

사염화탄소 투여로 인한 랫드의 급성 간 손상에 대한 루틴의 예방 효과

황의경¹

상지대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

(게재승인: 2012년 1월 15일)

Protective Effect of Rutin on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats

Eui-Kyung Hwang¹

Department of Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract : This study was performed to investigate hepatoprotective effect of rutin on acute hepatic damage induced by carbon tetrachloride in rats. Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups; normal control group, CCl₄ control group, two rutin treatment groups (rutin 200+CCl₄ and rutin 400+CCl₄). Dissolving vehicles were applied to the rats in the normal control group. The rutin was administrated to the rats in rutin 200+CCl₄ and rutin 400+CCl₄ groups at the levels of 200 mg/kg and 400 mg/kg, 3 consecutive days orally, with 24 hours interval before inoculating CCl₄. CCl₄ was intraperitoneally administered an hour after the last treatment of rutin to the rats in every group except the normal control group. The body weight of rats in CCl₄ control group were significantly lower than other groups ($p < 0.05$), but the liver weight and relative liver weight were higher than normal control group ($p < 0.05$). The activities of ALT, AST, ALP, GTP, LDH and the level of total bilirubin in sera of rats in CCl₄ control group were higher and the levels of total protein, albumin and globulin were lower than the normal group ($p < 0.05$). The activities of ALT, AST, ALP, GTP, LDH and the level of total bilirubin in rutin 200+CCl₄ and rutin 400+CCl₄ groups were lower than CCl₄ control group ($p < 0.05$). Therefore the pre-treatment of rutin before CCl₄ inoculation in rats effectively inhibited the elevation of serum ALT, AST and total bilirubin which are the parameters of hepatic damage.

Key words : rutin, CCl₄, ALT, bilirubin, rat.

서 론

Rutin은 플라보노이드(flavonoids) 중에서 채소, 과일 및 곡류 등에 특히 다량 함유되어 있는 flavonol에 속하며(10,11,23,26), 매우 다양한 기능을 가지고 있어 생체 내에서 일어나는 여러 반응에 관여한다. Rutin은 동물과 사람에서 항산화작용(11,21,30,31)을 위시하여 콜레스테롤 저하작용(6,25,32,33), 세균에 대한 항균작용(4), 말라리아 병원체에 대한 항원중 작용(16), 바이러스에 대한 항바이러스 작용(9), 유전자 손상 방어 작용(35), 암세포의 증식을 억제하는 항암작용(10), 항알레르기 작용(9), 면역조절작용(7), 항염증작용(15), 간 손상 보호 작용(2,18), 위궤양 예방 작용(21), 항혈전 작용(14), 혈관 확장 작용(9) 등 유용한 생리활성 기능을 하는 것으로 밝혀져 있다.

사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)는 향긋한 냄새가 나는 무색 액체로서 화재 진압용 소화제, 세탁용 용매, 냉각제, 구충제 및 살서제 등으로 사용되어 왔으며, 독성학적으로 간세포의 괴사를 일으키고 간경화를 유발하는 등 간장 독성이 있다는 사실이 밝혀져 있어 간독성의 기전을 규명하고, 약물에 대한 간보호 효과 등을 밝히려는 실험 등에서 널리 사용되고 있다(24,36,37). CCl₄에 의한 간손상은 CCl₄가 간의 microsomal cytochrome P450 type 2E1(CYP2E1), 2B1(CYP2B1) 또는 2B2(CYP2B2) 등에 의해 환원적 탈염소반응을 통해 생성된 trichloromethyl radical(CCl₃·)과 CCl₃·이 다시 산소와 결합하여 형성된 trichloromethyl peroxy radical(CCl₃OO·)에 의해 야기된다(24,29,36,37). 이들 radical은 간세포 세포막의 구성성분인 지방에 대해 과산화반응을 일으켜 세포막의 투과성을 증진시켜 세포에 손상을 주거나 세포 괴사를 초래한다(12,29,36).

