J. Fd Hyg. Safety 14(2), 179–185 (1999)

홍화자 분획물이 사염화탄소 유발 간손상 흰쥐에서 지질과산화와 oxygen free radical 제거 효소 활성도에 미치는 영향

정기화† · 정춘식 · 정정숙
덕성여자대학교 약학대학 약학연구소

Effect of Subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on the Lipid Peroxidation and Oxygen Free Radical Scavenging Enzyme Activities in CCl_4-induced Hepatotoxic Rats

Ki-Wha Jung†, Choon-Sik Jeong and Jeong-Suk Jeong
Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

ABSTRACT – Previous studies have shown that methanol extract and its butanol fraction of *Carthamus tinctorius* L. Semen have the hepatoprotective effect on the CCl_4-induced hepatotoxicity. The hepatoprotective effect of the subfractions of butanol fraction has been evaluated by analyzing oxygen free radical scavenging enzyme activities and histopathological examinations. In BS-5 subfraction treated group, the activity of superoxide dismutase has been significantly increased as compared with that of CCl_4 treated rats. Antioxidant activity has been evaluated by the examination of the scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. BS-5 subfraction has shown strong antioxidant activities. The histopathological examination showed that the treatment of BS-5 subfraction has relieved the ballooning degeneration of hepatocytes which had been generated by CCl_4. It appears that the protective effect of BS-5 subfraction would be mediated of the attenuation of lipid peroxidation by acting as a free radical scavenger, which were based on the increase of superoxide dismutase activity.

Key words □ *Carthamus tinctorius* L. Semen, Hepatoprotective effect, CCl_4, Hepatotoxicity, Malondialdehyde, Superoxide dismutase, Free radical scavenger, Lipid peroxidation

1996년 통계청 사망 원인 통계 연보를 보면 인구 10만 명당 남성의 간암 사망률은 33명으로서 세계에서 가장 높고, 만성 간질환으로 인한 사망률도 인구 10만 명당 44명으로 매우 높은 것으로 나타나고 있다. 특히 우리 나라에서 문제가 되고 있는 만성 간질환으로는 B형 간염과 점차 중요도를 더해가고 있는 C형 간염, 알코올성 간질환, 간경변증 및 간암 등이 있다.

간세포를 비롯한 생체내 세포는 free radicals에 의한 지질과산화에 대해 방어 기전을 가지고 있다. 지질과산화 현상은 세포막의 주요 구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화 지방산이 활성산소와 결합함으로써 시작된다. 지질과산화 반응으로 인하여 세포막을 구성하는 인지질은 알코올, 케톤 및 알데히드 등으로 분해되어 세포막의 정상적인 작용을 상실하게 된다. 이들 분해 산물은 효소의 활성을 억제하며, 세포 괴사 및 미세 혈관 병변 등의 원인으로 알려져 있다.

지질과산화를 통해 세포 독성을 일으키는 화학 물질로는 사염화탄소 (CCl_4), 클로로포름, 에탄올, 브로모벤젠 등이 있다. 생체 내로 유입되는 이러한 화학 물질들에 의해 생성된 free radicals는 지질과산화, 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴 등 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있으나,[1,2] 조직은 내인성 제거제를 함유하고 있어서 free radicals에 의한 손상을 방어한다.[3]

이러한 내인성 free radicals 제거제 중 superoxide radical 제거제로서 superoxide dismutase가 있다. Superoxide dismutase는 두 개의 superoxide anion radicals를 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 산소로 전환시키는데 촉매작용을 함으로써[4,5] superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적

†Author to whom correspondence should be addressed.

손상에 대해 세포를 방어한다.[6]

CCl_4는 phase I 약물 대사 효소 중 산화 반응에 관련하는 효소인 cytochrome P450과 NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해서 하나의 전자가 reductive dehalogenation되어 trichloro-methyl radical ($\cdot CCl_3$)을 만든다. Trichloromethyl radical은 O_2분자와 결합하여 trichloromethyl peroxy radical ($\cdot OOCCl_3$)을 생성한다. Trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals는 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격해서 지질과산화를 야기하여 간세포 괴사를 일으킨다.[7,8]

홍화자 (*Carthamus tinctorius* L. Semen)는 홍화의 씨로서 관상 동맥 확장 및 혈압을 낮추는 작용이 있으며 고콜레스테롤혈증을 개선시키고 혈전을 치료하는 효과가 있다고 보고되었다.[9] 또한 최근에 민간에서는 골절 및 골다공증의 예방제로 사용되고 있다.

