

일차 배양 흰쥐 간세포에서 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 수종 생약 용매 분획의 억제효과 검색과 *in vivo* 간보호 작용 평가

김영숙 · 경종수 · 박기현[#]
한국인삼연초연구원
(Received September 20, 1995)

Screening for Inhibitory Effect of Solvent Fractions Prepared from Herbal Drugs on CCl₄-induced Cytotoxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes and Evaluation of Antihepatotoxicity *in Vivo*

Young Sook Kim, Jong Su Kyung and Ki Hyun Park[#]
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstract— Solvent fractions were prepared from traditional herbal drugs which of methanol extracts inhibited CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes and continuously assayed their effects. Ethylacetate and *n*-butanol fractions from *Cibotii Rhizoma* and chloroform fraction from *Gelatina Nigra* inhibited the release of LDH and GPT from CCl₄-treated hepatocytes, respectively. Water fraction (WAR) among solvent fractions from *Astragali Radix* showed the most potent inhibitory effect on the release of GOT or GPT by treatment with CCl₄. All of solvent fractions prepared from *Eucommiae Cortex* had no effect on CCl₄-induced cytotoxicity. Chloroform and ethylacetate fractions from *Rehmanniae Radix Preparata* increased the release of GPT from CCl₄-treated hepatocytes. *n*-Hexan, chloroform or ethylacetate fraction from 5 herbal drugs increased the release of LDH, GOT or GPT from normal hepatocytes at the dose of 1.0 mg/ml. Administration of WAR suppressed the elevation of GOT, ALP activities and MDA contents in the serum as well as in the liver tissue of CCl₄-intoxicated rats. Based on these results, isolation of antihepatotoxic substances from WAR is under the process.

Keywords □ *Astragali Radix*, antihepatotoxicity, CCl₄, primary cultured rat hepatocytes.

바이러스, 알콜성 또는 약물에 의한 급성 간염은 만성 간염으로 진행되어 간경변과 나아가서는 간암으로까지 발전될 수 있다.¹⁾

동남아를 비롯하여 한국에서 발병률이 높은 B형 바이러스성 간염은 백신의 개발로 예방이 가능하게 되었으며 항바이러스작용을 갖는 핵산 유도제²⁾와 interferon이 B형 만성 간염치료에 주로 사용되고 있다.³⁾

그러나 각종 간염과 간경변등과 같은 간질환을 치료할 수 있는 약물은 거의 없는 상태로 대부분 충분한 휴식과

식이요법 또는 민간요법에 의존하고 있는 실정이다. 그러므로 천연물로부터 간장 질환 치료제를 개발하기 위한 많은 연구가 시도되어 왔으며 개발된 대표적인 간장보호제로서는 마리아 영경귀 (*Silybum marianum*)에서 분리된 silymarin제제가 있으며 감초 (*Glycyrrhizae Radix*)와 오미자 (*Schizandrae Fructus*)에서 각각 분리된 glycyrrhizin과 schizandrins^{4,5)}은 널리 알려진 간보호 물질이다. 또한 aucubin은 사염화탄소와 α -amanitin으로 유발한 간장해를 현저히 억제하는 활성물질로서 택사 (*Alisma Tuber*)와 질경이 (*Plantago Semen*)로부터 분리되었다.^{6,7)} 구기자 (*Lycii Fructus*)의 주요 성분인 betaine^{8,9)}과 음양곽 (*Epimedi Herba*)에서 분

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-861-5213 (팩스) 042-861-1949

리된 icarin과 icariside II¹⁰⁾도 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 사염화탄소로 유발한 간세포 손상에 보호효과를 나타내었다.

전통적으로 간질환과 자양 강장제로 사용되어 오는 생약으로부터 간보호 작용 또는 간기능 촉진작용을 갖는 물질의 탐색 일환으로 저자들은 일차 배양 흰쥐 간세포에서 사염화탄소 유도 세포독성을 이용한 *in vitro* 검색방법을 수립하였다.¹¹⁾ 일차적으로 이 검색방법에서 44종 생약의 80% 메탄올 엑스가 사염화탄소 유발 세포독성에 미치는 영향을 검정하여¹²⁾ 구척, 두충, 숙지황, 아교, 황기를 일차 후보 간보호 생약으로 선정하였다.

