

躑躅가 Bromobenzene에 의한 흰쥐의 肝損傷에 미치는 影響

韓汀勳 · 申鉉喆 · 尹哲浩 · 金鍾吳 · 鄭智天* · 申億燮**

ABSTRACT

Effects of *Holotrichia* on damages of liver tissue induced by bromobenzene in rats

Han Jeong-Hoon, Shin Hyeon-Chul, Yoon Cheol-Ho, Kim Jong-Dae, Jeong Ji-Cheon*

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ.

Shin Uk-Seob**

** Dept. of Pharmacy, Dongguk Medical Center

Holotrichia was tested for the effects on damages of liver tissue induced by bromobenzene. *Holotrichia* was treated firstly into samples, and then bromobenzene intoxicated animal models were set with them.

In vitro, the level of lipid peroxide in tissue of liver proportionally decreased with the level of concentration of extract prepared from *Holotrichia*. It was much more decreased, when lipid peroxidation was induced with ferrous iron (Fe^{+2}). *In vivo*, after the extract was administered to the animal model for twenty days, the level of lipid peroxide in liver decreased compared to that of bromobenzene-treated group.

The enzyme activities of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in liver highly increased in *Holotrichia* pre-medicating group compare with the group treated with only bromo-

* 東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

** 東國大學校 醫療院 藥劑科

benzene. And we can get the same results in the enzyme activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. The level of glutathione followed by *Holotrichia* pre-medicationg administration, increased as highly as normal group in compare with the group treated with only bromobenzene. Also, the enzyme activities of ALT, AST and γ -GTP in liver considerably decreased.

In conclusion, *Holotrichia* recovers the damage of liver due to bromobenzene intoxication by the increased activities of lipid peroxidation and bromobenzene scavenging enzymes.

Key words : *Holotrichia*, lipid peroxidation, epoxide hydrolase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione

1. 서 론

肝臟은 인체내에서 가장 큰 실질장기로 당질 및 지질대사를 담당하며 혈액량을 조절하고 혈액과 관련된 기능으로 조혈과 파혈작용이 있으며, 요소 생성과 암모니아 처리로 체내외에서 생성, 유입되어온 산물들을 수용성 형태로 바꾸어 주로 소변으로 배출함으로써 解毒作用을 담당한다.¹⁾

한의학에서는 간경화, 간비종대, 간종양 등의 치료에 活血化癥法이 활용되는데 탐식세포의 기능과 모세혈관의 투과성을 증강시켜 消除腫瘤하는 효과가 있으며, 蠱虫, 水蛭, 虻虫, 蟪蛄 등의 蟲類약물이 이에 屬한다.²⁾

蟪蛄(*Holotrichia*)는 진검정 풍뎡이의 유충인 굼벵이를 건조한 것으로 性溫·味鹹하고 肝經에 歸經하며 破血行瘀·散結消腫하는 효능으로 惡血, 瘀血痞氣, 目中淫膈, 青翳白膜, 月閉, 浮腫 및 破傷風 등의 치료에 활용되며,³⁻¹¹⁾ 민간에서는 간장 질환의 치료에 이용되고 있다.

蟪蛄에 관한 연구로는 文¹²⁾, 安¹³⁾, 洪¹⁴⁾ 등이 prothrombin time을 단축시키고, fibrinogen의 양을 증가시키며, FDP의 농도를 감소시키고 혈전 용해 효소 단백질이 존재하여 항혈전 효과를 나타낸다고 보고하였다.

過酸化脂質은 活性酸素(free radical)들이 생체막 구성 성분인 불포화지방산을 공격하므로써 생

성되며, 세포의 파괴, 기능 손실, 조직 손상을 통하여 당뇨병, 심장병, 신부전 등의 주요 원인이 될 뿐만 아니라,¹⁵⁻¹⁷⁾ 간세포 손상을 일으킨다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 또한, 과산화지질은 superoxide dismutase,¹⁹⁾ glutathione peroxidase²⁰⁾ 및 catalase²¹⁾ 등의 활성 산소 解毒系 효소에 의해서 생성이 억제되고, xanthine oxidase,²²⁾ aldehyde oxidase²³⁾ 등의 생성계 효소에 의해서 생성이 촉진된다.

이에 저자는 항혈전 효능을 가진 蟪蛄가 간세포의 손상 및 간장 질환의 치료에 효과가 있을 것으로 여겨져, 蟪蛄 추출물을 실험동물에 前처치한 다음 肝臟에 bromobenzene²⁴⁾으로 급성 독성을 유발한 후 세포 손상의 지표인 과산화지질과 이와 관련된 여러 효소들에 미치는 영향을 검토하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 藥材

열처리하지 않은 신선한 蟪蛄(*Holotrichia*)를 시중에서 구입하여 사용하였다.

2) 動物

실험에 사용한 동물은 동국대학교 한의과대학 동물사에서 일정한 온도와 습도가 유지되는 조건으로 사육한 외관상 건강하고 체중이 약 250g 내외의 雄性 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다.

3) 試藥 및 機器

Bovine serum albumin(BSA), ferrous chloride (Fe II), glutathione reduced, glutathione reductase, hematoxylin, nicotineamide adenine dinucleotide (NAD), sodium chloride, thiobarbituric acid sodium salt, xanthine oxidase는 Sigma사로부터 hydrogen peroxide, trichloroacetic acid, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, trans-stilbenoxide는 Nakarai 사로부터, potassium phosphate mono and dibasic은 Wako pure Chemical, malondialdehyde (MDA)는 Aldrich사로부터 구입한 제품을 사용하였고 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 UV spectrophotometer (Shimazu UV-1201), refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D), ultra centrifuge (Hitachi 70P-72), deep freezer (Revco) 등이었다.

2. 方法

1) 抽出液의 調製

열처리하지 않은 신선한 蟻螞 분말 150g을 round flask에 넣고 4°C cold chamber 안에서 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) 50ml를 넣고 2시간씩 3회, 총 150ml를 여과 추출하여 추출액을 동결건조로 농축하여 25.86g의 분말을 얻은 후 -20°C에 보관하였다.

2) 酵素源의 調製

동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 0.9% 생리식염수로 관류시킨 간장을 적

출하였다. 적출한 간장을 생리식염수에 깨끗이 씻은 다음 濾紙로 가볍게 압박하여 이물질 또는 생리식염수를 제거하였다. 간조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로略함)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 磨碎하였다. 이 마쇄 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 未마쇄부분을 제거한 上澄液을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 한편, mitochondrial fraction을 제거시킨 상정액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction을 분리하였다.

