

乾栗蠶螯湯이 CCl₄로誘發된 肝損傷 白鼠에 미치는 影響

김정렬·김혁·양상묵·김달래·전종원*

상지대학교 한의과대학 사상체질의학교실

* 상지영서대학 멀티미디어디자인학과

Abstract

The Effects of Gunyuljejo-tang on the CCl₄-induced Liver Damage in Rats

Kim Jung-Yul, Kim Hyuk, Yang Sang-Mook, Kim Dal-Rae, Jeon Jong-Weon*

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, SangJi Univ.

* Dept. of MultiMedia Design, SangJi-YoungSeo College.

1. Objectives

This study was carried out to investigate the effects of Gunyuljejo-tang on the CCl₄-induced Liver Damage in Rats.

2. Methods

Sprague-Dawley rats were divided into 5 experimental groups : Normal, NS+CCl₄(Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed), GYJTT+CCl₄(Solid extract of CCl₄ injection group after Gunyuljejo-tang feed), CCl₄+NS(Normal Saline feed group after CCl₄ injection), CCl₄+GYJTT(Solid extract of Gunyuljejo-tang feed group after CCl₄ injection). Biochemical assays for serum enzyme activities such as AST, ALT, ALP, BUN, Creatinine, Uric Acid, Total Protein, Albumin, Total Cholesterol, Triglyceride, Glucose, and mRNA Revelation of Cytochrome p450 and activities such as LPO, GSH, GST, Glutathione Reductase, Glutathione Peroxidase, SOD, Catalase, Hydroxyproline, and β -Glucuronidase were performed.

3. Results

- ① GYJTT+CCl₄ showed lower revelation of Cytochrome p450.
- ② GYJTT+CCl₄ showed higher GSH activity than NS+CCl₄, CCl₄+GYJTT showed higher GSH activity than CCl₄+NS injection significantly.
- ③ GYJTT+CCl₄ showed higher GST activity than NS+CCl₄, CCl₄+GYJTT showed higher GST activity than CCl₄+NS significantly.
- ④ GYJTT+CCl₄ showed higher Glutathione Peroxidase activity than NS+CCl₄, CCl₄+GYJTT showed higher Glutathione Peroxidase activity than CCl₄+NS significantly.
- ⑤ CCl₄+GYJTT showed higher SOD activity than CCl₄+NS significantly.
- ⑥ CCl₄+GYJTT showed higher Catalase activity than CCl₄+NS significantly.
- ⑦ GYJTT+CCl₄ showed lower Hydroxyproline than NS+CCl₄ significantly, CCl₄+GYJTT showed higher Hydroxyproline than CCl₄+NS significantly.
- ⑧ GYJTT+CCl₄ showed higher β -Glucuronidase activity than NS+CCl₄, CCl₄+GYJTT showed higher β -Glucuronidase activity than CCl₄+NS significantly.

4. Conclusions

Gunyuljejo-tang has the recovering effects on the CCl₄-induced Liver Damage significantly.

Key Words: Gunyuljejo-tang, CCl₄, Liver Damage

I. 서론

간은 늑골에 의하여 보호되며, 폐, 흉막, 심장 등과는 횡격막을 사이에 두고 있다¹. 간은 보통 좌엽, 우엽, 미상엽, 방형엽으로 나누지만 기능적인 측면에서 혈관과 담도계의 분포에 기초하여 생리적 우엽과 좌엽으로 나누고 있다. 간은 대부분이 Glisson 피막으로 덮여 있어 외면이 매끈하다. 또한 무개는

·접수일 2004년 10월 28일; 승인일 2004년 11월 30일
·교신저자 : 김정렬
강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학 사상체질의학교실
Tel : +82-33-741-9202, Fax : +82-33-743-7184
E-mail : orients21@freechal.com

정상일 때 1,400~1,600g이며, 보통 늑골연에서 만져지지 않는다. 간은 인체내의 혈량을 조절하고 각종 대사, 분비, 합성에 관여하는 중요한 장기이며, 간실질의 80%를 제거하더라도 남아있는 실질이 정상일 경우 환자가 살아 남을 수 있을 만큼 대단한 재생능력을 가지고 있다. 병리적으로는 대사물질에 의한 중독에 민감하게 반응하여 간세포의 변성, 괴사, 지방축적, 간효소의 유출 등의 간장애를 나타낸다².

韓醫學에서는 肝은 主疏泄·主藏血·主風情·主安靜·筋脈順理의 生理를 擔當하는 臟器이다².

乾栗蟻螞湯은 李濟馬에 의해 처음 創方되어 『東醫壽世保元』에 “太陰人 有腹脹浮腫病 當用乾栗蟻螞湯”³이라고 記載되어 있고, 그 처방은 “乾栗 100箇, 蟻螞 10箇 湯服 或 灸食 黃栗 蟻螞 10箇 作末 別用 黃栗湯水 調下”라고 되어 있으며, 適應症으로는 腎臟炎의 初期에 使用되었고, 太陰人의 肝熱과 有關한 氣液의 鬱滯에 使用되어 왔다⁴.

乾栗은 참나무과(Fagaceae)에 속하는 낙엽활엽교목인 밤나무의 열매인 밤의 껍질을 까서 말린 것으로 민간에서는 健胃·補腎·益氣에 쓰이며, 蟻螞는 節肢動物昆蟲綱 鞘翅目 金龜子科(Scarabaeidae)에 속하는 굽벵이를 採取하여 말린 것이다⁵. 『神農本草經』에 “蟻螞味鹹微溫 主惡血 血瘀 痺氣 破折血在脅下堅滿痛 月閉目中淫膚 青翳白膜”⁶이라고 收載된 以後에 “破血 血瘀 散結 通乳 治切損疼痛 痛風 破傷風 喉痺 目翳 丹毒 癰疽 痔漏”의 效能⁷을 가진 破血祛瘀藥으로 쓰이는 本草로 使用되어왔고⁵, 民間에서는 肝癌에 效果的이라는 俗說이 있다.

CCl₄는 오랫동안 가장 普遍的으로 使用되었으며^{8,9}, 빠른 肝損傷을 일으키고 肝細胞의 代謝와 遺傳子 表現에 심한 障礙를 招來한다¹⁰.