홍화자에는 다른 종자와 마찬가지로 단백, 지방 및 탄수화물이 다량 함유되어 있으며, 특히 지방산에 있어서는 linoleic acid가 70%나 된다고 보고되었다.[10] 홍화자로부터 홍화유를 추출하고 남은 잔여물에서 항산화 효과가 있는 serotonin 유도체에 대한 보고도 있었다.[11,12] 또한 홍화자의 성분에는 linoleic acid 및 oleic acid 등의 불포화 지방산뿐만 아니라 flavonoids도 다량 함유되어 있다. Flavonoids는 다양한 작용이 보고되고 있고 중요한 생리 활성 물질로 인식되고 있으며 특히 지질과산화의 초기 단계에서 free radicals를 포획한다. 이러한 free radicals의 제거는 간세포 보호 작용에 중요한 역할을 한다.

따라서, 본 연구에서 CCl_4로 유발된 간손상에 대하여 유효한 효과를 나타내었다고 보고된[13] 홍화자 분획물의 간보호 효과에 대한 기전을 규명하고자 지질과산화에 미치는 영향을 malondialdehyde의 양과 superoxide dismutase 활성도를 측정하고 in vitro에서 free radical scavenging 작용을 측정하였으며, 조직병리학적 분석을 통해 간보호 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 홍화자는 경동 시장 내 한약건재상으로부터 구입하였다.

시약

Carbon tetrachloride (Duksan pharmaceutical Co., Korea), *carduus marianus* ext., Tris-acetate, EDTA, Tris base, glycerol, foline ciocalteu's phenol reagent, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, xanthine, cytochrome c, xanthine oxidase, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, L-ascorbic acid (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA), xylene (Yakuri pure chemicals. Co., Ltd., Japan), hematoxylin (Fischer scientific Co., USA), eosin (Merch Co.), silica gel (Kieselgel 60, 70~230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734), TLC plate (Kieselgel 60, F_{254}, precoated, Merck, Art. 5714), anisaldehyde H_2SO_4 reagent, $FeCl_3$ reagent를 사용하였으며, 기타 시약 및 추출 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

기기

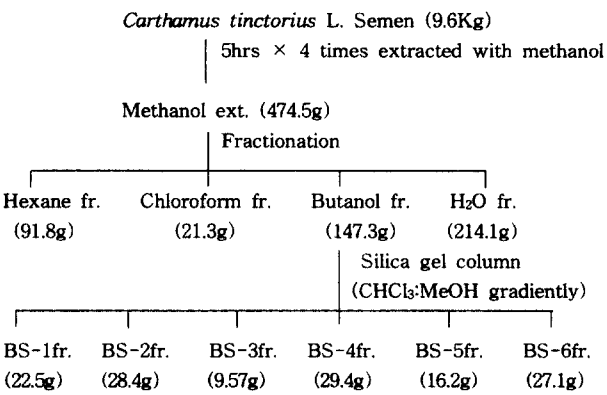
High speed centrifuge (DuPont Sorvall instrument, Model RC 5C), ice maker (Welbilt Co. USA), micropipette (Gilson medical electronics, France), UV-spectrophotometer (Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), ultracentrifuge (Beckman Co., Lid. L-80), osterizer blender (Oster Co., Listed 564A Household type), autotechnicon (Shandon Citadel 2000), microscope (Olympus optical., Ltd.)를 사용하였다.

홍화자의 추출 및 분획

잘 건조된 홍화자를 Scheme 1과 같이 methanol로 수욕상에서 5시간씩 4회 추출한 후 온시 여과하고, 여액을 감압 농축하였다. Methanol 추출물은 hexane, chloroform, butanol 및 H_2O 가용부로 계통적으로 분획하고 각 분획물은 감압 농축하였다.

