

랫드 일차 배양 간세포에서 사염화탄소의 독성에 대한 지잠 물추출물의 보호효과

윤수홍 · 김덕현 · 현선희* · 이상규* · 전태원* · 정태천*^{·#}

대구가톨릭대학교 약학대학, *영남대학교 약학대학

(Received August 8, 2006; Revised August 14, 2006)

Protective Effects of the Water Extract of *Protaetia brevitarsis* Larva Against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity in the Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes

Soo Hong Yun, Duk Hyun Kim, Sun Hee Hyun*, Sang Kyu Lee*, Tae Won Jeon* and Tae Cheon Jeong*^{·#}

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract — Protective effects of the water extract of *Protaetia brevitarsis* larva against CCl₄-induced toxicity were investigated in primary cultures of adult rat hepatocytes. The extract used in these studies contained several minerals, fatty acids and amino acids. Treatment of hepatocyte cultures with the extract provided a significant protection from the increased LDH activity induced by CCl₄. The results demonstrated that the extract may have the protective effect against CCl₄-induced toxicity in hepatocyte cultures.

Keywords □ Hepatoprotection, *Protaetia brevitarsis* larva, carbon tetrachloride, primary cultures, rat hepatocytes, lactate dehydrogenase leakage

인체는 간장에서 독작용을 일으키는 활성 대사체로 전환될 수 있는 수많은 환경오염물질과 화학물질, 식품 첨가제 및 의약품 등에 노출되고 있다. 용제로 널리 사용되는 사염화탄소(CCl₄)는 일산화소 첨가 효소계(mixed function oxidase system)의 활성에 의해 trichloromethyl free radical(-CCl₃)로 활성화되어 간독성을 유발한다.¹⁾ 생성된 free radical은 인근 지질막을 공격하여 지질의 과산화물을 일으키거나,²⁾ free radical이 세포내의 단백질이나 지질 등의 거대분자와 결합하여³⁾ 간의 괴사, 지질침착, 약물대사 효소 활성의 저하 등과 같은 간독성을 나타내고, 소포체의 Ca²⁺ 펌프를 억제하여 세포 내 Ca²⁺의 항상성을 저해하여 세포의 죽음을 초래하는 것으로 알려져 있다.^{4,7)}

지잠(地蠶)은 딱정벌레 목(Coleoptera) 풍뎅이 과(Scarabaeidae) 꽃무지 아과(Cetoniinae)에 속하는 17~24 mm 크기의 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)의 유충이다.^{8,9)} 중국, 일본 및 시베

리아 동부지역에 서식하고 있으며, 우리나라의 경우, 중부와 남부 특히 제주도에 많이 분포하고 있다. 흰점박이꽃무지의 성충은 5월에서 10월에 걸쳐 1~2년에 1회 발생하고, 3주령 성충유충 상태로 월동하며, 퇴비, 건초더미, 썩은 초가지붕이나 낙엽 등의 유기물이 풍부한 토양 속에서 서식하는 것으로 보고되고 있다.⁸⁻¹¹⁾

지잠에 대한 연구는 대단히 희소하며 和漢藥¹²⁾과 본초강목¹³⁾에서는 유독성을 기록하였고, 신농본초경¹⁴⁾은 하약(下藥)으로 분류하였다. 지잠의 성질은 약간 차고(微寒), 맛이 짜며 독성이 있고 악혈(惡血), 어혈(瘀血), 비기(痺氣), 월폐(月閉), 시력감퇴, 금창(金瘡), 산후풍, 악성종기, 아구창, 파상풍, 치질, 골절, 혈결(血結) 등의 치료에 탁월한 효과가 있다고 알려져 있으며, 특히 간경(肝經)에 작용하여 파혈행어(破血行瘀)의 효능이 있으므로 간경의 어혈을 다스린다고 한다.¹³⁻¹⁶⁾

간 질환은 환경의 오염, 식생활의 변화, stress, 음주, 병원체의 감염 및 혈액소중과 당뇨병 같은 대사성 질환 등 여러 가지 요인에 의하여 발생된다. 현재 임상적으로 널리 쓰이는 간질환 치료제로는 biphenyldimethyl dicarboxylate, silymarin, ursode-

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2819 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) taecheon@yumail.ac.kr

soxycholic acid, vitamin B complex 및 한약제 등¹⁷⁻¹⁹⁾이 있으며, 그 질환의 심각성에 비해 치료제의 종류가 많지 않을 뿐 아니라 천연물질로서의 치료제는 과학적인 검증 없이 주로 민간요법 내지는 한약제로서 사용되고 있는 실정이다. 현재 풍뎅이류의 유충을 뭍뎅이라 하여 간 질환자들의 민간약으로 사용되고 있는데 이들에 대한 과학적인 유효성의 검증이 필요한 것으로 판단된다.