Rutin이 간 손상을 방어하는 작용에 대한 연구는 아직까지 많이 이루어지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 랫드에

¹Corresponding author.
E-mail : ekhwang@sangji.ac.kr

rutin을 미리 투여 후에 CCl₄를 투여한 다음 간 손상의 지표가 되는 혈청화학치를 조사함으로써 rutin 사전 투여가 CCl₄에 의한 간 손상을 방어하는 효과에 대해 알아보려고 실시하였다.

재료 및 방법

공시 시료

본 시험에 사용된 rutin, carbon tetrachloride(CCl₄) 및 propylene glycol 등의 시약은 Sigma-Aldrich, Inc(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였고, 혈청분석용 키트는 아산 제약(경기 화성)으로부터 구입하여 사용하였다.

실험 동물 및 사양관리

평균체중이 99.3 ± 3.9 g인 생후 4주령인 Sprague-Dawley (SD) 랫드 수컷 24마리를 (주)대한 바이오링크(충북 음성)로부터 구입하여 2주일간 상용 펠렛 사료(CJ Feed, 인천)로 예비사양한 후 이들(체중 233.0 ± 10.6 g)을 무작위로 군 당 6마리씩 4개의 군으로 나누어 실험에 이용하였다. 모든 랫드는 1두씩 랫드용 폴리카보네이트 케이지에 넣어 개별로 사육하였으며 바닥에는 깔짚으로 대패밥을 깔아주었다. 동물의 사육실 조건은 온도는 23 ± 2°C가 되게 하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

루틴 및 사염화탄소 투여

정상대조군(normal control)은 rutin의 용매로 사용한 20% propylene glycol 용액을 rutin 투여군과 같은 양으로 1일 1회 3일간 경구 투여한 후 마지막 투여 1시간 후 olive oil을 체중 kg 당 2 ml 되게 복강으로 투여하였고, CCl₄ 대조군은 다른 군에서 최종 rutin 투여 1시간 후에 CCl₄ 원액을 olive oil에 1:1(v/v)로 혼합한 것을 체중 kg 당 2 ml 되게 복강으로 투여하였다. rutin 투여군은 1일 1회 3일간 rutin을 20% propylene glycol 용액에 현탁하여 체중 kg 당 200 mg 및 400 mg을 각각 경구 투여하였고 최종 rutin 투여 1시간 후에 CCl₄ 원액을 olive oil에 1:1(v/v)로 혼합한 것을 체중 kg 당 2 ml 되게 복강으로 투여하였다.

시료 채취

CCl₄ 투여 24 시간 경과 후 랫드를 에테르로 가볍게 마취하여 복부를 절개한 다음 복강대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 랫드는 희생시키기 전 12시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취하도록 하였다. 채취한 전혈을 실온에 30분간 방치하여 혈액이 응고된 다음에 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 검사에 사용하였다.

시료분석

Aspartate aminotransaminase(AST)와 alanine aminotransaminase(ALT) 활성도는 Reitman-Frankel법, alkaline phosphatase(ALP)는 p-nitrophenyl phosphate 기질법, gamma-

glutamyl transpeptidase(γ-GTP)는 Szasz법, lactate dehydrogenase(LDH)는 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH)를 측정하는 효소법, total bilirubin은 Malloy-Evelyn 법, 총단백 농도(Total protein)는 biuret법 및 albumin(A) 농도는 bromcresol green법에 따라서 각각 조제된 시약 kit(아산제약, Korea)를 이용하여 측정하였으며, globulin(G) 농도는 총단백 농도에서 albumin 농도를 빼서 구하였고, A/G 비율은 albumin 농도를 globulin 농도로 나눈 것으로서 계산하였다(3).

