

사염화탄소에 의해 유발된 생쥐의 간독성에 미치는 누에 추출물의 영향

류강선[†] · 이희삼 · 김선여*

농업과학기술원 잠사곤충부

*경희대학교 동서의학 대학원

Effects of *Bombyx mori* Larvae Extracts on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice

Kang-Sun Ryu[†], Heui-Sam Lee and Sun-Yeou Kim

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

*Graduate School of East-West Medical College, Kyunghee University Seoul 130-701, Korea

Abstract

To evaluate the protective effects of extracts of silkworm on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, serum glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic dehydrogenase activities, malondialdehydes values and glutathione-S-transferase activity were measured in ICR mice. Extracts of silkworm was administered orally at 30min after the administration of CCl₄. Mice were sacrificed at 24h after the administration of extracts of silkworm. 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 decreased by the treatment of butanol soluble fraction of silkworm methanol extract. Glutathione S-transferase activity was decreased by carbontetrachloride than control, but also inhibited by the treatment of butanol soluble fraction of silkworm methanol extract.

Key words – Glutamic oxaloacetic transaminase, Glutamic pyruvic transaminase, Malondialdehyde, Lipid peroxidation, Silkworm, Hepatotoxicity

서 론

누에는 곤충강, 인시목에 속하는 곤충으로 야잠(들누에: *Bombyx mandarina*)과 구분하여 가잠(집누에: *Bombyx mori*)이라고도 부른다. 누에는 완전탈바꿈하는 곤충으로서 그 1세대는 누에알, 유충, 번데기 및 나방(성충)의 네 시기를 경과하며 누에는 알로서 월동한다. 이는 인간에게 silk를 제공함으로써 섬유산업에 이용되어 온 산업 곤충으로 알

려져 있고, 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)와 함께 다양한 유전적, 생리적 및 육종학적인 연구가 많이 이루어졌고 현재까지 약 400여 종류 이상의 형태적 돌연변이가 알려져 있다[4]. 또한 누에는 비단용 이외에도 산간지역 농민들이 영양실조증이나 폐결핵에 그 유충을 민간약으로 이용하였고 풍사, 익정, 중풍 및 뱃병 등에도 많이 이용하였다[15]. 최근 곤충의 생물소재 산업화 연구의 일환으로 누에의 유충을 이용하여 생리활성을 검색하고 그 작용 물질을

[†] Corresponding author

분리하는 연구가 수행되고 있다[17]. 동의보감을 비롯한 동양의약서에는 누에 번데기와 누에고치가 소갈증에 효과가 있다고 기록되어 있는데, 권 등은 家窠에 alloxan을 투여하여 당뇨병을 유발시킨 후 혈당량에 미치는 영향을 실험한 결과 혈중 인슐린 함량을 증가시킴으로써 혈당량을 감소시키는 결과를 얻었다[6]. 그리고 류 등은 누에분말의 제조 조건 중, 5령3일 때에 냉동건조 시킨 누에가 가장 혈당강하 효과가 높다고 보고하였고, 이러한 작용은 소장의 당분해효소 억제작용에 기인한다고 보고하였다[16]. 또한 최근에는 누에의 분변인 잠분으로부터 세포독성 물질을 분리하여 항암치료제로의 응용에 관한 연구를 수행중에 있다[11-14]. 이렇듯 누에 및 누에관련 산물의 생리활성이 점차 밝혀지고 누에가 민간에서 이용할 수 있는 식품으로 인정됨에 따라 누에를 복용하는 사람이 증가하고 있다. 따라서 누에의 장기간 복용에 따른 간기능에 미치는 영향에 대한 연구의 필요성이 점차 높아지고 있다.

본 연구에서는 사염화탄소에 의하여 유발되는 간독성에 미치는 누에 추출물의 영향을 알아보기 위하여, 일차적으로 사염화탄소로 독성을 입힌 일차배양 간세포를 이용하여 간보호작용을 검색하였다. 또한 일차배양 간세포에서 누에 추출물의 각 분획물 중 BuOH 분획물이 가장 높은 간세포보호 효과를 나타냈기 때문에, 사염화탄소를 처리함으로써 간독성이 유발된 생쥐를 이용하여 누에 BuOH 분획물의 간에 미치는 작용을 Silymarin을 대조로 하여 검색하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

세포배양용 및 활성 검색용 시약은 모두 Sigma사에서 구입하였고, horse serum과 fetal bovine serum은 Hyclone (Logan, UT., USA)의 제품을 사용하였다. 또한 사염화탄소, olive oil 및 기타 시약은 Junsei chemicals사에서 구입하였고, GOT, GPT 및 LDH측정용 kit는 영동제약사에서 구입하였다.

