

사염화탄소로 유도한 일차 배양 간세포 독성에서 Flavonoid류의 세포보호 효과

김영관 · 김양희 · 김동현 · 이경태*
경희대학교 약학대학

Cytoprotective Effects of Natural Flavonoids on Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity in Primary Cultures of Rat Hepatocytes

Young-Kwan Kim, Yang-Hee Kim, Dong-Hyun Kim, and Kyung-Tae Lee*

College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Dongdaemun-Ku, Hoegi-Dong, Seoul 130-701, Korea

Abstract – Protective effects of various natural flavonoids on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity were investigated in primary cultured rat hepatocytes. Some of these flavonoids decreased the ALT and LDH releases induced by CCl₄ in a dose-dependent manner. Neohesperidin, hesperetin, baicalin, baicalein and quercetin inhibited CCl₄-induced alanine aminotransferase (ALT) release. In addition, quercetin, quercitrin, neohesperidin, baicalin, baicalein and naringin reduced CCl₄-induced lactate dehydrogenase (LDH) leakage. Among these flavonoids, quercitrin, quercetin, baicalin and baicalein possessed potent protective effects and were selected for the further investigation on lipid peroxidation. These four flavonoids inhibited dose dependently CCl₄-induced lipid peroxidation. Especially, the protective effects of quercetin and baicalein were similar to silybin as a well-known hepatoprotective agent. These results suggest that these four flavonoids have significant cytoprotective effects and possibility of therapeutic effect on chemical-induced liver diseases.

Key words – Flavonoid, hepatocyte, carbon tetrachloride, ALT, LDH, lipid peroxidation

간은 당, 단백질, 지방 등의 물질 대사의 중심으로 체내에 들어온 생체 외물질 (xenobiotics)을 산화, 환원, 가수분해 및 포합 반응을 통해 체내로 배설하는 기능을 담당한다. 또한 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한 기관이므로 혈류를 통해서도 독성물질의 침투가 용이하게 일어날 수 있다.

간 손상의 원인으로는 알코올, 흡연 외에도 aflatoxin B₁, pyrrolizidine alkaloid, polychlorinated biphenyl (PCB), dialkylnitrosamine, dimethyl-benzanthracene, 사염화탄소 (CCl₄)등 화학물질도 간세포에 독성을 유발하는 물질로 알려져 있다.¹⁾ 간에 직접적인 장애를 일으키는 대표적인 독성 물질인 사염화탄소는 cytochrome P-450 monooxygenase의 농도가 높은 간 중심부인 중심소엽에서 삼염화탄소 라디칼로 변화하여 necrosis를 일으켜 지방간을 일으키며, 만성적 노출 시에는 간경화와 간암, 때로는 신장손상을 일으킨다.²⁾ 한국인에 있어서 만성 간 질환의 경우 암, 당뇨병과 함께 가장 발생빈도가 높은 것으로 조사되고 있고 간암에 의한 사

망물은 세계에서 최고 높은 것으로 조사되고 있다.³⁾

Flavonoid는 2-phenyl-benzo- γ -pyrone ring 구조를 공통으로 갖는 화합물로서 당과 결합하여 일반적으로 배당체로 존재한다. 간 보호 작용이 있는 것으로 알려진 silybin은 flavonoid와 phenylpropanoid가 축합되어 생성된 것으로 flavonolignan이라고 한다. Flavonoid들은 일반적으로 topoisomerase II 저해,⁴⁾ DNA replication 억제,⁵⁾ 항산화제,⁶⁾ 및 항염증 작용⁷⁾ 등도 보고되어 있다. 실제로 baicalin과 baicalein은 전립선 암 세포 및 골수종세포에서 apoptosis를 유도하는 연구가 보고되었다.^{8,9)} 최근 연구에서는 어성초에 주로 존재하는 pentahydroxyflavone인 quercetin이 쥐의 간세포에서 interleukin-1 β 에 의해 생성된 활성산소를 감소시키고, 염증 반응을 매개하는 NF- κ B의 활성화를 저해하는 것이 보고되었다.¹⁰⁾ Flavonoid와 구조가 비슷한 tectorigenin, genistein등 다른 flavonoid들도 역시 apoptosis 유도에 의한 세포사멸이 보고되고 있다.^{11,12)} 일반적으로 naringenin, hesperetin 같은 비당체 flavonoid들은 그들의 배당체 보다 강한 항산화 및 세포독성 효과를 보여주고 있다.¹³⁾