통계처리

모든 실험성적은 평균치와 표준편차로 나타내었고, 정상대조군과 CCl₄ 대조군 및 rutin 투여군 간의 통계분석은 Dunnett's test를 이용하여 검정하였으며, p < 0.05 이하를 유의한 차이로 인정하였다.

결 과

랫드의 체중, 간 무게 및 체중 대비 간 무게의 비율

각 실험군의 체중, 간의 무게 및 체중 대비 간 무게의 비율은 Table 1과 같다. 체중은 CCl₄ 대조군이 정상대조군에 비하여 유의성 있게 가벼웠으며(p < 0.05), rutin 투여군은 모두 normal control 군에 비하여는 낮았으나 CCl₄ 대조군에 비하여는 유의성 있게 증가하여(p < 0.05), rutin 투여가 CCl₄ 투여로 인한 체중 감소를 어느 정도 방지한다는 것을 확인하였다. 간 무게는 CCl₄ 대조군이 정상대조군에 비하여 유의성 있게 무거웠고(p < 0.05), rutin 투여군의 경우 CCl₄ 대조군에 비하여 낮았지만 모두 유의성은 없었다. 체중 대비 간 무게의 비율은 CCl₄ 대조군이 정상대조군에 비하여 유의적으로 높았으며(p < 0.05), rutin 투여군은 모두 정상대조군에 비하여는 높았으나 CCl₄ 대조군에 비하여는 유의성 있게 낮았다(p < 0.05).

혈청의 AST, ALT 및 ALP 활성도

간세포 손상의 중요한 지표가 되는 혈청 AST, ALT 및 ALP 활성도는 Table 2와 같다. AST 농도는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군의 농도가 약 5.8배까지 상승하여 유의성

Table 1. Body weight, liver weight and relative liver weight in rats by CCl₄-induced hepatotoxicity

Group	Body weight(g)	Liver weight(g)	Relative liver weight(%)
Normal control	243.8 ± 8.9	9.7 ± 0.7	4.0 ± 0.3
CCl ₄ control	223.6 ± 12.1*	11.6 ± 1.0*	5.2 ± 0.3*
Rutin 200 + CCl ₄	239.1 ± 11.5 [#]	11.0 ± 1.3	4.8 ± 0.4 [#]
Rutin 400 + CCl ₄	238.8 ± 13.9 [#]	10.5 ± 1.1	4.5 ± 0.3 [#]

Each value represents mean ± SD.

*p < 0.05 vs. normal control

[#]p < 0.05 vs. CCl₄ control

Table 2. Effect of rutin pretreatment on serum AST, ALT and ALP activities in rats induced by CCl₄ hepatotoxicity

Group	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	ALP(IU/L)
Normal control	86.3 ± 10.7	42.8 ± 7.4	343.3 ± 106.7
CCl ₄ control	501.7 ± 240.5*	595.5 ± 203.2*	752.8 ± 258.4*
Rutin 200 + CCl ₄	81.2 ± 70.7#	217.8 ± 114.6#	550.5 ± 74.9
Rutin 400 + CCl ₄	79.2 ± 46.1#	197.0 ± 134.6#	526.5 ± 61.9

Each value represents mean ± SD.

* $p < 0.05$ vs. normal control

$p < 0.05$ vs. CCl₄ control

있게 높게 나타났($p < 0.05$). rutin 투여군은 모두 AST 농도가 CCl₄ 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았고($p < 0.05$), 정상대조군과 유사한 수준을 나타내었다. rutin 투여 농도에 따른 AST 활성도의 차이는 거의 없었다.

ALT 활성도는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군의 농도가 유의성 있게 높게 나타난 반면에($p < 0.05$), rutin 투여군은 모두 ALT 활성도가 CCl₄ 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$). rutin 투여 농도에 따른 ALT 활성도는 rutin 400+CCl₄ 군이 rutin 200+CCl₄ 군에 비하여 조금 더 낮았다.