유효 성분의 분리

홍화자 butanol 분획물을 methanol에 용해시키고 silica gel로 coating하였다. 이 분말을 silica gel를 충진시킨



Scheme 1. Fractionation of *Carthamus tinctorius* L. Semen

silica gel column에 넣고 chloroform과 methanol 혼액으로 gradient elution (0% → 100%) 하였다. 용출액은 thin layer chromatography를 실시하여 TLC 상에서 UV lamp로 관찰하여 같은 Rf값을 나타내는 분획을 합하여 6개의 subfraction을 얻었다 (BS-1 fraction ~ BS-6 fraction).

실험 동물 처치

체중 150~250 g의 Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐를 22±2℃에서 2주 이상 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였고 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

흉화자 각 분획물은 수득율에 따라 0.5% CMC 액에 현탁하여 3일간 경구투여 하였다. CCl_4는 corn oil을 vehicle로 하여 0.4 ml/kg용량으로 약물 최종 투여 3시간 후에 복강 투여하고 18시간 가량 절식시켜 간손상을 유발시켰다.

Microsome 및 cytosol 분리

약물 최종 투여 24시간 후 적출한 간조직을 생리식염수로 씻고 세절한 후 3배 용량의 0.1 M Tris-KCl buffer (0.1 M Tris acetate, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 with Tris base)를 가하고 osterizer blender를 이용하여 조직을 마쇄하였다. 마쇄된 조직은 high speed centrifuge로 8,000 g에서 30분, 10,000 g에서 90분간 초원심분리시켜 상징액인 cytosol을 분리하였다. 상징액인 cytosol을 취하고 남은 침전인 microsome을 0.1 M sodium pyrophosphate buffer (0.1 M sodium pyrophosphate와 1mM EDTA)에서 재혼화하여 100,000 g에서 60분간 다시 초원심분리하여 세척한 후 microsome을 얻었다. 얻어진 microsome을 50 mM Tris acetate buffer (50 mM Tris acetate, 20% glycerol, pH 7.4 with Tris base)에 재분산시킨 후 분주하여 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. 모든 조작은 4℃ 이하에서 실시하였다.

단백정량

희석된 microsome 및 cytosol 0.6 ml에 0.5 ml Lowry complex (0.2 ml 4% sodium potassium tartarate, 0.2 ml 2% copper sulfate와 10.0 ml의 4% sodium bicarbonate / 0.2 N sodium hydroxide 용액을 사용 직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼화하였다. 15분 후 0.1 ml의 folin ciocalteou's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분간 방치하고, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 얻었다.[14]

지질과산화물 측정

Microsome 0.5 ml에 1% H_3PO_4, 0.67% thiobarbituric acid 시약을 가한 후 95℃에서 45분간 진탕한 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 ml를 가해서 진탕 추출한 후 원심분리하여 butanol 층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다.[15]

Superoxide dismutase 활성 측정

Superoxide dismutase는 xanthine-xanthine oxidase assay에 의해 활성도를 측정하였다. 2.9ml의 혼합용액 (5 μ mol xanthine, 2 μ mol cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8)을 cuvette에 넣은 후 50 μl의 cytosol을 첨가하여 1~2분간 기준선을 설정한 다음 0.1 mM EDTA 용액에 약 0.2U/ml의 xanthine oxidase를 함유하는 용액 50 μl을 첨가하여 반응을 시작함과 동시에 550 nm에서 흡광도 증가 속도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 이때의 cytochrome c의 분자흡광계수는 $21 mM^{-1}cm^{-1}$로 환산하여 계산하였다.[16]

*In vitro*에서의 항산화 효과 측정

1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 흉화자의 각 분획물에 methanol을 가하여 120, 80, 40, 20, 10, 5 및 2.5 μg/ml의 농도가 되도록 조제하고 4 ml씩 시험관에 취했다. 여기에 1.5×10-4 M 1, 1-diphenyl-2-picryl- hydrazyl / methanol 용액 1 ml를 가한 다음 잘 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 효과는 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical을 50% 제거하는 농도 (EC_{50})로 표시하였고, 양성대조약물로 L-ascorbic acid를 사용하였다.[17]

조직병리학적 분석

약물 최종 투여 24시간 후 적출한 간조직을 두께 약 0.2 mm정도로 자른 후 비응고형 고정제 (변성형 고정제)인 10% formalin 용액을 채운 유리 vial에 넣어 4℃에서 24시간 방치하였다.