*교신저자(E-mail) : ktlee@khu.ac.kr
(FAX) : 02-961-0860

현재 생약에서 분리된 glycyrrhizin, gomisin, silymarin 및 biphenyldimethyl dicarboxylate 등이 임상적으로 만성간염 치료제로서 이용되고 있다. 생약을 중심으로 간질환 치료에 적용될 수 있는 물질을 찾는 연구는 간 질환 발병률이 높은 우리 나라를 비롯하여 일본 및 중국에서 적극적으로 행하여지고 있다.¹⁴⁾

본 실험은 천연물로부터 분리된 12종의 flavonoid들의 간 보호 효능에 대해 실험하였다. 사염화탄소로 간독성을 유도한 일차 배양 흰 쥐 간세포를 이용하여 ALT, LDH 및 지질 과산화정도를 생화학적 지표로 사용하였고 실험을 통한 결과를 바탕으로 flavonoid를 새로운 간 보호 약물의 선도 화합물로서 사용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 검색단계에서 사용된 flavonoid는 kakkalide, poncirin, diosmetin, hesperidin, neohesperidin, hesperetin, naringin, rutin, quercitrin, quercetin, baicalin, baicalein 등 12종은 경희대 김동현 교수님으로부터 받아 사용하였다.

시약 - 세포배양용 100, 60, 30 mm Petri dish 및 96 well과 6well plate 등은 Falcon사 제품을 사용하였고, collagen (C9791) 시약은 Sigma chemical Co. 것을 사용하였다. 간세포 부착 배지 (17706-029), FBS (fetal bovine serum), DMEM (12100-038), penicillin 및 streptomycin은 Gibco 것을 사용하였고 William's E media는 Biowhittaker사 제품을 사용하였다. ALT와 LDH 측정에 사용한 assay kit는 영동제약과 아산제약 것을 사용하였다.

실험동물 - 흰 쥐 (Witer, male)는 160~180 g 정도를 한 립실험동물로부터 충분한 사료와 일정한 조건 (온도: $20 \pm 5^\circ\text{C}$, 습도: $60 \pm 5\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 일주일 정도 적응시켰다. 180~200 g 정도되면 12시간 이상 절식시킨 후 공복상태가 되도록 하여 사용하였다.

일차 배양 간세포의 분리 - Seglen¹⁵⁾ 등에 의한 방법을 응용하여 두 단계 collagenase perfusion 방법으로 흰 쥐 간세포를 분리하였다. 간세포 분리에 사용한 모든 수술기구와 도구들은 하루 전날 멸균, 건조한 후 사용하고 콜라겐 (0.3 mg/ml, 0.2% acetic acid)으로 4°C 에서 하룻밤 동안 코팅한 60 ml dish도 미리 준비해 놓는다. 우선 12시간 절식시킨 200 g 정도의 흰 쥐를 마취시킨 후 복부 부위를 70% 알코올을 뿌려주고 거즈 등으로 깨끗이 닦고 복부 중앙선과 옆선을 따라 먼저 외피부를 절개한다. 간을 적출하기 복부를 적당하게 개방하고 cannulation할 간문맥을 고정시켜둔다. 22 G catheter를 정맥에 꽂고, 37°C 정도의 washing solution으로 perfusion하면서 일차적으로 간 내 혈액을 제거하고 (5~10분, 20 ml/min 속도) posterior vena cava를 절개하여 perfusion액이 간 주위를 오염시키지 않으면서 흘러나오게 하