ALP 활성도는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군의 농도가 현저히 높게 나타난 반면에($p < 0.05$), rutin 투여군은 모두 ALP 활성도가 CCl₄ 대조군에 비하여 낮은 편이었으나 모두 유의성은 없었다. rutin 투여 농도에 따른 ALP 활성도의 차이는 거의 없었다.

혈청의 bilirubin 농도, γ -GTP 및 LDH 활성도

간 세포 손상의 지표로 활용되고 있는 total bilirubin 농도, γ -GTP와 LDH 활성도는 Table 3과 같다.

total bilirubin 농도는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군의 농도가 유의성 있게 높게 나타난 반면에($p < 0.05$), rutin 투여군은 모두 total bilirubin 농도가 CCl₄ 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았고($p < 0.05$), 보다 높은 농도로 rutin을 투

Table 3. Effect of rutin pretreatment on serum ALP and bilirubin levels in rats induced by CCl₄ hepatotoxicity

Group	bilirubin (mg/dL)	γ -GTP(IU/L)	LDH(IU/L)
Normal control	0.36 ± 0.30	7.1 ± 2.7	452.2 ± 112.8
CCl ₄ control	1.50 ± 0.31*	15.8 ± 4.9*	1,579.2 ± 337.7*
Rutin 200 + CCl ₄	0.67 ± 0.21#	11.1 ± 3.7	1,349.2 ± 295.7
Rutin 400 + CCl ₄	0.42 ± 0.10#	10.2 ± 2.4	1,302.2 ± 315.8

Each value represents mean ± SD.

* $p < 0.05$ vs. normal control

$p < 0.05$ vs. CCl₄ control

여한 rutin 400+CCl₄ 군이 rutin 200+CCl₄ 군에 비하여 더 낮았다.

γ -GTP 활성도는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군이 유의성 있게 높게 나타난 반면에($p < 0.05$), rutin 투여군은 모두 γ -GTP 활성도가 CCl₄ 대조군에 비하여 낮은 편이었으나 모두 유의성은 없었다. rutin 투여 농도에 따른 γ -GTP 활성도의 차이는 거의 없었다.

LDH 활성도는 normal control 군에 비하여 CCl₄ 대조군이 유의성 있게 높게 나타난 반면에($p < 0.05$), rutin 투여군은 모두 LDH 활성도가 CCl₄ 대조군에 비하여 낮은 편이었으나 모두 유의성은 없었다. rutin 투여 농도에 따른 LDH 활성도의 차이는 거의 없었다.

혈청 총단백, 알부민, 글로부린 및 A/G 비율

간 세포 손상의 간접적 지표로 활용되고 있는 혈청 총단백, 알부민, 글로부린 및 A/G 비율은 Table 4와 같다.

총단백치와 알부민치는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군이 낮았고, rutin 투여군은 모두 CCl₄ control에 비하여 높았으나 모두 각 군 간에 유의성은 없었다. 총단백치와 알부민치는 rutin 투여 농도에 따른 차이를 나타내지 않았다. 글로부린치는 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군이 낮았으나 유의성은 없었고, rutin 투여군은 모두 CCl₄ 대조군과 차이가 없었다. A/G 비율은 정상대조군에 비하여 CCl₄ 대조군과 rutin 투여군이 모두 높았지만 유의성은 없었고, rutin 투여 농도에 따른 차이를 나타내지도 않았다.