세포가 충분히 고정된 후 조직 내에 남아 있는 고정액은 흐르는 수돗물에 충분히 수세하였다. 각 군의 조직을 auto-technicon을 사용해서 투명 및 침투 과정을 하였다. 과정은 다음과 같다.

70% ethanol (1시간) → 80% ethanol (1시간) → 95% ethanol (1시간) → 95% ethanol (1시간) → 95% ethanol (2시간) → 100% ethanol (2시간) → xylene (1시간) →

xylene (2시간) → paraffin (2시간)

일정 모양의 paraffin block을 만들기 위해 embedding center (Lipshaw)를 사용하였다. Paraffin 침투 과정이 끝난 조직을 paraffin warming chamber에 넣고 base mold에 paraffin을 채운 후 조직을 안착시키고 cryoplate에 올려놓고 굳은 후 base mold를 떼어놓았다.

Paraffin block을 박절기에서 4 μm 두께로 자른 후 슬라이드 글라스 위에 올려 60°C hot plate에서 건조 부착시켰다.

절편이 부착된 슬라이드 글라스를 60°C의 oven에 넣어 조직 이외의 paraffin을 녹이고 xylene에서 10분씩 3회 처리한 후 100%, 95%, 80% 및 70% ethanol 순으로 2회씩 2분간 처리하여 함수 시켰다. H&E염색은 함수과정 후 탈이온수에서 10분간 처리한 후 Harris's hematoxylin으로 염색하였다. 흐르는 상수로 세척하고 95% ethanol로 8분 동안 처리한 후, 0.5% eosin으로 2분 동안 염색하였다. 95%와 100% ethanol로 탈수한 후 말리고 xylene으로 처리한 후 밀봉하였다. 모든 검경은 100배율로 하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 p값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

지질과산화물에 미치는 영향

세포막의 인지질은 free radical의 공격에 의해서 oxygen centered lipid peroxyl radical을 거쳐 carbon centered lipid endoperoxide radical 및 lipid endoperoxide로 된 후 분해되어 malondialdehyde를 생성하게 되므로 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 된다.[18]

홍화자 butanol subfractions의 CCl_4로 유발된 간손상에 대한 방어 기전을 확인하기 위하여 간 microsome 중 malondialdehyde를 측정한 결과 CCl_4 투여군은 1.68±0.10 nmol/mg protein이었으며 홍화자 BS-1, BS-2 및 BS-6 분획투여군을 제외한 홍화자 subfraction 투여군에서 감소되었다. 홍화자 BS-3 분획투여군과 양성대조군은 각각 1.42±0.10 nmol/mg protein과 1.02±0.04 nmol/mg protein으로 CCl_4 투여군과 비교할 때 유의성 있게 감소되었다(Table 1).

본 실험에서 홍화자 BS-3, BS-4, BS-5 분획투여군의 malondialdehyde 감소는 CCl_4의 대사에 의해 생긴 free radicals의 지질과산화 형성이 감소된 것으로 생각된다.

Superoxide dismutase 활성에 미치는 영향

Superoxide dismutase는 metalloenzyme으로서 함유되어 있는 Cu, Zn, Mn 및 Fe 같은 금속 이온의 종류에 따라 구분하며 superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 효소로 알려져 있다.[6]

홍화자 butanol subfractions의 CCl_4로 유발된 간손상에 대한 방어 기전을 확인하기 위하여 간 cytosol 중 superoxide dismutase 활성도를 측정한 결과 CCl_4 투여군은 7.17±1.32 Unit/mg protein이었으며 홍화자 BS-1과 BS-2 분획투여군을 제외한 홍화자 subfraction 투여군에서 증가되었다. 홍화자 BS-4, BS-5, BS-6 분획투여군 및 양성대조군은 각각 13.12±2.64 Unit/mg protein, 13.74±1.85 Unit/mg protein, 11.03±1.31 Unit/mg protein 및 11.67±3.15 Unit/mg protein으로 CCl_4 투여군과 비교할 때 유의성있게 증가되었다(Table 1).

