

Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate가 간내 Cytochrome P₄₅₀ 1A1 과 2B1 및 CCl₄ 유도 간독성에 미치는 영향

김순선[#] · 오현영* · 김학림 · 양지선 · 김동섭 · 신윤용* · 최기환

식품의약품안전청 국립독성연구소, *이화여자대학교 약학대학

(Received October 25, 1999)

Effect of Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate on Cytochrome P₄₅₀ 1A1 and 2B1 and CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Rat Liver

Soon Sun Kim[#], Hyun Young Oh*, Hak Rim Kim, Ji Sun Yang,
Dong Sup Kim, Yhun Yhong Sheen* and Ki Hwan Choi

National Institute of Toxicological Research, KFDA, Seoul 122-704, Korea

*Ewha Women's University, Seoul 120-750, Korea

Abstract — In this study, we have investigated the effect of Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate (DDB), a synthetic analogue of Schizandrin C isolated from *Schizandrae Fructus* on cytochrome P₄₅₀ 1A1 and 2B1, and the protective mechanism against CCl₄-induced hepatotoxicity in rat liver. After DDB was administered into male rats for different periods of time (1~7 days) and with different doses (25, 50, 100 and 200 mg/kg), mRNA levels of CYP1A1 and CYP2B1 were measured by polymerase chain reaction (PCR) and assayed the activities of CYP1A1 specific ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) and CYP2B1 specific benzyloxyresorufin-O-dealkylase (BROD). DDB treatment resulted in increase in CYP2B1 mRNA level and BROD activity, whereas there was no change in CYP1A1 mRNA level and EROD activity. This effect of DDB was time- and dose-dependent and reached maximal level by 3 day and 200 mg/kg treatment. In addition, rats were pre-treated with DDB at doses of 25, 50 or 100 mg/kg daily for 4 days, 3-hr after final treatment on the 4th day, CCl₄ 0.3 ml/kg was intraperitoneally injected into the rats to examine the effect of DDB on CCl₄-induced hepatic injury. Serum levels of ALT and AST were determined and histopathological examination was done in rat liver. Furthermore, we have measured hepatic microsomal malondialdehyde (MDA) level, a parameter of lipid peroxidation. Based on serum ALT level and lipid peroxidation, pre-treatment of DDB, 50 mg/kg appeared the most protective effect against CCl₄-induced hepatotoxicity. These results indicate that DDB stimulates CYP2B1 mRNA level and BROD activity in time and dose dependent manner and suggest that protective effect of DDB on CCl₄-induced hepatotoxicity may be mediated through free radical scavenging.

Keywords □ Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate (DDB), CYP2B1, CCl₄-induced hepatotoxicity, benzyloxyresorufin-O-dealkylase (BROD), free radical scavenging.

Biphenyl dimethyl dicarboxylate(DDB)는 오래전부터 민간요법에서 간질환에 사용해오던 오미자(*Schizandrae Fructus*)로부터 추출된 성분중 간보호 효과를 가진 Schizandrin C 유사구조(Fig. 1)의 합성

동족체로서 1982년, 중국에서 Liu등¹⁾에 의해 합성되었다. DDB는 현재까지의 연구결과, thiocetamide등의 독성물질에 의한 간손상에 효과가 있으며²⁻⁴⁾ 국내외의 여러 임상연구에 의하면 바이러스에 의한 급·만성간염환자, 만성간질환 환자 및 약물독성에 의해 간손상을 받은 환자의 상승된 혈청 transaminase 수치를 현저하게 떨어뜨리는 것으로 보고되어있다.⁵⁻⁷⁾

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1808 (팩스) 02-380-1806

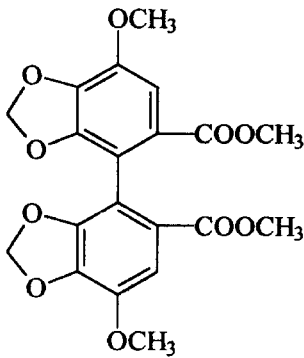


Fig. 1 - Structure of dimethyl 4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-methylenedioxy biphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB).

