

사염화탄소에 의해 유발된 간독성에 대한 상백피 추출물의 간보호효과

김선여[#] · 이희삼 · 류강선 · 이은주* · 김영중*

농업과학기술원 잠사곤충부, * 서울대학교 약학대학

(Received March 22, 1999)

Protective Effects Of Extracts of Mori Cortex Radicis on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity

Sun Yeou Kim, Heui Sam Lee, Kang Sun Ryu, Eun Ju Lee* and Young Choong Kim*

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture
Science and Technology, RDA, Suwon, 441-100, Korea

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstracts — In order to evaluate the protective effects of extracts of Mori cortex radicis on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, lactic dehydrogenase, malondialdehyde values and glutathione S-transferase activity were measured in ICR mice. The activities of serum aminotransferase and the hepatic content of lipid peroxide after carbon tetrachloride-treatment were markedly increased than normal control but those levels were significantly decreased by the treatment of butanol fraction of Mori cortex radicis methanol extract. Glutathione S-transferase activity was decreased by carbon tetrachloride than control, but that also inhibited by the treatment of butanol fraction of Mori cortex radicis methanol extract. These results demonstrate a possible hepatoprotective role of extracts of Mori cortex radicis against CCl₄-induced hepatotoxicity *in vivo*.

Keywords □ GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT((glutamic pyruvic transaminase), MDA(malondialdehyde), Lipid peroxidaton, Mori cortex radicis.

상백피(桑白皮)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 뽕나무의 뿌리껍질로 한국에서 널리 자생하고 있다.¹⁾ 상백피는 예로부터 항알러지, 항염증 및 이뇨촉진 효과가 있는 것으로 알려져 왔다.²⁾ 특히 상백피의 극성분획물은 해열, 항경련, 이뇨촉진 등의 작용이 있고, 또한 혈당강하 물질로는 moran가 보고된바 있고,³⁾ mulberofuran과 같은 phenylpropanoid류 화합물은 혈압강하 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 상백피추출물은 강력한 항산화 작용을 갖고 있는 것으로도 알려져 있어 식품 및 화장품용으로 대량 이용되고 있으며 현재 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁶⁾ 최근 산화적 스트레스에 의한 질병 유발이 증가되면서 간질환보호제

탐색과정에서 항산화 작용을 갖는 물질을 찾는 경우가 있다.⁷⁾ 본 연구에서는 사염화탄소에 의하여 유발되는 지질과산화에 의한 간독성에 미치는 상백피추출물의 영향을 알아보기 위하여, 일차적으로 사염화탄소로 독성을 입힌 일차배양 간세포를 이용하여 간보호작용을 검색하였다. 또한 일차배양 간세포에서 상백피 추출물 중 butanol분획물이 유의성 있는 간세포보호 효과를 나타냈기 때문에, 사염화탄소를 처리함으로써 간독성이 유발된 생쥐를 이용하여 상백피 butanol 분획물의 간보호 작용을 silymarin을 대조로 하여 검색하였다.

실험방법

시약 및 재료 - 세포배양용 및 활성 검색용 시약은 모두 Sigma사에서 구입하였고 horse serum과 fetal

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-8463 (팩스) 0331-290-8420

bovine serum은 Hyclone(Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였다. 또한 사염화탄소, olive oil 및 기타시약은 Junsei chemicals사에서 구입하였고, GOT, GPT 및 LDH측정용 kit는 영동제약사에서 구입하였다.

실험동물 - 실험용 동물은 체중 22 ± 3 g 정도의 웅성 ICR계 생쥐를 사용하였다. 10 마리씩을 1군으로 각각 무작위로 나누어 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 50~60%로 유지되는 실험동물 사육실에서 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하여 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 세포배양용 흰쥐는 체중 200 ± 6 g 정도의 웅성 Wistar 흰쥐만을 사용하였다.

상백피 추출 및 분획 - 건조된 상백피 1 kg을 85% 메탄올 3 l를 가하여 1시간 동안 초음파추출을 3회 실시한 후 여과하고 감압농축하여 추출물 187 g을 얻었다. 이를 극성에 따라 분획하여 hexane 분획물 2 g, CH_2Cl_2 분획물 13 g, butanol 분획물 11 g 및 H_2O 분획물 152 g을 얻었다.

투여방법 - ICR 수컷 생쥐에 olive oil만을 투여하여 정상대조군으로 하였고, 사염화탄소를 olive oil에 희석하여 체중 kg당 50 mg 용량이 되도록 복강투여하여 간독성 유발군으로 하였다. 약물투여는 20, 200 mg/kg의 상백피 butanol 분획물과 2 mg/kg의 silymarin을 각각 olive oil에 현탁시켜 조제한 다음, 사염화탄소 투여 30분 후에 약물을 경구 투여하였다. 사염화탄소 투여 24시간 후에 채혈한 후 간을 적출하였다.