고 찰

CCl₄를 투여하여 인공적으로 간손상을 유발하는 동물 실험에서 CCl₄의 투여방법은 주로 경구, 피하 또는 복강내 투여가 가장 널리 이용되고 있는데 랫드에서는 CCl₄를 복강내로 투여하는 것이 혈청 내 ALT, AST와 ALP 활성도 및 bilirubin 수준을 검사하는데 있어 가장 적합한 것으로 보고 되어 있어(2,17,18,19), 이번 실험에서도 복강내 투여 방법을 선택하였다. 랫드에 CCl₄ 복강 투여 시에 랫드에서 폐사를

Table 4. Effect of rutin pretreatment on serum total protein, albumin, globulin and A/G ratio in rats induced by CCl₄ hepatotoxicity

Group	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Globulin (g/dL)	A/G ratio
Normal control	6.8 ± 0.9	4.2 ± 1.0	2.6 ± 0.5	1.74 ± 0.66
CCl ₄ control	5.9 ± 0.4	3.9 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.89 ± 0.19
Rutin 200 + CCl ₄	6.2 ± 0.8	4.0 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.93 ± 0.25
Rutin 400 + CCl ₄	6.4 ± 0.7	4.1 ± 0.2	2.2 ± 0.6	1.93 ± 0.35

Each value represents mean ± SD.

일으키지 않으면서 간독성 정도를 검사할 수 있는 가장 적절한 CCl₄의 용량은 CCl₄ 기준으로 1 ml/kg으로 밝혀져 있어(17,20), 이번 실험에서도 같은 용량을 사용하였다. 랫드의 채혈은 Galati 등(13)과 Janakat와 Al-Merie(17)가 CCl₄ 투여 24시간 후에 혈장내 ALT, AST 및 ALP 활성도가 가장 높았다고 보고한 것을 따라서 CCl₄ 투여 24시간 후에 채혈하였다.

체중의 경우 정상대조군에 비하여 CCl₄를 투여한 군에서 체중감소와 함께 간의 무게 및 체중 대비 간무게의 비율의 증가가 나타났는데 이는 CCl₄를 투여한 랫드에서 일반적으로 나타나는 소견이며(1,8,19,22), CCl₄를 투여한 군에서 체중이 감소한 이유는 CCl₄의 독성작용으로 인한 식욕질폐와 오심, 구토, 설사와 복통 등에 따른 결과로 여겨졌으며(37), 간 무게가 증가한 것은 CCl₄가 간세포 내에서 지방축적을 유발한 결과에 따른 것으로 여겨졌다(1,36). Rutin 투여군의 경우 CCl₄ 대조군에 비하여 체중 대비 간무게의 비율이 유의성 있게($p < 0.05$) 낮아 rutin 투여가 간손상 예방 효과가 있음을 알 수 있었다. Rutin의 CCl₄에 의한 간손상을 예방하는 효과는 CCl₄에 의해 형성되는 CCl₃·와 CCl₃OO· radical에 대한 rutin의 free radical 제거작용을 통하여 발휘되는 것으로 밝혀져 있다(9,12,37).

ALT는 간세포 내에 다량 존재하는 효소이고 AST는 간세포뿐만 아니라 적혈구와 심근 및 골격근에 분포하지만 두 효소는 모두 특히 급성 간 손상 시에 간세포외로 다량 유출되어 혈액으로 유입됨으로써 이 수치가 증가하게 되기 때문에 간기능 판정의 지표로 이용되는 효소인데(3), CCl₄ 대조군에 비하여 rutin 투여군이 유의성 있게 낮아 CCl₄에 대한 rutin의 간세포보호 효과가 있음을 나타내었는데 이는 Janbaz 등(2002)과 손 등(1991)의 결과와도 일치하였다.

ALP는 간 담관상피세포, 뼈, 소장 및 태반 등 여러 장기에 분포하는 효소이고 γ -GTP는 간세포와 담관세포를 비롯하여 여러 장기의 세포외막에 분포하는 효소이지만 이 두 효소는 간질환의 지표로 활용되고 있으며 특히 이 두 효소치가 동시에 상승할 경우에는 확실한 간손상을 의미하는 것으로 해석되고 있으며(3), LDH는 심근, 적혈구, 뇌, 신장, 간 및 골격근 등 여러 장기의 세포에서 존재하는데 용혈, 심근경색, 암, 뇌염, 근육질환 및 간괴사 등 발생 시에 증가한다(3). 이번 실험에서 ALP, γ -GTP 및 LDH 값이 모두 rutin 투여군이 CCl₄ 대조군에 비하여 낮았지만 유의성은 없었는데 이는 CCl₄가 간에 가장 큰 손상을 일으키지만 간 이외에 신장 등의 장기에 또한 손상을 초래할 수 있고 손상을 받은 장기의 세포에서 이들 효소가 유출될 수 있기 때문인 것으로 여겨졌다(1,5,34,37).