이처럼, DDB는 독성물질등에 의한 간손상으로부터의 보호작용이 확인되어 만성간염등 간질환 치료제로 여러 제약회사에 의해 판매되고 있다. 그 작용기전으로는 DDB의 cytochrome P₄₅₀ 2B1 유도,⁸⁾ glutathione-s-transferase 활성증가⁹⁾가 보고되어 있고 1995년, Kim등¹⁰⁾은 DDB의 간보호작용 기전을 규명하고자 면역학적인 방법과 Northern blot 분석법으로 실험한 결과, DDB는 cytochrome P₄₅₀ 2B1/2를 유도하지만 glutathione-s-transferase 발현에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였으나, 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 DDB의 간보호 작용기전 연구의 일환으로 DDB가 간의 약물대사 효소인 cytochrome P₄₅₀ 유도작용이 있는지, 각 cytochrome P₄₅₀ isozyme 활성에 영향을 미치는 지를 검색하였다.

또한, DDB를 전투여한 후, CCl₄ 0.3 ml/kg를 1회 복강주사하여 간독성을 유발시키고 혈청내 ALT 및 AST 활성, 간소포체내 lipid peroxidation을 측정하고 조직학적 관찰을 실시하여 DDB 전처리가 간독성 보호에 미치는 영향을 평가하였다.

실험방법

실험동물 - 식품의약품안전청, 국립독성연구소에서 생산된 4주령의 웅성 Sprague Dawley rat를 온도 23±2°C, 습도 55±10%, 12시간 조명주기 조건 하에서 체중이 220~230 g이 될 때까지 사육하여 실험에 사용하였으며 물과 사료는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

약물투여 - DDB를 0.5% Tween 80을 함유하는 생

리식염수 용액에 현탁시켜 용량(25, 50, 100, 200 mg/kg) 및 시간(1~7일)별로 경구투여하였으며 CCl₄는 corn oil에 용해시켜 0.3 ml/kg의 용량으로 복강주사하였다.

간독성 유발 - CCl₄에 의한 DDB의 간독성 보호효과를 조사하기 위하여 DDB를 25, 50 또는 100 mg/kg의 용량으로 1일 1회, 4일간 연속 경구투여하고 네렛날 최종투여 3시간 후, 0.3 ml/kg의 CCl₄를 1회 복강주사하여 간독성을 유발시켰다.

혈청 ALT 및 AST 함량측정 - 마지막 약물투여 24시간 후 복대정맥으로부터 혈액을 채취하여 상온에서 약 30분 방치 후 4,000 g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 혈액생화학 자동분석기(Technichon RA-XT)를 이용, ALT 및 AST 함량을 측정하였다.

Lipid peroxidation 측정 - 적출간으로부터 Trush등¹²⁾의 방법을 응용하여 lipid peroxidation 측정을 위한 간소포체 분획을 제조하였다. 적출간 약 2~3 g을 미세가위로 세절한 후 간 무게의 약 4배가 되는 Tris-HCl buffer(0.1 M trizma base, pH 7.4)를 첨가한 후 polytron을 사용하여 균질화하였다. 균질액을 600 g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 15,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 다시 상등액을 취하여 105,000 g에서 1시간 동안 원심분리하여 침전층을 취하고 Tris-HCl buffer로 재현탁시켜 Bose등¹³⁾의 방법을 응용하여 lipid peroxidation 정도를 나타내는 지표의 하나인¹⁴⁾ malondialdehyde(MDA)함량을 측정하였다. 제조한 소포체분획 0.3 ml에 8% trichloroacetic acid 0.9 ml를 가하고 4°C, 10,000 g에서 5분간 원심분리하여 상등액 1 ml를 취하여 0.2% NaOH를 함유하는 1% thiobarbituric acid 용액 0.25 ml를 가하여 혼화한 후, 100°C에서 20분간 가열하여 발색시켰다. 실온으로 냉각시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, MDA 생성량은 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 농도환산을 위한 표준물질로 사용하여 nmole/mg protein으로 나타내었다.