본 연구에서는 사염화탄소로 유발시킨 간독성에 대한 지잠 추출액의 보호효과를 살펴보기 위하여 정상 랫드의 간세포를 일차 배양하여 *in vitro*에서 실험을 수행하였다. 일반적으로 *in vitro* 실험에서 암세포주를 활용한 배양시에는 여러 효소의 발현이 정상적인 간세포와는 다르게 나타나는데, 일차배양 세포계의 경우에는 정상 랫드에서 간세포를 분리, 배양하게 되므로 *in vivo*에서의 작용을 더 정확하게 살펴볼 수 있다는 중요한 장점을 갖고 있다. 방법적으로는 간세포로부터 배양액 중으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH) 활성을 비교, 측정하여 지잠 추출액의 용량 및 시간의존적인 간보호 효과를 확인하였다. 이를 위한 선행 연구의 일환으로 시험에 사용한 지잠의 영양성분에 대한 기초적인 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

시료의 조제

우리나라 제주산 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)의 5주령 유충인 지잠 100 g에 증류수 1,000 ml를 가해 3시간 가열 추출한 후, 온시 여과하고 여액을 모아 rotary vacuum evaporator (Buchi, 스위스)로 감압 농축하여 전량 100 ml로 하였으며, 이 물 추출액의 냉동건조 분말을 증류수에 용해시키고 여과 멸균하여 시험에 사용하였다.

실험동물

대한실험동물센터(음성, 한국)에서 구입한 4주령의 특정 병원체 부재 Sprague-Dawley 계 웅성 랫드를 2주간 일반사료로 순화시킨 후, 체중이 200~250 g 되었을 때 사용하였다. 물은 음용수를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육환경은 23±3°C의 온도와 50±10%의 습도에서 12시간씩 명암주기를 조절하여 관리하였다.

시약 및 기구

실험에 사용한 CCl₄, collagenase, dimethyl sulfoxide, pentobarbital sodium 및 LDH kit는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터, 그리고 trypan blue, Waymouth MB 752/1 및 collagen은 GIBCO(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약도 모두 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

영양성분 분석

무기질 성분 - 무기질은 습식법으로 분해시킨 후 inductively coupled plasma spectrophotometer(Jovin Yvon 50P, 프랑스)를 사용하여 다음과 같은 조건 하에서 분석하였다.

Wavelength (nm)	Ca : 393.40, Mg : 279.60, Fe : 238.20, Zn : 213.90, Cu : 324.80, Cd : 228.80, Cr : 205.55, As : 193.76, Na : 589.00, Hg : 184.89, Pb : 220.35, Mn : 257.60, K : 383.00
Line gas pressure (psi)	70
Coolant gas flow rate (l/min)	12
Sample gas pressure	40
Nebulizer carrier gas flow rate (l/min)	0.4
Nebulizer pump rate (l/min)	1.5
Integration period	1.0

지방산 성분 - 시료를 chloroform : methanol(2 : 1) 혼합용액으로 추출하여 농축한 지질을 boron trifluoride-methanol 용액으로 methylation시켜 gas chromatograph(HP 5890 series II, 미국)로 다음과 같은 조건하에서 분석하였다.

Instrument	Gas Liquid Chromatograph
Column	10% SP-2330 glass column 2 m
Detector	Flame Ionization Detector
Injection temperature	240°C
Detector temperature	280°C
Column temperature	Initial temperature 210°C for 3 min Program rate increase 15°C/min Final temperature 240°C for 5 min
Carrier gas	Nitrogen gas Linear velocity 50 ml/min

아미노산 - 지잠 15 g을 75% ethanol로 추출하여 여과 농축한 후, 75% ethanol로 용해시켜 냉동실에서 16시간 동안 침지하여 강압 여과한 시료를 amino acid analyzer(Hitachi Model 835, 일본)로 다음과 같은 조건하에서 분석하였다.