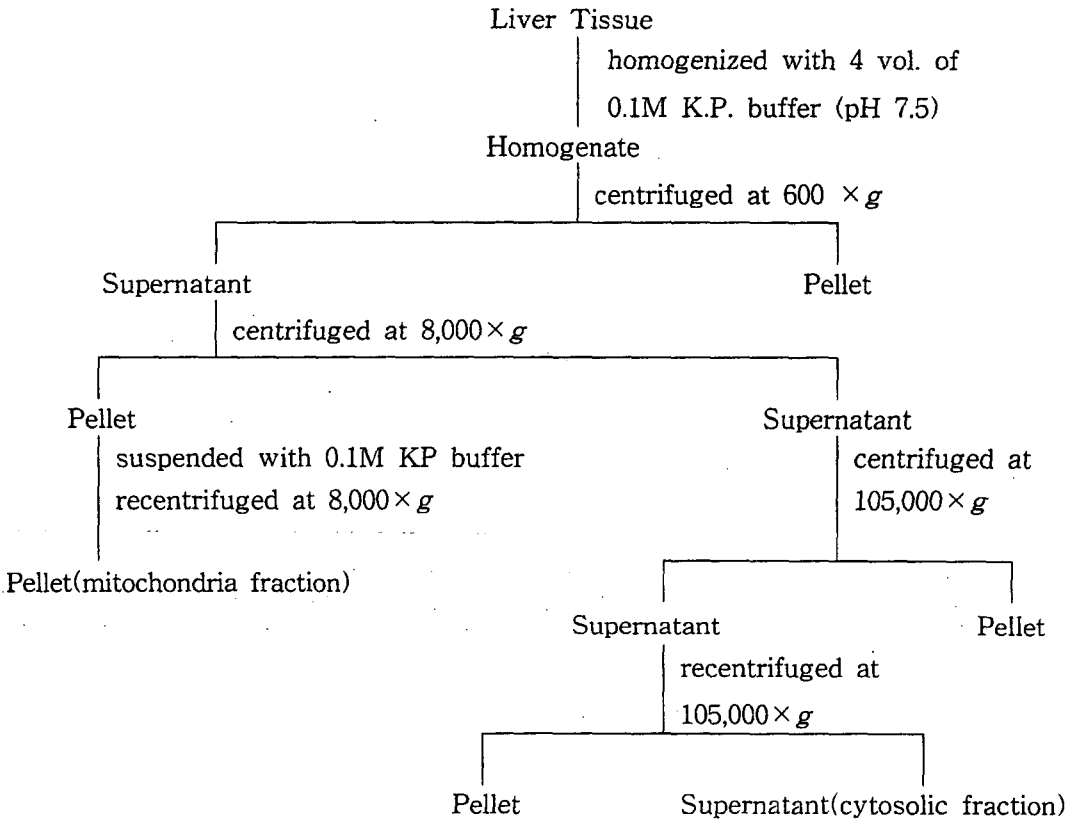
Cytosolic fraction은 epoxide hydrolase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 및 superoxide dismutase 활성 측정의 효소원으로 사용하였으며 mitochondrial fraction은 0.1M K.P. buffer에懸濁시킨 다음 재원심분리하였다. 이때 얻은 침전물을 일정량의 0.1M K.P. buffer에 재현탁시켜 freezing & thawing한 다음 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4°C에서 행하였다. 한편, 채취한 혈액은 실온에서 1시간 정도 방치시켜 혈청을 분리시킨 후 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 및 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 활성 측정원으로 사용하였다. (Scheme I)

3) 檢液의 投與

蟻螞 추출물의 투여는 실험 동물의 체중 kg당 200mg을 1일 1회 20일간 경구 투여하였으며 정상군은 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다. 실험 동물은 실험전 16시간 동안 물만 주고 절식시켰다. 급성독성 모델동물은 실험 동물에 Huh 등²⁵⁾의 방법을 약간 수정하여 bromobenzene을 체중 kg 당 340mg을 1일 1회 2일간 복강 투여하여 급성 독성을 유발시켰다. 실험 동물은 정상군,

bromobenzene 투여 독성 유발군 (대조군) 및 蟻 螯 추출물 前처치후 bromobenzene 투여 독성 유발군 (실험군) 등의 세 그룹으로 분류하였으며, 한 그룹당 개체수를 10마리로 하였다.

백질이 기질인 trans-stilbene oxide를 소실시키는 양을 nmole로 나타내었다.



Scheme I. Preparation of enzyme source

4) 酵素 活性의 測定

① Epoxide hydrolase 活性 測定

Epoxide hydrolase 활성 측정은 Hammock 등²⁶⁾의 방법에 준해 0.1M K.P. buffer (pH 7.0)에 기질로 1mM trans-stilbene oxide, 효소액 (100-200 μg의 단백질)을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시키고 이 때 소실되는 기질의 양을 파장 229nm에서 흡광도의 감소를 읽고 검량선에 준하여 산정하였다. 효소의 활성도는 1mg의 단

② Glutathione S-transferase 活性 測定

Glutathione S-transferase 활성 측정은 Habig 등²⁷⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 0.1M K.P. buffer (pH 6.5) 일정량에 1mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 GSH를 기질로 하여 효소액을 가하고 25 °C에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA로 반응을 종료시킨 후 생성된 conjugated 2,4-dinitrobenzene-GSH의 양을 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산정하였다.

효소 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 conjugated 2,4-dinitrobenzene-GSH의 양을 nmoles로 표시하였다.

③ Superoxide dismutase 活性 測定

Superoxide dismutase 활성 측정은 Martin 등²¹⁾의 방법에 준해 실시하였다. 효소원 조제 방법에 따라 분리된 cytosolic fraction에 EtOH:CHCl₃ (5:3)혼액 0.4배량을 가하여 잘 혼합한 다음 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 얻고 이것을 superoxide dismutase 활성 측정 효소원으로 사용하였다. 반응액은 50mM K.P. buffer (pH 7.5, EDTA 0.1mM 함유) 일정량에 5mM hematoxylin, 효소액의 용량을 달리하여 첨가하고 최종 반응액이 3.0ml가 되게 하였다. 이 반응액을 25℃에서 5분간 반응시킨 다음 560nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산정하였다. 효소 활성의 unit는 효소를 넣지않고 반응시킨 5mM hematoxylin 액의 흡광도 증가를 50% 억제하는 단백질의 양으로 산정하였다.

④ Catalase 活性 測定

Catalase 활성 측정은 Aebi의 방법²⁸⁾에 준해 50mM K.P. buffer (pH 6.8)에 기질인 H₂O₂ 10.5mM 및 mitochondria 효소액을 첨가하여 최종 반응액이 3.0ml가 되게 하였다. 이 반응액을 25℃에서 30초간 반응시키면서 240nm에서 H₂O₂의 분해정도를 측정하여 분자 흡광계수 (E₂₄₀=0.041mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 분해시킨 H₂O₂의 양을 μmole로 나타내었다.