조직학적 관찰 - 간을 생리식염수로 관류하여 간조직내의 혈액을 충분히 제거시킨 후, 간 좌엽의 일정부위를 잘라내어 10% neutral buffered formalin 용액으로 48시간 이상 고정시켰다. 일반적인 탈수, 치환 및 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매시킨 후 4 μm로 절편하여 H&E 염색을 실시하였으며 광학 현미경하에서 조직의 병변 유무를 관찰하였다.

Cytochrome P₄₅₀ 1A1 mRNA 및 cytochrome P₄₅₀ 2B1 mRNA 함량측정

Total RNA 분리 - Chomczynski¹⁵⁾의 방법을 변형하여 total RNA를 분리하였다. 간 약 0.25 g을 잘라내어 TRIzol 2.5 ml를 가한 후 조직분쇄기를 이용하여 균질화시키고 0.5 ml의 chloroform을 가하여 15초 동안 혼합한 후 상온에서 2~3분간 방치시켰다. 4°C, 12,000 g에서 15분 동안 원심분리하고 수층을 취하여 동일용량의 isopropanol을 가한 후 상온에서 10분간 침전시켰다. 다시 12,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 pellet을 취하여 75% ethanol로 세척한 후 건조시켜 0.1% DEPC-treated water에 용해시켰다.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Paola¹⁶⁾의 방법에 따라 실시하였다. 분리한 총 RNA 3 µg에 random primer를 가하여 70°C에서 10분간 방치한 후 재빨리 얼음에서 식혔다. 잠시 후 1 mM dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 1 µl, 0.1M DTT 2 µl, 5×first strand buffer 4 µl(BRL), M-MLV-RT 200 units, RNasin 20 units를 가하여 섞고 23°C에서 10분, 37°C에서 60분간 반응시키고 95°C에서 10분간 가열하여 RT 반응을 종결시켰다. 총 RT반응액 20 µl중 1 µl를 취하여 2.5 mM dNTP 0.5 µl, tag polymerase 0.5 unit, Table I, II에 나타난 forward/reverse primer 각각 2 pmole, capillary 10×reaction buffer(750 mM Tris-HCl pH 9.0, 200 mM(NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween), 25 mM MgCl₂ 1 µl를 가하여 총 반응액 10 µl를 capillary로 옮겨 양 끝을 봉입한 후 아래와 같은 조건으로 thermal cycler(대한과학, Korea)에서 30 cycle을 작동시켰다.

pre-denaturation	94°C	10sec
annealing	58°C	30sec
elongation	72°C	60sec

denaturation	94°C	10sec
post-elongation	72°C	10sec

PCR product는 2% agarose gel상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였고 band를 각각 잘라 1M NaCl 용액에서 12시간이상 elution 시킨 후 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

7-benzyloxyresorufin-0-dealkylase(BROD) 활성 측정 - BROD의 활성은 Burke¹⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다. 80 µg의 단백질을 포함하는 postmitochondrial 분획에 dimethylsulfoxide에 용해시킨 0.01 mM benzyloxyresorufin 5 µ에 0.1M phosphate buffer (Na-K salts, pH 7.6)를 혼합하여 199 µ가 되게한 후 37°C에서 1분간 가온하여 안정화 시켰다. 50 mM NADPH 1 µ를 가해서 37°C에서 30분동안 incubation시켜 충분히 반응되도록 한 후 methanol 400 µl를 가해 반응을 종결시켰다. 800 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 fluorescence spectrophotometer(SFH 25, Kontron Instrument)를 사용, excitation wavelength 530 nm와 emmission wavelength 585 nm에서 형광도를 측정하였다.