Separation column	BTC 2710
Column	3.2 mm×400 mm
Bed height	205 mm
Elution buffer (pH)	3.50, 3.83, 4.30, 5.20, 10.60
Buffer flow rate	0.28 ml/min
Column temperature	48°C, 56°C, 64°C, 70°C
Relation coil temperature	125°C

간세포 분리

간세포는 Berry와 Friend의 방법²⁰⁾에 의해 두 단계를 거쳐 분리하였다. 랫드는 50 mg/kg의 pentobarbital sodium을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 복부 정중선을 절개하였다. 간문맥을 통해 관류용액을 주입하면서 즉시 하대정맥을 절단하여 간으로부터 혈액을 제거하였다. 약 100 ml의 관류용액을 통과시킨 후 하대정맥을 실로 묶었다. 간을 통과한 관류용액은 상대정맥을 통

해 관류병에 유출되도록 함으로써 재순환 시켰다. 이때의 관류 용액은 37°C를 유지시켰으며, 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스로 포화시킨 상태에서 사용하였다. 재순환이 시작된 후 관류용액에 0.05~0.06% 농도의 collagenase 용액을 관류병에 첨가하여 간이 부풀 때까지 약 15~20분 동안 관류시켰다. 부풀 간을 떼어 100 ml 관류용액이 담긴 비이커에 담은 후 가위로 잘라 단일 세포가 되게 하였다. 그 후 250 µl 나일론 천으로 여과시켜 50×g에서 4분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 다시 관류용액으로 2번 반복하여 세정하였다. 0.4% trypan blue에 의해 세포 생존도를 확인 한 후 세포계수기(Coulter Inc., 미국)로 세포수를 1.0×10⁶ 세포/ml이 되도록 배양용 배지인 Waymouth MB 752/1 액체배지로 조정하였다.

배양조건

Collagen을 미리 바른 60×15 mm plastic Petri dish에 3 ml의 세포현탁액을 넣어 37°C에서 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스를 포함하는 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였으며, 4시간 후 새로운 배지로 바꾸어 주었다.

시료의 처리

시료는 증류수에 녹여 0.45 µm Millipore filter로 여과하여 무균상태로 제조하였으며, 간독성 유발을 위하여 사염화탄소를 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 배양 4시간 후 직접 배양액에 처리하였다. DMSO의 최종농도는 1%가 되도록 하였다.

LDH 효소 활성도 측정

LDH 효소 활성은 Sigma사에서 구입한 kit를 이용하여 함께 제공된 시험방법에 준하여 측정하였다. Pyruvate 기질 1.0 m/ml NADH vial에 넣은 후 37°C에서 3분간 preincubation한 후 배양액 0.1 ml를 첨가하여 잘 혼합한 다음 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 각각의 vial에 1.0 ml의 발색시약을 넣어 실온에서 20분간 방치한 후, 10 ml의 0.4 N NaOH 용액을 첨가하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 대조군에 대한 유의성 여부는 Dunnett t-test를 이용하여 검정하였다. p<0.05(*) 및 p<0.01(**) 수준에서 유의성을 보이는 결과를 별표로 표시하였다.

결과 및 고찰

지잠의 영양성분 분석

지잠의 무기질 분석 결과, sodium이 73,200 mg%로 가장 많았

Table I - Minerals in the *Protoetia brevitarsis* larva

Mineral	Content (mg%)
Na	73,200
K	46,000
Mg	3,330
Ca	2,905
Fe	234
Al	217
Mn	54
Zn	41
Se	11
Cu	7
Cr	4
Cd	ND
Pb	ND
As	ND
Co	ND
Si	ND
Ni	ND

ND, not detected.

Table II - Composition of fatty acids in the *Protoetia brevitarsis* larva

Fatty acid	Content (%)
C 18 : 1	54.23
C 16 : 0	22.61
C 18 : 2*	8.16
C 16 : 1	6.62
C 18 : 0	4.46
C 22 : 1	3.91
Total unsaturated fatty acid	72.92
Total saturated fatty acid	27.07

*, Essential fatty acid (linoleic acid).