이에 저자는 乾栗蟻螞湯이 肝損傷에 미치는 影響을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley系 흰쥐에 乾栗蟻螞湯 煎湯液 濃縮 抽出物을 投與한 후 생화학 검사-Cytochrome p450의 mRNA발현·항산화 활성 검사를 실시하여 간손상에 미치는 효과를 실험한 결과 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 동물 및 약재

가. 동물

실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley계 Rat (SD-Rat)으로 대한바이오링크로부터 구입하여 온도 21℃, 습도 55%를 유지하며 사료와 수돗물을 자유롭게 급식하면서 항온항습기(명진기계, 한국)에서 1주일간 적응 후 각 군에 10마리씩 총 50마리를 실험에 사용하였다.

나. 약재

실험에 사용된 약재는 乾栗蟻螞湯으로 『東醫壽世保元』에 收載된 것을 상지대학교 한방병원 처방집의 분량에 맞추어 사용하였다.

건울제조탕 1100 g을 물 3000cc와 함께 5000 cc의 플라스크에 넣어 3시간 전탕하고 16겹의 거즈로 여과한 후 동결건조기에 넣어 -60℃에서 72시간 동결 건조하여 건조 분말 87.33g을 얻었다. 수득율은 7.93%이었다.

Table 1. Prescription of Gonyuljejo-tang

藥材名	學名	重量
乾栗	<i>Mastanea crenata</i> S	100 g
蟻螞	<i>Citri Reticulatae</i> <i>Virride Pericarpium</i>	10 g

다. 시료

乾栗蟻螞湯 투여 및 CCl₄로 처리한 실험 종료일에 급식을 중단하고 다음날 혈액 및 간을 적출하였다.

럼폰(Rompun, BAYER, 한국) : 케타민(Ketamine, 유한양행, 한국)을 2:3의 비율로 혼합 후 0.2ml씩 근육 주사하여 마취 후에 복부 정중선을 따라 개복한 뒤, 복대정맥을 통해 혈액을 5 ml씩 채취 하고, 즉시 혈액응고제가 포함된 vacutainer tube(vacutainer, BECTON, DICKINSON, USA)에 넣었고, 원심분리기(HRT-601V, 한일과학, 한국)에서 3000rpm으로 10분간 원심한 뒤 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

간의 적출은 혈액 채취 이후에 조심스럽게 간을 적출하였으며, 적출 즉시 -20℃의 냉장고(삼성전자, 한국)에서 1시간 보관 후 -80℃의 냉동고(Heto, Denmark)로 옮겨 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

가. 간독성 유발

간 독성 유발은 사염화탄소(Carbon tetrachloride, CCl₄, Junsei cem. co., Ltd., Japan)를 Olive oil(Shinyo pure chemicals co., Ltd., Japan)과 1:1로 혼합한 뒤 0.2 ml를 SD-Rat에 복강 주입하였다.

나. 군분리 및 건울제조탕 투여

건울제조탕의 간독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Normal군, NS+CCl₄군, GYJJT+CCl₄군, CCl₄+NS군, CCl₄+GYJJT군으로 나누었다.

Normal군은 처치를 하지 않은 군이다. NS+CCl₄군은 Normal Saline (NaCl 9g / 증류수 1000ml, 대한약품공업주식회사, 한국)을 5일간 연속 경구 투여하고 CCl₄로 처리한 군이며, GYJJT+CCl₄군은 건울제조탕을 5일간 연속 경구 투여하고 CCl₄로 처리한 군이다. CCl₄+NS군은 CCl₄ 처리 후 24시간 뒤부터 5일간 연속 Normal Saline을 경구 투여한 군이며 CCl₄+GYJJT군은 CCl₄ 처리 후 24시간 뒤부터 5일간 연속 건울제조탕을 경구 투여한 군이다.

NS+CCl₄군은 GYJJT+CCl₄군의 간보호효과를 확인하기 위한 대조군으로 사용되었고, CCl₄+NS군은 CCl₄+GYJJT

T군의 간독성치료효과를 확인하기 위한 대조군으로 사용되었다.

乾栗蟻螬湯 291mg을 증류수 10ml에 녹여 매일 0.2 ml씩 준대를 이용하여 경구 투여 하였으며, Normal Saline은 동량을 같은 방법으로 경구투여 하였다.

이상의 실험과정을 도표화하면 다음과 같다.

Table 2. Schedule of Experimental Study

Treatment	Days	n	Days						
			1	2	3	4	5	6	7
NS+CCl ₄ Group	10	●	●	●	●	●	●	■	◎
GYJJT+CCl ₄ Group	10	◆	◆	◆	◆	◆	◆	■	◎
CCl ₄ +NS Group	10	■	●	●	●	●	●	●	◎
CCl ₄ +GYJJT Group	10	■	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◎

- : Normal Saline oral feeding
- : CCl₄ injection
- ◆ : Gynuljejo-tang oral feeding
- ◎ : Blood sampling and Hepatectomy

3. 측정항목 및 방법

가. 생화학 검사

상기의 방법으로 얻어진 혈청을 이용하여 생화학 검사를 실시하였다. 검사항목은 AST(Asparate aminotransferase), ALT(Alanine aminotransferase), ALP (Alkaline phosphatase), BUN, Creatinine, Uric Acid, Total Protein, Albumin, Total Cholesterol, Triglyceride, Glucose를 실시하였다.

검사는 생화학분석기(TBA-120FR, Toshiba, Japan)를 이용하였으며, 각각의 측정 방법에 맞는 시약(生研, 일본)을 이용했다. BUN은 Urease-Indophenol 법, Creatinine은 Jaffe법, Uric Acid는 효소법, Total Protein, Albumin, ALP(Alkaline phosphatase), AST (Asparate amino-transferase), ALT (Alanine aminotransferase), Total Cholesterol은 효소법, Triglyceride는 GPO법, Glucose는 HK-G6PD법으로 측정하였다.

나. Cytochrome p450 mRNA 발현

1) Total RNA 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 RNAzol B(Friendswood, Texas)를 사용하였다. -80℃에 보관 중이던 간 조직 0.2 g을 homogenizer(Coming, USA)로 잘 분쇄하여 lysis시킨 후, 전체분량의 1/10의 chloroform (Sigma, USA)을 첨가하였다. 이후에 Voltex하여 얼음에 2분간 방치하였다가 원심분리기(Micro17R, 한일과학, 한국)를 이용하여 12,000rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액에 두배의 ethanol(Sigma, USA)를 첨가한 후 잘 흔들고, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액만 버린 후, 가라앉은 pellet에 70% Diethyl-pyrocyanate(DEPC; Sigma, USA)-treated ethanol로 세척하여 12,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 이후에 상층액을 완전히 제거하고 공기 중에 3분간 방치하였다가 0.1% DEPC-treated H₂O에 녹여 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)에서 260/280nm로 Total RNA를 정량하여 다음 실험에 사용하였다.