실험동물

실험용 동물은 체중 22 ± 3 g 정도의 음성 ICR계 생쥐를 사용하였다. 10마리씩을 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 음성 Wistar 흰쥐만을 사용하였다.

누에 추출 및 분획

냉동건조된 누에 1 kg을 85% 메탄올 3 l를 가하여 1시간 동안 초음파추출을 3회 실시한 후 여과하고 감압농축하여 추출물 153 g을 얻었다. 이를 극성에 따라 분획하여 Hexane 분획물 20 g, CH_2Cl_2 분획물 23 g, BuOH 분획물 35 g 및 물분획물 75 g을 얻었다.

투여 방법

ICR 수컷 생쥐에 olive oil만을 투여하여 정상대조군으로 하였고, 사염화탄소를 olive oil에 희석하여 체중 kg당 50 mg 용량이 되도록 복강투여하여 간독성 유발군으로 하였다. 약물 투여는 20, 200 mg/kg의 누에 추출물 중의 BuOH 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 조직학적인 관찰

간을 적출하여 10% 중성 포르말린으로 고정시킨 후 헤마톡실린-에오신용액으로 염색하여 조직병리학적인 방법으로 간조직을 관찰하였다.

혈청 중 GPT, GOT, LDH 활성측정

안와정맥에서 채혈한 혈액을 4°C 에서 30분 방치한 후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 영동제약 kit를 사용하여 혈청 중의 GOT, GPT 및 LDH활성을 Reitman-Frankel의 방법[13]에 의하여 측정하였다.

과산화지질 측정

채혈 후 간을 적출하여 0.9% saline에 세척하고 -70°C 에

서 24시간 보관한 다음 homogenizer로 균질화시키고 9000 g에서 30분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 post mitochondrial supernatant에서 과산화 생성물인 malondialdehyde (MDA)를 thiobarbituric acid법에 의하여 측정하였다. 지질의 과산화정도는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane를 표준물질로 하여 측정하였다[7].

Glutathione-S-transferase 활성측정

간을 66 mM Tris buffer(pH 7.4)를 가하여 균질화시킨 다음 12,500 g에서 15분간 원심분리하였다. 50 µl glutathione (30 mM), 50 µl 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(30 mM) 및 500 µl potassium phosphate buffer(pH 7.4)가 담긴 시험관에 600 µl post mitochondrial 상등액을 가하여 혼합한 후, 340 nm에서 즉시 흡광도의 변화를 2분 동안 측정하여 ΔE/min를 계산하였다[3].

단백질함량 측정

단백질 양은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry방법으로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다[8]

일차배양 간세포에서의 누에 추출물의 간보호효과

Berry와 Friend의 방법을 약간 수정한 collagenase 관류법으로 간세포를 분리하여 배양하였다[1]. 일차배양한 흰쥐의 간세포를 24시간 동안 배양한 후 CCl₄ 10 mM 처리하여 인위적인 독성을 유발하고 일정농도의 각 검액을 처리하였다[5]. 그리고 배양액으로 유리된 glutamic pyruvic transaminase의 활성은 kit를 사용하여 측정하였다.

통계처리

분석결과의 통계는 실험군 당 평균치와 표준오차로 계산하였고 군간의 차이는 Anova test를 이용하였다.

결과 및 고찰

사염화탄소에 의해 유도된 간독성에 누에의 메탄올 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여, 일차적으로 흰쥐의 간으로부터 직접 분리한 간세포를 24시간 동안 배양하였다. 그리고 사염화탄소 10 mM로 독성을 유발시키면서

누에의 메탄올 추출물을 50 µg/ml의 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, 누에 추출물을 동시에 첨가한 경우에는 간세포괴사가 덜 되었음을 현미경으로 관찰할 수 있었다.

사염화탄소 처리로 인하여 간세포가 독성을 입게 되면, GPT효소가 배양액으로 유리되어 그 수치가 147.2±3.8 (IU/L serum)으로 증가되었다. 누에의 메탄올 추출물을 50 µg/ml 농도로 처리할 때에는 GPT치가 106.9±3.2(IU/L serum)로 감소되어, 누에의 메탄올 추출물은 34%의 간세포 회복효과를 나타냄을 알 수 있었다(Table 1).

