

애엽 에탄올 추출물이 사염화탄소로 유발된 흰쥐의 간 손상 보호효과

김옥경[†]

[†]대진대학교 과학기술대학 식품영양학과

(2019년 11월 25일 접수: 2019년 12월 27일 수정: 2019년 12월 29일 채택)

Protective Effect of Ethanol Extract of *Artemisiae vulgaris* L. on hepatic injury Induced by Carbon tetrachloride In Rat.

Ok-Kyung Kim[†]

[†]Department of Food Science and Nutrition, Dae Jin University,
Pochon 487-711, Korea

(Received November 25, 2019; Revised December 27, 2019; Accepted December 29, 2019)

요 약 : Dawley 계 숫컷 흰쥐(200~210g)를 정상군, CCl₄-대조군, CCl₄-실험군으로 나누어 실험군은 애엽 에탄올 추출물을 1,000mg/kg,b.w의 용량으로 1일1회7일간 경구 투여 후 사염화탄소를 0.6mg/kg,b.w의 용량으로 복강내 주사 후 다음날 개복하여 혈청내의 Alanine aminotransferase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST), Alkaline phosphatase(ALP), Glutamyltranspeptidase(γ -GT), Lactate dehydrogenase(LDH)의 활성도와 중성지방, 콜레스테롤 함량을 측정하여 애엽 추출물 투여군에서 CCl₄-대조군과 비교하여 유의적인 감소를 나타내었으며, HDL-콜레스테롤은 유의적인 증가를 나타내었다. 간조직중의 지질과산화 함량은 감소를 glutathione함량은 유의적인 증가를 나타내었다 이 실험 결과 애엽 에탄올 추출물은 사염화탄소 투여에 의한 간 손상을 억제하는 보호물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

주제어 : 애엽 추출물, 효소 활성, 사염화탄소, 간 독성 보호작용, 지질대사

Abstract : This study was done to investigate the protective effects of ethanol extract *Artemisiae vulgaris* L(Av) on carbon tetrachloride(CCl₄)intoxicated rats. Male sprague Dawley rats(200~210g)was used. experimental groups were divided into normal group, CCl₄-control group, and ethanol extract CCl₄-treated group. CCl₄-treated groups were injected with CCl₄ 0.6mg/kg.b.w(i.p). The activities of Alanine aminotransferase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST), Alkaline phosphatase(ALP), Glutamyl transpeptidase(γ -GT), Lactate dehydrogenase(LDH) in extract pretrated group was significantly decreased(p<0.05) compared to the CCl₄-control group. The

[†]Corresponding author

(E-mail: okkim@daejin.ac.kr)

contents of triglyceride, cholesterol and lipid peroxide were significantly decreased($p < 0.05$), whereas the contents of HDL-cholesterol and glutathione(GSH) were significantly increased($p < 0.05$). These results suggest that extract of *Artemisiae vulgaris L(Av)* has hepatoprotective effect in the CCl_4 -intoxicated rats.

Keywords : *Artemisiae vulgaris L(Av)*, enzyme activity, carbon tetrachloride, lipid metabolism, hepatoprotective effect.