⑤ Glutathione peroxidase 活性 測定

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Paglia 등의 방법²⁹⁾에 준해 일정량의 0.1M Tris·HCl buffer (pH 7.2) 용액에 기질인 H₂O₂, 1mM

glutathione, glutathione reductase(2 I.U.), 0.2mM NADPH 및 효소원을 첨가하여 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 생성되는 GSSG를 환원시키는데 소비된 NADPH의 함량을 340nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1mg의 단백질이 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 나타내었다.

⑥ 血清中 γ-glutamyl transpeptidase 活性 測定

혈청중의 γ-glutamyl transpeptidase 활성 측정은 Divon의 방법³⁰⁾을 약간 변경하여 실시하였다. 기질액 1.0ml를 시험관에 첨가하고 37℃에서 5분간 가온한 다음 혈청 일정량을 가하여 잘 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액에 정색시약 3.0ml를 가하여 10℃ 상 실온에서 방치시킨 다음 60분 이내에 맹검을 대조로하여 파장 565nm에서 생성된 p-nitroaniline의 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 혈청 ml당 생성된 p-nitroaniline의 양을 nmole로 나타내었다.

⑦ 血清中 ALT 및 AST 活性 測定

혈청중의 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST) 활성 측정은 Reitman과 Frankel 등³¹⁾의 방법에 준하여 조제된 kit 시약을 사용하였다. 조제된 기질완충액 2.0ml에 혈청 0.2ml를 첨가하여 37℃에서 ALT는 30분 동안 반응시키고 AST의 경우는 37℃에서 60분 동안 반응시킨 다음 정색시약 1.0ml를 첨가하여 반응을 종료시키고 여기에 0.4N NaOH 10ml를 넣어 잘 혼합시킨 다음 실온에서 30분 정도 방치시켜 충분히 발색시킨 후 파장 505nm에서 흡광도를 읽고 그 흡광도를 표준곡선에 의거하여 효소의 활성도를 산정하였다.

5) 過酸化脂質 含量 測定

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등³²⁾의 방법에 준해 간조직 마쇄균질액 일정량에 8.1%

sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 혼합액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 한편, *in vitro* 실험에서는 Haber-Weiss 반응³³⁾을 이용하여 Fe(II)과 xanthine-xanthine oxidase system을 첨가시킨 반응액에 농도를 달리한 제조 추출물을 첨가시켜 반응시킨 후 생성된 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하였다. 과산화지질의 함량은 단백질 1mg당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

6) Glutathione 含量 測定

조직중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법³⁴⁾에 준해 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상정액 일정량에 0.1mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1M sodium phosphate buffer (pH. 8) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412nm에서 측정하여 농도를 산정하였다. GSH 함량은 조직 1g당 함유되어 있는 GSH의 양을 μ mole로 나타내었다.

7) 蛋白質의 定量

단백질의 정량은 Lowry 등³⁵⁾의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다.

8) 統計 및 處理

실험 결과의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 이용하여 상호 비교하였다.

III. 성 적

1. 시험관내에서 過酸化脂質 生成 變化

시험관내에서 과산화지질의 함량을 측정하는 반응액중에 蟻螞 추출물의 첨가 농도를 달리하면서 반응시킨 후 간장 조직중의 과산화지질의 함량을 관찰하여 그림 1에 나타내었다.

蟻螞 추출물을 첨가시키지 않은 정상조건에서의 과산화지질 함량은 12.84 nmole/g of tissue 이었으나 반응액중에 蟻螞 추출물을 농도를 달리 하면서 첨가시켜 관찰한 과산화지질의 함량은 蟻螞 추출물 첨가농도에 비례하여 감소 현상을 나타내었으며 첨가량이 반응액 ml당 0.1mg이 되게 하였을 때는 과산화지질의 함량이 11.52 nmole/g of tissue, 0.2mg인 경우는 10.92 nmole/g of tissue, 0.4mg인 경우는 9.92 nmole/g of tissue, 0.8mg인 경우는 8.02 nmole/g of tissue로 대조치에 비해 현저한 과산화지질 함량의 감소현상을 관찰할 수 있었다.

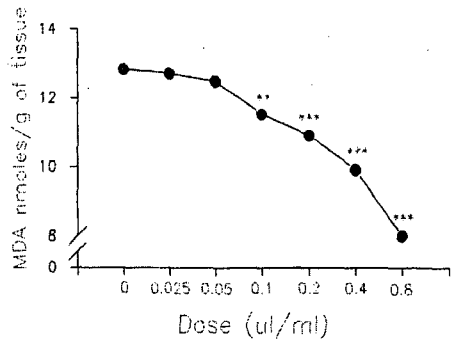


Fig. 1. Effect of the extract of *Holotrichia* on the hepatic lipid peroxidation *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments. Significantly different from control group (**:P<0.01, ***:P<0.001)

2. 시험관내에서 Fe(II)에 의해 誘導된 過酸化脂質 生成 變化

시험관내에서 활성산소 생성계인 Fe(II)과

xanthine/xanthine oxidase계를 이용하여 과산화 지질의 생성모형을 인위적으로 만든 다음 蟻螞 추출물의 항산화 효과를 관찰하였다.

활성산소 생성모형을 이용한 과산화지질 측정 반응액중에 蟻螞 추출물의 농도를 달리하면서 첨가시키고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 간장 조직중의 과산화지질의 함량을 관찰하여 그림 2에 나타내었다.

간조직 마쇄액 일정량에 Fe(II)과 xanthine/xanthine oxidase system의 활성산소 생성계를 이용하여 인위적으로 지질의 과산화반응을 촉진시킨 조건에서는 과산화지질의 함량이 33.45 nmoles/g of tissue이었다. 그러나, 반응액 중에 0.1mg의 蟻螞 추출물을 첨가시킨 경우는 26.58 nmoles, 0.2mg의 蟻螞 추출물을 첨가시킨 조건에서는 과산화지질의 함량이 24.22 nmole, 0.4mg을 첨가시켰을 때는 22.44 nmole, 0.8mg을 첨가시켰을 때는 과산화지질의 생성량이 19.06 nmole로서 대조치에 비하여 유의성 있게 과산화지질 생성을 저해하였다.

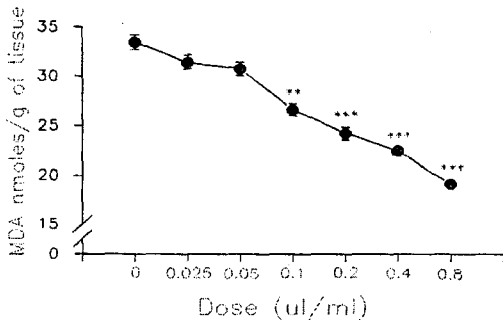


Fig. 2. Effect of the extract of *Holotrichia* on the Fe(II)-induced hepatic lipid peroxidation *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments. Significantly different from control group (**:P<0.01, ***:P<0.001).