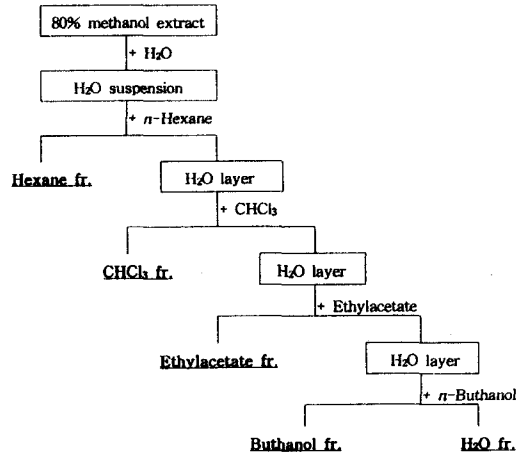
본 연구에서는 일차 검색에서 효과를 나타낸 구척, 두충, 숙지황, 아교, 황기의 각 용매 분획을 조제하여 일차 배양 흰쥐 간세포에서 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 효과를 검색하였고 가장 큰 억제효과를 나타낸 황기 물분획(WAR)에 대한 *in vivo* 간보호 작용을 사염화탄소 간독성 유발 흰쥐에서 평가하였다.

실험방법

시약 - Fetal bovine serum, William's E medium, L-glutamine, trypan blue stain은 GIBCO (Grand Island, NY)에서 구입하였고, collagenase (Type IV), insulin, dexamethasone, antibiotics, dimethyl sulfoxide(DMSO), glycyrrhizin, 1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane, corn oil, Hanks' balanced salt solution (HBSS) 및 세포 배양에 필요한 시약은 cell culture grade의 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)제품을 사용하였으며 CCl₄는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI)에서 구입하였다.

실험동물 및 생약시료 - 한국인삼연구원 실험동물 사육실에서 표준조건(22±2°C, 상대습도 55±5°C, 12시간 명암주기)으로 사육한 150~180g의 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 사용하였다. 생약시료는 대전 소재 한약상에서 구입하였고 서울대학교 천연물과학연구소에서 감정을 받았다.

생약 분획 시료 조제 - 각 생약의 80% 메탄올 엑스를 20배의 증류수에 현탁시키고 동량의 n-헥산을 넣어 진탕하여 3회 추출 후 핵산층을 모았다. 남은 물층에 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올 순서로 같은 방법으로 추출하여 용매 극성의 차이에 따른 분획을 실시하



Scheme I - Fractionation of 80% methanol extract of herbal durg.

였다 (Scheme I). 각 분획은 용매가 완전히 제거될 때까지 감압 농축하여 시료로 사용하였다.

흰쥐 간세포 분리과 배양¹¹⁾ - Berry와 Friend¹³⁾의 collagenase perfusion 방법을 기초로 perfusion 용액으로는 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 15 mM HEPES, 0.225% NaHCO₃와 10⁻⁷ M insulin을 함유하는 Ca²⁺, Mg²⁺-free HBSS를 사용하여 흰쥐의 간세포를 분리하였다. 분리한 간세포의 생존율은 trypan blue로 염색하여 측정하였고 매번 세포 분리시 85% 이상의 생존율일 때 실험에 사용하였다. 2×10⁵ cells/ml의 세포 현탁액을 24 well plate (Falcon, Primaria)에 1 ml씩 분주하고 5% CO₂/95% air 혼합기체를 공급하면서 일정습도를 유지하는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양액은 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 4 mM L-glutamine, 10⁻⁶ M dexamethason, 10⁻⁷ M insulin이 첨가된 William's E medium을 사용하였다.

간세포 독성 유도 및 시료처리 - 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 생약 분획 시료의 억제효과를 검색하기 위해서 간세포가 용기표면에서 부착하도록 2시간 배양 후 신선한 배지로 교체하고 동시에 DMSO에 용해한 생약시료 (10 µl)와 CCl₄ (10 µl)을 1 ml의 배양액에 첨가하고 90분간 배양하였다. 생약시료의 효과는 3개 실험치의 평균값을 각 대조군의 효소활성치에 대한 %로 환산하였고 Table I에서와 같이 표시하였다.