1. 서론

인간을 비롯한 모든 호기성 생물들의 산소는 체내의 여러 대사를 거쳐 superoxide anion(O_2^-), hydroxyl radical(OH \cdot) 및 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)을 만들어 세포막 지질의 산화와 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, keton류, Carbon류, furan류 및 epoxide등을 만들어 세포의 노화, 분해, 산화등을 일으켜 노화나 질병을 유발 한다[1-3] 사염화탄소(CCl_4)는 유지, 고무, 수지의 용제등으로 산업현장에서 많이 사용하고 있는 xenobiotics로써 생체 세포내의 복합 다기능 산화 기구에 의해 trichloromethyl radical($CCl_3\cdot$)이 세포막의 인지질을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 간세포의 괴사를 일으키며[4] 급성간염, 지방간, 간경변등의 유발 물질로 실험적으로 많이 이용되고 있다. 이들 세포독성을 일으키는 유리기 생성의 화학적 물질로는 사염화탄소(CCl_4), 클로르포름, 에탄올, 브로모벤젠 등이 있으며 특히 화합물의 합성이나 혼합물의 분리를 위해 용매로 사용되고 있다. 썩은 우리나라 전역에서 자생하고 있는 다년생 식물인 국화과에 속하며 전호 말린 것을 애엽 또는 애오라 하며 줄기와 잎은 약용으로 어린잎은 식용, 보통 잎은 뜸쭉을 만들 때 사용되어 왔다[5] 썩의 주요성분으로는 acetylene, sesquiterpene lactone, 휘발성 정유성분, ayanin, kaempferol 3-glucoside, rutinoid, quercetin 3-glucoside 등의 flavonoid 등[6]이며 생리활성 연구로는 위손상에 대한 강한 억제작용[5], 혈액 암세포 억제작용 및 prostaglandin synthase활성도[7], 인진호 추출물의 식중독 세균들에 대한 생육억제효과[8]와 간세포에 미치는효과[9], 사염화탄소를 투여한 흰쥐에서 인진썩 및 동풍하초의 지질대사 촉진 및 간 독성 저해효과[10], 큰비 썩 추출물의 암세포 증식억제

효과[11]등이 보고 되었다. 따라서 본 실험에서는 애엽 에탄올 추출물을 1일 1회 7일간 경구투여하여 사염화탄소로 유발된 간독성에 대한 보호작용에 미치는 영향을 검토 하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시료, 시약 및 기기

시료: 본 실험에 사용된 애엽은 경동시장(강화산)에서 구입하여 사용하였으며,

시약: carbon tetrachloride (Janssen Co., Japan), olive oil (Yakuri Co., Japan) sodium azide, glutathione, glutathione reductase, NADPH, bovine serum albumin (Sigma Co., U.S.A.)을 사용하였으며, alanine amino transferase(ALT) aspartateamino transferase (AST), alkaline phosphatase(AIP), γ -glutamyltransferase(γ -GT), cholesterol, HDL-cholesterol triglyceride (TG) kit (영동제약, Korea), lactate dehydrogenase(LDH) kit (아산제약, Korea)를 사용하였고, 추출용 유기용매와 나머지 기타 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

기기: rotary vaccum evaporator (eyela co. japan), deep freezer (Hanil Co., Korea), Centrifuge (Hanil Co., Korea), UV spectrometer (Kontron Uvicon 923 Italy), Homogenizer (Omni, U.S.A.), Ultracentrifuge (Sorval, U.S.A.)등을 사용하였다.

2.2. 추출실험

애엽 300g을 95% 에탄올 1000ml에 넣고 8 $^{\circ}C$ 가 유지되는 80x80x50cm의 크기로 열선이 있는 임의로 제작한 수욕상에서 5시간씩 3회 가열 추출하고 따뜻할 때 여과하고 여액을 rotary

vaccum evaporator(Eyela Co. Japan)에서 감압-농축하여 에탄올 추출물을 얻는다.

2.3. CCl₄를 이용한 실험동물의 급성 독성 유발

체중 190±15 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)오리엔트 바이오에서 구입하였으며, 동물실험은 2015년 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 재 승인을 받아(심의번호:2015-05) 행하였으며 1주일간 적응시킨 후 평균 체중 220±10 g인 것을 3군으로 나누어 사용하였고, 동물실 온도는 22~25°C의 동물 사육실에서 고형 사료(삼양유지 Co.) 및 물을 자유로이 섭취토록 하였다.

실험군은 애엽 에탄올 추출물을 1,000mg/kg, b.w.로 정상군과 대조군은 증류수를 7일간 경구투여 후 최종 분획물 투여 6시간 후에 Rao 등의 방법[12]을 보완, 수정하여 흰쥐에게 CCl₄ 0.6 mg/kg [CCl₄ : olive oil = 3 : 2(v/v)로 1.0 mg/kg]씩 복강내 투여하여 급성 간 독성을 유발시켰다.