간중량/체중 측정 - 생쥐의 체중을 측정한 다음 간의 중량을 측정하여 간중량/체중(g/g)의 비를 산출하였다.

간의 조직화학적 관찰 - 간을 적출하여 10% 중성 포르말린으로 고정시킨 후 헤마톡실린-에오신 용액으로 염색하여 조직병리화학적 방법으로 간조직을 관찰하였다.

혈청중 GOT, GPT, LDH 활성 측정 - 안와정맥에서 채혈한 혈액을 4°C 에서 30분 방치한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 영동제약 kit를 사용하여 혈청중의 GOT, GPT 및 LDH활성을 Rei-tman-Frankel의 방법⁸⁾에 의하여 측정하였다.

과산화지질 측정 - 채혈 후 간을 적출하여 0.9% saline에 세척하고 -70°C 에서 24시간 보관한 다음 homogenizer로 균질화시키고 9000g에서 30분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 post mitochondrial supernatant에서 과산화 생성물인 malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid법에 의하여 측정하였다. 지질의 과

산화 정도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane를 표준물질로 하여 측정하였다.⁹⁾

Glutathione-S-transferase 활성 측정 - 간을 66 mM Tris buffer(pH 7.4)를 가하여 균질화시킨 다음 12,500 g에서 15분간 원심분리하였다. $50 \mu\text{l}$ glutathione(30 mM), $50 \mu\text{l}$ 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (30 mM) 및 $500 \mu\text{l}$ potassium phosphate buffer (pH 7.4)가 담긴 시험관에 $600 \mu\text{l}$ post mitochondrial 상등액을 가하여 혼합한 후 즉시, 340 nm에서 흡광도의 변화를 2분 동안 측정하여 $\Delta\text{E}/\text{min}$ 를 계산하였다.¹⁰⁾

단백질함량 측정 - 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry방법으로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.¹¹⁾

일차배양 간세포를 이용한 상백피 추출물의 간세포 보호효과 - Berry와 Friend의 방법을 약간 수정한 collagenase 관류법으로 간세포를 분리하여 배양하였다.¹²⁾ 일차배양한 흰쥐의 간세포를 24시간 동안 배양한 후 CCl_4 10 mM 처리하여 인위적인 독성을 유발하고 일정농도의 각 검액을 처리하였다.¹³⁾ 그리고 배양액으로 유리된 glutamic pyruvic transaminase의 활성은 kit를 사용하여 측정하였다.

통계처리 - 통계적 유의성을 검토하기 위하여 대조치로부터의 변동을 "Anova" test에 의해 판정하였다. P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

사염화탄소에 의해 유도된 간독성회복에 상백피추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 일차적으로 흰쥐의 간으로부터 직접 분리한 간세포를 24시간 동안 배양하였다. 그리고 사염화탄소 10 mM로 독성을 유발시키면서 상백피추출물을 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 동시에 첨가한 후 1.5시간 더 배양하였다. 이후 간독성회복 정도를 알아보기 위하여 배양액으로 유리되는 GPT활성을 측정하였다. 일차배양한 흰쥐의 간세포를 사염화탄소로 독성을 유발시키면 거의 모든 세포가 괴사를 일으키나, 상백피추출물을 동시에 첨가한 경우에는 간세포 괴사가 덜 되었음을 현미경으로 관찰할 수 있었다.

사염화탄소 처리로 인하여 간세포가 독성을 입게 되면, GPT효소가 배양액으로 유리되어 그 수치가 $147.2 \pm 3.8(\text{U}/\text{ml serum})$ 으로 증가되었다. $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의

Table I — Effects of extracts of Mori cortex radiceis on glutamic-pyruvic transaminase activity on CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes

CCl ₄	Treatment Test materials	µg/ml	GPT (U/ml serum)
0	Control	0	0029.1 ± 2.5(100) ¹⁾
10	Reference	0	147.2 ± 3.8(0)
10	Total MeOH extract	50	111.0 ± 0.8(31)
10	Hexane fraction	50	131.3 ± 0.3(14)
10	CH ₂ Cl ₂ fraction	50	128.7 ± 1.5(16)
10	BuOH fraction	50	0087.2 ± 3.8(51)*
10	H ₂ O fraction	50	159.5 ± 0.5(-)

The activity of GPT in the medium was determined. Values represent mean ± S.D.(n=4). Control is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. ¹⁾The values in parenthesis are relative percents. The % of protection is calculated as 100 × (value of reference-value of sample)/(value of reference-value of control). *Significantly different from positive control at p<0.05.