In vivo 간보호 효과 검정 - 실험군은 정상 대조군.

Table 1— Effect of solvent fractions prepared from herbal drugs on CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes

Herbal drug	Fraction	Dose (mg/ml)	LDH		GDT		GPT	
			CCl ₄ (-)	CCl ₄ (+)	CCl ₄ (-)	CCl ₄ (+)	CCl ₄ (-)	CCl ₄ (+)
Cibotii Rhizoma	Hexane	0.3	t	-	-	-	-	-
		1.0	t	-	t	-	-	-
	CHCl ₃	0.3	-	-	t	-	-	-
		1.0	t	-	t	-	-	-
	Ethylacetate	0.3	+	+	-	-	-	-
		1.0	-	++	-	-	-	-
	Buthanol	0.3	-	+	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
Eucommiae Cortex	Hexane	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	t	-	t	-	-	-
	CHCl ₃	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	t	-	t	-	-	-
	Ethylacetate	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
	Buthanol	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O	0.3	-	-	-	-	-	-
		0.1	-	-	-	-	-	-
Rehmanniae Radix Preparata	Hexane	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
	CHCl ₃	0.3	-	-	-	-	t	-
		1.0	-	-	t	-	t	t
	Ethylacetate	0.3	-	-	-	-	t	t
		1.0	-	-	t	-	t	t
	Buthanol	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
Gelatina Nigra	Hexane	0.3	t	-	t	-	-	-
		1.0	t	-	t	-	-	-
	CHCl ₃	0.3	t	-	-	-	-	+
		1.0	t	-	t	-	-	++
	Ethylacetate	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	t	-	-	-	-	-
	Buthanol	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-
Astragali Radix	Hexane	0.3	t	-	t	-	-	-
		1.0	t	-	t	-	-	-
	CHCl ₃	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	t	-	-	-	-	+
	Ethylacetate	0.3	-	-	-	-	-	-
		1.0	t	-	+	-	-	+
	Buthanol	0.3	-	-	-	-	-	+
		1.0	-	-	-	+	-	+
	H ₂ O	0.3	-	-	-	-	-	++
		1.0	-	-	-	+	-	++

The hepatocytes were preincubated for 2 hr, and simultaneously treated with or without 1.5 mM CCl₄ (10 μl in DMSO) and each solvent fraction (10 μl in DMSO) for 1.5 hr in fresh medium (1 ml). Through all experiments, LDH, GOT and GPT activities in the medium of normal hepatocytes were 136~188 W-U, 27~44 K-U and 11~26 K-U and were increased to 7~9, 5~6 and 4~5 times by treatment with CCl₄, respectively. The results from 3 determinations were calculated as % of each control and expressed as follows, -: no significant effect, +: 15~25% inhibitory effect, ++: 26~35% inhibitory effect, t, toxic effect.

WAR 단독 투여군 (100 mg/kg), 사염화탄소 단독투여군 (1.0 ml/kg), WAR (50 mg/kg)+사염화탄소 (1.0 ml/kg) 투여군 및 WAR (100 mg/kg)+사염화탄소 (1.0 ml/kg) 투여군으로 나누어 1군당 7마리씩 사육하였다. WAR은 생리 식염수에 녹여서 6일간 연속 1일 1회 복강투여 하였고 사염화탄소는 4일째 옥수수 기름에 1 ml/kg로 희석하여 WAR 투여 1시간후 복강 주사하였다. 마지막 시료 투여날 (투여 6일째) 저녁을 절식시키고 그 다음날 아침, 체중을 측정하고 심장에서 채혈한 후 간을 적출하였다.

효소활성 측정 - 배양시간이 끝나면 배양액을 채취하여 3000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 상등액과 혈청에서 아산제약 kit을 사용하여 glutamic pyruvic transaminase (GPT), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), lactic dehydrogenase (LDH)과 alkaline phosphatase (ALP) 활성을 측정하였다.