Table III - Amount of amino acids in the *Protoetia brevitarsis* larva

Amino acid	Content (mg/100 g)
Histidine	27.36
Valine	24.85
Lysine	19.41
Threonine	14.42
Essential amino acid	13.51
Arginine	13.35
Phenylalanine	11.82
Isoleucine	11.60
Leucine	1.30
Methionine	55.52
Proline	41.58
Glutamic acid	33.34
Tyrosine	24.11
Non-essential amino acid	22.27
Alanine	16.07
Glycine	12.69
Serine	9.33
Aspartic acid	
Cystine	

으며, potassium, magnesium, calcium 및 iron 순으로 검출되었다. 그러나 cadmium, lead 및 arsenic 등의 중금속은 검출되지 않았다(Table I).

지방산에서는 불포화지방산인 oleic acid가 54.23%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 포화지방산인 palmitic acid 함량도 22.61%

로 많았고, 필수 지방산인 linoleic acid는 8.16%로 비교적 많이 함유되어 있었고, oleic acid>palmitic acid>linoleic acid>palmitoleic acid>stearic acid 순으로 검출되었으며, 불포화지방산이 73%로 포화지방산 27%에 비해서 매우 많이 함유되어 있었다(Table II).

아미노산 분석 결과, 총 17종의 아미노산이 검출되었으며, 이 중 필수아미노산은 histidine이 가장 많이 함유되어 있으며 valine, lysine 순으로 검출되었다(Table III).

일차배양 간세포에서 사염화탄소에 의한 간독성 유발

사염화탄소는 체내에서 약물대사효소에 의하여 대사되어 지질 과산화물을 유도하여 간독성을 유발하는 유기용매로, 실험동물에서 간독성을 유발할 때 널리 사용된다.²¹⁾ 본 연구에서는 지잡의 간독성 보호효과를 간세포 배양계에서 연구할 목적으로 먼저 사염화탄소의 간독성 특성을 Sprague-Dawley계 랫드에서 분리한 일차배양 간세포에서 살펴보았다.

먼저 랫드에서 collagenase 관류 방법으로 간세포를 단일세포로 분리한 다음 collagen을 도포한 배양용 접시에서 세포배양을 시작하고, 4시간 후에 죽은 세포를 제거하기 위하여 배양용 배지를 신선한 배지로 교환하였다. 간세포는 배양접시 표면에 부착하여 monolayer 형태로 생존하게 되므로 배양액 교환 시 죽은 세포는 쉽게 분리 제거 할 수 있었다.

배양액을 교환한 다음, 사염화탄소를 1, 5 및 10 mM의 최종 농도로 배양액에 처리하고, 24시간 후에 배양액을 수거하여 간세포로부터 배양액으로 유리되어 나온 LDH의 활성도를 측정하였다. LDH는 pyruvate를 lactic acid로 전환시키는 효소로 세포

질에 존재하므로 사염화탄소에 의해 간세포막이 손상을 받으면 세포 밖으로 유출되게 되고, 배양액 중의 LDH의 활성은 결국 간세포로부터 유리된 것이므로 활성이 높을수록 간독성이 심하게 유발된 것으로 해석할 수 있다.

사염화탄소를 간세포 배양에 처리하면 5 mM의 농도에서부터 배양액 내에 용량의존적으로 LDH 활성이 통계적인 유의성 ($p<0.05$)을 보이며 증가하였다(Fig. 1). 이는 사염화탄소가 일차 배양 간세포에서도 독성 대사체로 대사가 되어 세포막에 손상을 줄을 의미하며, 간세포 배양계에서 지잡의 간독성 보호효과를 검증할 수 있음을 제시해 주는 결과이었다. 본 연구에서는 예비실험의 결과를 토대로 간독성 유발 시에 10 mM($p<0.01$)의 사염화탄소를 계속 사용하였다.

지잡이 일차배양 간세포에 미치는 영향

지잡 물추출액이 일차배양 간세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지잡 물추출액의 동결건조 분말을 증류수에 녹여 여과멸균하고, 배양 후 4시간째에 간세포 배양에 1, 2 및 5 mg/ml이 되도록 처리하였다. 처리 후 24시간째에 배양액 중의 간독성 지표인 LDH 활성도를 측정한 결과, 2 mg/ml 처리군부터 유의성 ($p<0.01$)있게 LDH의 유출을 보호하였다. 이는 정상적인 간세포 배양계에서도 세포막의 손상으로 간세포 내의 LDH가 유출이 되는데, 지잡 물추출액의 처리에 의하여 이러한 간세포의 손상을 보호함을 입증하는 결과로 해석되었다. 즉, 정상적인 간세포의 일차배양계에서도 간세포막의 손상이 어느 정도 일어나게 되지만, 지잡 물추출액이 이러한 정상적인 간손상도 일부 보호할 수 있음을 암시하는 결과로 해석되었다. 이 결과로부터 사염화탄소