단백질 정량 - 시료중의 단백질 농도는 bovine serum albumin(BCA)을 표준물질로 하여 BCA protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

통계처리 - 실험결과의 통계처리는 unpaired student's t-test를 사용하였으며, p<0.05 수준이하에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

혈청 ALT 및 AST 함량 - DDB의 간독성 보호효과를 평가하기 위하여 마지막 약물투여 24시간 후에 복대정맥으로 부터 혈액을 채취, 혈청내 ALT 및

Table I - Primer sequence

Primer	bps	GC Content (%)	Sequences
CYPIA1-FP	20	55	5'-CCATGACCAGGAACATATGGG-3'
CYPIA1-RP	20	55	5'-TCTGGTGAGCATCCAGGACA-3'

Table II - Primer sequence

Primer	bps	GC Content(%)	Sequence
CYP2B-FP	20	60	5'-TCACACCGGTACCAACCCT-3'
CYP2B-RP	20	60	5'-CTGTGGGTATGAGAGACTC-3'

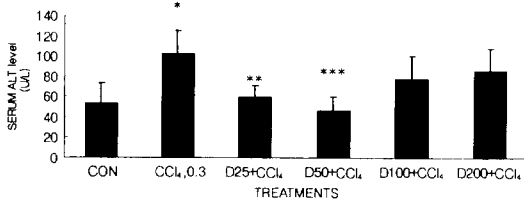


Fig. 2 – Effect of DDB on CCl₄-induced serum ALT level in rat. Each value represents mean ± S.D (n=6-9). *Significant difference from control group (p<0.01). **Significant difference from CCl₄-treated group (p<0.01), ***Significant difference from CCl₄-treated group (p<0.001)

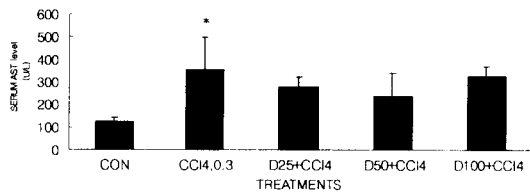


Fig. 3 – Effect of DDB on CCl₄-induced serum AST level in rat. Each value represents mean ± S.D (n=6-9). *Significant difference from control group(p<0.01).

AST 활성을 측정하였다. DDB는 대조군에 비하여 ALT 및 AST 활성을 현저히 감소시켰으며(Table III, IV) DDB 25, 50 mg/kg의 전투여는 CCl₄ 처치 (0.3 ml/kg, i.p)에 의해 증가된 ALT 활성을 현저하게 (p<0.001) 감소시켰으나 AST 활성의 감소는 CCl₄ 처치군과 유의적인 차이가 없었다(Figs. 2 & 3).

Malondialdehyde(MDA) 함량 – DDB의 간독성 보호 효과를 평가하기 위하여 마지막 약물투여 24시간 후에 간을 적출하여 간소포체분획을 제조, lipid peroxidation 측정지표의 하나인 malondialdehyde (MDA)생성정도를 측정하였다. DDB투여에 의해 MDA 생성이 감소되었으며(Table IV) 특히, 25 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비해 유의한 차이를 보여주었다. (p<0.01) 또한, DDB 25, 50 mg/kg의 전투여는 CCl₄ 처치 (0.3 ml/kg, i.p)에 의해 증가된 MDA함량을 유의적으로 (p<0.01) 감소시켰다(Fig. 4).

조직학적 관찰결과 – DDB의 간독성 보호효과 평가 지표의 하나로 조직학적 관찰을 실시하였는데, DDB는 모든 투여용량에서 간의 조직학적 변화를 일으키지 않았다. DDB 전투여는 육안소견 CCl₄ 처치(0.3 ml/kg, ip)에 의해 유발된 주위 장기와의 유착등을 감소시켰으나, CCl₄에 의한 간세포의 섬유화, 공포화 변성

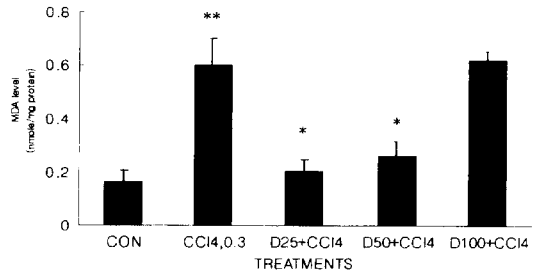


Fig. 4 – Effect of DDB on CCl₄-induced MDA level in rat liver microsome. The rats were pretreated with DDB(D) 25, 50 or 100 mg/kg for 4 days, 3 hrs after final treatment on the 4th day. CCl₄(0.3 ml/kg) was intraperitoneally injected. Each value represents mean ± S.D(n=6-10). **Significant difference from control group (p<0.001). *Significant difference from CCl₄-treated group (p<0.01).