과산화지질 측정 - 혈청과 간조직의 과산화지질은 thiobarbituric acid와 반응하여 생성되는 malondialdehyde (MDA)를 Ohkawa등¹⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 표준물질로서 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane을 사용하였고 단백질 정량은 소혈청 알부민을 표준물질로 Bradford의 방법¹⁵⁾으로 측정하였다.

통계학적 분석 - 통계학적 유의성은 Student의 *t*-test로 평가하였다.

결과 및 고찰

일차 배양 간세포에서 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 생약 용매 분획의 효과

일차 배양 흰쥐 간세포를 1.5 mM 사염화탄소와 0.3, 1.0 mg/ml의 생약 분획 시료를 동시 처리하고 90분간 배양하여 사염화탄소를 처리한 간세포로부터 배지로의 LDH, GOT 및 GPT 유리와 정상 배양 간세포에 대한 각 분획 시료의 영향을 관찰하였다 (Table I). 전보¹²⁾에서 수중 생약의 80% 메탄올 추출물을 0.01, 0.1, 1.0 mg/ml 처리하고 실험한 결과, 0.01 또는 0.1 mg/ml 농도에서 CCl₄ 유발 세포독성을 억제하는 생약이 적어서 본 실험에서는 0.3 mg/ml과 1.0 mg/ml에서 그 효과를 관찰하였다. 일차 배양 간세포를 1.5 mM 사염화탄소로 90분 처리시 간세포로부터 LDH, GOT 및 GPT 유리는 정상 배양 간세포에 비하여 각각 7~9배, 5~6배, 4~5배 증가되는 세포독성을 나타냈으며 이는 전보^{11, 12)}

에서와 유사한 세포독성 유발이었다. 구척 (Cibotii Rhizoma)의 에틸아세테이트 분획은 농도 의존적으로 사염화탄소에 의한 LDH 유리를 억제하였으며 0.3 mg/ml에서는 정상 간세포로부터 LDH 유리도 억제하였다. 또한 구척의 핵산, 클로로포름 분획은 정상 간세포로부터 LDH 또는 GOT 유리를 증가시키는 세포독성을 나타냈다. 두충 (Eucommiae Cortex)의 각 용매 분획은 사염화탄소 처리에 의한 LDH, GOT와 GPT 유리에 유의한 영향을 미치지 않았으며 핵산과 클로로포름 분획은 1.0 mg/ml 농도에서 정상 간세포로부터 LDH와 GOT의 유리를 증가시켰다. 숙지황 (Rehmanine Radix Preparata)의 클로로포름과 에틸아세테이트 분획은 0.3 mg/ml 또는 1.0 mg/ml에서 정상 간세포와 사염화탄소 처리 간세포에서 GPT 유리를 증가시켰고 이들 분획 1.0 mg/ml에서는 정상 간세포로부터 GOT 유리를 증가시키는 세포독성을 나타냈다. 아교 (Gelatina Nigra)의 클로로포름 분획은 농도 의존적으로 사염화탄소에 의한 GPT유리를 억제하였으며 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 분획 0.3 mg/ml 또는 1.0 mg/ml에서 정상 간세포로부터 LDH 또는 GOT 유리를 증가시켰다. 황기 (Astragali Radix)의 클로로포름과 에틸아세테이트 분획은 1.0 mg/ml 농도에서 사염화탄소에 의한 GPT 유리를 억제하였고 부탄올과 물 분획은 두가지 농도에서 모두 사염화탄소에 의한 GPT 유리를 억제하였으며 물 분획의 억제효과가 더 컸다. 이 두 분획은 1.0 mg/ml에서는 사염화탄소 처리에 의한 GOT 유리도 억제하여 5종 생약의 각 용매 분획중에서 사염화탄소 유도 세포독성에 가장 큰 억제효과를 나타냈다. 황기 핵산 분획은 정상 간세포에서 LDH와 GOT 유리를 증가시켰고 클로로포름과 에틸아세테이트 분획은 1.0 mg/ml에서 정상 간세포에서 LDH 유리를 증가시켰다. 5종 생약의 핵산과 클로로포름 분획은 부탄올 또는 물분획에 비해 정상 간세포에서 LDH, GOT 또는 GPT 유리를 증가시키는 세포독성을 나타내었는데 이는 극성 물질에 비해 비극성 물질이 간세포에 대하여 독성이 보다 클 가능성을 시사한다.