상백피메탄올 추출물을 처리할 때에는 GPT치가 111.0 ± 0.8(U/ml serum)로 감소되어, 상백피메탄올 추출물은 30%의 간세포 회복효과를 나타냄을 알 수 있었다 (Table I).

또한 상백피메탄올 추출물을 극성에 따라 hexane, CH₂Cl₂, butanol 및 H₂O와 같은 유기용매로 분획한 후, 각각의 분획물을 50 µg/ml의 농도로 처리하여 간세포 보호활성을 검색하였다. 그 결과 butanol 분획물 처리군이 유의적으로 GPT치를 감소시킴으로써 간세포보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table I).

이러한 일차배양 간세포에서의 상백피 butanol 분획물의 간보호효과를 생체실험에서도 그대로 반영되는지를 구명하기 위하여, 사염화탄소로 간손상이 유도된 생쥐에 상백피 butanol 분획물을 처리하였다. 이 후 체중당 간중량비, 혈청중의 GPT, GOT, LDH, malondialdehyde 함량 및 glutathione S-transferase활성을 측정하였고, 더불어 병리조직검사를 수행하였다.

사염화탄소를 투여함으로써 발생하는 간의 비정상적

Table II — Effects of butanol fraction of Mori cortex radiceis extract on liver weight/body weight in mice treated with carbon tetrachloride

CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Treatment Test materials	(mg/kg, p.o.)	Liver weight/Body weight (g/g)
0	Control	0	0.057 ± 0.004(100) ¹⁾
50	Reference	0	0.061 ± 0.001(0)
50	Silymarin	2	0.060 ± 0.005(25)
50	BuOH fraction	20	0.058 ± 0.005(75)**
50	BuOH fraction	200	0.057 ± 0.004(100)***

Values represent mean ± S.D. of 10 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30 min after injection of the CCl₄. ¹⁾The values in parenthesis are relative percents. *Significantly different from positive control at p<0.05.

인 지방축적에 상백피 butanol 분획물이 어떻게 작용하는지를 알아보기 위하여, 생쥐 체중당 간의 중량비를 측정하였다. 생쥐에 사염화탄소를 처리하여 간독성을 유발시키면, 지방이 간에 비정상적으로 축적되어 간이 비대해지고 나아가서는 괴사를 일으킨다고 알려져 있다.^{14,15)} 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되는 경우 정상군에 비하여 체중당 간중량비가 10% 정도 증가되었으나 상백피 butanol분획물을 200 mg/kg의 농도로 투여하는 경우 정상 수준으로 체중당 간중량비가 감소하였다. 이러한 결과로 볼 때 상백피의 butanol분획물은 사염화탄소에 의한 지방간 형성을 억제시켜 간이 비대해지는 것을 막아준다고 할 수 있겠다.

CCl₄는 cytochrome P-450에 의해 독성이 강한 대사물이 되어 결국 간세포의 지질과산화물을 일으키고 중심정맥 주위에 지방변성 및 괴사를 일으킨다. 이러한 대사물이 간 microsomes의 막단백 thiol과 강하게 결합하여 막의 지질과산화 반응을 촉진하여 장애를 일으킴으로써, 단백질 합성 억제, 혈중으로 GOT, GPT 및 LDH 등을 유리시키는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾

Table III — Effects of butanol fraction of Mori cortex radiceis extract on serum glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic dehydrogenase activities in mice treated with carbon tetrachloride

CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Treatment Test materials	(mg/kg, p.o.)	Enzymes activities (U/ml serum, %)		
			sGOT	sGPT	sLDH
0	Control	0	47.0 ± 9.6 (100) ¹⁾	17.9 ± 3.4 (100) ¹⁾	1605 ± 48 (100) ¹⁾
50	Reference	0	166.1 ± 33.0(0)	57.4 ± 14.4(0)	2617 ± 14 (0)
50	Silymarin	2	69.2 ± 14.1(81)**	28.3 ± 3.7 (74)*	2241 ± 201(37)
50	BuOH fraction	20	101.0 ± 8.5 (55)*	49.5 ± 11.7(2)	2375 ± 149(23)
50	BuOH fraction	200	72.6 ± 12.1(78)**	38.6 ± 9.4 (8)	2073 ± 64 (54)*

Values represent mean ± S.D. of 10 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30 min after injection of the CCl₄. ¹⁾The values in parenthesis are relative percents. *Significantly different from positive control at p<0.05.