면서 간을 충분히 세척 해준다. 다음 37°C 정도의 collagenase solution으로 바꾸어 15~20 ml/min의 속도로 perfusion하고 간세포가 일부 digestion한 모습이 보이면 perfusion을 중단한다. 간을 조심스럽게 복부로부터 분리해내어 ice chamber 위에 놓인 petri dish에 놓는다. 멸균 벤치에서 떼어낸 간 조직 중 불필요한 부분과 막을 제거하고 간 조직을 멸균된 칼을 이용하여 완전히 부순 다음 DMEM배지를 떨어뜨리면서 넣어주고 끝을 자른 피펫으로 서서히 저어주면서 간세포가 용출되어 나오도록 하였다. 이 간 세포액을 거즈로 여과하여 여액을 ice chamber 위에 놓인 비이커에 모은 뒤 4°C 에서 500 rpm으로 2분 원심분리하여 세포를 수집하였다. DMEM 배지로 같은 조작으로 두 번 더 세척한 다음 수집된 세포를 DMEM 배지로 resuspension하고 이 액 0.1 ml에 동량의 0.4% trypan blue를 가하여 hemocytometer로 viability를 확인하여 80% 이상의 것만 사용하였다.

세포 배양 및 약물처리 - 분리한 간세포는 적당한 세포 농도로 콜라겐으로 코팅된 culture dish에 넣고 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 함유한 간세포 부착 배지에서 4시간 배양하여 dish에 부착시켰다. 배지를 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 함유한 William's E media로 교체하고 24시간 배양한 뒤 약물을 전처리하고 10 mM 사염화탄소로 세포 독성을 유도하여 실험하였다. 세포는 95% air, 5% CO_2 를 함유하며 37°C 를 유지하는 incubator에서 배양하였다.

세포배양액에서 ALT와 LDH 활성 측정 - 간세포는 5×10^5 세포/ml로 6 well에 3 ml씩 seeding하여 24시간 배양한 후 새로운 배지로 갈아주고 약물을 1시간 전처리 한 뒤 1 mM 사염화탄소를 필요한 시간만큼 처리하고 각각의 medium을 취하여 영동제약과 아산제약의 assay kit를 이용하여 ALT와 LDH 활성을 측정하였다. 대조 약물로는 현재 간 보호 작용이 있는 것으로 알려진 silybin을 사용하였다.

지질과산화 (lipid peroxidation) 측정 - 간세포를 2.5×10^5 세포/ml 농도로 6 ml culture dish에 5 ml씩 seeding하여 24시간 배양한 후 새로운 배지로 갈아주고 약물을 1시간 전처리 한 뒤 1 mM 사염화탄소를 필요한 시간만큼 처리하고 배지를 걷어내고 cold PBS로 2번 세척한 뒤 cold PBS를 넣고 scrapper로 세포를 모아 2000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 세포를 모은 뒤 단백질 정량 및 thiobarbituric acid를 사용하여 형성된 malonaldehyde (MDA)를 532 nm에서 측정하였다.

결 과

혈청학적 지표에 의한 간 보호 효과 - Lactate dehydrogenase (LDH)는 lactate를 pyruvate로 전환하는 효소이다. 세포에 이상이 있을 경우 세포 외로 유출되어 배지 중에서 증

가하게 된다. Alanine aminotransferase (ALT)는 간세포에 특이적으로 존재하는 아미노산 합성 효소로 간 손상에 의해 세포막이 파괴되면 세포 외로 유출되어 수치가 상승하게 된다. 간세포에 손상이 생기면 배지 중으로 유리되는 이들 효소의 양이 증가하게 되고, 간세포 보호작용이 있는 약물은 유리된 이들 효소의 양을 감소시킨다.

천연으로부터 분리된 12종의 flavonoid에 대한 간세포 독성 보호 효과를 사염화탄소로 독성을 유도한 일차 배양 흰쥐 간세포를 이용하여 배지로 유도되는 ALT와 LDH 정도를 측정하여 검색해 보았다. ALT 측정에서는 neohesperidin과 hesperetin, baicalin 등이 10 mg/ml 농도의 약물 처리시 30~40%의 저해 효과를 보였고, baicalein과 quercetin은 1 mg/ml 농도에서 30~40% 저해 효과를 보여 대조약물인 silybin과 유사한 저해 효과를 나타냈다(Table I). LDH에 대한 실험에서는 quercetin이 1 mg/ml의 농도에서 30%의 저해 효과를 보였고, neohesperidin, baicalin, baicalein, naringin, 그리고 quercitrin은 10 mg/ml 농도의 약물 처리에서만 30~42%의 LDH를 저해하는 효과를 보였(Table I). Neohesperidin, baicalin, baicalein, quercitrin과 quercetin 등은 ALT와 LDH 모두 뚜렷한 저해 효과를 나타냈고, 이들 중 배당체와 비당체 모두 효과를 보인 baicalin, baicalein, quercitrin과 quercetin을 이용하여 지질과산화 억제 실험을 하였다.