3. Bromobenzene 投與 흰쥐의 過酸化 脂質 含量 變化

실험동물에 蟻螞 추출물을 투여한 후 bromobenzene을 복강 투여하여 급성독성을 유발시킨 다음 간장을 적출하여 조직중의 과산화지질의 함량 변화를 관찰한 것이 그림 3이다.

생리식염수만을 투여한 정상군의 과산화지질의 함량은 12.96 nmoles 이었으며 bromobenzene을 투여하여 간독성을 유발시킨 대조군의 과산화지질 함량은 30.05 nmoles로서 정상군에 비해 약 2 배 이상의 유의한 함량 증가현상이 관찰되었다. 그러나, 蟻螞 추출물을 전처치한 후 bromobenzene을 투여하여 독성을 유발시킨 실험군은 과산화지질의 함량이 21.47 nmoles로 bromobenzene 독성 유발군에 비해 유의성 있는 과산화지질의 함량 감소현상을 비교 관찰 할 수 있었다.

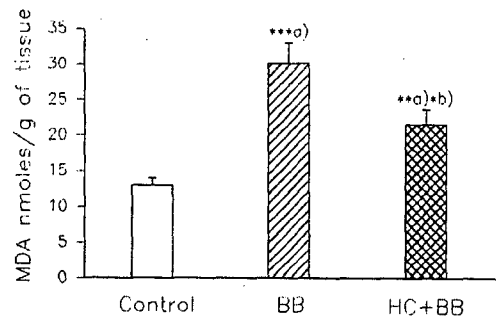


Fig. 3. Effect of the extract of *Holotrichia* on the content of hepatic lipid peroxide in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:P<0.001).

BB : Bromobenzene-treated group
 HC : Holotrichia extract-treated group

4. Bromobenzene 投與 흰쥐의 Epoxide hydrolase 活性 變化

실험동물에 蟾蜍 추출물을 1일 1회 20일간 전 처치한 후 bromobenzene을 복강투여하여 급성 독성을 유발시킨다음 간장을 적출하여 효소액을 만든 후 간장중의 epoxide hydrolase 활성 변화를 관찰한 것이 그림 4이다.

생리식염수만을 처치한 정상군의 epoxide hydrolase 활성은 6.20 nmoles이었으며 bromobenzene을 투여하여 간독성을 유발시킨 대조군은 3.77 nmoles로서 정상군에 비해 현저한 활성 억제현상이 관찰되었다. 그러나, 蟾蜍 추출물을 전처치한 후 bromobenzene을 투여하여 독성을 유발시킨 실험군은 활성이 4.99 nmoles로 bromobenzene 단독 투여군에 비하여 활성이 정상수준으로 가깝게 회복되는 양상을 관찰할 수 있었다.

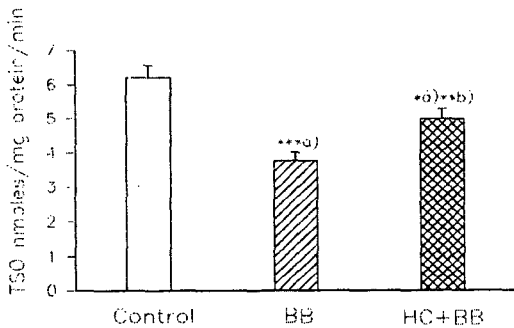


Fig. 4. Effect of the extract of *Holotrichia* on the hepatic cytosolic epoxide hydrolase activity in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b)

Significantly different from bromobenzene-treated group (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

BB : Bromobenzene-treated group
 HC : Holotrichia extract-treated group

5. Bromobenzene 投與 흰쥐 glutathione S-transferase 活性 變化

20일 동안 蟾蜍 추출물을 경구로 섭취시킨 다음 bromobenzene으로 급성 독성을 유발시킨 실험동물의 간조직중의 glutathione S-transferase 활성변화를 비교검토한 것이 그림 5이다. 생리식염수만을 투여한 정상군의 경우 효소활성이 901.5 nmoles인데 비하여 bromobenzene 투여 독성 유발군은 활성이 현저히 억제되어 542.3 nmoles로서 정상상태와 비교해 볼때 약 40% 이상의 활성억제현상이 관찰되었다. 그러나, 蟾蜍 추출물을 20일동안 전처치 한 후 bromobenzene 투여하여 독성을 유발시킨 실험군은 783.3 nmoles로 나타나 bromobenzene만 투여하여 독성을 유발시킨 대조군에 비해 유의성있게 효소활성이 정상군 수준 가깝게 증가되는 현상을 볼 수 있었다.

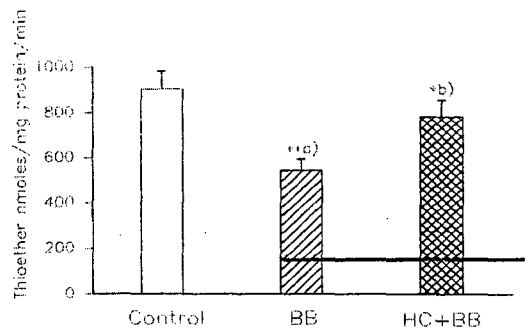


Fig. 5. Effect of the extract of *Holotrichia* on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*:p<0.05, **:P<0.01).
 BB : Bromobenzene-treated group
 HC : Holotrichia extract-treated group

mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (**:P<0.01, ***:P<0.001).
 BB : Bromobenzene-treated group
 HC : Holotrichia extract-treated group

6. Bromobenzene 投與 흰쥐 superoxide dismutase 活性 變化

蟾蜍 추출물을 실험동물에게 경구 투여한 후 bromobenzene을 투여하여 급성독성을 유발시킨 조건에서 간조직중의 superoxide dismutase 활성 변화를 관찰한 것이 그림 6이다. 생리식염수만을 투여한 정상군의 활성이 6.20 units/mg protein이었으나 bromobenzene 투여 대조군은 2.74 units/mg protein로 정상군에 비하여 현저한 활성 억제현상이 관찰되었다. 그러나, 蟾蜍 추출물을 전처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군의 경우는 4.06 units/mg protein로 유의성 있게 정상수준으로 회복되어지는 경향을 나타내었다.