CCl₄를 복강투여함으로써 증가된 혈청 GPT, GOT 및 LDH의 활성은, 상백피 butanol 분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg으로 경구투여 하였을 때 유의적으로 감소하였다(Table III).

즉 정상상태 때의 GPT치는 47.0±9.6 U/ml serum 인데 비하여 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되면 혈중 GPT치가 166.1±33.0 U/ml serum으로 증가되었다. 상백피 butanol 분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg로 각각 투여할 때 GPT치가 101.0±8.5 U/ml serum와 72.6±12.1 U/ml serum로 감소하였다. 또한 사염화탄소 투여로 증가된 GOT치는 상백피 butanol 분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg로 각각 투여할 때 GOT치가 17.9±3.4 U/ml serum와 57.4±14.4 U/ml serum로 감소하였다. LDH치는 사염화탄소 투여로 정상군(1605±48 U/ml serum)에 비하여 2617±14.0 U/ml serum로 증가되었다. 상백피 butanol 분획물 20 mg/kg과 200 mg/kg으로 각각 투여할 때 LDH치가 2073±64 U/ml serum로 감소하였다. 이로부터 상백피 butanol분획물이 silymarin 보다 LDH치 저하효과가 다소 높음을 알 수 있었다.

상백피 butanol 분획물과 silymarin 투여에 의한 CCl₄유도 MDA생성 억제에 미치는 영향은 Table IV에 나타났다. 즉 사염화탄소 투여로 증가되는 지질과산화물 생성에 미치는 상백피 butanol 분획물의 억제효과를 알아보기 위하여, 사염화탄소로 간독성이 유발된 생쥐 간에서 malondialdehyde양을 측정하였다.

사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되면 정상 쥐에 비하여 malondialdehyde 함량이 약 3배가 증가됨을 알 수 있었다. 즉 사염화탄소 투여로 증가된 MDA함량은 6.9±0.1 μmole/g of tissue이었고, 상백피 butanol분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg농도로 각각 투여할 때 MDA치가 5.2±0.1 μmole/g of tissue과 4.2

±0.1 μmole/g of tissue로 감소하였다. 이러한 상백피 butanol 분획물의 지질과산화 억제효과는 2 mg/kg 농도로 silymarin을 투여한 경우보다는 22% 정도 미약하였다. 간에 존재하는 glutathione S-transferase 효소는 다양한 독성화합물을 해독시킴으로써, 독성물질에 의한 간의 손상을 막아주는 간보호 작용에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

간의 해독작용에 미치는 상백피 butanol 분획물의 효과를 알아보기 위하여 glutathione S-transferase의 활성을 측정하였다. 사염화탄소로 인하여 간독성이 유발될 경우 glutathione S-transferase 활성이 정상군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 상백피 butanol 분획물을 20 mg/kg의 농도로 처리하는 경우는 glutathione S-transferase 활성에 영향을 미치지 않았으나, 상백피 butanol 분획물을 200 mg/kg농도로 투여한 경우는 glutathione S-transferase의 활성이 정상군의 63% 수준으로 유의성 있게 증가되었다(Table IV).

상백피 butanol 분획물을 투여함으로써 나타나는 간보호 효과를 간의 병리·조직학적 측면에서 관찰하기 위하여, 간조직을 H&E 염색을 하여 현미경적 관찰을 하였다. 정상쥐의 간조직에서는 특별한 병변을 관찰할 수 없었으나(Fig. 1), 사염화탄소에 의한 간독성이 유발되면 간세포가 괴사됨을 알 수 있었고, 특히 중심정맥 오른쪽에 염증세포가 증가됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 상백피 butanol 분획물 투여군은 중심정맥쪽에 아주 경미한 허혈성 변성 이외에는 다른 병변을 찾을 수 없었다(Fig. 3).

이와 같이 상백피 butanol 분획물 투여군은 사염화탄소로 생쥐에 간독성을 유발시켰을 때 뚜렷한 간보호 활성을 나타냄을 간조직검사로 밝힐 수 있었다. 또한 사염화탄소로 간독성이 유발되었을 때 간독성지표가 되는 여러 효소의 저하된 활성을 유의성 있게 회복시

Table IV — Effects of butanol fraction of Mori cortex radices extract on lipid peroxide contents and glutathione S-transferase activity in mice treated with carbon tetrachloride

CCl ₄ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	Treatment Test materials (mg/kg, <i>p.o.</i>)	MDA (μmole/g of tissue)	GST(nmole/mg protein/min)	
0	Control	0	2.4 ± 0.2(100)	237 ± 5(100)
50	Reference	0	6.9 ± 0.1(0)	104 ± 1(0)
50	Silymarin	2	3.3 ± 0.3(82)**	159 ± 4(41)
50	BuOH fraction	20	5.2 ± 0.1(38)	95 ± 5(-)
50	BuOH fraction	200	4.2 ± 0.1(60)*	188 ± 2(63)*

Values represent mean ± S.D. of mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30 min after injection of the CCl₄. ¹⁾ The values in parenthesis are relative percents. *Significantly different from positive control at *p*<0.05.