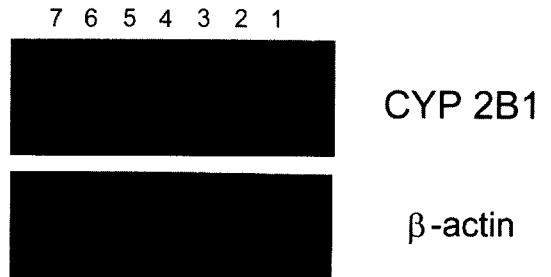


Fig. 5 – Time course effect of DDB on CYP2B1 mRNA expression in rat liver microsome. The rats were treated with DDB (200 mg/kg) for 1-7 days and then processed for RNA extraction and RT-PCR. Each lane represents RT-PCR products of β-actin and CYP2B1. lane 1: control, lane 2: 1 일, lane 3: 2 일, lane 4: 3 일, lane 5: 5 일, lane 6: 6 일, lane 7: 7 일

Table III – Effect of DDB on serum ALT level in rat

Treatment (mg/kg)	ALT level(U/L)
Control	52.7 ± 19.9
DDB (25)	30.1 ± 3.6**
DDB (50)	25.1 ± 5.3**
DDB (100)	27.7 ± 6.7**
DDB (200)	27.8 ± 6.7*

Each value represents mean ± S.D (n= 6-10).

*Significant difference from control group(p<0.05).

**Significant difference from control group(p<0.01).

및 괴사에는 통계적으로 유의성 있는 개선효과를 나타 내지 않았다.

CYP1A1 mRNA 및 CYP2B1 mRNA 함량 – DDB가 간내 약물대사효소, CYP1A1 및 CYP2B1 활

Table IV – Effect of DDB on serum AST level in rat

Treatment (mg/kg)	AST level(U/L)
Control	119.9 ± 22.4
DDB (25)	113.7 ± 6.4
DDB (50)	97.2 ± 9.2*
DDB (100)	91.1 ± 9.3**
DDB (200)	100 ± 18

Each value represents mean ± S.D (n= 6-10).

*Significant difference from control group(p<0.05).

**Significant difference from control group(p<0.01).

Table V – Effect of DDB on malondialdehyde(MDA) level in rat liver microsome

Treatment (mg/kg)	MDA level (nmole/mg protein)
Control	0.16 ± 0.046
DDB (25)	0.09 ± 0.019*
DDB (50)	0.16 ± 0.063
DDB (100)	0.17 ± 0.043

Each value represents mean ± S.D (n= 6-10).

*Significant difference from control group(p<0.05).

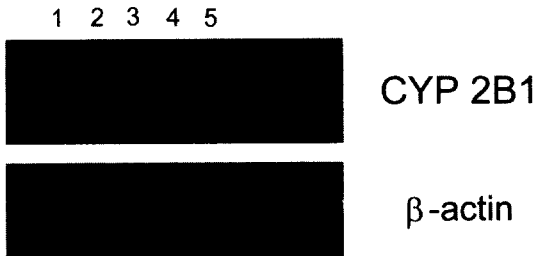


Fig. 6 – Dose response effect of DDB on CYP2B1 mRNA expression in rat liver microsome. The rats were treated with DDB 25, 50, 100 or 200 mg/kg for four days and then processed for RNA extraction and RT-PCR. Each lane represents RT-PCR products of β-actin and CYP2B1. lane 1: control, lane 2: DDB, 25 mg/kg, lane 3: DDB, 50 mg/kg, lane 4: DDB, 100 mg/kg, lane 5: DDB, 200 mg/kg

성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 24시간 후 간을 적출하여 간 microsome내 total RNA를 분리, RT-PCR을 이용하여 CYP1A1 mRNA 및 CYP2B1 mRNA 함량변화를 측정하였다.