이상과 같이 일차 배양 간세포에서 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 5종 생약의 각 용매 분획의 영향을 검색하였을때 황기 부탄올과 물 분획이 사염화탄소에 의한 간세포로부터 GOT와 GPT 유리를 억제하였고 물 분획의 억제 효과가 더 컸다. 그러므로 일차 배양 간세포에서 사염화탄소를 이용한 *in vitro* 검색에서 큰 억제

Table II—Effect of Water fraction from Astragali Radix (WAR) on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats

Treatment	Dose (mg/Kg)	Liver ratio to body weight(%)	s-GOT		s-GPT (Karmen unit/ml)	ALP (K-A unit)	MDA(nmol)	
			(Karmen unit/ml)	(Karmen unit/ml)			Serum(ml)	Liver(100 mg protein)
Normal	-	3.71±0.27	92±18	25±5	38.4±3.0	6.66±0.94	183.1±25.0	
WAR	100	3.77±0.13	79±12	27±4	35.9±9.0	6.82±1.10	186.6±25.9	
CCl ₄ (Control)	-	4.83±0.53##	162±25##	89±18##	61.1±13.6##	14.36±2.55##	320.6±76.7##	
WAR+CCl ₄	50	4.75±0.67	138±21	77±13	54.0±10.0	8.55±1.40	329.9±92.7	
WAR+CCl ₄	100	4.56±0.54	119±15**	73±10	43.1±13.8*	7.99±0.91*	205.4±49.6*	

The animals were administered with WAR (dissolved in saline, *i.p.*) on day 1-6, and treated with or without CCl₄ (1 ml/kg in corn oil, *i.p.*) 1 hr after WAR treatment on day 4, and sacrificed on day 7. The results are expressed as the mean±S.D. for 5 or 6 rats. Significantly different from CCl₄-treated control, *; P<0.05, **; P<0.01, and from the normal, ##; P<0.01.

효과를 나타낸 황기 물 분획의 *in vivo* 간보호 효과를 사염화탄소 투여로 간독성을 유발시킨 흰쥐에 평가하였다.

In vivo 간보호 효과

황기 물 분획(WAR)을 50 mg/kg 또는 100 mg/kg 용량으로 흰쥐에 6일간 복강투여 하면서 시료 투여 4일째 사염화탄소 (1.0 ml/kg in corn oil)를 복강 주사하여 간독성을 유도하였다. 7일째 혈청의 효소활성과 혈청 및 간 조직의 MDA 함량을 측정하였다(Table II). 사염화탄소에 의한 간독성 유발시 간조직 부종에 의한 체중에 대한 간의 무게비는 정상동물에 비해 30% 증가되었으며 WAR의 투여는 간의 무게비를 용량 의존적으로 감소시키는 경향이였다. 혈청 GOT, GPT 및 ALP 활성은 사염화탄소에 의한 간독성 유발로 정상군에 비해 각각 1.8배, 3.6배 및 1.6배 상승되었으나 WAR 투여는 사염화탄소 유도 간독성에 의한 혈청 GOT와 ALP 활성 상승을 용량의존적으로 현저히 억제하여 100 mg/kg 투여시 각각 27%, 29% 억제하였고 혈청 GPT 활성의 증가는 감소되는 경향이였다. 사염화탄소에 의한 과산화지질 생성의 증가로 혈청과 간조직에서 MDA함량이 각각 2.2배, 1.8배 증가되었으며 WAR 투여는 혈청과 간조직에서 용량의존적으로 MDA 함량 증가를 억제시켜 100 mg/kg 투여로 혈청과 간조직에서 MDA 생성이 각각 41%, 34% 억제되었다. 정상동물에 WAR 100 mg/kg 투여시 본 실험에서 측정된 여러가지 지표에 대하여 유의한 변화가 관찰되지 않았으므로 이 투여 용량까지는 유해한 영향을 미치지 않음을 제시하였다. *in vitro* 검색방법으로 수립한 일차 배양 간세포에서 사염화탄소 유도 세포독성을 억제한 WAR는 흰쥐에서 사염화탄소로 유발한 간독성을 억제하여 *in vitro* 와 *in vivo* 효과가 잘 일치되었다. 이는 간보호 효과를 검색할 수 있는 일차적인 방법으로 많은 동물을 사용하지 않고 재현성이 높을 뿐 아니라 적은량으로 많은 종류의 시료를 검정할 수 있는 *in vitro* 검색방법이 적절함을 제시해 준다.