7. Bromobenzene 投與 흰쥐의 catalase 活性 變化

실험동물에 20일 동안 蟾蜍 추출물을 경구 투여한 후 독성유발약물로 bromobenzene을 투여하여 급성독성을 유발시키고 간장 조직중의 catalase 활성변화를 관찰한 것이 그림 7이다. 정상상태의 실험동물의 경우 catalase 활성이 1.78 μ moles이었으나, bromobenzene을 투여한 독성 유발 대조군은 1.05 μ moles로서 정상상태와 비교해 볼때 유의성있는 활성 억제현상을 나타내었다. 한편, 蟾蜍 추출물을 20일간 전 처치한 후 bromobenzene 투여한 실험군의 경우는 catalase 활성이 1.57로 bromobenzene 독성 유발군에 비해 상당히 정상수준 가깝게 호전되어지는 경향을 나타내었다.

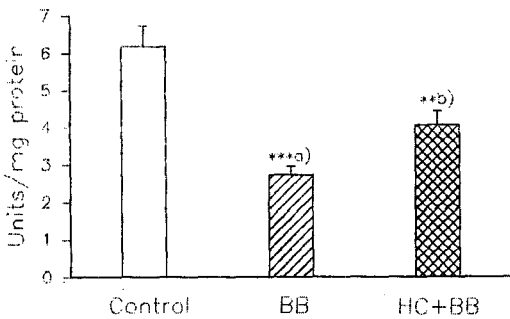


Fig. 6. Effect of the extract of *Holotrichia* on the hepatic cytosolic superoxide dismutase activity in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are

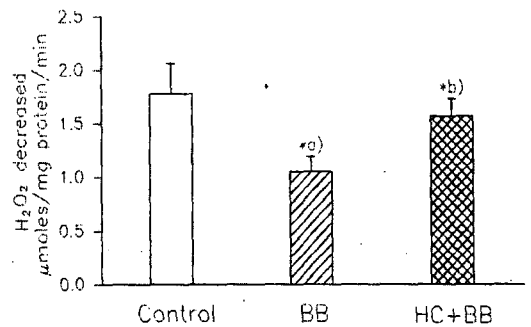


Fig. 7. Effect of the extract of *Holotrichia* on the hepatic mitochondrial catalase activity in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in

the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene -treated group (*:P<0.05).

BB : Bromobenzene-treated group

HC : *Holotrichia* extract-treated group

8. Bromobenzene 投與 흰쥐 glutathione peroxidase 活性 變化

실험동물에 蟻螞 추출물을 투여한 후 bromobenzene으로 급성독성을 유발시키고 간장 조직중의 glutathione peroxidase 활성변화를 관찰한 것이 그림 8이다. 蟻螞 추출물을 투여하지 않은 정상동물에서 간조직중의 효소활성이 270.5 nmoles이었다. 실험동물에 bromobenzene 2회 투여하여 독성을 유발시킨 대조군은 185.4 nmoles로서 정상군과 비교해 볼때 약 30% 이상의 유의성있는 활성 억제현상을 관찰할 수 있었다. 한편, 蟻螞 추출물을 20일간 경구 투여한 후 bromobenzene 투여하여 독성을 유발시킨 실험군은 249.3 nmoles로 bromobenzene 단독 투여군에 비해 효소활성이 상당히 증가되어 거의 정상수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

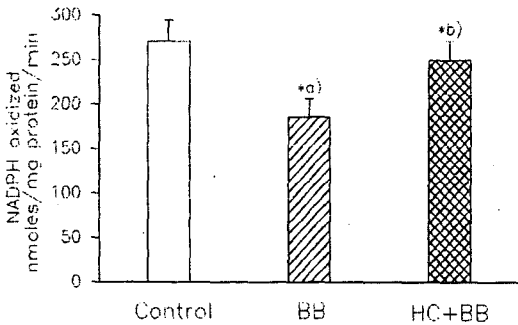


Fig. 8. Effect of the extract of *Holotrichia* on the hepatic cytosolic glutathione peroxidase activity in bromobenzene

-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene -treated group (*:P<0.05).

BB : Bromobenzene-treated group

HC : *Holotrichia* extract-treated group

9. Bromobenzene 投與 흰쥐 glutathione 含量 變化

실험동물에 蟻螞 추출물을 경구로 섭취시킨 후 bromobenzene을 복강 투여하여 급성독성을 유발시키고 간장을 적출하여 조직중의 glutathione 함량변화를 관찰한 것이 그림 9이다.

정상군의 간장 조직중의 glutathione 함량은 4.24 μ moles 이었으며 bromobenzene을 투여하여 간독성을 유발시킨 대조군은 2.35 μ moles로서 정상군에 비해 현저한 함량 감소현상을 보였다. 그러나, 蟻螞 추출물을 20일간 전처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군은 3.65 μ moles로 bromobenzene만 투여하여 독성을 유발시킨 대조군에 비해 glutathione 함량이 유의성 있게 정상군 수준으로 증가되는 것을 알 수 있었다.

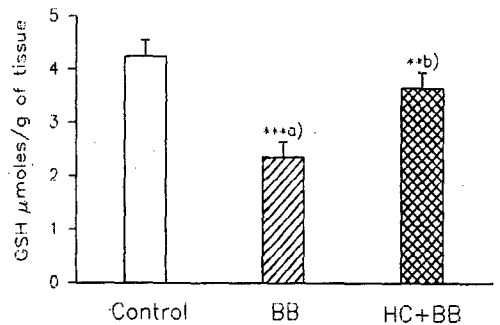


Fig. 9. Effect of the extract of *Holotrichia* on the content of hepatic glutathione in

bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (**:P<0.01, ***:P<0.001).

BB : Bromobenzene-treated group

HC : Holotrichia extract-treated group

10. Bromobenzene 投與 흰쥐 血清中의 γ -GTP 活性 變化

실험동물에 蟾蜍 추출물을 전처치한 후 bromobenzene을 복강 투여하여 급성독성을 유발시킨 다음 혈액을 채취하여 실온에 일정시간 방치후 혈청을 분리하고 분리된 혈청을 이용하여 γ -GTP 활성 변화를 관찰한 것이 그림 10이다.

아무런 처치없는 정상상태의 실험동물에서 혈청중의 γ -GTP 활성은 46.25 nmoles이었으나 bromobenzene을 투여하여 간독성을 유발시킨 대조군은 89.7 nmoles로서 정상군에 비해 현저한 활성 증가현상이 관찰되었다. 그러나, 蟾蜍 추출물을 20일간 전처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군의 경우는 62.55 nmoles로 bromobenzene 단독투여군에 비하여 효소활성이 유의성있게 저하되어 정상군 수준으로 회복되는 경향을 관찰할 수 있었다.

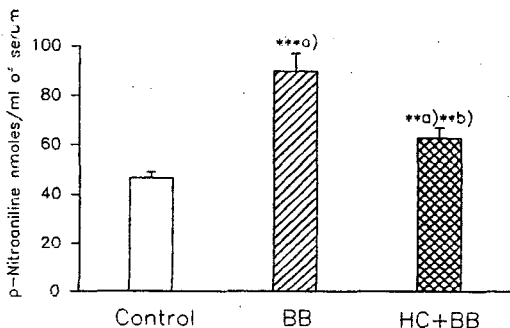


Fig. 10. Effect of the extract of *Holotrichia* on the serum γ -GTP activity in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (**:P<0.01, ***:P<0.001).