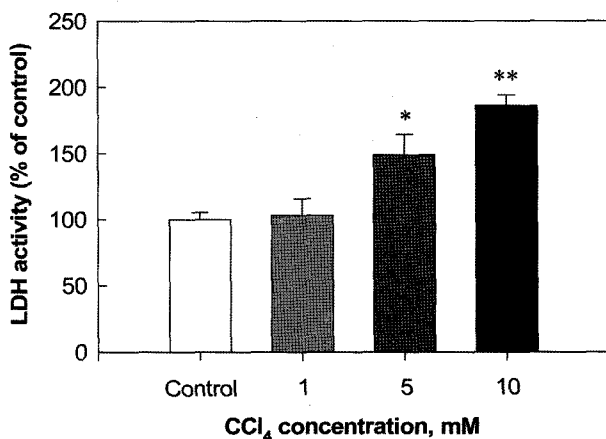


Fig. 1 - Effects of carbon tetrachloride on lactic dehydrogenase leakage in primary cultures of rat hepatocytes. Four hour after the initiation of cultures, the medium was refreshed with given concentrations of CCl₄. Each bar represents mean LDH activity \pm S.E. of triplicate cultures. Asterisks indicate the values significantly different from the vehicle treated control at $p<0.05$ (*) or $p<0.01$ (**).

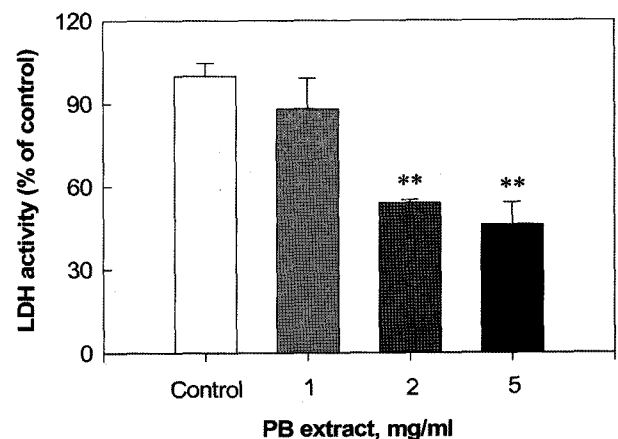


Fig. 2 - Effects of the water extract of *Protactia brevitarsis* larva (PB) on lactic dehydrogenase leakage in primary cultures of rat hepatocytes. Four hour after the initiation of cultures, the medium was refreshed with given concentrations of the PB. Each bar represents mean LDH activity \pm S.E. of triplicate cultures. Asterisk indicates the values significantly different from the vehicle treated control at $p<0.01$ (**).

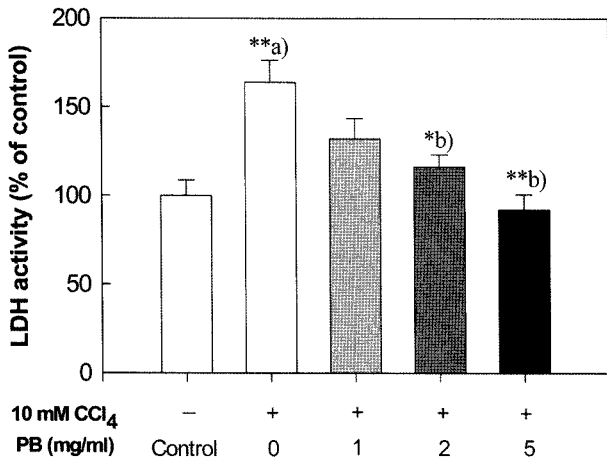


Fig. 3 – Effects of the water extract of *Protoetia brevitarsis* larva (PB) on CCl₄-induced elevation of lactic dehydrogenase leakage in primary cultures of rat hepatocytes. Four hour after the initiation of cultures, the medium was refreshed with given concentrations of the PB with 10 mM CCl₄. Each bar represents mean LDH activity±S.E. of triplicate cultures. a) Significantly different from the control group. b) Significantly different from the CCl₄ group. *, p<0.05; **, p<0.01.