DDB는 CYP1A1 mRNA 함량에는 영향을 미치지 않았으나 CYP2B1 유전자 발현을 유도시켰으며 DDB의 이러한 CYP2B1 유전자 발현유도 효과는 투여시간, 용량에 비례하여 3일, 200 mg/kg 투여시에 극대치를 나타내었다(Figs. 5 & 6).

7-ethoxyresorufin-O-dealkylase(EROD) 및 7-

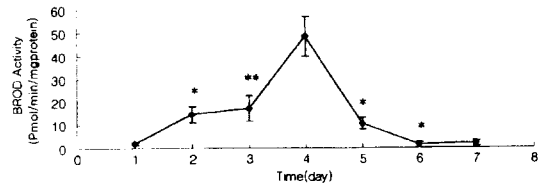


Fig. 7 – Time course effect of DDB on BROD activity in rat liver microsome. The rats were treated with DDB (200 mg/kg) for 1-7 days and then processed for microsome extraction and BROD assay. Each value represents mean ± SD(n=6-10), *Significant difference from control group(p<0.05). **Significant difference from control group(p<0.001).

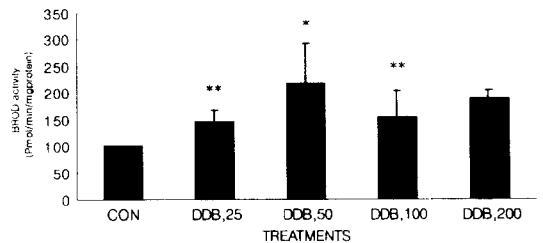


Fig. 8 – Dose response effect of DDB on BROD activity in rat liver microsome. The rats were treated with DDB 25, 50, 100 and 200 mg/kg for four days and then processed for microsome extraction and BROD assay. Each value represents mean ± SD (n=6-10) *Significant difference from control group (p<0.01). **Significant difference from control group (p<0.001).

benzyloxyresorufin-O-dealkylase(BROD) 활성 – DDB가 CYP1A1 유전자 발현에는 영향이 없었으나 CYP2B1 유전자 발현을 유도시킴에 따라 CYP1A1에 특이한 EROD와 CYP2B1에 특이한 BROD활성을 측정하였다. DDB는 EROD 활성에는 영향을 미치지 않았으나 CYP2B1에 특이한 BROD 활성을 CYP2B1 유전자 발현유도 효과와 유사하게 시간, 용량 의존적으로 증가시켜 3일, 50 mg/kg 투여시에 최대 활성을 나타내었다(Figs. 7 & 8).

고 찰

천연물에서 분리한 물질을 이용한 간손상 보호제 및 치료제 개발연구는 오래전부터 활발히 이루어져, Silybum marianum에서 분리한 silymarin,¹⁸⁾ 인진에서 분리된 capiamertemin, 오약에서 분리된 lindesterene,

승마에서 분리한 cimigenol xyloside, 시호에서 분리된 saikosaponin, 감초에서 분리된 glycyrrhizin 등 많은 물질이 사염화탄소등에 의해 유발된 간손상에 보호작용이 있음이 보고되어 있고 현재, 이러한 물질들은 간 질환 예방 및 치료제로의 개발이 시도되고 있으며 silymarin과 glycyrrhizin은 이미 시판되고 있지만, 이들 약물 대부분의 간보호작용 기전은 확실히 밝혀져 있지 않다. 간의 약물대사는 약물의 해독뿐만 아니라 독성발현에도 영향을 미치므로 약물의 간독성 보호 및 치료제 개발시 약물대사에 미치는 영향을 검토하는 것이 필수적이다.