또한 누에메탄올 추출물을 극성에 따라 Hexane, CH₂Cl₂, BuOH 및 H₂O와 같은 유기용매로 분획한 후, 각각의 분획물을 50 µg/ml의 농도로 처리하여 간세포 보호활성을 검색하였다. 그 결과 Hexane분획물은 효과가 없었고, CH₂Cl₂, BuOH 및 H₂O 분획물은 GPT치를 감소시킴으로써 각각 36%, 43% 및 35% 간세포보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었고 유의성은 없었지만 BuOH분획물이 가장 높은 활성을 나타냈다(Table 1).

Table 1. Effects of MeOH extracts and its various fractions of *Bombyx mori* larvae on glutamic-pyruvic transaminase activity on CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes

CCl ₄	Treatment Test materials	Dose (µg/ml)	GPT (IU/L serum) (%)
0	Control	0	29.1 ± 2.5(100)
10	Reference	0	147.2 ± 3.8(0)
10	Total MeOH extract	50	106.9 ± 3.2(34)
10	Hexane fraction	50	170.3 ± 0.3(-)
10	CH ₂ Cl ₂ fraction	50	104.9 ± 4.2(36)
10	BuOH fraction	50	96.9 ± 0.5(43)
10	H ₂ O fraction	50	106.2 ± 0.9(35)

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. Reference is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. 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.

이러한 일차배양 간세포에서의 누에 BuOH 분획물의 간보호효과를 생체실험에서도 그대로 반영되는지를 구명하기 위하여, 사염화탄소로 간손상이 유도된 생쥐에 누에 BuOH 분획물을 처리하였다. 이후 체중당 간중량비, 혈청 중의 GPT, GOT, LDH, malondialdehyde 함량 및 glutathione S-transferase 활성을 측정하였고, 더불어 병리조직 검사를 수행하였다.

사염화탄소를 투여함으로써 발생하는 간의 비정상적인 지방축적에 누에 BuOH 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[9,12]. 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되는 경우 정상군에 비하여 체중당 간 중량비가 10% 정도 증가되었으나, 누에 BuOH 분획물을 200 mg/kg의 농도로 투여하는 경우 정상 수준의 50% 수준으로 체중당 간중량비가 감소하였다. 이러한 결과로 볼 때 누에의 BuOH 분획물은 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 thiol와 강하게 결합하여 막의 지질과산화 반응을 촉진하여 장애를 일으킴으로써 단백질 합성 억제, 혈중으로 GOT, GPT 및 LDH 등을 유리시키는 것으로 알려져 있다[2].

CCl₄를 복강투여함으로써 증가된 혈청 GPT, GOT 및 LDH의 활성은, 누에 BuOH 분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg으로 경구투여하였을 때 유의적으로 감소하였다(Table 3).

즉 정상상태 때의 GOT치는 47.0±9.6 IU/L인데 비하여 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되면 혈중 GOT치가 166.1±33.0 IU/L으로 증가되었다. 누에 BuOH 분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg로 각각 투여할 때 GOT치가 89.4±14.6 IU/L과 83.4±21.8 IU/L로 감소하였다. 또한 사염화탄소 투여로 증가된 GPT치는 누에 BuOH 분획물을 20 mg/kg과 200 mg/kg로 각각 투여할 때 GPT치가 45.7±16.2 IU/L과 44.9±6.2 IU/L로 감소하였다. LDH치는 사염화탄소 투여로 정상군(1605±48 U/L)에 비하여 2617±14.0 U/L로 증가되었다. 누에 BuOH 분획물 20 mg/kg과 200 mg/kg으로 각각 투여할 때 LDH치가 2336±12.9 U/L와 2276±11.1 U/L로 감소하였다. 이러한 결과로부터 누에 BuOH 분획물의 LDH치 저하효과는 silymarin보다 다소 낮음을 알 수 있었다.

누에 BuOH 분획물과 silymarin투여에 의한 CC₄유도 MDA생성 억제에 미치는 영향은 Table 4에 나타났다. 즉 사염화탄소 투여로 증가되는 지질과산화물 생성에 미치는 누에 BuOH 분획물의 억제효과를 알아보기 위하여, 사염화탄소로 간독성이 유발된 생쥐 간에서 malondialdehyde 양을 측정하여 보았다.