2) RT-PCR

DNA 합성은 Promega RT kit(Promega, USA)를 사용하였다. Total RNA 1μg/μl에 2.5mM MgCl₂, 10X PCR buffer, RNase free dH₂O, 10mM dNTP, AMV RTase, 2.5 pmole oligo dT를 전체 20μl되게 넣어 준 다음 60℃에서 10분간 반응시키고, 42℃에서 30분간 annealing하였다.

PCR은 1μl의 RT product에 0.5μl primer(100pmol), 10X PCR buffer 5μl, 2.5mM dNTP 1μl, taq

polymerase 1 μ l에 sterilized H₂O를 첨가하여 총부피가 25 μ l가 되도록 하였다. 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간, 95 $^{\circ}$ C에서 60초, 54 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 90초 동안 25cycle 반응시키고 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 신장하였다.

각각의 PCR product는 5 μ l씩 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 EtBr로 염색하고, UV transilluminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기(Polaroid H-3, USA)를 사용하여 자외선 조명 하에서 촬영하였다.

사용된 Cytochrome p450(CYP2E1)의 primer는 다음과 같고, 보한바이오사(한국)에 의뢰하여 합성하였다.

- Sense primer
: 5'ACCACCAGCACAACCTCTGAGA3'
- Antisense primer
: 5'CAATTCATGCGGGCCAGGCC3'

다. 항산화 활성 측정

1) 시료준비

① 균질액의 준비

효소활성도 측정을 위하여 전체 조직의 4배 용량의 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 균질화 하였다. 이 균질액을 1000 \times g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액으로 과산화지질(Lipid peroxide) 및 Glutathione 함량, Glutathione-S-transferase, Glutathione Peroxidase 및 Superoxide dismutase을 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 위의 모든 실험은 4 $^{\circ}$ C 하에서 실행하였다.

② Cytosol 분획

Cytosolic fraction은 균질액 준비에서 얻어진 상층액에 ethanol : chloroform(5:3) 용액을 0.4배량을 첨가하여 섞어 준 다음 10,000rpm 에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻어 Superoxide Dismutase측정에 사용하였다. 위의 모든 실험은 4 $^{\circ}$ C 하에서 실행하였다.

③ Mitochondria 분획

Mitochondria 분획은 균질액의 준비에서 얻은 상층액을 600 \times g에서 15분간 원심분리하여 CCl₄+NS 균과 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 12,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아를 모아 Catalase 활성도를 측정하기 위한 시료로

사용하였다. 위의 모든 실험은 4 $^{\circ}$ C 하에서 실행하였다.

2) 단백질 정량

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 Bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 μ g/ μ l)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ μ l에 BCA 용액 100 μ l를 첨가하여 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μ l와 BCA 용액 100 μ l을 섞은 뒤 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

3) LPO(Lipid Peroxidation)의 활성도 측정

조직내 지질 과산화물의 함량 측정은 Ohkawa 등¹¹의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 조직 마쇄 균질액을 1,000 \times g에서 15분간 원심분리한 후 20%간 조직 균질액 0.1ml에 8.1% Sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma, USA) 0.1ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 0.75ml과 2.1% Thiobarbituric acid(TBA, Sigma, USA) 0.5ml를 가한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시키고 실온에서 냉각한 다음 혼합액을 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 상층액을 취하여 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)에서 540 nm로 흡광도를 측정한 후 조직 단위 당 과산화지질의 농도를 산출하였다.

4) GSH(Glutathione)의 활성도 측정

간조직의 GSH 함량은 Ellman¹²의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 간조직 균질액을 1,000 \times g에서 15분간 원심분리한 후 상층액 0.2 ml에 증류수 0.3 ml, 4% sulfosalicylic acid(Sigma, USA) 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 1,000 \times g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 발색제인 1mM의 5,5'- dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB, Sigma, USA) 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 분광광도계에서 402nm로 흡광도를 측정하였다.

5) GST(Glutathione-S-Transferase)의 활성도 측정

GST 활성도 측정은 Hibig 등¹³의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간조직 균질액 50 μ l, 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 890 μ l, 100mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB; Sigma, USA) 10 μ l, 20mM GSH 50 μ l를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡

광도 변화를 10분 간격으로 60분간 측정하였다. 활성도는 분당 mg 단백질로 나타내었다.

6) Glutathione Reductase의 활성도 측정

Glutathione Reductase의 활성측정은 Racker¹⁴의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간 조직 균질액 20 μ l, 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 2.5 μ l, 26.978mM EDTA 100 μ l, 66.01mM glutathione disulphide (GSSG; Sigma, USA) 200 μ l, 9.148mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH; Sigma, USA) 50 μ l를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 10분 간격으로 60분간 측정하였다. 활성도는 분당 mg 단백질로 나타내었다.

7) Glutathione Peroxidase의 활성도 측정

Glutathione Peroxidase의 활성측정은 Flohe 등¹⁵의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 간 조직 균질액 25 μ l, 0.3M sodium phosphate buffer 500 μ l, 25.5mM sodium azide (Sigma, USA) 250 μ l, 1mM hydroperoxide(Sigma, USA) 160 μ l, 294.37mM glutathione (Sigma, USA) 30 μ l, 8.4mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH; Sigma, USA) 55 μ l, glutathione reductase(Sigma, USA) (2.5 mg/ml) 5 μ l를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 측정하였다.

8) SOD(Superoxide Dismutase)의 활성도 측정

Cytosolic 분획의 상층액 10 μ l를 0.1mM EDTA (Sigma, USA)가 첨가된 50mM potassium phosphate buffer 2.93ml에 가한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 여기에 50 mM hematoxylin(Sigma, USA) 60 μ l를 첨가한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) Catalase의 활성도 측정

조직 내의 Catalase 활성도는 Goth and Vitai¹⁶의 방법에 따라 측정하였다. Mitochondrial fraction에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 2~3ml를 넣고 얼렸다 녹였다 하는 과정을 3회 반복하여 막단백질인 Catalase를 유리시켰다. 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.5ml에 원액 H₂O₂ 용액 (30%)을 가하여 25 °C에서 5분간 예비 반응시킨 다음 mitochondria 분획 20 μ l를 넣어 섞어 준 후 30초 후에 32.4mM의 ammonium molybdate 0.1ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 분광광도계에서 402nm로 흡광도를 측정하였다. 대조실험으로 기질인 H₂O₂ 용액과 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를

가하여 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도 변화를 측정하였으며, 효소의 활성도는 30초 동안에 μ M의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.