이에 본 연구에서는 DDB가 간내 약물대사효소, cytochrome P450 isozyme 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하고 관련 효소의 활성을 측정하였다. DDB는 시간, 용량의존적으로 CYP2B1 유전자 발현을 유도시키고 CYP2B1에 특이한 7-benzoyloxyresorfin-O-dealkylase(BROD) 활성을 증가시켰다. DDB 투여에 의한 CYP2B1 유전자 발현유도는 Yan,⁸⁾ Liu등의⁹⁾ 연구와 일치하는 결과이며 Liu등의 연구에 의하면 DDB는 간의 약물대사효소, cytochrome P₄₅₀ 총량 및 glutathione-S-transferase 활성을 증가시키며 AFB₁에 의해 유발된 돌연변이 복귀에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이와 관련해서 DDB가 해독의 주 경로인 phase II 대사에 미치는 영향에 대한 검토가 필요하다고 생각된다.

본 실험에서 간독성 유발물질로 사용한 carbon tetrachloride(CCl₄)는 간내 약물대사효소, cytochrome P₄₅₀ 2E1에 의해 대사되고, 생성된 trichloromethyl radical(CCl₃·)이 지질과산화 반응을 야기하여 lipid oxy(LO), lipid peroxy(LOO)등의 free radical이 연쇄적으로 생성되고 free radical이 adduct을 형성하는등 CCl₄의 간독성 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데,¹⁹⁻²⁴⁾ free radical들은 간 microsomes의 thiol기와 강하게 결합하여 막의 지질과산화 반응을 촉진하고 간세포의 괴사와 간조직을 파괴시켜 ALT및 AST등의 효소를 혈중에 이탈시키는 것으로 알려져있다. 즉, 간세포의 괴사와 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어²⁸⁾ 높은 활성을 나타내게 되므로 혈청에서의 transaminase 활성도 측정은 간독성 연구의 가장 유용한 방법의 하나로 이용되고 있다. DDB투여에 의하여 CCl₄로 유발된 간세포체막의 lipid peroxidation이 감소된 점에서 DDB의 free

radical scavenger 가능성을 고려해 볼 수 있으며 이와 관련한 추가실험이 필요하다고 사료된다.

감사의 말씀

본 실험에 사용한 Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate(DDB)는 태림제약으로부터 제공받았으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Liu, K. T., Cresteil, T., Columelli, S. and Lesca, P.: Pharmacological properties of dibenzo(a, c)cyclooctene derivatives isolated from Fructus Schizandrae chinensis II. Induction of phenobarbital-like hepatic monooxygenases. *Chem. Biol. Interactions* **39**, 315 (1982).
- 2) Liu, K. T., Wang, G. F., Wei, H. L., Bao, T. T. and Song, Z. Y.: A comparison of the protective actions of biphenyl dimethyl-dicarboxylate, transe-silbene alcoholic extracts of Fructus Schizandrae and ganoderma against experimental liver injury in mice. *Acta Pharm. Sinica* **14**, 598 (1979).
- 3) Liu, K. T. and Lesca, P.: Pharmacological properties of dibenzo(a, c)cyclooctene derivatives isolated from Schizandrae Fructus chinensis. Interaction with rat liver cytochrome P450 and inhibition of xenobiotic metabolism and mutagenicity. *Chem. Bio. Interactions* **39**, 301 (1982).
- 4) Liu, K. T. and Lesca, P.: Pharmacological properties of dibenzo(a, c)cyclooctene derivatives isolated from Fructus Schizandrae chinensis III. Inhibitory effects on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation, metabolism and covalent binding of carbon tetrachloride to lipids. *Chem. Bio. Interactions* **41**, 39 (1982).
- 5) Yu, H. Q., Yang, X. Y. and Zao, S. J.: biphenyl dimethyl-dicarboxylate in Treating and Preventing Hepatitis due to Drug Poisoning. *Chin. Med. J.* **100**(2), 122 (1987).
- 6) 이효석, 김용태, 정현채, 윤용범, 송인성, 김정룡 : 만성 활동성 간질환 환자에서 Diphenyl Dimethyl-Dicarboxylate의 혈청 Alanine Aminotransferase치 저하효과에 관한 전향적 무작위 선정 대조 연구. *대한내과학회잡지* **40**(2), 172 (1991).