지질과산화 억제 효과 - 사염화탄소의 독성은 특징적으로 세포막을 파괴하고 칼슘의 항상성을 깨뜨려 세포의 괴

사를 초래하는 기전을 가지고 있다.¹⁶⁾ 세포막 파괴에 의해 유리된 불포화 지방산의 매개에 의해 세포막에 결합되어 있는 효소인 NADPH oxidase가 활성화되어 superoxide를 생성한다. 이 superoxide는 세포 내 항산화 효소에 의한 연쇄 반응을 거쳐 hydroxyl radical을 형성하고 지질과산화를 유도하여 최종 산물인 malonedialdehyde (MDA)를 생성한다. 이런 지질과산화의 억제는 곧 MDA 형성의 감소와 관련되고 간세포 보호작용이 있다는 것을 의미한다고 알려져 있다.¹⁷⁾

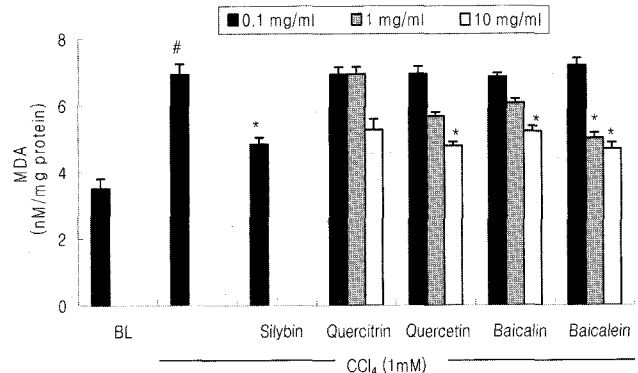


Fig. 1. Anti-lipid peroxidation effects on primary rat hepatocytes treated with CCl₄.

Each data represents the mean±S.E.

[#]Significantly different from blank at *p*<0.05, ^{*} Significantly different from CCl₄ at *p*<0.05 by Student's *t*-test.

Table I. Effect of flavonoids on the activities of ALT and LDH released from hepatocytes treated with CCl₄

Compound	mg/ml	ALT release (%)			LDH release (%)		
		0	1	10	0	1	10
CCl ₄ +			100.00±18.1 [#]			100.00±34.5	
Kakkalide		106.21±8.3 ¹⁾	92.00±12.0	95.77±16.8	92.26±14.6	77.07±31.7	82.36±48.5
Poncirin		91.07±13.3	95.98±11.9	82.20±11.2	91.03±9.9	102.30±7.30	107.08±42.6
Diosmetin		100.35±9.3	91.07±12.4	77.28±12.4	95.89±30.5	87.90±30.1	95.57±19.5
Hesperidin		104.48±4.8	99.47±20.6	82.00±10.8	95.82±46.0	95.87±28.5	89.82±63.8
Neohesperidin		89.98±14.4	86.22±18.6	60.35±8.2 [*]	104.9±36.3	78.90±53.3	58.30±35.6
Hesperetin		97.88±17.9	83.80±25.2	61.44±3.8 [*]	89.37±20.9	97.87±38.4	74.86±24.5
Baicalin		100.59±19.6	84.24±18.1	68.19±14.0 [*]	99.81±20.3	79.01±58.1	65.19±18.8
Baicalein		91.09±8.8	67.86±15.5 [*]	65.53±13.2 [*]	99.64±19.2	78.56±65.2	61.01±11.8
Naringin		93.54±12.2	88.90±14.8	66.75±4.5 [*]	100.70±64.3	87.25±36.5	70.33±14.2
Rutin		109.76±11.2	75.43±15.9	70.41±7.4 [*]	91.51±13.8	91.41±60.3	72.60±46.3
Quercitrin		97.61±18.3	86.74±11.5	61.16±4.5 [*]	104.49±38.9	93.64±30.2	66.39±37.5
Quercetin		88.40±15.0	68.88±4.3 [*]	61.47±16.5 [*]	86.43±29.7	71.96±23.6	61.07±40.8
Silybin		-	-	62.12±3.5 [*]	-	-	66.03±21.8

1 mM of CCl₄ was treated at cells

¹⁾ values are the mean±S.E.