10) Hydroxyproline의 활성도 측정

간조직내에 존재하는 총 collagen 양을 간접적으로 측정하여 간조직 중 collagen의 축적 정도를 파악하기 위하여 Hydroxyproline 양을 Jamall¹⁷ 등의 방법에 따라 측정하였다.

냉동시킨 간조직의 일부(0.6g)를 6N HCl에 넣고 균질화시켜서 110°C에서 10-24시간 가수분해시킨 다음에 여과시켰다. 이때 trans hydroxyproline를 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ g농도로 6N HCl에 넣어 시료와 같이 110°C에서 10-24시간 가수분해 시켰다(표준용액). 각 시료와 표준용액 50 μ l를 완전히 건조시켜 염산을 제거한 후 50% isopropanol을 넣어 침전물을 용해시키고 200 μ l chloramine-T(84mg chloramine-T in 10 ml acetate citrate buffer) 용액을 가하여 10분간 실온에서 반응시키고 1.2ml의 Ehrlich 반응용액(2.7 gp-dimethyl-aminobenzaldehyde + 3ml 60% perchloric acid + 8ml isopropanol)을 넣었다. 50°C에서 90분간 발색시킨 후 상온에서 냉각시켜 분광광도계에서 540nm로 흡광도를 측정하여 표준용액에 따라 농도를 측정하였다.

11) Beta-Glucuronidase의 활성도 측정

Beta-glucuronidase의 측정은 김 등¹⁸의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, Mitochondrial 분획에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 2~3ml를 넣고 얼렸다 녹였다 하는 과정을 3회 반복하여 효소액을 유리시켰다. 0.1M phosphate buffer 0.38ml에 10mM p-nitrophenyl - β -D-glucuronide(Sigma, USA) 0.02ml, 효소액 0.1ml를 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 0.5N NaOH 0.5ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1 ml를 가하여 2000 \times g에서 20분간 원심분리한 후 분광광도계에서 405nm로 흡광도를 측정하였다.

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 STATISTICA for Windows Release 6.0(StatSoft, USA)을 이용하였고, 통계방법은 Student's T-test를 하였으며, 그 결과 95% 신뢰수준에서 유의수준이 0.05미만(p<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 실험결과

1. Cytochrome p450의 mRNA발현에 미치는 영향

GYJJT+CCl₄군에서만 대조군에 비하여 mRNA의 발현이 감소하였고 다른 군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 1).

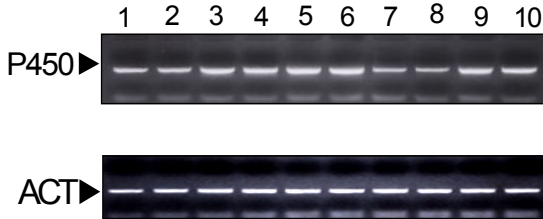


Figure 1. Effect of Gonyuljejo-tang on the Serum Cytochrome p450 mRNA in Rats Injured by CCl₄ Solution
 1-2: Not treated group
 3-4: Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 5-6: Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 7-8: Solid extract of CCl₄ injection group after Gonyuljejo-tang feed
 9-10: Solid extract of Gonyuljejo-tang feed group after CCl₄ injection

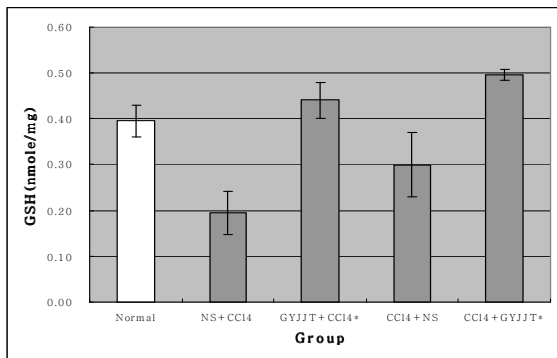


Figure 2. Effect of Gonyuljejo-tang on the Serum GSH in Rats Injured by CCl₄ Solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gonyuljejo-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gonyuljejo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

2. 항산화 활성에 미치는 영향

가. GSH(Glutathione)에 미치는 영향

GSH의 활성함량은 Normal군이 0.40±0.03umoles/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 0.20±0.05umoles/mg, GYJJT+CCl₄군은 0.44±0.04umoles/mg, CCl₄+NS군은 0.30±0.07umoles/mg, CCl₄+GYJJT군은 0.49±0.01umoles/mg을 나타내었다. GYJJT+CCl₄군과 CCl₄+GYJJT군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 2).

나. GST(Glutathion-S-Transferase)에 미치는 영향

GST의 활성함량은 Normal군이 125.75±13.15 umoles/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 169.50±12.50 umoles/mg, GYJJT+CCl₄군은 193.33±13.33umoles/mg, CCl₄+NS군은 174.25±12.53umoles/mg, CCl₄+GYJJT군은 201.50±5.80umoles/mg을 나타내었다. GYJJT+CCl₄군과 CCl₄+GYJJT 군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 3).

다. Glutathione Peroxidase에 미치는 영향

Glutathione Peroxidase의 활성함량은 Normal군이 16.86±1.60unit/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 21.90±1.29unit/mg, GYJJT+CCl₄군은 31.44±0.74 unit/mg, CCl₄+NS군은 26.48±0.61unit/mg, CCl₄+GYJJT

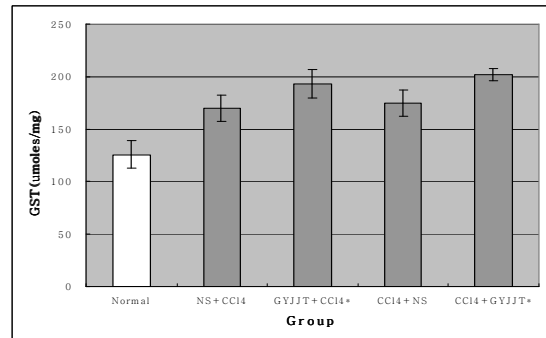


Figure 3. Effect of Gonyuljejo-tang on the Serum GST in Rats Injured by CCl₄ Solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gonyuljejo-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gonyuljejo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

군은 36.06±3.66 unit/mg을 나타내었다. GYJJT+CCl₄군과 CCl₄+GYJJT군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 4).