결 론

일차 배양 간세포에서 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 구척, 두충, 숙지황, 아교, 황기의 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올과 물 분획의 영향을 검정하

였다. 황기의 부탄올 분획과 물 분획이 사염화탄소에 의한 GOT와 GPT 유리를 억제하였고 물 분획의 억제 효과가 더 컸다. 황기 물 분획은 사염화탄소로 간독성을 유발한 흰쥐에서 혈청 GOT, ALP활성과 간조직 및 혈청의 MDA 함량을 농도 의존적으로 현저히 억제하는 *in vivo* 간보호 효과를 나타냈다. 이들 결과로부터 황기 물분획에서 간보호 작용을 갖는 물질의 분리가 수행중이다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 신동의약개발 연구비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

문 헌

- 1) Isselbacher, K. J.: *Harrison's principles of internal medicine*. 11 th ed., McGraw-Will Book Company, New York, p. 1308 (1987).
- 2) Perrillo, R. P., Regenstein, E. C., Bodicky, C. J., Campall, C. R., Sarders, G. R. and Sunwoo, Y. C.: Comparative efficacy of adenine arabinoside 5'-monophosphate and perdnison withdrawal followed by adenine arabinoside 5'-monophosphate in the treatment of chronic active hepatitis type B. *Gastroenterology* **88**, 780 (1985).
- 3) Alexander, G. J. M., Braha, J., Fagan, E. A., Smith, H. M., Daniels, H. M., Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R.: Loss of HBeAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection *Lancet i*: **66**, 69 (1987).
- 4) Chen, Y. Y., Shu, Z. B. and Li, L. N.: Studies on fructus Schizandrae. IV Isolation and determination of the active compounds (in lowering high sGPT levels) of *Schizandrae chinensis* Bail. *Scientia Sinica*, **1**, 98 (1976).
- 5) Chen, Y. Y. and Yang, Y. A.: Studies on the sGPT-lowering active component of the fructus on *Schizandrae Rubriflora* Rhed et Wills. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **17**, 310 (1982).
- 6) Yun-Choi, H. and Chang, I. M.: Plants with liver protective activities. *Asian J. Pharmacy* **6**, 3 (1982).

- 7) Chang, I. M. and Yun, H. S.: *Advances in chinese medical materials research*(ed. by Chang, H. M.) World Scientific Publ. Co., Singapore, p. 268 (1985).
- 8) 김선여, 김홍표, 이미경, 김승희, 문애리, 한형미, 허훈, 김영중 : 일차 배양한 흰쥐의 간세포에서 사염화탄소로 인한 독성에 미치는 비테인의 효과. 약학회지 **37**, 499(1993).
- 9) 김선여, 김홍표, 이미경, 변순정, 김승희, 문애리, 한형미, 허훈, 김영중 : 사염화탄소에 의하여 유발된 흰쥐의 간독성에 미치는 비테인의 효과. 약학회지 **37**, 538 (1993).
- 10) Cho, N. J., Sung, S. H., Lee, H. S., Jeon, M. H. and Kim, Y. C.: Anti-hepatotoxic activity of icaraside II, a constituent of *Epimedium koreanum*. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 289 (1995).
- 11) 김영숙, 박기현 : 일차 배양 흰쥐 간세포에서 CCl₄ 유발 세포 독성을 이용한 간보호 효과 검색방법. 생약학회지 **26**, 51 (1995).
- 12) 김영숙, 박기현 : 수종의 전통약제가 일차 배양 간세포에서 CCl₄ 유발 세포 독성에 미치는 영향. 생약학회지 **25**, 388 (1994).
- 13) Berry, M. N. and Friend, D. S.: High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* **43**, 506 (1969).
- 14) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
- 15) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-drug binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).