Bilirubin은 수명을 다한 적혈구의 해체 시에 heme 부분에서 유래된 색소로 간에서 담즙의 성분으로 합성되어 소장으로 배출되는데 간세포 손상 시에는 담즙의 생산이 저해하므로 bilirubin 값이 상승하기 때문에 간세포 손상을 측정하는 지표의 하나로 간주되는데(3), CCl₄ 대조군에 비하여 rutin 투여군이 유의성 있게 낮아 CCl₄에 대한 rutin의 간세포보호

효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 생체 내에서 대부분의 단백질이 간에서 생성되기 때문에 간장의 상태를 간접적으로 나타내고 있는 혈청 중 총단백, 알부민 및 글로불린 농도는 모두 CCl₄ 대조군에 비하여 rutin 투여군이 조금 높거나 같아 큰 차이를 보이지는 않았는데 이는 CCl₄ 투여 24시간 후에 혈액을 채취하여 미처 간에서 합성한 이들 단백질의 농도가 차이를 나타내기에는 시간적 간격이 너무 적었기 때문인 것으로 여겨졌다(3,27).

이상을 종합하여 보면 랫드에서 rutin의 사전 투여가 CCl₄에 의해 유발되는 간장의 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다.

결론

랫드에서 rutin의 사전투여가 CCl₄를 투여하여 발생시킨 급성 간손상에 대한 보호효과를 규명하고자 rutin 처리군에 속한 랫드에 대해 체중 kg 당 200 mg과 400 mg 되게 하루 한 번 3일간 경구투여한 다음 마지막 rutin 투여 1시간 후 CCl₄(2 mL/kg, 1:1 in olive oil)를 복강투여한 다음 24시간 경과 후 채혈하여 혈청 중 간손상지표로 이용되는 AST, ALT, total bilirubin, ALP, γ -GTP, LDH, total protein 및 albumin 농도를 검사하였다. 조사 결과 rutin 투여가 체중 감소의 완화와 더불어 ALT, AST 및 total bilirubin 농도의 유의성 있는 상승억제 효과가 나타났으며($p < 0.05$), ALP, γ -GTP 및 LDH 활성도 역시 유의성은 나타나지 않았지만 상승억제 효과가 있음을 확인하였다. 이상의 결과로 볼 때 rutin 사전 투여가 CCl₄ 유발 급성 간손상을 예방하는 효과가 있었다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임.

참고 문헌

1. 김길수, 박준형. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호추출물의 영향. 1. 혈청내 효소(AST, ALT, LDH) 활성도, 지질함량 및 간내 과산화지질함량에 미치는 영향. 대한수의학회지 1992; 32: 347-356.
2. 손홍수, 김현숙, 주진순. 루틴과 헤스페리딘이 간 독성을 일으킨 흰쥐의 cholesterol 함량, transaminase, alkaline phosphatase 효소활성에 미치는 영향. 한국농화학회지 1991; 34: 318-326.
3. 이삼열, 정운섭, 권오현, 송경순. 임상병리검사법. 7판. 서울: 연세대학교 출판부. 2000: 224-315.
4. 임교환, 어성국, 김영소, 이종길, 한성순. 천연 Rutin의 항균효과와 급성독성에 미치는 영향. 생약학회지 1996; 27: 309-315.
5. 임미경, 김주완, 김지은, 김홍태, 정상주, 강미영, 이근우. 헛개나무추출액 및 생약성분의 혼용이 사염화탄소 투여로 유발된 흰쥐의 급성 간 및 신장손상의 회복에 미치는 영