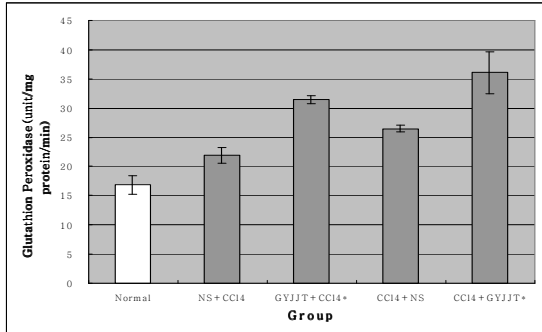


Figure 4. Effect of Gunyuljeo-tang on the Serum Glutathione Peroxidase in Rats Injured by CCl₄ Solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+ CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+ CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gunyuljeo-tang feed
 CCl₄+ NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gunyuljeo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

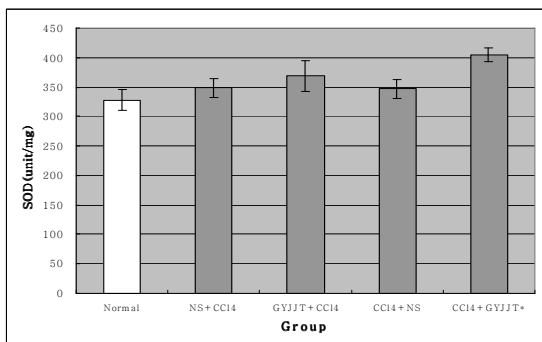


Figure 5. Effect of Gunyuljeo-tang on the serum SOD in Rats injured by CCl₄ solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+ CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+ CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gunyuljeo-tang feed
 CCl₄+ NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gunyuljeo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

라. SOD(Superoxide Dismutase)에 미치는 영향

SOD의 활성함량은 Normal군이 328.18±17.21 unit/mg을 나타내었으며, NS+ CCl₄군은 348.48±16.46 unit/mg, GYJJT+ CCl₄군은 368.60±26.80 unit/mg, CCl₄+NS군은 346.94±16.04 unit/mg, CCl₄+GYJJT군은 404.85±12.18 unit/mg을 나타내었다. CCl₄+GYJJT군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(Figure 5).

마. Catalase의 활성도에 미치는 영향

Catalase의 활성함량은 Normal군이 361.38±10.98 umoles/mg을 나타내었으며, NS+ CCl₄군은 363.75±9.34umoles/mg, GYJJT+ CCl₄군은 371.00±12.19 umoles/mg, CCl₄+NS군은 374.55±6.44 umoles/mg, CCl₄+GYJJT군은 405.48±7.88umoles/mg을 나타내었다. CCl₄+GYJJT군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. (Figure 6.)

바. Hydroxyproline의 활성도에 미치는 영향

Hydroxyproline의 활성함량은 Normal군이 0.20±0.00ug/ml을 나타내었으며, NS+ CCl₄군은 0.21±0.01 ug/ml, GYJJT+ CCl₄군은 0.18±0.01ug/ml, CCl₄+NS군은 0.23±0.01ug/ml, CCl₄+GYJJT군은 0.38±0.01 ug/ml을 나타내었다. GYJJT+ CCl₄군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었고, CCl₄+GYJJT군은

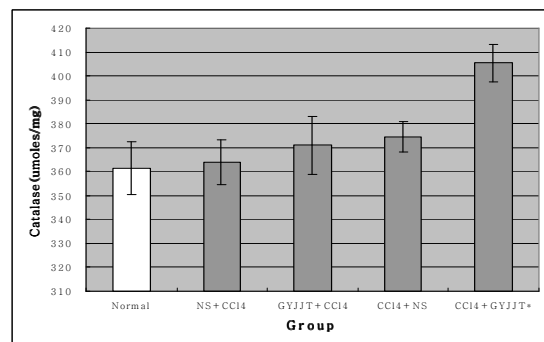


Figure 6. Effect of Gunyuljeo-tang on the Serum Catalase in Rats injured by CCl₄ Solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+ CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+ CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gunyuljeo-tang feed
 CCl₄+ NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gunyuljeo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

유의한 증가를 나타내었다 (Figure 7).

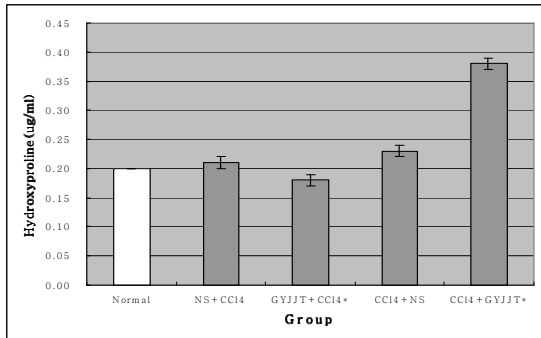


Figure 7. Effect of Gunyuljejo-tang on the Serum Hydroxyproline in Rats Injured by CCl₄ Solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gunyuljejo-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gunyuljejo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

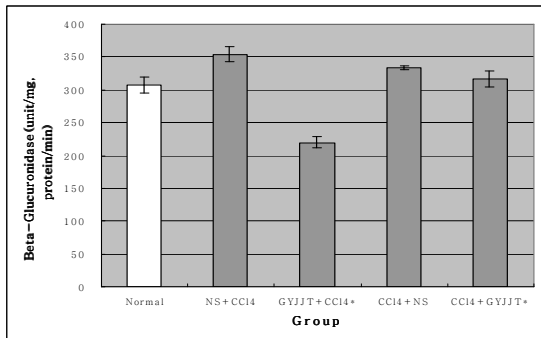


Figure 8. Effect of Gunyuljejo-tang on the Serum β-Glucuronidase in Rats Injured by CCl₄ Solution

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 GYJJT+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Gunyuljejo-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+GYJJT: Solid extract of Gunyuljejo-tang feed group after CCl₄ injection
 * : P<0.05

사. β-Glucuronidase의 활성도에 미치는 영향

Beta-Glucuronidase의 활성함량은 Normal군이 307.15±12.61unit/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은

354.33±11.09unit/mg, GYJJT+CCl₄군은 220.00±8.16 unit/mg, CCl₄+NS군은 333.68±3.30unit/mg, CCl₄+GYJJT군은 316.83±12.52unit/mg을 나타내었다. GYJJT+CCl₄군과 CCl₄+GYJJT 군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 8).