BB : Bromobenzene-treated group

HC : Holotrichia extract-treated group

11. Bromobenzene 投與 흰쥐 血清中의 ALT 및 AST 活性 變化

蟾蜍 추출물을 20일 동안 실험동물에 전처치한 후 bromobenzene을 복강 투여하여 간독성을 유발시킨 다음 채혈하여 실온에 일정시간 방치후 혈청을 분리하고 분리된 혈청을 이용하여 ALT AST 활성변화를 관찰한 것이 그림 11이다.

정상상태의 실험동물에서 혈청중의 ALT 활성은 24.36 unit이었으나 bromobenzene으로 간독성을 유발시킨 대조군의 경우는 74.56 unit로서 정상군에 비해 현저한 활성 증가현상이 관찰되었다. 그러나, 蟾蜍 추출물을 20일간 전처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군의 경우는 46.21 unit로 bromobenzene 단독 투여군에 비하여 효소활성이 유의성있게 정상수준 가깝게 저하되는 현상을 나타내었다.

AST 활성의 경우도 ALT의 경우와 마찬가지로 정상군의 활성이 30.27 unit이었으나 bromobenzene 독성군은 활성이 62.44 unit로 나타나 정상군에 비해 현저하게 효소활성의 증가를 관찰할 수 있었다. 蟾蜍 추출물을 전처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군의 활성은 43.25 unit로 정상수준으로 효소활성이 저하되어짐을 관찰할 수 있었다.

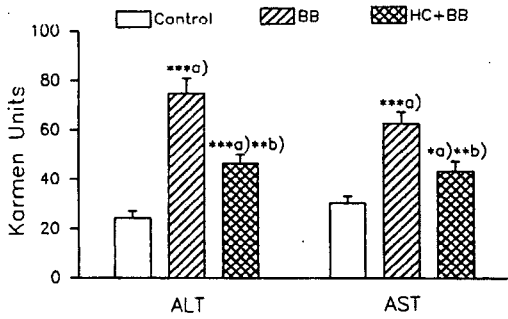


Fig. 11. Effect of the extract of *Holotrichia* on the serum ALT and AST activities in bromobenzene-treated rats.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 10 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*:p<0.05, **:P<0.01, ***:P<0.001).

BB : Bromobenzene-treated group

HC : *Holotrichia* extract-treated group

IV. 고 찰

鱗螬는 풍뎡이의 유충인 굽벵이를 건조한 것으로, 神農本草經⁵⁾에 최초로 기재된 후 蝨, 蝨螬, 蠶齊, 乳齊, 地蠶, 應條, 老母虫, 核桃虫 등의 異名^{36,37)}이 있다. 性은 溫하고 肝經에 入하며 여러 문헌에 主治를 主惡血 瘀血, 月閉, 目中淫膚, 青翳白膜, 金瘡內塞, 赤白游疹 등으로 기재하고 있는데³⁻⁹⁾ 주로 瘀血의 치료에 사용되어 왔다.

肝臟은 藏血을 통한 혈액조절, 영양대사, 造血 및 破血, 解毒機能 등 다양한 기능이 있는데, 그 중 解毒作用은 생체내에서 생성되는 각종 산물들과 생체외로부터 들어오는 이물질들 중 정상적인 탄소, 질소대사를 거치지 못하거나 일반적인 경로에 의하여 체외배출이 되지 못하는 산물들을

수용성 형태로 바꾸어 주로 소변으로 배출하도록 하는 역할을 담당하고 있어¹⁾ 간장 조직의 손상 발생시 인체에 미치는 영향은 심각하리라 여겨진다.

따라서 저자는 破血行瘀·散結消腫하는 鱗螬가 간손상의 회복에 효과를 나타내는지 관찰하기 위하여 실험동물에 鱗螬 추출물을 장기간 前처치한 후 독성물질인 bromobenzene을 복강 주사하여 간독성을 유도한 다음 간조직중의 과산화지질과 glutathione 함량 변화, epoxide hydrolase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 및 혈청중의 γ -glutamyl transpeptidase, ALT, AST 활성 변화 등을 비교 관찰하고자 하였다.

과산화지질을 측정하는 반응액중에 鱗螬 추출물의 농도를 달리하면서 첨가시키고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰을 때 鱗螬 추출물의 첨가농도 의존적으로 간조직에서 과산화지질의 생성을 억제시킴을 관찰할 수 있었다. 과산화지질의 생성은 세포막에 많이 존재하고 있는 불포화지방산이 활성산소 遊離基들의 공격으로 인해서 연쇄적 산화반응이 이루어지고 이러한 일련의 생화학적 산화반응에 의해서 세포막이 손상을 입게 되고 결국에는 세포막의 파괴로 인한 세포손상이 나타나므로,³⁸⁾ 간조직중의 과산화지질을 측정하므로써 간조직의 손상정도를 가늠할 수 있다고 한다.

한편, 시험관내에서 지질 과산화반응을 측정하는 조건 중에 xanthine/xanthine oxidase system과 Fe(II)을 공존시킨 상태에서 인위적으로 과산화지질의 생성을 촉진시킨 실험모델인 Haber-Weiss 반응³³⁾에서 시험관내에 鱗螬 추출물을 첨가농도를 달리하면서 관찰하였을 때는 정상상태에서 나타나는 과산화지질 생성 억제작용보다 더욱 강한 억제작용을 관찰할 수 있었는데 이는 鱗螬 추출물이 정상상태보다는 생체내의 병태생리 조건이 부여된 질병유발상태에서 더욱 민감하게 작용을 나타내고 있음을 나타내주고 있다.

시험관 실험에서 관찰된 蟻螞 추출물의 항산화 효과를 실험동물에서도 유사하게 관찰되는 것을 검토하기 위하여 실험동물에 蟻螞 추출물을 20일간 전처치한 후 bromobenzene으로 간독성을 유발시킨 다음 간조직중의 과산화지질 함량변화를 관찰하였을 때 bromobenzene에 의하여 현저하게 증가되던 과산화지질의 함량이 蟻螞 추출물의 전처치에 의하여 거의 정상군 수준으로 회복되는 경향을 볼 수 있었다. 이는 蟻螞 추출물이 간독성 유발물질들의 생체내 작용을 차단하여 독성물질들로부터 생체를 방어하는 작용을 지니고 있음을 시사하고 있다고 여겨진다.