- 향. 한국임상수의학회지 2007; 24: 400-405.
6. 황의경. 루틴 첨가가 고지방 식이 랫드의 혈청 지질 농도의 변화에 미치는 영향. 한국임상수의학회지 2008; 25: 324-329.
 7. Chen SS, Gong J, Liu FT, Mahammed U. Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation. *Immunology* 2000; 100: 471-480.
 8. Choi H, Joeng D, Jung B, Shin T, Wie M. Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase, inhibits carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Korean J vet Res* 2010; 50: 145-149.
 9. Cook NC, Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 66-76.
 10. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999; 65: 337-353.
 11. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 2004; 24: 851-874.
 12. Farber JL, El-Mofty SK. The biochemical pathology of liver cell necrosis. *Am J Pathol* 1975; 8: 237-250.
 13. Galati EM, Mondello MR, Lauriano ER, Taviano MF, Galluzzo M, Miceli N. *Opuntia ficus indica* (L) Mill fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury. *Phytother Res* 2005; 19: 796-800.
 14. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Świer J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 317-322.
 15. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 2001; 56: 683-687.
 16. Iwu MM, Obidoa O, Anazodo M. Biochemical mechanism of the antimalarial activity of *Azadirachta indica* leaf extract. *Pharmacol Res Commun* 1986; 18: 81-91.
 17. Janakat S, Al-Merie H. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002; 48: 41-44.
 18. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 2002; 73: 557-563.
 19. Kim KS, Lee NJ, You JH, Jeong YR, Yang BH, Kang JK. Protective and therapeutic effect of HSMI on CCl₄ induced liver dysfunction in rats. *Lab Anim Res* 2007; 23: 89-94.
 20. Kim YH, Park SC, Son WY, Rhee MH, Kim TW, Han SH, Kim BH, Kim KS. Hepatoprotective effects of *Opuntia humifusa* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Lab Anim Res* 2005; 21: 263-266.
 21. La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 45-53.
 22. Lee JS, Kim HS, Lee YJ, Yong CS, Choi HG, Han GD, Kim JA, Lee JS. Hepatoprotective effect of *Grifola frondosa* water extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Food Sci Biotechnol* 2008; 17: 203-207.
 23. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.
 24. McGregor D, Lang M. Carbon tetrachloride: Genetic effects and other modes of action. *Mutation Res* 1996; 366: 181-195.
 25. Park SY, Bok SH, Jeon SM, Park YB, Lee SJ, Jeong TS, Choi MS. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutr Res* 2002; 22: 283-295.
 26. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 1998; 18: 1995-2018.
 27. Plaa GL. Toxic responses of the liver. In: Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(ed.). *Casarett and Doull's Toxicology*. 4th ed. New York: Pergamon Press. 1991: 334-353.
 28. Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 1967; 19: 145-208.
 29. Recknagel RO, Glende Jr EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac Ther* 1989; 43: 139-154.
 30. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-956.
 31. Robak J, Gryglewski R. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 837-841.
 32. Santos KFR, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MGA. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacol Res* 1999; 40: 493-496.
 33. Silva RR, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Albino LFT, Almeida MR, Moraes GHK, Pinto JG. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2001; 51: 258-264.
 34. Singh KP, Zaidi SIA, Raisuddin, Saxena AK, Dwivedi PD, Seth PK, Ray PK. Protection against carbon-tetrachloride-induced lymphoid organotoxicity in rats by protein A. *Toxicol Letters* 1990; 51: 339-351.
 35. Ündeğer Ü, Aydın S, Başaran AA, Başaran N. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicol Lett* 2004; 151: 143-149.
 36. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33: 105-136.
 37. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of free radical-mediated injury. *Seminars Liver Dis* 1990; 10: 279-284.