2.4. 효소원 조제 및 분석

CCl₄ 를 복강 투여 후 18시간 동안 절식시키고 흰쥐를 에틸에테르로 마취하여 복부를 절개하여 심장에서 직접 채혈하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 적출한 간은 생리식염수로 장기 표면에 묻어 있는 혈액을 씻은 후 여지로 남아 있는 생리식염수를 제거한 다음 무게를 측정 후 -70°C에 냉동 보관하였다가 본 실험에 사용하였다.

효소원의 조제 및 혈청중의 ALT, AST, ALP, γ -GT, LDH활성도, bilirubin, cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride의 함량과 간 조직중의 지질과산화물, GSH함량, 단백질 함량은 Kim[13]의 방법에 따라 측정하였다.

3.5. 통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준 ± 표준 오차로 계산하였고, 각 군간의 차이는 Student's t-test를 실시하여 p값이 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 애엽추출물의 수율

애엽 300g을 에탄올 1,000ml에 넣고 85°C가 유지되는 추출장치에서 4시간씩 3회 추출 후 회전식 진공 농축기에서 농축하여 60 g의 에탄올 추출물(수율 5%)을 얻었다.

3.2. ALT 및 AST 활성도

추출물 투여에 의한 ALT 및 AST 활성도는 Table 1 과 같다. CCl₄ 로 유발된 혈청중의 이들 효소는 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되어 높은 활성치를 나타낸다는 Hayes[14]의 보고와 같이 정상군과 비교하여 대조군에서 각각 유의적인 증가를 나타내었다. 그러나 추출물을 투여한 실험군에서 대조군과 비교하여 각 각 유의적인 감소(p<0.05)를

Table 1. The Effects of Extract of *Artemisia vulgaris* L.(Av) on the Serum ALT and AST Activities in CCl₄ Intoxicated Rats

Experimental group	Dose (mg/kg, b.w, p.o)	ALT	AST
		(KA unit/ ℓ)	(KA unit/ ℓ)
normal	-	40.35±4.32 ¹⁾	117.06±10.64
CCl ₄ ²⁾ control	-	125.37±22.51 [#]	235.19±13.12 [#]
Av ³⁾ +CCl ₄	1,000	63.24±18.76 [*]	90.83±29.13 [*]

¹⁾Values are the mean±S.E (n=5). [#]Significantly different from normal at p<0.05,

^{*}Significantly different from CCl₄ control at p<0.05,

²⁾CCl₄ 0.6mg/kg, B.W. [CCl₄ : Olive oil = 3:2(v/v)] was i.p. injected one time after the sample pretreatment.

³⁾*Artemisia vulgaris* L

나타내었다. 이는 Lee등[15], Chen등[16], Jin등 [10]의 보고와 비슷한 결과를 나타내어 애엽 추출물이 CCl₄에 의한 간 손상의 보호 작용이 있음을 알 수 있었다.

3.3. AIP, γ -GT, LDH 활성도

애엽 추출물 투여에 의한 alkaline phosphatase (AIP), γ -glutamyltransferase(γ -GT) 및 lactate dehydrogenase(LDH) 활성도는 Table 2와 같다. 정상군과 비교하여 대조군에서 이들 활성도가 유의적인 증가를 나타내었다. alkaline phosphatase는 간담도계 질환이나 신장 및 골조직의 질환이 있을 때 증가를 나타내며[17], γ -GT는 γ -glutamylpeptide를 가수분해하여 γ -glutamyl기를 다른 peptide나 아미노산에 전이시키는 효소로써 간세포의 변성 또는 괴사가 되면 혈중으로 유출되어 활성이 증가[18]되며, LDH도 transaminase와 마찬가지로 간조직이 파괴되면 혈액중으로 방출되어 증가를 나타낸다. 본 실험에서도 정상군과 비교하여 대조군에서 이들 활성도가 유의적인 증가를 나타내었다. 애엽 추출물 투여에 의한 AIP와 γ -GT 활성도는 대조군에 비하여 유의적인 감소를 나타내었으나, LDH는 추출

물 투여에 의해 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다. 이들 효소의 활성이 억제된 것은 애엽 추출물이 CCl₄에 의한 간조직의 손상이나 간세포막을 안정시켜서 나타나는 결과로 사료된다.