IV. 고찰

많은 화학물질이 간손상을 일으키며 그 손상의 기전 또한 다양하다. 최근에는 각종 독성 물질에 의한 손상이 화학물질을 다루는 작업장에서부터 가정에 이르기까지 많이 일어나고 있다¹. Chlorinated hydrocarbon, 쥐약 등에 포함되어 있는 인(P)과 Paracetamol, 독버섯 등이 아직도 독성 간손상을 일으키는 주요 원인이 된다. 그러나 최근에는 치료 약제에 대한 반응이 강조되고 있으며, 약물 복용의 증가와 더불어 더 늘어날 것으로 생각된다. 간손상의 발생기전은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 첫째는 “내인성 간손상”인데 약물자체나 그 대사물질이 직접 간세포나 세포질 소기관을 파괴시켜서 세포대사에 장애가 일어나거나, 특정 대사과정을 방해함으로써 간손상이 생기고 이차적으로 간세포의 구조적 변화가 일어나게 된다. 둘째는 “특이체질 간손상”으로 오직 특이 체질에서만 일어나는 것으로, 과민성 반응에 의한 것과 대사이상으로 인하여 간손상을 일으키는 대사물질이 만들어지거나 축적되어 일어나는 것이다.

사람의 간경변증과 아주 잘 맞는 실험적인 간경변증의 모형은 없으나, 그동안 여러 가지 모형이 유용하게 사용되어 왔다. 간경변을 일으킬 수 있는 약물과 시술적인 방법으로는 알코올⁹, Schistosomiasis¹⁹, 지방단백식이²⁰, 담관결찰²¹, 사염화탄소²², Mitrosamine²³ 등이 있다. 사염화탄소는 오랫동안 가장 보편적으로 사용되었으며^{8,9}, 빠른 간손상을 일으키고 간세포의 대사와 유전자 표현에 심한 장애를 초래한다. 사염화탄소의 지연성 독성효과는 구토, 설사, 복통, 토혈이고 가장 심각한 효과는 간독성과 신경독성에 의한 것이다. 간손상의 징후와 증상은 수 시간내지 2~3일 후에 나타나며, 초기의 심한 중추신경계에 대한 효과가 없이 나타날 수 있다. 사염화탄소에 의한 급성 간부전 및 신부전증은 치료가 어렵고, 사염화탄소 중독의 현저한 양상

은 간부전이기는 하나 가장 많은 사망원인은 신부전이다²⁴.

간장에서 유발될 수 있는 질환은 간염, 간경변, 지방간, 간종양, 간농양, 간디스토마, 간매독, 간성 혼수, 레이증후군, 윌슨병 등 다양하다. 그중 간경화는 간내의 여러 장애가 여러 단계의 과정을 거쳐, 간에 가해진 결과로써 생기는 모든 형태의 만성 간질환으로, 보건년감에 의한 사망원인 분석에 의하면, 전체 소화기계 질환은 감소하는 추세이나 만성간질환 및 간경변에 의한 사망률에 의한 사망률은 오히려 증가하고 있다².

간경변을 일으키는 주요 원인으로는 Virus, 세균, Alcohol, 철의 과다복용, 각종 심장질환 등을 꼽을 수 있으며 기타 원인불명인 경우도 적지 않다^{2,25}. 간경변을 서양의학에서는 편의상 조직학적 또는 병인적 의의를 참고하여 문맥성(Portal), 담즙성(Biliary), 심장성(Cardiac), 기타 稀有型 및 비특이적 간경변증으로 분류하는데 이와 같은 여러 형은 종말에는 대부분이 괴사후성 간경변으로 이행한다^{2,25,26}.

간경변은 지속적인 간세포 기능상실과 간혈관계의 진행성 변화를 동반하는 문맥성 항진, 상부 소화도 대량출혈, 간성 혼수 등의 3가지의 위험한 병발증을 일으킨다^{2,26,27}.

각종 대사기능의 중심 기능을 수행하고 있는 간장은 대사물질에 의한 중독에 민감하게 반응하게 간세포의 변성, 괴사, 지방축적, 간효소의 누출 등의 간장애를 나타낸다². 이러한 肝硬變에 미치는 研究로 金²이 生肝健脾湯이 肝臟의 代謝와 再生機能에 미치는 影響을, 金²⁸이 肝疾患에 대한 韓方治療劑에 關한 研究를, 安²⁹등이 柴苓湯이 肝損傷에 미치는 影響을, 柳³⁰가 補心清肝湯이 肝臟의 酵素活性에 미치는 影響에 關한 研究를, 李³¹가 鹿茸이 肝組織에 미치는 影響에 關한 研究를, 任 등³²이 淸肝健脾湯의 茵陳 增量이 損傷肝에 미치는 影響을, 崔³³가 小柴胡湯 및 柴苓湯이 CCl₄에 의한 胃의 肝損傷에 미치는 影響을, 洪 등³⁴이 淸肝湯이 GOT, GPT, ALP, LDH의 活性度를 정상에 가깝게 回復시킨다고 하였으며, 姜³⁵이 淸肝解鬱湯煎液과 淸肝解鬱湯加金銀花煎液이 肝細胞의 再生에 효과적이라고 報告하는 등 많은 실험연구가 進行되었으며 效能이 확인되었다.

肝은 藏血之臟이며 疏泄機能을 수행하는 臟器

로서, 人體의 氣機를 舒暢, 條達케하는 作用을 하는 臟器로 인식하며, 病理的으로 肝損傷의 原因을 外感邪氣, 飲食失節, 飲酒, 情志鬱結 등으로 꼽는다. 症狀과 轉歸를 고찰해 볼 때 韓醫學에서는 肝硬變이란 용어는 없으나 積聚, 鼓脹, 單腹脹, 痞塊, 黃疸 등의 範疇에 屬한다고 볼 수 있다^{26,27,36-38}.