사염화탄소에 의하여 간독성이 유발되면 정상 쥐에 비하여 malondialdehyde 함량이 약 3배가 증가됨을 알 수 있었다. 즉 사염화탄소투여로 증가된 MDA함량은 6.9±0.1 μmole/g of tissue이었고, 누에 BuOH분획물을 20 mg/kg

Table 2. Effect of BuOH fraction of *Bombyx mori* larvae extract on liver weight/body weight in mice treated with carbon tetrachloride

CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Treatment Test materials	Dose (mg/kg, p.o.)	Liver weight/Body weight (g/g, %)
0	Control	0	0.057±0.004(100)
50	Reference	0	0.061±0.001(0)
50	Silymarin	2	0.060±0.005(25)
50	BuOH fraction	20	0.060±0.002(25)
50	BuOH fraction	200	0.059±0.004(50)*

Values represent mean±S. D. of 10 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30min after injection of the CCl₄.

*Significantly different from positive control at p<0.05.

Table 3. Effects of BuOH fraction of *Bombyx mori* larvae 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	Dose (mg/kg, p.o.)	Enzymes activities (IU/L serum, %)		
			sGOT	sGPT	sLDH
0	Control	0	47.0 ± 9.6(100)	17.9 ± 3.4(100)	1605 ± 48(100)
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	89.4 ± 14.6(64)*	45.7 ± 16.2(30)	2336 ± 129(33)
50	BuOH fraction	200	83.4 ± 21.8(69)*	44.9 ± 6.2(32)	2276 ± 111(33)

Values represent mean ± S. D. of 10 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30min after injection of the CCl₄.

*Significantly different from positive control at p<0.05.

과 200 mg/kg농도로 각각 투여할 때는 MDA치가 4.9±0.4 과 4.6±0.0 μmole/g of tissue로 감소하였다. 이러한 누에 BuOH 분획물의 지질과산화 억제효과는 2 mg/kg 농도로 silymarin을 투여한 경우보다는 30% 정도 미약하였다. 간에 존재하는 glutathione S-transferase 효소는 다양한 독성화합물을 해독시킴으로써, 독성물질에 의한 간의 손상을 막아주는 간보호 작용에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[10].

간의 해독작용에 미치는 누에 BuOH 분획물의 효과를 알아보기 위하여 glutathione S-transferase의 활성을 측정하였다. 사염화탄소로 인하여 간독성이 유발될 경우 glutathione S-transferase활성이 정상군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 누에 BuOH 분획물을 20 mg/kg의 농도로 처리하는 경우는 glutathione S-transferase 활성에 영향을 미치지 않았으나, 누에 BuOH 분획물을 200 mg/kg농도로 투여한 경우는 glutathione S-transferase의 활성이 정상

42%수준으로 증가되었다(Table 4).

누에 BuOH 분획물을 투여함으로써 나타나는 간보호효과를 간의 병리·조직학적 측면에서 관찰하기 위하여, 간조직을 H&E 염색을 하여 현미경으로 관찰하였다. 정상쥐의 간조직에서는 특별한 병변을 관찰할 수 없었으나, 사염화탄소에 의한 간독성이 유발되면 간세포가 괴사됨을 알 수 있었고, 특히 중심정맥 오른쪽에 염증세포가 증가됨을 확인할 수 있었다. 누에 BuOH 분획물 투여군은 중심정맥 쪽에 경미한 허혈성 변성과 세포의 팽창이 확인되었으나, 사염화탄소 투여군보다는 병리증상이 덜함을 확인할 수 있었다(Table 5).

이와 같이 누에 BuOH 분획물 투여군은 사염화탄소로 생쥐에 간독성을 유발시켰을 때 간독성지표가 되는 여러 생화학적 요인에 영향을 미침으로써 간보호활성을 나타낼 수 확인할 수 있었다.

Table 4. Effects of BuOH fraction of *Bombyx mori* larvae extract on lipid peroxide contents and glutathione S-transferase activity in mice treated with carbon tetrachloride.

CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Treatment Test materials	Dose (mg/kg, p.o.)	MDA	GST
			(μmole/g of tissue, %)	(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	4.9 ± 0.4(47)	75 ± 1(-)
50	BuOH fraction	200	4.6 ± 0.0(52)*	160 ± 3(42)

Values represent mean ± S. D. of 10 mice per each group. CCl₄ was injected intraperitoneally, and test materials were administered orally at 30min after injection of the CCl₄.

*Significantly different from positive control at p<0.05.