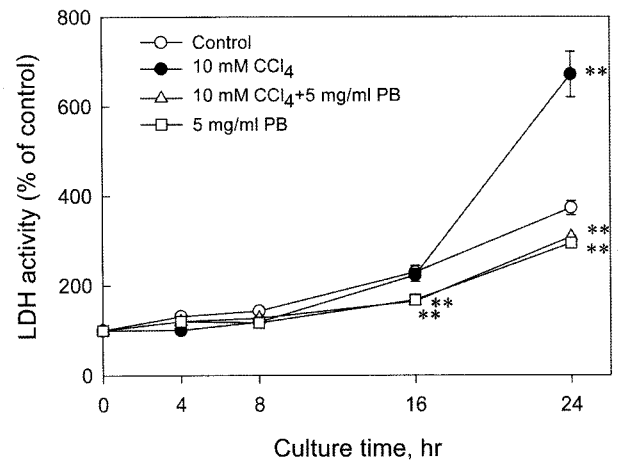


Fig. 4 – Time-course effects of the water extract of *Protoetia brevitarsis* larva (PB) on CCl₄-induced elevation of lactic dehydrogenase leakage in primary cultures of rat hepatocytes. Four hour after the initiation of cultures, the medium was refreshed with 5 mg/ml of the PB with 10 mM CCl₄. The LDH activity in the culture media removed on the given culture time was determined. Each bar represents mean LDH activity±S.E. of triplicate cultures. Asterisk indicates the values significantly different from the vehicle treated control at p<0.01 (**).

에 의한 간독성에 대한 보호효과 시험에는 1, 2 및 5 mg/ml의 지잠 물추출액을 사용하였다(Fig. 2).

일차배양 간세포에서 지잠 물추출액의 농도에 따른 보호효과

사염화탄소로 유발시킨 간독성에 대하여 지잠 물추출액의 보호효과를 살펴보기 위하여, 간세포 배양 시작 4시간 후에 배지를 교환하고 10 mM의 사염화탄소와 1, 2 및 5 mg/ml의 지잠 물추출액을 24시간 동안 처리하였다. Fig. 3에 도시한 바와 같이, 사염화탄소 처리 시에 대조군에 비해 64% 정도의 통계적으로 유의성(p<0.01) 있는 LDH의 증가를 관찰하여 간독성이 유발됨을 확인하였고, 지잠 물추출액의 처리에 의하여 용량이 증가함에 따라 사염화탄소 처리군에 비해 각각 20%, 29%(p<0.05) 및 44%(p<0.01) 정도 LDH의 활성이 용량 의존적으로 감소하여, 사염화탄소에 의한 간독성을 보호함을 알 수 있었다. 특히 2 mg/ml의 지잠 물추출액 처리군부터는 대조군과 유사한 수준까지 사염화탄소의 간독성을 보호한다는 사실을 알 수 있었다. 사염화탄소의 간독성 기작이 대사활성화 후에 간세포막에 지질과산화 과정을 야기하여 일어난다는 보고들로부터 지잠 물추출액은 사염화탄소의 대사활성화 효소계 또는 항산화 작용에 기인할 수 있음을 암시하는 결과로 해석되었다.²⁾

일차배양 간세포에서 처리 시간에 따른 지잠의 보호효과

사염화탄소로 유발시킨 간독성에 대한 지잠 물추출액의 보호효과를 좀더 자세히 살펴보기 위하여, 간세포 배양 4시간 후에

배지를 교환한 다음, 10 mM의 사염화탄소와 5 mg/ml의 지잠 물추출액을 배양액에 처리하였다. 그런 다음, 4, 8, 16 및 24시간 후에 배양액 중에 유출되는 LDH 활성을 측정하여 보았다. 그 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이, 사염화탄소에 의한 간독성은 처리 후 16시간에서 24시간 사이에 유발되는 것을 확인했고, 지잠 물추출액의 보호효과도 16시간에서 24시간 사이에 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 지잠 물추출액 처리군의 경우, 처리 후 16시간부터 이미 정상세포에서 유리되는 LDH 활성보다 낮은 수치를 보여 지잠 물추출액의 간독성 예방작용을 확인할 수 있었다. 이는 Fig. 2에서 관찰한 지잠 물추출액 자체의 간독성 보호효과와 일치하는 것으로 정상적인 상태의 간세포 손상에도 보호작용을 갖음을 재차 확인한 결과이다. 따라서 지잠 물추출액은 랫드의 일차배양 간세포에서 사염화탄소가 유발하는 간독성을 효과적으로 보호하는 것으로 판단되었다.