Table 1. Effects of subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on malondialdehyde level and superoxide dismutase activity in CCl_4 treated rats

Treatment	Dose(mg/kg, p.o.)	MDA(nmol/mg protein)	% Change	SOD(Unit/mg protein)	% Change
Untreated	-	1.07±0.03	-	10.79±0.68	-
CCl_4	-	1.68±0.10	100	7.17±1.32	100
BS-1 fr.+CCl_4	100	2.35±0.21	140	4.10±1.38	57
BS-2 fr.+CCl_4	100	2.17±0.79	129	6.01±2.56	84
BS-3 fr.+CCl_4	50	1.42±0.10**	85	10.18±6.62	142
BS-4 fr.+CCl_4	100	1.64±0.04	97	13.12±2.64*	183
BS-5 fr.+CCl_4	65	1.64±0.07	97	13.74±1.85**	192
BS-6 fr.+CCl_4	100	1.99±0.01	119	11.03±1.31*	154
CM ext.+CCl_4	150	1.02±0.04**	61	11.67±3.15*	163

The values are mean±S.D. (n=6). Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.4 ml/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours after the last treatment with the agent. Rats were sacrificed for the assay at 24 hours after the final agent treatment. *, Significantly different from the CCl_4 treated rats (Student's t-test, $p<0.05$). **, Significantly different from the CCl_4 treated rats (Student's t-test, $p<0.01$). CM, *Carduus marianus*; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase.

Table 2. Radical scavenging effects of BS-5 fraction of *Carthamus tinctorius* L. Semen on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

Samples	EC_{50} (μg)
BS-5 fraction	28.54
Carduus marianus ext.	26.88
L-Ascorbic acid	13.13

The values indicate 50% decrease of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

본 실험에서 홍화자 BS-4, BS-5, BS-6 분획투여군의 superoxide dismutase 활성도가 CCl_4 투여군과 비교할 때 증가한 것은 CCl_4의 대사에 의해 생긴 free radicals의 지질과산화에 대한 방어 작용으로서 superoxide dismutase의 활성도가 증가되는 것으로 생각된다.

*In vitro*에서의 항산화 효과

홍화자 butanol subfractions 중 CCl_4로 간손상을 유발시킨 흰쥐에서의 malondialdehyde 감소와 superoxide dismutase의 활성도 증가를 뚜렷하게 나타낸 BS-5 분획물의 in vitro에서의 직접적인 free radical scavenging효과를 측정하고자 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 제거 활성을 측정하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical을 50% 제거하는 EC_{50}은 BS-5 분획물과 *Carduus marianus* ext.이 각각 28.54 μg와 26.88 μg으로 높은 항산화 활성을 나타내었다 (Table 2).

각 농도에 따른 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 제거 활성을 비교해 보면 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타내었다.