Table 5. Effects of BuOH fraction of *Bombyx mori* larvae on liver pathological symptoms in mice treated with carbon tetrachloride

CCl ₄ (mg/kg, i.p.)	Treatment Test materials	Dose (mg/kg, p.o.)	Glycogen degeneration	Centrilobular necrosis	Cellular swelling
0	Control	0	-	-	-
50	Reference	0	++	+++	++
50	Silymarin	2	-	-	+
50	MeOH extract	200	-	+	++

¹⁾ Showed as liver tissue damage intensity

-: none damage, +: weak damage, ++: moderate damage, +++: strong damage

요 약

CCl₄로 독성유발시킨 일차배양 간세포에 대한 누에의 메탄추출물을 50 µg/ml 농도로 처리시 GPT치를 감소시킴으로써 34%의 간세포 보호효과를 나타냈다. 누에의 메탄추출물을 각각 극성에 따라 분획하여 처리한 결과, 누에의 BuOH 분획물이 가장 높게 GPT치를 감소시킴으로써 간세포 보호활성을 나타냈다. 일차배양 간세포에서의 간세포 보호효과가 생체에서 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐에 CCl₄독성을 유발시킨 후, 30분 후에 검역을 투여하고 24시간 후에 혈액과 간을 이용하여 누에 BuOH 분획물의 간독성 회복효과를 검색하였다. 간중량/체중에 미치는 영향은 누에분획물을 200 mg/kg 처리시 50%의 감소효과를 나타냈다. GOT와 LDH효소활성도 GPT와 비슷한 경향으로 활성을 감소시켰다. 지질과산화억제도는 누에의 경우 20과 200 mg/kg 처리시 47%와 52%이었고, 간의 해독작용에 관여하는 GST의 활성은 저농도에서는 활성에 영향을 미치지 않았고 고농도 처리군에서는 42%수준으로 활성을 증가시켜 간독성 회복작용을 나타냈다. 간의 병리화적인 조사에서는 사염화탄소에 의한 간독성이 유발되면 간세포가 괴사됨을 알 수 있었고, 특히 중심정맥 오른쪽에 염증세포가 증가됨을 확인할 수 있었으나 누에 BuOH 분획물 투여군은 중심정맥쪽에 경미한 허혈성 변성과 세포의 팽창만이 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Berry, M. N., Edward, A. M. and Barritt, G. J. 1991. Laboratory technique in biochemistry and molecular

biology., Burdon, ed, Elsevier, New York, 21, p.15.
 2. Groot, H. and Noll, T. 1986. The crucial role of oxygen partial pressures in haloalkane free radical mediated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 15.
 3. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130.
 4. Kafatos, F. C., Louis, C., Savakis, C., Glover, D. M. and Ashurer, E. 1991. Integrated map of *Drosophila genome*, *Trends Genetics*, **7**, 155-161.
 5. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. 1983. Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Med.* **49**, 222.
 6. Kwon, Y. C., Kim, Y. S. and Bae, H. S. 1987. Effects on glucose level in alloxan induced hyperglycemia rabbits, *Kyunghee Univ. Oriental Medi Proced* **10**, 189-205.
 7. Logani, M. K. and Davis, R. E. 1979. Lipid peroxidation, *Lipids*. **15**, 485.
 8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
 9. Maynard, E. H., Bitterns, S. and James, R. G. 1971. Effect of 3-methylchloanthrene induction on the CCl₄-induced changes in rat hepatic microsomal enzyme system. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 745.
 10. Naei, K., Tak, Y. A. and Murad, O. 1985. The regulation as hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 715.
 11. Park, I. K., Lee J. O., Lee, H. S., Seol, K. Y. and Ahn, Y. J. 1998. Cytotoxic activity of *Bombyx mori* and *Morus alba* derived materials against human tumor cell lines. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **41** (2), 187-190.
 12. Recknigel, R. O. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145.

13. Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clinic. Pathol.* **28**, 56.
14. Renke, D., Richard, S., David F., Han. H. J., Kim C. S. and Song, P. S. 1992. Characterization of silkworm chlorophyll metabolites as an active photosensitizer for photodynamic therapy, *J. Natl. Prod.* **55**(9), 1241-1251.
15. Retnakaran, A. Granett, J. et al. 1985. Insect growth regulator, *Comprehensive insect physiology, Biochemistry*, **12**, 529-601.
16. Ryu, K. S., Chung, S. H. 1997. Studies on the Development of functional foods from silkworm related materials, *Rural Development Administration* 21-49.
17. Ryu, K. S., Chung, S. H. 1998. *Silkworm and Diabetes*, pp.59-95, Sinil Co.