[#]Significantly different from blank at *p*<0.05, ^{*} Significantly different from CCl₄ at *p*<0.05 by Student's *t*-test.

실제로 quercetin과 baicalin이 독성을 유발한 쥐의 간에서 보호효과를 갖는다는 연구가 다양하게 보고 되었다.¹⁸⁾ Dimethylnitrosamine에 의해 손상을 입은 쥐에게 quercetin을 투여하였을 때 ALT의 유리를 억제하고 bilirubin을 감소한다는 연구도 보고 되었다.¹⁹⁾ Scutellariae Radix에서 분리한 baicalin이 아세트아미노펜에 의한 간독성을 저해하는 보고도 발표되었다.²⁰⁾

배당체와 비당체 모두 효과를 보인 quercitrin과 quercetin 그리고 baicalin과 baicalein을 가지고 일차 배양 세포를 이용하여 지질과산화 정도를 측정하였다. 1 mM 사염화탄소로 유도된 간 독성에 대해 quercetin 및 baicalein은 1 mg/ml 농도에서 각각 18% 및 28%의 MDA 형성을 저해하는 효과를 보였다. 10 mg/ml 농도에서 quercitrin 및 baicalin은 모두 24% 정도 지질과산화를 각각 저해하는 것으로 나타났고, 배당체 구조인 quercetin 및 baicalein은 모두 30% 정도 저해 효과를 나타내 대조 약물인 silybin과 유사한 효과를 얻었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 flavonoid는 배당체인 quercitrin과 baicalin보다 비당체 구조인 quercetin과 baicalein이 더욱 뚜렷한 저해 효과가 있음을 알 수 있었다.

결론 및 고찰

새로운 간 보호 약물을 검색하기 위해 사염화탄소로 독성을 유도한 일차 배양 흰 쥐 간세포를 이용하여 flavonoid들의 간 보호 효과를 보았다. 실험에 사용한 12종의 flavonoid 중 hesperidin, neohesperidin, hesperetin, naringin, rutin, quercitrin, quercetin, baicalin, baicalein 등은 모두 농도 의존적으로 독성 저해 효과를 나타냈다. ALT측정에서는 baicalein과 quercetin이 가장 좋은 효과를 나타냈으며, neohesperidin, baicalin 및 hesperetin 등도 효과를 보이는 것으로 나타났다. LDH에 대한 실험에서는 역시 quercetin이 가장 좋은 저해 효과를 보였고, neohesperidin, baicalin, baicalein 그리고 quercitrin 등도 효과를 보였다. 그 중 배당체와 비당체 모두 뚜렷한 효과를 나타내는 quercitrin과 quercetin, 그리고 baicalin과 baicalein을 선별하였다.

세포 내 항산화적 방어력 감소에 의해 야기되는 지질 과산화는 체외 독성물질이나 약물에 의한 간 손상 발생의 기전으로 인정된다. 반응성이 큰 과산화물들의 유리기는 체내 단백질 또는 아미노산과 반응하여 기능을 파괴시키거나 다른 물질들과 결합을 형성하여 조직에서 세포막의 변화를 일으킬 뿐만 아니라 효소활성의 감소 및 DNA손상과 퇴행성 장애를 일으킨다. 사염화탄소가 유발하는 지질 과산화에 대해 quercitrin과 quercetin 그리고 baicalin과 baicalein을 사용하여 측정한 결과 비당체 구조인 quercetin과 baicalein이 1 mg/ml 농도에서 36%과 56%의 MDA 형성을 저해하는 효과를 보였으며, quercitrin과 baicalin은 10 mg/ml 농도에서

약 30% 정도 지질과산화를 저해하는 것으로 나타났다. 배당체와 비당체간 활성을 비교해 보았을 때 비당체 구조가 사염화탄소에 의한 간세포 독성을 저해하는데 더욱 효과적이었다. 이러한 결과를 바탕으로 사염화탄소에 의해 유도된 간세포 독성을 flavonoid 물질이 효과적으로 저해하였으며, 간 보호 효과를 가지는 새로운 약물로서 이용될 수 있는 가능성을 제시한다.