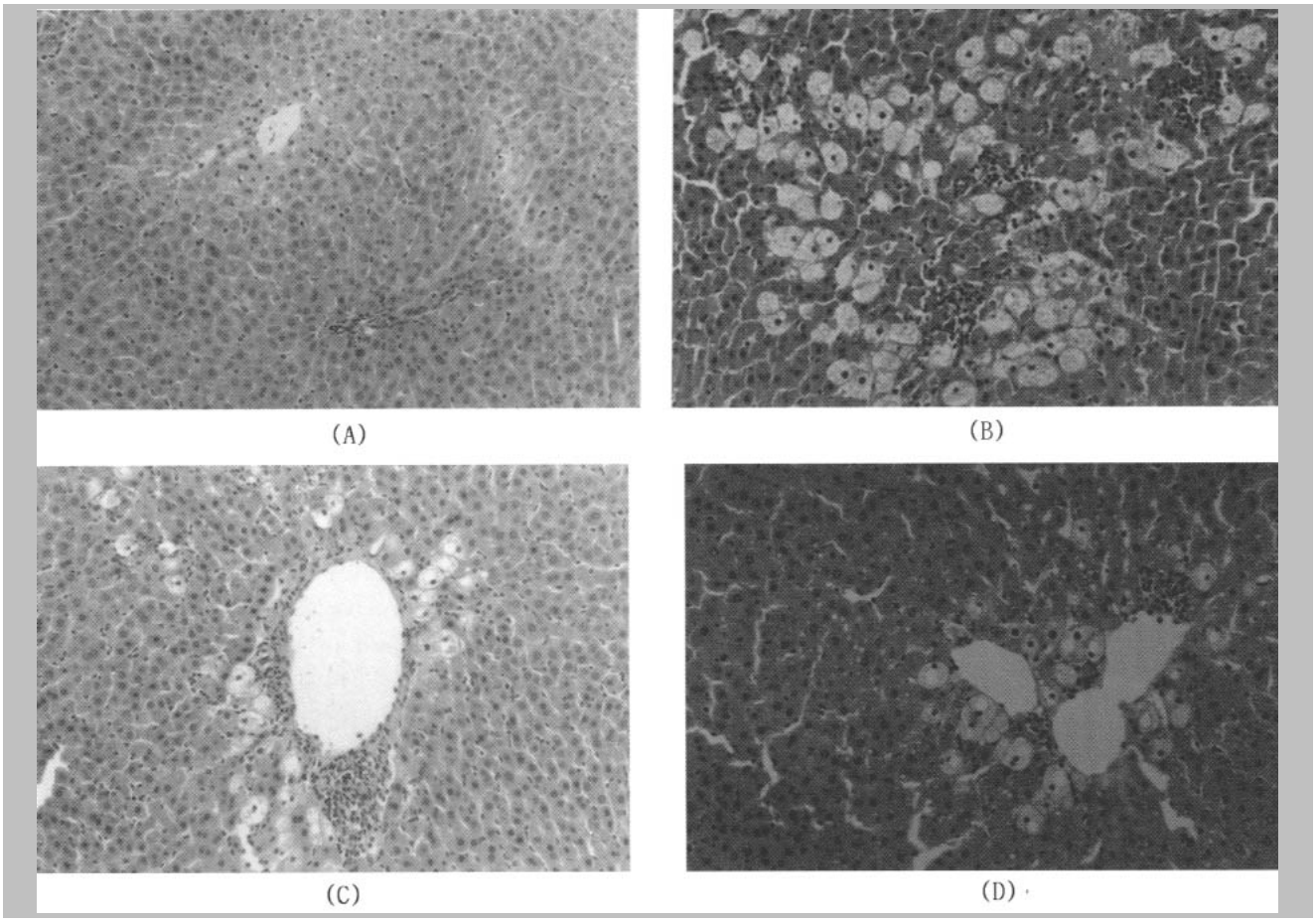


Fig. 1. Effects of BS-5 subfraction of *Carthamus tinctorius* L. Semen on CCl_4-induced hepatotoxicity in rats.
Rats were treated with each agent for 3 consecutive days. CCl_4 (0.4 ml/kg) was intraperitoneally injected at 3 hours afterthe last treatment with the agent. Livers were examined at 24 hours after the final agent treatment. Hematoxylin and eosin-stained sections were photographed at x100; Well-preserved lobular architecture was observed in untreated rat (A). Note ballooning degeneration of hepatocyte with severe necrosis and hemorrhage with infiltration of inflammatory cells around the central vein in the CCl_4 treated rat (B). Ballooning degeneration of hepatocyte with severe necrosis was relieved in the BS-5 subfraction treated rat (C) and *Carduus marianus* ext. treated rat (D) prior to CCl_4 treatment.

본 실험에서 홍화자 BS-5 분획물은 free radical scavenging 작용에 의해서 CCl_4에 의한 간손상을 억제하는 것으로 생각된다.