肝은 體陰而用陽이라 불리우며 肝陰과 肝陽사이 에 일정한 平衡狀態를 유지할 때 정상적인 肝의 機能인 主疏泄·主藏血·主風·情志安靜·筋脈順理의 生理를 수행할 수 있으며, 肝病은 주로 어떤 원인에 의한 疏泄機能, 藏血機能 失常이나, 風, 寒, 濕, 熱 등의 邪氣에 의하여 일어난다. 肝病에서 일어날 수 있는 症狀으로는 口苦, 眩暈, 脇痛, 脇滿, 耳鳴, 耳聾, 少腹痛, 情志變化, 出血症狀, 癱木, 麻痺, 瘳攣, 震顫, 舌乾, 疝氣, 月經不調, 寒熱往來, 黃疸, 鼓脹, 疲勞, 惡心, 嘔吐 등이 있다³⁶.

乾栗은 “開肺之胃氣 而消食進食”³⁹한다 하였고, 健胃·補腎·益氣에 應用한다. 蟻螞는 蟻螞蟻應條地蠶蜚齊土蠶·老母蟲·核桃蟲 등으로 불리어지며²⁰ 性味는 微鹹, 微溫하며 足厥陰肝經에 入한다. 또한 破血, 血瘀, 散結, 通乳, 治切損疼痛, 痛風, 破傷風, 喉痺, 目翳, 丹毒, 癰疽, 痔漏에 使用되거니⁷, “月閉能通 兼脇痛 金匱治瘀血及脇下硬滿 目翳先去及喉痺”⁴⁰, “破瘀止痛 散風平喘 明目退翳”⁴¹에 使用된다.

본 실험에 건물제조당은 일반적으로 혈류의 장애로 간손상에 사용함을 응용하여 간손상의 정도와 간의 산화억제를 측정할 수 있는 혈청생화학 검사와 간의 산화억제와 환원성을 측정하기 위하여 LPO, GSH, GST, Glutathione Reductase, Glutathione Peroxidase, SOD, Catalase, Hydroxyproline, Beta-Glucuronidase를 측정하였다.

실험군과 대조군의 설정은, 간의 손상정도 와 간손상의 회복을 측정하기 위하여 CCl₄를 투여하기 전 Normal Saline과 Gonyuljejo-tang을 투여하여 비교하였고 CCl₄를 투여한 후 Normal Saline과 Gonyuljejo-tang을 투여하여 비교하였다.

Cytochrome p450은 인체의 간대사효소로 발암물질을 활성화시키면서 mRNA을 발현시킨다⁴². 본 실험에서는 GYJTT+CCl₄군은 대조군에 비하여 mRNA의 발현이 감소하였다(Figure 1).

GSH(Glutathione)는 셀프히드럴화합물 중 가장

중요한 환원성 효소로 자체는 산화되고 지질은 환원시킨다⁴². 본 실험에서 GSH의 활성함량은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 2).

GST(Glutathione-S-Tranferase)는 GSH의 -SH를 -SS-로 변화시켜 환원시킨다⁴². 본 실험에서 GST의 활성함량은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 3).

Glutathione Peroxidase는 항산화효소의 성분으로 간의 산화적 손상을 방지한다. 과산화수소(H₂O₂)나 지방과산화물질을 제거하는 반응에 관여하고 있을때, 산화형 Glutathione은 Vit E와 더불어 불포화지방산의 과산화를 방지한다⁴². 본 실험에서 Glutathione Peroxidase의 활성함량은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 4).

SOD(Superoxide Dismutase)는 활성산소를 제거시키는 효소로서 과잉생성된 활성산소를 해독하는 역할을 한다⁴². 본 실험에서 SOD의 활성함량은 CCl₄+GYJJT군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 5).

Catalase는 인체의 적혈구, 간, 신장등의 세포내 Peroxisome이나 Mitochondria같은 소과립에 풍부하게 존재한다⁴². 본 실험에서 Catalase의 활성함량은 CCl₄+GYJJT군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 6).

Hydroxyproline은 Collagen 대사의 생화학적 지표로 섬유화를 일으키는 여러 가지 질환에서 측정한다⁴². 본 실험에서 Hydroxyproline의 활성함량은 GYJJT+CCl₄군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었고, CCl₄+GYJJT군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Figure 7).

β -glucuronidase는 정상적으로 신장에서 배설되는 효소로 뇨중에서는 급성·만성 활동성 신우신염에서는 증가하고, 신장이나 요로계의 악성종양에서는 감소하는 경향을 나타낸다⁴². 본 실험에서 β -Glucuronidase의 활성함량은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Figure 8).

이상의 결과를 종합해보면, CCl₄로 유발된 급성 간손상에 건율제조탕 투여는 혈청 생화학 검사에서는 큰 변화를 나타내지 않는 것으로 판단되었다. 그러나, 건율제조탕을 먼저 투여한 실험군에서 발

암물질을 유발하는 간대사효소인 Cytochrome p450의 mRNA 발현을 억제하는 것으로 나타내었고, 불포화지방산의 과산화를 방지하는 GSH와 GST, Glutathione Peroxidase의 활성에서 실험군 모두 유의한 증가를 나타낼 뿐만 아니라, CCl₄에 노출한 후 건율제조탕을 투여한 실험군에서는 활성산소를 제거하는 항산화물질인 SOD와 과산화 분해효소인 Catalase, Hydroproline의 활성이 증가하였고, β -Glucuronidase도 실험군 모두에서 활성을 저하시킨 것으로 보아 건율제조탕은 간의 항산화 작용이나 항암작용에 일정한 영향을 미치는 것으로 판단된다.

이상의 실험으로 볼때 CCl₄로 유발된 간의 산화손상에 대하여 건율제조탕을 투여한 군에서 환원도가 유의한 것으로 보아 건율제조탕은 간기능의 보호작용보다는 손상된 간의 기능회복에 유의성이 있는 것으로 추정된다.