인용문헌

- Hikino, H. (1985) Antihepatotoxic activity of crude drugs. *Yakugaku Zasshi* **105**: 109-118.
- Gilman, A. G. (1985) Carbon tetrachloride. *The pharmacological basis of therapeutics* **7**: 1635-1636.
- 보건복지부 통계자료 (2002).
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J. M., Le Pecq, J. B., and Larsen, A. K. (1989) Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* **49**: 5111-5117.
- Tricoli, J. V., Sahai, B. M., McCormick, P. J., Jarlinski, S. J., Bertram, J. S., and Kowalski, D. (1985) DNA topoisomerase I and II activities during cell proliferation and the cell cycle in cultured mouse embryo fibroblast (C37 10T 1/2) cells. *Exp. cell. Res.* **158**: 1-14.
- Gao, Z., Huang, K., Yang, X., and Xu, H. (1999) Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim. Biophys. Acta.* **1472**: 643-650.
- Middlelton, Jr. E., and Kandaswarni, C. (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacol.* **43**: 1167-1179.
- Miocinovic, R., McCabe, N. P., Keck, R. W., Jankun, J., Hampton, J. A., and Selman, S. H. (2005) *In vivo* and *in vitro* effect of baicalein on human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **26**: 241-246.
- Gu, Z. Q., Sun, Y. H., Xu, C. L., and Liu, Y. (2005) Study of baicalin in inducing prostate cancer cell line DU145 apoptosis *in vitro*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **30**: 63-66.
- Martinez-Florez, S., Gutierrez-Fernandez, B., Sanchez-Campos, S., Gonzalez-Gallego, J., and Tunon, M. J. (2005) Quercetin attenuates Nuclear Factor- κ B activation and nitric oxide production in Interleukin-1 β -activated rat hepatocytes. *J. Nutr.* **135**: 1359-1365.
- Lee, H. U., Bae, E. A., and Kim, D. H. (2005) Hepatoprotective effect of tectoridin and tectorigenin on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *J. Pharmacol. Sci.* **97**: 541-544.
- Liu, Y., Zhang, Y. M., Song, D. F., and Cui, H. B. (2005) Effect of apoptosis in human breast cancer cells and its probable mechanisms by genistein. *Wei Sheng Yan Jiu.* **34**: 67-69.

13. Ratty, A. K. and Das, N. P. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochem. Mod. Metab. Biol.* **39**: 69-79.
14. 일양약품 등(1993) 고등균류로서 간장질환치료제의 개발.
15. Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolation rat liver cell. *Methods cell Biol.* **13**: 29-83.
16. Albano, E., Carini, R., Parola, M., Bellomo, G., Gorla-Gatti, L., Poli, G., and Dianzani, M. U. (1989) Effects of carbon tetrachloride on calcium homeostasis: A critical reconsideration. *Biochemical Pharmacol.* **38**: 2719-2725.
17. Bataller, R., Schwabe, R. F., Choi, Y. H., Yang, L., Paik, Y. H., Lindquist, J., Qian, T., Schoonhoven, R., Hagedorn, C. H., Lemasters, J. J., and Brenner, D. A. (2003) NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**:1383-1394.
18. Gilani, A. H., Janbaz, K. H., and Shah, B. H. (1997) Quercetin exhibits hepatoprotective activity in rats. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: S619.
19. Lee, E. S., Lee, H. E., Shin, J. Y., Yoon, S., and Moon, J. O. (2003) The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **55**:1169-1174.
20. Jang, S. I., Kim, H. J., Hwang, K. M., Jekal, S. J., Pae, H. O., Choi, B. M., Yun, Y. G., Kwon, T. O., Chung, H. T., and Kim, Y. C. (2003) Hepatoprotective effect of baicalin, a major flavone from *Scutellaria radix*, on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **25**: 585-594.
21. Glende, E. A. and Recknagel, R. O. (1992) Phospholipase A₂ activation and cell injury in isolated rat hepatocytes exposed to bromotrichloromethane, chloroform, and 1, 1-dichloroethylene as compared to effects of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **113**: 159-162.

(2005년 7월 20일 접수)