조직병리학적 소견

Figure 1에 나타낸 바와 같이 약물을 투여하지 않은 정상대조군에 비해 CCl_4 투여군은 실질세포에 심한 괴사와 중심 정맥 주변에서의 출혈 및 염증 세포의 침윤을 볼 수 있었고 세포 내에 많은 소포들이 관찰되었으며 전체적으로 ballooning degeneration이 심하게 나타났다. 홍화자 BS-5 분획투여군에서는 CCl_4 투여로 인한 중심정맥 주변의 ballooning degeneration, 염증 세포 침윤 및 괴사가 많이 완화된 것을 관찰하여 홍화자 BS-5 분획투여군의 간보호 효과를 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 나타난 바와 같이 홍화자 butanol subfractions 중 BS-5 분획물은 CCl_4로 간손상을 유발시킨 흰쥐에서의 malondialdehyde 감소와 superoxide dismutase의 활성도 증가 및 in vitro에서의 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical를 직접적으로 제거함으로써 간손상 보호 작용을 나타낸 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 99년도 덕성여자대학교 약학연구소와 과기처 선도기술개발과제 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

국문요약

저자들은 사염화탄소로 유발된 간손상에 대한 홍화자 메탄올 추출물과 이를 계통 분획한 분획물의 보호 효과를 이미 보고하였다. 본 실험에서는 홍화자 분획물의 간보호 작용에 대한 기전을 살펴보기 위하여 지질과산화와 oxygen free radical 제거 효소 활성을 측정하였고 조직병리학적 분석을 통하여 간보호 효과를 확인하였다. 홍화자 BS-5 분획물은 CCl_4로 간손상을 유발시킨 흰쥐에서 superoxide dismutase의 활성도를 유의적으로 증가시켰으며, in vitro에서의 1, 1-diphenyl -2-picrylhydrazyl radical를 직접적으로 제거하였다. 또한 조직병리학적 분석에서도 홍화자 BS-5 분획투여군은 CCl_4 투여로 인한 중심정맥 주변의 ballooning degeneration, 염증 세포 침윤 및 괴사를 완화시켜 간손상 보호 작용을 나타내었으며, 이는 free radical scavenging 작용에 의한 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Moody, C. S. and Hassan, H. M.: Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc Natl Acad. SCI* **79**, 2855-2859 (1982)
2. Junqueira, V. B. C., Simiz, K., Videla, L. A. and Barros, S. B.: Dose dependent study of the effects of acute lindance administration on rat liver superoxide anionproduction, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Texicology* **41**, 193-204 (1996)
3. Wendel, A. and Feuerstein, S.: Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monoxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol* **30**, 2513-2520 (1981)
4. Hassan H. M.: *Free Radical Biol. Med.* **5**, 377-385 (1988)
5. Touati, D. J.: *Bacteiol.* **170**, 2511-2520 (1988)
6. Ho, Y. S. and Crapo, J. D.: *FEBS Letters* **229**, 256-260 (1988)
7. McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M. and Janzen, E. G.: Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolosm, *J. Biol, Chem.* **259**, 2135-2143 (1984)
8. Butler, T. C.: Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **134**, 311-319 (1990)
9. 중약대사전, 소학관, 689-691 (1985)
10. 나효환, 백순옥, 한상빈, 복진영 : 녹차 종자의 일반성분. 한국농화학회지 **35**, 272-275 (1992)
11. Zhang, H. L., Nagatsu, A. and Sakakibara, J.: Novel antioxidants from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 874-876 (1996)
12. Zhang, H. L., Nagatsu, A., Watanabe, T., Sakakibara, J. and Harumi, O.: Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1910-1914 (1997)
13. 강혜경: 사염화탄소에 의한 간독성에 미치는 홍화자추출물의 억제 효과. 덕성여자대학교 박사 학위논문 (1997)

14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. R.: Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
15. Uchiyama, M. and Mihara, M.: *Anal. Biochem.* **86**, 271-278 (1978)
16. Fridovich, I.: Xanthine oxidase, CRC handbook of methods for oxygen radical research. New York, CRC Press (1985)
17. Yoshida, T., Mori. K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita., Y. and Okura, T.: Studies in inhibition mechanism of tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1919-1921 (1989)
18. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M.: Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450, *FEBS Letters,* **183,** 265-269 (1985)