3.4. Triglyceride, Total cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량

애엽 추출물이 지질 함량에 미치는 영향은 Table 3과 같다. TG와 cholesterol 함량은 정상군과 비교하여 대조군에서 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 정상적인 간세포는 지질의 합성과 이용의 균형을 이루지만 CCl₄와 같은 물질에 의해 손상을 받으면 반응성이 높은 CCl₄기가 생성되어 간세포의 기능을 저하시켜 관상동맥이나 췌장질환 특히 지질대사와 지방간의 중요 지표가 되는 이들 물질이 증가한다는 보고[19]와 유사하였다. 그러나 추출물 투여에 의해 유의적인 감소(p<0.05)를 나타내었으며 이는 Nam등[20]의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. HDL-cholesterol은 정상군과 비교하여 대조군에서 유의적인 감소를 나타내었으나 추출물 투여에 의해 유의적인 증가(p<0.05)를 나타내었다. 이는 애엽 추출물이 CCl₄에 의한 간손상을 억제한 결과 정상적인 지

Table 2. The Effects of Extract of *Artemisiae vulgaris L(Av)* on the Serum AIP, γ -GT and LDH Activities in CCl₄ Intoxicated rats

Experimental group	Dose (m ℓ /kg,b.w,p.o)	AIP (KA units/ml)	γ -GT (mu/ml)	LDH (Wroblewski units/ml)
normal	-	21.03 \pm 2.54 ¹⁾	28.02 \pm 10.16	428.31 \pm 92.73
CCl ₄ ²⁾ control	-	52.43 \pm 15.03	84.21 \pm 9.03 [#]	849.81 \pm 148.24 [#]
Av ³⁾ + CCl ₄	1,000	40.15 \pm 9.82 [*]	42.35 \pm 12.29 [*]	529.43 \pm 64.10

^{1),2),3)}: See the legend of Table 1.

Table 3. The Effects of Extract of *Artemisiae vulgaris L(Av)* on the Serum TG, cholesterol and HDL-cholesterol Contents in CCl₄ Intoxicated Rats

Experimental group	Dose (mg/kg,b.w,p.o)	TG (mg/dl)	cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)
normal	-	52.03 \pm 11.09 ¹⁾	42.05 \pm 3.28	35.29 \pm 1.34
CCl ₄ ²⁾ control	-	113.27 \pm 6.43 [#]	89.17 \pm 5.42 [#]	20.23 \pm 4.28 [#]
Av ³⁾ + CCl ₄	1,000	62.34 \pm 11.18 [*]	61.32 \pm 10.17 [*]	33.02 \pm 1.54 [*]

^{1),2),3)} : See the legend of Table 1.

질대사가 이루어진 것으로 사료된다.

4.5. 간 조직 중의 과산화지질 및 glutathione 함량

추출물 투여에 의한 간 조직중의 과산화지질 및 glutathione 함량은 Table 4와 같다. 과산화지질은 유리기들에 의해 세포막 지질의 불포화지방산들이 산화적 분해를 일으키는 것으로 지질과산화의 지표인 malondialdehyde (MDA) 함량은 정상군과 비교하여 대조군에서 유의적인 증가를 나타내었다. 이 결과는 CCl₄ 와 같은 xenobiotics의 대사 또는 내적인 요인(oxygen free radical generating system)에 의해 생성된 oxygen free radical이 관여된 결과 증가되었다는 보고[18,21]와 유사한 결과를 나타내었으나 추출물 투여에 의해 감소를 나타내었다. 따라서 본 실험 결과 애엽 추출물이 CCl₄ 에 의하여 생성된 대사산물인 trichloromethyl radical 등의 free radical 생성을 억제하거나 소거하여 간 조직중의 지질과산화물의 함량을 감소시켜 손상된 간기능을 회복시킨 것으로 사료되며, glutathione은 비효소계 물질로써 생체내에서 친전자성 물질, hydroxyl radical과 같은 물질의 강력한 소거제이며 또한 GSH-Px의 기질로 알려져 있다[22]. 본 실험 결과 추출물이 oxidative stress의 감소 결과 glutathione의 소모를 덜어주어 그 함량이 유의적으로 증가(p<0.05)된 것으로 사료된다.