Bromobenzene은 할로젠 화합물로서 간단한 화학구조를 지니고 있으나 생체내에서는 발암, 간 및 신기능 등 생체 전반적으로 독성을 나타내는 맹독성 물질로 분류되는 물질이다.²⁴⁾ 이 화합물은 생체내에서 microsomal cytochrome P450에 의하여 산화반응을 거쳐 bromobenzene epoxide로 1차 대사되며 이 epoxide 화합물이 독성을 유발시키는 원인 물질로 알려져 있다. 중간대사체인 bromobenzene epoxide는 간장중의 epoxide hydrolase와 glutathione S-transferase에 의해 대사되어 3,4-dihydroxy benzene이나 mercapturic acid로 무독성화되어 배설되므로 解毒作用이 이루어진다.³⁹⁾

Bromobenzene에 의해 유발된 간손상에 미치는 蟻螞 추출물의 영향을 검토하기 위하여 蟻螞 추출물을 20일간 前처치한 후 bromobenzene으로 간독성을 유발시키고 대표적인 bromobenzene 解毒酵素인 epoxide hydrolase 및 glutathione S-transferase의 활성변화를 검토하였을 때 두 효소 모두 bromobenzene 독성유발군에서는 효소 활성이 현저히 저하되었으나 蟻螞 추출물을 前처치한 후 bromobenzene을 투여한 실험군은 효소 활성이 거의 정상수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

이러한 실험결과들은 蟻螞 추출물이 생체내에

서 bromobenzene의 대사를 촉진시켜 독성유발물질인 중간대사체의 체외 배설을 증진시키므로써 이 물질에 의한 독성을 경감시켜 줄 수 있을 것으로 생각할 수 있다. Bromobenzene에 의해 유발되는 독성기전은 아직까지 정확하게 규명되어 있지는 않지만 일반적으로 중간대사물질인 bromobenzene epoxide에 의해 세포막의 손상으로 나타나는 것으로 생각할 수 있다. 중간대사물질인 epoxide 화합물은 활성이 굉장히 강한 친전자성 화합물이므로 free radical을 발생시켜 세포막 독성을 나타낼수 있을 것으로 생각할 수 있다.

따라서 저자는 free radical에 의해 나타나는 bromobenzene의 간독성을 蟻螞 추출물이 어떻게 방어하는지를 검토하는 일환으로 free radical 분해 효소들인 superoxide dismutase,¹⁹⁾ catalase²¹⁾ 및 glutathione peroxidase²⁰⁾ 활성 변동에 미치는 영향을 검토코자 하였다. 실험동물에 蟻螞 추출물을 전처치한 후 bromobenzene을 투여하여 독성을 유발시키고 간조직 중의 superoxide dismutase 활성을 관찰하였을 때 bromobenzene에 의해 현저하게 억제되던 superoxide dismutase 활성이 蟻螞 추출물의 전처치에 의하여 정상수준으로 효소활성이 증가되는 현상을 알 수 있었다. 한편, 또 다른 분해 효소인 catalase와 glutathione peroxidase 활성도 superoxide dismutase의 경우와 마찬가지로 bromobenzene에 의해 억제되던 효소활성이 蟻螞 추출물 투여에 의하여 정상수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

이러한 결과들로 보아 蟻螞 추출물은 독성물질에 의해 억제된 생체내 기능을 정상적으로 개선시키는 효과가 있음을 입증할 수 있었으며 앞의 과산화지질 생성 억제현상과 free radical 분해 효소활성들을 정상화시키는 효과로 미루어 보아 free radical에 의한 간독성도 현저하게 개선시키는 항산화작용을 지니고 있음을 시사하고 있다.

외부에서 생체내로 유입된 독성물질들로 부터 생체를 보호하기 위하여 생체방어 메카니즘이 동원되게 되는데 이 때 가장 대표적인 방어기전으로서 glutathione을 들 수 있으며 이 화합물질은 3개의 아미노산으로 구성된 tripeptide로서 간장에서 주로 생합성이 이루어지며 생체 전반적으로 분포하고 있다.⁴⁰⁾ 따라서, 조직중의 glutathione 함량을 측정하므로써 독성물질에 대한 생체방어 능력을 간접적으로 측정할 수 있을 것이다. 간독성 유발물질인 bromobenzene을 투여하였을 때 현저하게 감소되던 glutathione 함량이 蟻螬 추출물 투여에 의해 정상수준으로 함량증가 현상을 나타내었다. 이는 蟻螬 추출물이 생체내에서 독성물질에 의한 생체방어물질의 파괴를 저해시켜서 나타나는 결과로 생각할 수 있다.

생체 외부의 독성인자에 의한 간기능손상을 측정하는 수많은 방법들이 있는데 그 중에서 간조직에 주로 분포하면서 간세포 손상시 혈액중으로 다량 유출되는 효소인 γ -glutamyl transpeptidase나 ALT 및 AST 활성¹⁾을 검토하여 간손상 정도를 예측할 수 있다. 蟻螬 추출물의 간기능 보호작용을 비교 검토하는 하나의 방법으로 혈액중의 상기 효소들의 활성을 관찰하였을 때 bromobenzene 독성유발 실험군에서 이러한 효소들의 활성이 현저하게 높게 나타났는데 이는 bromobenzene이 세포막에 손상을 입혀 막을 파괴시키므로써 세포질에 존재하던 이들 효소들이 혈액중으로 유출되므로 활성이 증가된 것으로 사료된다. 그러나, 蟻螬 추출물의 전처치에 의해서 이러한 효소활성의 증가현상이 저해되어 정상수준으로 조절되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 蟻螬 추출물이 bromobenzene에 의해 야기되는 간독성을 예방하여줌을 나타내는 실험성적이라고 생각할 수 있다.

이상의 모든 결과들을 종합하여 볼 때, 蟻螬 추출물은 생체내에서 독성물질인 bromobenzene에 의해 유도된 간독성을 예방하는 효과를 지니

고 있으며 그 작용기전은 bromobenzene 대사효소들의 활성을 증가시켜 독성물질의 체외배설을 촉진시키므로써 독성을 경감시켜 줄 수 있을 것으로 생각된다.

또한, bromobenzene이 대사과정중에 free radical을 유리시키는 점을 감안할 때 蟻螬 추출물이 free radical의 분해효소들의 활성을 조절하여 free radical에 의한 간세포막 손상도 예방시키는 작용기전에 의해 독성물질로 부터 간을 보호하는 작용을 나타낸 것으로 사료되며 앞으로 더 많은 연구를 시행하여 보다 구체적인 약리작용 기전을 규명하여야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

蟻螬 추출물의 간기능 보호작용을 관찰하기 위하여 실험 동물에 蟻螬 추출물을 前처치한 다음 bromobenzene으로 급성 독성을 유발한 후, 세포 손상의 지표인 과산화지질과 이와 관련된 parameter들을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시험관내에서 지질 과산화반응은 蟻螬 추출물의 첨가농도에 비례하여 생성이 억제되었으며, 인위적으로 Haber-Weiss 반응을 이용하여 활성산소의 생성을 촉진시킨 상태에서는 더욱 강력한 억제효과가 관찰되었다.