결론

본 연구에서는 사염화탄소에 의하여 유발된 간독성에 미치는 지잠 물추출액의 간보호 효과를 확인하기 위하여, 랫드의 일차 배양 간세포에서 *in vitro* 시험을 실시하였고 지잠의 무기질, 지방산 및 아미노산 분석도 시행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

지잠의 무기질 함량은 Na, K, Mg, Ca의 순이었으며, Cd과 Pb 등의 중금속은 검출되지 않았다. 지방산은 불포화지방산이 많았으며 oleic acid 함량이 가장 높았고, palmitic acid, linoleic acid

의 순으로 검출되었다. 아미노산 분석에서는 총 17종의 아미노산(필수아미노산 9종, 비필수아미노산 8종)이 검출되었으며, proline, tyrosine, histidine의 순으로 나타났다.

지잠 물추출액의 처리에 의해 용량의존적으로 사염화탄소에 의한 간독성을 보호하였고, 처리 후, 16시간부터 이미 정상세포에서 유리되는 LDH 활성 보다 낮은 수치를 보여 지잠 물추출액의 간독성 보호 작용을 확인할 수 있었다.

이상 결과를 종합하면 지잠은 사염화탄소에 의한 간독성에 대하여 우수한 보호 효과를 갖는 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 영남대학교 약학대학 후원 및 장학회의 지원에 의해 수행되었습니다.

문헌

- 1) Recknagel, R. O. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **19**, 145 (1967).
- 2) Recknagel, R. O. and Glende, E. A. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263 (1973).
- 3) Villarruel, M. C., Diaz Gomez, M. I. and Castro, J. A. : The nature of the *in vitro* irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal lipids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **33**, 106 (1975).
- 4) Glende, E. A. and Pushpendran, C. K. : Activation of phospholipase A₂ by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3301 (1986).
- 5) Long, R. M. and Moore, L. : Inhibition of liver endoplasmic reticulum calcium pump by CCl₄ and release of a sequestered calcium pool. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 4131 (1986).
- 6) Plaa, G. L. and Hewitt, W. R. : Quantitative evaluation of indices of hepatotoxicity. In *Toxicology of the Liver*. Raven Press, New York, pp. 103-120 (1982).
- 7) Recknagel, R. O. : A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci.* **33**, 401 (1983).
- 8) 신민교 : 원색임상본초학, 도서출판 영림사, p. 482 (1986).
- 9) 김진일 : 한국곤충생태도감, 고려대학교 한국곤충연구소, Vol. III, pp. 45-78 (1998).
- 10) 古川晴男, 長谷川仁, 奥谷禎一 : 原色昆蟲百科圖鑑, 集英社, pp. 573-574 (1977).
- 11) 張芝利 : 中國經濟昆蟲誌 28輯, 초시목, 中國科學院 中國動物誌 編纂委員會, 科學出版社 (1984).
- 12) 赤松金榜 : 和漢藥, 醫齒藥出版社, 東京, p. 950 (1970).
- 13) 李時珍 : 本草綱目, 人民衛生出版社, 北京, pp. 2297-2298 (1981).
- 14) 孫星衍 : 神農本草經, 聞名學社出版社, 台灣, 卷二, p. 30 (1985).
- 15) 中藥大辭典 : 上海科學技術出版社, 第2卷, 東京, 小學館, p. 1389 (1985).
- 16) 中藥大辭典 : 江蘇新醫學院, 上海科學技術出版社, 上海, pp. 2378-2380 (1977).
- 17) Campos, R., Garrido, A., Guerra, R. and Valenzuela, A. : Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Med.* **55**, 417 (1989).
- 18) 김덕현, 윤수홍 : 소시호탕이 사염화탄소에 의해 유도된 흰쥐의 간 장애에 미치는 영향. *한국위생과약학회지* **4**, 3 (1998).
- 19) Hofmann, A. F. and Popper, H. : Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Lancet* **2**, 398 (1987).
- 20) Berry, M. N. and Friend, D. S. : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506 (1969).
- 21) Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. : Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Med.* **49**, 222 (1983).