Kim, S.G. JunB/AP-1 and NF- κ B-mediated induction of nitric oxide synthase by bovine type I collagen in serum-stimulated murine macrophages. Nitric Oxide 6: 319-332, 2002.
30. Sauer, J.M., Waalkes, M.P., Hooser, S.B., Kuester, R.K., McQueen, C.A., Sipes, I.G. Suppression of Kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague-Dawley rat. Toxicology 121: 155-164, 1997.
31. Srivastava, R.K., Sharma, S., Verma, S., Arora, B., Lal, H. Influence of diabetes on liver injury induced by antitubercular drugs and on silymarin hepatoprotection in

- rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30: 731-737, 2008.
32. Belyaeva, E.A., Dymkowska, D., Więckowski, M.R., Wojtczak, L. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied pharmacology* 231: 34-42, 2008.
 33. Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7: 321-328, 2002.
 34. Tan, K.K., Bang, S.L., Vijayan, A., Chiu, M.T. Hepatic enzymes have a role in the diagnosis of hepatic injury after blunt abdominal trauma. *Injury* 40: 978-983, 2009.
 35. 김순호, 손한철, 이은엽, 장철훈. 최신판임상검사진단학. 서울, 계축문화사, pp 150-157, 1996.
 36. Sherlock, S., Dooley, J. *Diseases of the Liver and Biliary System*, 11th ed., London, Blackwell Science, p 23, 2002.
 37. Tzirogiannis, K.N., Panoutsopoulos, G.I., Demonakou, M.D., Hereti, R.I., Alexandropoulou, K.N., Mykoniatas, M.G. Effect of hepatic stimulator substance (HSS) on cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver. *Dig Dis Sci* 49: 1019-1028, 2004.
 38. Horiguchi, H., Oguma, E., Kayama, F., Sato, M., Fukushima, M. Dexamethasone prevents acute cadmium-induced hepatic injury but exacerbates kidney dysfunction in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 174: 225-234, 2001.
 39. Arjmandi, B.H., Khalil, D.A. and Hollis, B.W. Soy protein: Its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-1 in ovariectomized rats. *Calcifed Tissue Int* 70: 483-487, 2002.
 40. Valencia, R., Gerpe, M., Trimmer, J., Buckman, T., Mason, A.Z. and Olsson, P. The effect of estrogen on cadmium distribution in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Environmental Research* 46: 167-171, 1998.
 41. 최정화, 이순재. 만성카드뮴 중독 쥐에서 카드뮴 축적에 미치는 녹차 Catechin의 영향. *한국영양학회지* 34: 384-392, 2001.
 42. 임태진. 랫드 간세포 일차배양에서 셀레늄이 카드뮴에 의해 유도된 독성 및 지질과산화에 미치는 영향. *한국환경농학회지* 22: 94-99, 2003.
 43. 이치호, 한규호, 최일신, 김충용, 조진국. 인진쑥의 열수 추출물이 흰쥐의 카드뮴 독성에 미치는 영향. *한국축산식품학회지* 19: 188-197, 1999.
 44. 김민지, 홍정희, 이순재. 만성 카드뮴 중독 흰쥐에서 카드뮴 축적과 배설에 미치는 Vitamin E의 영향. *한국영양학회지* 36: 691-698, 2003.
 45. Belyaeva, E.A., Dymkowska, D., Więckowski, M.R., Wojtczak, L. Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in Cd²⁺-induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 1568-1574, 2006.
 46. Russmann, S., Kullak-Ublick, G.A., Grattagliano, I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem* 16: 3041-3053, 2009.
 47. Ueda, H. Prothymosin alpha and cell death mode switch, a novel target for the prevention of cerebral ischemia-induced damage. *Pharmacol Ther* 123: 323-333, 2009.
 48. Geoffrey M. Cooper 저, 전국분자생물학교수 역, 세포학 (The Cell), 서울, 한우리, pp 599-636, 2000.
 49. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516, 2007.
 50. Nagata, S. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406: 119-124, 1996.
 51. 손윤희, 조현정, 김미경, 정은정, 남경수. 단삼 에탄올추출물이 지방암 예방 및 전이에 미치는 영향. *생약학회지* 38: 62-66, 2007.
 52. van Wijk, S.J., Hageman, G.J. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 39: 81-90, 2005.
 53. Skilleter, D., Cain, K., Dinsdale, D., Paine, A. Biochemical mechanisms and morphology selectivity in hepatotoxicity: Studies in cultures of hepatic-parenchymal and non-parenchymal cells, *Xenobiotica* 15: 687-693, 1985.
 54. Lee, J.R., Park, S.J., Lee, H.S., Jee, S.Y., Seo, J., Kwon, Y.K., Kwon, T.K., Kim, S.C. Hepatoprotective Activity of Licorice Water Extract against Cadmium-induced Toxicity in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 195-201, 2009
 55. Park Eun Young. Hepatoprotective and renoprotective effects of liquiritigenin, a component of licorice, on cadmium-induced toxicity in rats. 대구한의대학교 대학원, 석사학위논문, 2008.