5. 결론

본 연구는 애엽 에탄올 추출물을 1,000mg/kg.b.w 용량으로 1일 1회7일간 경구 투여 후

60mg/kg.bw의 용량으로 사염화탄소를 복강내 투여한 후 간 손상에 대한 보호 효과를 측정하 결과 다음과 같았다.

1. 사염화탄소 투여로 증가된 ALT, AST, AIP 및 γ -GT 활성치가 추출물 투여로 유의성 있는 감소(p<0.05)를 나타내었다.
2. 사염화탄소 투여로 증가된 triglyceride 과 cholesterol 함량이 추출물 투여로 유의성 있는 감소(p<0.05)를 나타내었고, HDL-cholesterol 함량은 유의성 있는 증가(p<0.05)를 나타내었다. 간조직중의 과산화지질 함량 저하와 GSH 함량의 유의적인 증가(p<0.05)를 나타내었다.

따라서 본 실험결과 애엽 에탄올 추출물이 사염화탄소와 같은 xenobiotics 투여에 의해 생성되는 free radical scavenging 작용을 하는 물질을 함유하는 것으로 추정된다.

References

1. J. Neuzil, J. Gebick, and R. Stocker, "Radical induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain breaking antioxidants". *Journal of Biochemical* Vol.293, No.1, pp.601-606 (1993).
2. D. Steinberg, S. Pathasarathly, T. E. Carew, J. C. Khoo, and J. L. Witztum "Beyond cholesterol. Modifications of low

Table 4. The Effects of Extract of *Artemisiae vulgaris L(Av)* on the Hepatic Lipid Peroxide and Glutathione Contents in CCl₄ Intoxicated Rats

Experimental group	Dose (mg/kg,b.w,p.o)	Lipid peroxide	Glutathione
		(MDA nmoles/g of tissue)	(moles/g of tissue)
normal	-	2.96±0.93 ¹⁾	13.65±2.16
CCl ₄ ²⁾ control	-	10.81±0.67 [#]	7.02±0.47 [#]
Sv ³⁾ +CCl ₄	1,000	1.82±0.92 [*]	12.94±1.32 [*]

¹⁾²⁾³⁾ : See the legend of Table 1.