- 7) 원지은, 안상길, 차기문, 정용민, 김희섭, 차한, 박호진 : 소아의 만성 간질환 환자에서 biphenyl dimethyl-dicarboxylate의 혈청 Alanine Aminotransferase치 저하효과에 관한 전향적 대조 연구. *대한소아과 학회지* **38**(10), 1378 (1995).
- 8) Yan, L., Shanthi, R., Jeong, P., Yoo, S. H., Ning, S. M., Ma, B. L., Lee, M. J., Liu, G. T. and Yang, C. S. : Induction of liver microsomal cytochrome P-450 2B1 by biphenyl dimethyl-dicarboxylate in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* **13**(6), 485 (1992).
- 9) Liu, T. Y., Hwua, Y. S., Chao, T. W. and Chi, C. W. : Mechanistic study of the inhibition of aflatoxin b1-induced hepatotoxicity by dimethyl 4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxy biphenyl-2,2'-dicarboxylate. *Cancer Letter* **89**, 201 (1995).
- 10) Kim, S. G., Nam, S. Y. and Jung, K. H. : Enhanced effectiveness of Dimethyl-4,4'-dimethoxy 5,6,5',6'-dimethylenedioxy biphenyl-2,2'-dicarboxylate in Combination with Galic Oil against Experimental Hepatic Injury in Rats and Mice. *J. Pharm. Pharmacol* **47**, 678 (1995).
- 11) Choi, K. H., Kim, S. S., Park, Y. J., Ahn, M. R., Suh, S. K., Sheen, Y. Y., Kim, D. S. and Chang, Y. S. : Studies on effect of natural products on hepatic metabolism(II). *The Annual Report of KFDA* **1**, 487 (1996).
- 12) Trush, M. A., Mimmaugh, E. G., Ginburg, E. and Gram, T. E. : Studies on the in vitro interaction of mitomycin C, nitrofurantoin and paraquat with pulmonary microsomes. Stimulation of reactive oxygen dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 805 (1982).
- 13) Bose, R., Schnell, C. L., Pinsky, C. and Zitko, V. : Effects of excitotoxins on free radical indices in mouse brain. *Toxicol. Lett.* **60**, 211 (1992).
- 14) Johansson, I. and Ingelman-Sunberg, M. : Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Letters* **183**, 265 (1985).
- 15) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1989).
- 16) Traber, P. G., Wang, W., McDonnell, M. and Gumucio, J. J. : P450IIB gene expression in rat small intestine-cloning of intestinal P450IIB1 mRNA using the polymerase chain reaction and transcriptional regulation of induction. *Mol. Pharmacol.* **37**, 810 (1990).
- 17) Burke, M. D., Elcombe, C. R., Halpert, J. and Thompson, S. : Ethoxy-, penthoxy-, and benzyloxyphenoxazone and homologues : A series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3337 (1985).
- 18) Kitagawa, I., Fukuda, Y., Yoshida, M., Yamahura, J. and Yoshikawa, M. : *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 352 (1976).
- 19) McCay, P. B., Lai, E. K. and Poyer, J. L. : Oxygen- and Carbon-centered Free Radical Formation during Carbon Tetrachloride Metabolism. *J. Biol. Chem.* **259**(4), 2135 (1984).
- 20) Pohl, L., Schulick, R., Hight, R. and Geoge, J. : Identification of dichloromethyl carbene as a metabolite of carbon tetrachloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 367 (1983).
- 21) Johansson, I. and Ingelman-Sunberg, M. : Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Letters* **183**, 265 (1985).
- 22) Pohl, L., Schulick, R. and Geoge, J. : Reductive oxygenation mechanism of metabolism of carbon tetrachloride to phosgene by cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* **25**, 318 (1986).
- 23) Philippe, L., Claude, D. and Alain, B. E. et al. : Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharm.* **39**, 2027 (1990).
- 24) Hayes. : Principles and Methods of Toxicology. *Raben press*, 407 (1982).