문 헌

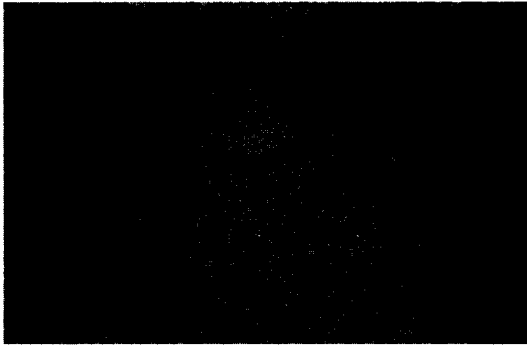


Fig. 1 - Liver tissue of normal mice. It shows congestion of central veins (H & E stain, X 100).



Fig. 2 - Liver tissue of CCl₄-intoxicated mice. It shows marked fatty change and slight necrosis of hepatic cell around centrilobular area. Inflammatory cells infiltration are remarked (H & E stain, X 100).

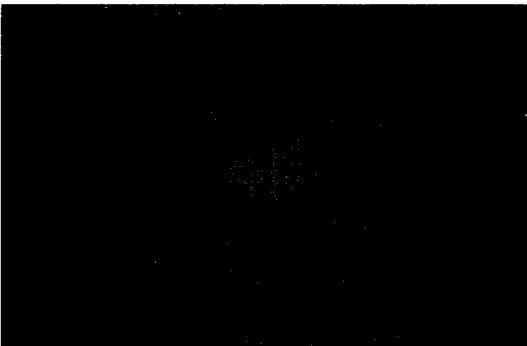


Fig. 3 - Liver tissue of mice which were treated with Mori cortex radice extract orally at 30 min after injection of the CCl₄. Slight hepatocellular fatty changes around the centrilobular area are remained, but all of pathologic are improved (H & E stain, X 100).

- 1) 한대석 외 : 생약학, 동명사, 서울, p 118 (1991).
- 2) 한국 생약학 교수협의회 : 본초학, 대한약사회, 서울, p 614 (1994).
- 3) Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y. and Konno, C. : Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root barks. *Plant med.* **51**, 159 (1985).
- 4) Nomura, T. and Fukai, T. : Kuwanon G, a new flavone derivatives from the root barks of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.). *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2548 (1980).
- 5) Fukai, T., Hanno, Y., Hirakura, K., Nomura, T. and Uzawa, J. : Constituents of the cultivated mulberry tree. XXV. Structures of two natural hypotensive Diels-Alder type adducts, mulberrofurans F and G from the cultivated mulberry tree (*Morus Lhou Koidz*). *Chem. Phar. Bull.* **33**, 3195 (1985).
- 6) 池田孝夫, 提龍彦 : 生藥의 機能과 美白效果 フレグランスジャーナル **6**, 59 (1990).
- 7) Mora, A., Paya, M., Rios, J. L. and Alcaraz, M. J. : Structure-activity relationships of polymethoxy-flavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharm.* **40**, 793 (1990).
- 8) Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clinic. Pathol.* **28**, 56 (1957).
- 9) Logani, M. K. and Davis, R. E. : Lipid peroxidation, *Lipids.* **15**, 485 (1979).
- 10) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130 (1974).
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 12) Berry, M. N., Edward, A. M. and Barritt, G. J. : Laboratory technique in biochemistry and molecular biology., Burdon, ed, Elsevier, New York, 21, p15 (1991).
- 13) Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. : Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured

김으로써 상백피추출물은 뚜렷한 간보호 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

- hepatocytes. *Planta med.* **49**, 222 (1983).
- 14) Recknigel, R. O. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145 (1967).
- 15) Maynard, E. H., Bitterns, S. and James, R. G. : Effect of 3-methylchloroanthrene induction on the CCl₄-induced changes in rat hepatic microsomal enzyme system. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 745 (1971).
- 16) Groot, H. and Noll, T., The crucial role of oxygen partial pressures in haloalkane free radical mediated lipid peroxidation. *Biochem. pharmacol.* **35**, 15 (1986).
- 17) Naei, K., Tak, Y. A. and Murad, O. : The regulation as hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 715 (1985).