2. 과산화지질 함량은 bromobenzene에 의하여 현저히 증가되었으나 蟻螬 추출물의 前처치에 의해 정상군 수준으로 회복되었다.

3. Bromobenzene의 대사효소인 epoxide hydrolase와 glutathione S-transferase 활성은 bromobenzene에 의해서 억제되었으나 蟻螬 추출물 前처치에 의하여 정상군 수준으로 증가되었다.

4. Superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 활성은 bromobenzene에 의해서 현저하게 저하되었으나 蟻螬 추출물의 前처치에 의하여 정상군에 가깝게 회복되는 경향을 나타내었다.

5. Bromobenzene 투여에 의하여 현저하게 감소되던 glutathione 함량은 蟻螬 추출물의 前처치에 의해 유의성 있게 증가되었다.

6. 혈청중의 γ -GTP, ALT 및 AST 활성은 bromobenzene 투여에 의해 현저히 증가되었으나 蟻螬 추출물의 前처치에 의하여 정상수준으로 조절되었다.

이상의 모든 결과들을 종합하여 볼 때, 蟻螬 추출물은 bromobenzene 대사효소들의 활성을 증가시켜 독성물질의 체외배설을 촉진시키고, 또한 free radical의 분해계 효소들의 활성을 조절하여 간세포막 손상도 예방시키는 기전을 통하여 bromobenzene에 의해 유도된 독성물질로 부터 간을 보호하는 약리작용을 나타낸 것으로 사료되며 앞으로 더 많은 연구를 시행하여 구체적인 약리작용 기전을 규명하여야 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 肝系內科學教授 共著 : 肝系內科學, 東洋醫學研究院, p. 156, 164-176, 182, 214-217, 1992.
2. 顏德馨 編著 : 活血化癆療法臨床實踐 (增訂本), 雲南人民出版社, pp. 26-27, 1984.
3. 蘇敬等選 : 新修本草, 安蘇科學技術出版社, 安徽省, pp 417-418, 1981.
4. 蘇頌 : 圖經本草, 龐源出版公社, 福川, pp. 433-434, 1988.
5. 孫星衍 選 : 神農本草經, 自由出版社, 臺北, pp. 185-186, 1973.
6. 吳普 : 吳普本草, 人民衛生出版社, 北京, p. 72, 1987.
7. 王好古 : 湯液本草, 人民衛生出版社, 北京, pp. 189-190, 1987.
8. 李尙仁 : 本草學, 修書院, 서울, p 471, 1981.
9. 李時珍 : 本草綱目, 高文社, 서울, p. 1300, 1975.
10. 동의과학원 : 동의보감부록 가정한방대전, 여강출판사, p.732, 1994.
11. 洪淳用 等 : 四象醫學原論, 杏林出版社, p.356, 1994.
12. 文成煥 外 : 血栓症에 미치는 蟻螬의 效能에 關한 實驗的 研究, 慶熙醫學, 8(2):177-181, 1992.
13. 安圭錫 : 蚯蚓, 水蛭, 蟻螬 및 蜈蚣이 血栓症에 미치는 影響, 大韓韓醫學學會誌, 11(2):92-101, 1990.
14. 홍시내 : 蟻螬의 血栓 溶解 酵素 分離 및 그 特性에 關한 研究, 東國大學校 大學院 碩士學位 論文, 1996.
15. Batteli, N. G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. : Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase) : Purification and interconversion and some properties. *Biochem. J.*, 131:191-198, 1973.
16. Floyd R. A. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4:2587-2597, 1990.
17. Harman, D : Free radical theory of aging ; Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. *Free Radicals, Aging and Degenerative Disease* (ed. Johnson, J.E. et al.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp.3-49, 1986.

18. 서울대학교 의과대학 내과학교실 편저 : 1996 최신지견 내과학, 군자출판사, p.467, 1996.
19. McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyuprein(hemocuprein). J. Biol. Chem., 244: 6049-6055, 1967.
20. Little, C. and O'Brien, P. J. : Anintracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. Biochem. Phys. Res. Comm., 31: 145-150, 1968.
21. Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on the hematoxylin autooxidation. Arch. Biochem. Biophys., 255: 329-336, 1987.
22. Parks, D. A. and Granger, D. N. : Xanthine oxidase : biochemistry, distribution and physiology. *Acta. Physiol. Scand Suppl.*, 548: 87-99, 1986.
23. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G. and Engel, P. C. : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoprotein with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36:891-897, 1969.
24. Poulas, T. L. and Raag, R. : Cytochrome P450 cam : Crystallography, oxygen activation and electron transfer. *FASEB J.*, 6: 674-679, 1992.
25. Huh, K., Jang, B. S. and Park, J. M. : Protective effect of ginseng on bromobenzene-induced hepatotoxicity in mice. *Korean J. Ginseng Sci.*, 12(2): 114-120, 1988.
26. Hammcock, B. D. and Hasegawa, L. S. : Spectrophotometric assay for mammalian cytosolic epoxide hydrolase using trans-stilbene oxide as the substrate. *Biochem. Pharmacol.*, 31(11): 1979-1984, 1982.
27. Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase. : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139, 1974.
28. Aebi, H. : La Catalase erythrocytaire, in : *Exposes Annuels de Biochimie Medicale*, 29 ieme serie, Masson & Cie (eds), Paris pp. 139-164, 1969.
29. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin.Med.*, 70: 158-169, 1967.
30. Divon, D. M. : Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in disease of the liver and gallbladder(except infectious jaundice). *Vnitr. Lrk.*, 15(4) : 347-353, 1969.
31. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28: 58-63, 1957.
32. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-358, 1979.
33. Milan, L., Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladislav, V. : *Free radicals in chemistry and biology*, CRC Press, pp 29-31, 283-283, 1989.
34. Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group.

- Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77, 1959.
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
36. 申佶求 : 申氏本草學, 壽文社, 서울, pp.568-569, 1979
37. 辛民教 : 臨床本草學, 永林出版社, 서울, p.482, 1988.
38. Pryor, W. A., Stanley, T. P. and Blair, E. : Autoxidation of polyunsaturated fatty acids(II), *Lipids*, 11: 370-379, 1976.
39. Hayes, A. W. : Principles and methods of toxicology. 3rd Ed, * Raven press, pp.59-100, 1994.
40. Higashi, T., Tateishi, N. and Sakamoto, Y. : Liver glutathione as a reservoir of L-cystein. In Sulfer amino acids : Biochemical and Clinical Aspects, Alan R. Liss press, pp. 397-410, 1983.