- density lipoproteins that increase its atherogenicity” *England. Journal of Meicine*. Vol.320, No.3, pp.915-923 (1989).
3. W. Gary, and D. Cynthia “Leaf The role of oxidative stress in HIV disease. free radical”. *Journal of Biological and Medicine*. Vol.19, No.2, pp.523-528 (1995).
 4. N. Manabe, M. Sugimoto, Y. Azuma, N. Taketome, A. Yamashita, H. Tsuboi, A. Tsunoo, N. Kinjo. “Effects of the nycelial extract of cultured *cordces sinensis* on in vivo hepatic energy metabolism in the mouse”. *Journal of Japaness. Pharmacology*. Vol.70, No.7, pp.85-88 (1996).
 5. S. N. Ryu, S. S. Han, J. J. Yang, H. G. Jeong, S. S. Kang. “Variation of *eupatilin* and *jaceoside* content of mugwert”. *Journal of Crop Science* Vol.50, No.10, pp.204-207 (2005).
 6. S. J. Lee, H. Y. Chang, I. K. Lee, I. D. Yoo. “Isolation and Identification of Flavonoids from Ethanol Extracts of *Artemisia vulgaris* and Their Antioxidant Activity”. *Korean Journal Food. Science Technology*. Vol.31, No.3, pp.815-822 (1999).
 7. Y. Koshihara, T. Neichi, S. Murota, A. Lao, Y. Fujimoto, T. Tatsuno. “Selective inhibition of 5-lipoxygenase by natural compounds isolated from chinese plants, *Artemisia rurips Naki*” *FEBS Letters* Vol.158, No. 10, pp.41-44 (1983).
 8. C. K. Lee, J. J. Seo. “Antimicrobial Activity of the Aerial part of *Artemisia capillaris* Extracts on the Food-Borne Pathogens”. *Journal Korean Society Food Science and Nutrition* Vol.32. No.8, pp.1227-1232 (2003).
 9. S. S. Yun. “Effect of aqua-acupuncture of *Artemisia capillaris* herba extract on the rat hepatocyte damaged by carbon tetrachloride”. *MS Thesis*. Daejeon University, pp.21-40 (1991).
 10. Y. X. Jin, Y. S. Yoo, E. K. Han, I. J. Kang, C. K Chung. “*Artemisia capillaris* and *paecilomyces Japonica* stimulate Lipid Metabolism and Reduced Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Rats”. *Journal Korean Society Food Science and Nutrition* Vol.37, No.5, pp. 548-554 (2008).
 11. K. N. Kim, J. A. Lee, W. J Yoon, J. Y. Kim, G. P Song, S. Y. Park. “The Cytotoxicity of *Artemicia fukudo* Extracts Against HL-6-Cells”. *Journal Korean Society Food Science and Nutrition* Vol.36, No.7, pp.819-824 (2007).
 12. V. C. Rao and H. M. Nehendale, “Colchicine Antimiosis Abolishes CCl₄ Autoprotection”, *Toxicology and Pathology*, Vol.19, No.8, pp.597-599 (1991).
 13. O. K.Kim : “The Effects of *Sedum sarmentosum* Bunge Extract using Super Critical Carbon Dioxide on Lipid Metabolism, Lipid Peroxidation and Antioxidation in Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats”. *Journal of Korean Oil Chemist’s Society* Vol.21, No.1, pp.204-213(2004).
 14. A. W. Hayes, “Principles and Methods of Toxicology”, pp.407-410, *Raben Press*, New York (1982).
 15. S. B, Lee, C. Jeong, S. H Jeong, S. M. Lee, S. B. Shim, T. S. Cho. “hepatoprotective effects of extracts from *artemisia iwayomogi*”. *Journal of Applied. Pharmacology*. Vol.20, No.5, pp.194-201 (1997).
 16. T. Y. Chen, C. F. Lu, Q. Y. Hu, S. X. Wang H. Tan. “protective effect of *Yinchenhae Tang* on hepatocytes of rats with experimental hepatic fibrosis and ultrastructural findings” *Heilongjiang Medicine Pharmacology* Vol.27, No.9, pp.11-12(2004).
 17. J. B. Whitfield, R. E. Pounder, G. Neale, and D. W. Moss, “Serum γ -Glutamyl Transpeptidase Activity in Liver Disease” *Gut* Vol.13, No.2, pp.702-705 (1972).
 18. E. G. Han and S. Y. Cho, “Effect of

- Codonopsis lanceolata* Water Extract on the Activities of Antioxidative Enzymes in Carbon Tetrachloride Treated Rats” *Journal. Korean society Food Science and Nutrition* Vol.26, No.5, pp.1181-1185 (1997).
19. A. W. Hayes, “Principles and Methods of Toxicology” pp.407-409, *Raben Press*, New York (1982).
 20. S. M. Nam, S. S. ham, D. H. OH, I. J. kang, S. Y. Lee, C. K. Chung. “effects of *Artemisia iwayomogi Kitamura* ethanol extract on lowering serum and liver lipids in rats” *Journal. Korean society Food Science and Nutrition* Vol.27, Vol.4, pp.338-343(1998).
 21. R. O. Recknagel, E. A. Glende, and A. M., Hruszkewycz, “Chemical Mechanism in Carbon Tetrachloride Toxicity. In Free Radicals in Biology”, W. A. Prayor (ed), pp.97-99, Academic Press, New York (1997).
 22. M. J. Burkitt and J. Duncan, “Effects of Trans Resveratrol on Copper Dependent Hydroxyl Radical Formation and DNA Damage : Evidence for Hydroxyl Radical Scavenging and a Novel, Glutathione Sparing Mechanism of Action”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol.381, No.8, pp.253-260 (2000).