V. 결 론

乾栗蟻螬湯의 肝損傷 回復 機能을 실험적으로 규명하기 위하여 실험을 시행한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Cytochrome p450의 mRNA발현은 대조군에 비하여 GYJJT+CCl₄군에서 감소를 나타내었다.
2. GSH의 활성도는 대조군에 비하여 실험군 모두 유의성있는 감소를 보였다
3. GST의 활성도는 대조군에 비하여 실험군 모두 유의성있는 증가를 보였다
4. Glutathione Peroxidase의 활성도는 대조군에 비하여 실험군 모두 유의성있는 증가를 보였다.
5. SOD의 활성도는 대조군에 비하여 CCl₄+GYJJT군에서 유의성있는 증가를 보였다.
6. Catalase의 활성도는 대조군에 비하여 CCl₄+GYJJT군에서 유의성있는 증가를 보였다.
7. Hyrdoxyproline의 활성도는 대조군에 비하여 GYJJT+CCl₄군은 유의성있는 감소를 보였으나, CCl₄+GYJJT군은 유의성있는 증가를 보였다.
8. Beta-Glucuronidase의 활성도는 대조군에 비하여 실험군 모두 유의성있는 감소를 나타내었다.

VI. 참고 문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, 1994: 735-737, 761.
2. 金秉雲 外. 東醫肝系內科學. 東洋醫學研究院 出版部, 서울, 1989:254-271.
3. 전국 한의과대학 사상의학교실. 四象醫學. 集文堂, 서울, 2000:484.
4. 이정찬. 新사상의학론. 木과土, 서울, 2001: 307-309.
5. 李載熙. 圖說韓方 藥理·藥能의 臨床應用. 學林社, 서울, 1985:529.
6. 神農本草經. 文光圖書出版公司. p185
7. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 中國. 上海科學技術出版社, 中華민국 71년:2788-2789.
8. Rubin E, Hutter F. Methods in the study of structural changes induced by experimental chronic hepatic injur., *Methods achive Exp. Pathol.* 1967;2: 224-230.
9. Tsukamoto H, Towner SJ, Ciofalo LM, French SW. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology.* 1986;6:814-822.
10. Farber JL, Gerson RJ. Mechanism of sell injury with hepatotoxic chemicals. *pharmacol Rev.* 1984;36: 718 ~ 726.
11. Ohkawa S, Fukatsu K, Miki S, Hashimoto T, Sakamoto J, Doi T, Nagai Y, Aono T. 5-aminocoumarans: dual inhibitors of lipid peroxidation and dopamine release with protective effects against central nervous system trauma and ischemia. *J Med Chem.* 1997;40:559-573.
12. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70-77.
13. Hibig WH, Pabst MJ, Jaloby WB. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974;249: 7130-7139.
14. Racker E. Glutathione Reductase from baker's yeast and beef liver. *J. Biol. Chem.* 1955;217: 855-865
15. Flohe L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-121.
16. Goth L, Vitai M. The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:882-888.
17. Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem.* 1981;112: 70-75.
18. Kim DH, Shim SB, Kim NJ, Jang IS. Beta-glucuronidase inhibitory activity and hepato-protective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull.* 1999;22(2):162-164.
19. Carmeron GR, Ganguly NC : An experimental study of the pathogenesis and reversibility of Schistosomal hepatic fibrosis, *I pathol Bacterio.* 1964;87 :217-327.
20. Jaffe ER, Wissler RW, Benditt EP. The importance of methionine and clonine in the arrest of dietary cirrhosis of the liver in the rat, *An J pathol.* 1950;26:951-960.
21. Kountouras J, Billing BH, Acheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction, A new experimental model for cirrhosis in the rat, *Br I Exp pathol.* 1984;65:305-311.
22. Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimental produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis *Hepatology.* 1983;3:112-120.
23. Madden Jw, Gertann SL, Rollf J, Bissel DM. Immunolocalization of Laminin normal rat liver and Biosynthesis of laminin b hepatic lipocytes in primary culture, *Gastroenterolog.* 1988;94:1053 ~ 1062.
24. 서울대학교 의과대학 약리학 교실. 약리학. 고려의학, 서울, 1994:839.
25. 李文鎬 外. 내과학(上卷). 博愛出版社, 서울, 1965:1003-1007.
26. 文濬典 外. 東醫病理學. 高文社, 서울, 1990: 331-337.
27. 具本泓. 消化器 疾患의 韓方臨床. 杏林出版社, 서울, 1977:312.
28. 金定濟. 肝疾患에 대한 韓方治療劑에 관한 研究. 慶熙韓醫大 論文集. 1978;1:9 ~ 42.
29. 安圭錫, 金光湖. 柴苓湯이 Thioacetamide에 의한 白鼠 肝損傷에 미치는 影響. 慶熙韓醫大 論文集. 1980;3:1 ~ 14.

30. 柳珍和. 補心清肝湯이 飢餓白鼠 肝臟의 酵素活性에 미치는 影響에 關한 組織化學的 研究. 慶熙韓醫大 論文集. 1980;3:109-121.
31. 李學仁. 鹿茸이 家兔血清內 cholesterol에 미치는 影響. 慶熙韓醫大 論文集. 1980;3:35-50.
32. 任宰訓 外. 清肝健脾湯의 茵陳 增量이 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響. 慶熙韓醫大 論文集. 1980;3:213-218.
33. 崔相昊. 小柴胡湯 및 柴芩湯이 CCl_4 에 의한 肝損傷에 미치는 治療效果의 比較研究. 圓光大學校 大學院 碩士論文. 1982.
34. 洪茂昌, 李孝仁, 金完熙. 白鼠肝臟에 대한 補肝湯, 瀉肝湯의 效果에 關한 研究. 慶熙韓醫大 論文集. 1983;6:227-244.
35. 姜泰鐘. 清肝解鬱湯煎液과 清肝解鬱湯加金銀花煎液이 四鹽化炭素로 誘發된 Mouse의 肝損傷에 미치는 影響에 關한 研究. 圓光大學校 大學院. 3:507-519.
36. 金秉雲 外. 東醫肝系內科學. 東洋醫學研究院 出版部, 서울, 1989:24~30, 39, 242, 254-271.
37. 李槲. 醫學入門. 大星文化社, 서울, 1982: 167
38. 張介賓. 景岳全書 上卷. 大星文化社, 서울, 475-483.
39. 崔炳一. 李濟馬 遺作文獻集. 도서출판 파란 들, 서울, 2002:237.
40. 朱東樵. 本草詩箋. 旋風出版社, 民國63년:179.
41. 蕭培根. 中國本草圖錄 券五. 1989:225.
42. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 제3판. 의학문화사, 서울, 2002:95, 101, 112, 116, 125, 155-156, 179, 180, 196-199, 218, 305, 328, 334, 345, 367-369, 399, 410-411, 829, 848.