

淸肺瀉肝湯이 CCl₄로 誘發된 흰쥐의 肝損傷에 미치는 影響

김정열 · 신미란 · 허운영 · 김달래 · 전종원*

삼지대학교 한의과대학 사상체질의학교실
*삼지영서대학 멀티미디어디자인학과

Abstract

The Effects of Chungpyesagan-tang on the Recovery of Liver Function in Rat Injured by CCl₄

Kim Jeong-Yeol, Shin Mee-Ran, Heo Woon-Yeong, 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

The present study was carried out to investigate the effects of Chungpyesagan-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), CP+CCl₄(Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagantang feed), CCl₄+NS(Normal Saline feed group after CCl₄ injection), CCl₄+CP(Solid extract of Chungpyesagantang 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(Lipid Peroxidation), GSH(Glutathione), GST(Glutathione-S-Transferase), Glutathione Reductase, Glutathione Peroxidase, SOD(Superoxide Dismutase), Catalase, Hydroxyproline, and βGlucuronidase were performed.

3. Results

- 1) CP+CCl₄ showed significantly lower relation of Cytochrome p450 than NS+CCl₄.
- 2) As to LPO · Hydroxyproline, CCl₄+CP showed significantly lower activity than CCl₄+NS.
- 3) As to GSH · GST · Glutathione Peroxidase · Catalase, CP+CCl₄ showed higher activity than NS+CCl₄. CCl₄+CP showed significantly higher activity than CCl₄+NS.
- 4) As to Glutathione Reductase · SOD, CCl₄+CP showed significantly higher activity than CCl₄+NS.
- 5) As to β-Glucuronidase, CP+CCl₄ showed significantly lower activity than NS+CCl₄.

4. Conclusions

Chungpyesagantang has the recovering effects on the CCl₄-induced Liver Damage.

key words : Chungpyesagan-tang, CCl₄, Liver Damage

I. 緒 論

많은 화학물질이 간손상을 일으키며 그 손상의 기전 또한 다양하다. 최근에는 각종 독성 물질에 의한 손상이 화학물질을 다루는 작업장에서부터 가정에 이르기까지 많이 일어나고 있다.

Chlorinated hydrocarbon, 쥐약 등에 포함되어 있는 인(P)과 Paracetamol, 독버섯 등이 아직도 독성 간손상을 일으키는 주요 원인인 된다. 그러나 최근에는 치료 약제에 대한 반응이 강조되고 있으며, 약물 복용의 증가와 더불어 더 늘어날 것으로 생각된다.

각종 대사기능의 중심 기능을 수행하고 있는 간장은 대사물질에 의한 중독에 민감하게 반응하여 간세포의 변성, 괴사, 지방축적, 간효소의 누출 등의 간장애를 나타낸다². 이러한 肝硬變에 미치는 研究로 金³이 肝疾患에 대한 韓方治療劑에 관한 研究를, 安⁴ 등이 柴苓湯이 肝損傷에 미치는 影響을, 柳⁵가 補心清肝湯이 肝臟의 酵素活性에 미치는 影響에 관한 研究를, 李⁶가 鹿茸이 肝組織에 미치는 影響에 관한 研究를, 任⁷ 등이 清肝健脾湯의 茵陳增量이 損傷肝에 미치는 影響을, 崔⁸가 小柴胡湯 및 柴苓湯이 CCl₄에 의한 쥐의 肝損傷에 미치는 影響을, 洪⁹ 등이 清肝湯이 GOT, GPT, ALP, LDH의 活性度를 정상에 가깝게 回復시킨다고 하였으며, 姜¹⁰이 清肝解鬱湯 煎液과 清肝解鬱湯 加金銀花 煎液이 肝細胞의 再生에 효과적이라고 報告하는 등 많은 실험연구가 진행되었으며 效能이 확인되었다.

清肺瀉肝湯은 元¹¹의 『東醫四象新編』에서 처음 命名된 處方으로, 李濟馬¹²의 『東醫壽世保元』의 「太陰人 肝受熱裏熱病論」에 기재된 熱多寒少湯에 大黃 1錢을 加한 處方이다. 이 處方은 太陰人 燥熱病에 大便秘結이 있는 症을 治療하는 方劑로, 中風으로 인한 中膈二便閉, 燥, 火, 六鬱, 水積, 白淫, 癰腫, 尿血, 痰塊, 產後 胎衣不下로 인한 腹痛 등을 治療하는데 사용된다¹¹⁻¹³.

이에 저자는 清肺瀉肝湯이 CCl₄로 유발된 急性 肝損傷에 미치는 影響을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley系 흰쥐에 清肺瀉肝湯 煎湯液 濃縮 抽出物을 投與한 후 생화학 검사·Cytochrome p450의 mRNA 발현·항산화 활성 검사를 실시하여 肝損傷에 미치는 효과를 실험한 결과 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 동물 및 약재

가. 동물

실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley계 Rat(SD-Rat)으로 대한바이오링크로부터 구입하여 온도 21℃, 습도 55%를 유지하며 사료와 물을 자유롭게 급식하면서 항온항습기(명진기계, 한국)에서 1주일간 적응 후

각 군에 10마리씩 총 50마리를 실험에 사용하였다. 나. 약재

실험에 사용된 약재는 清肺瀉肝湯으로 『東醫四象新編』을 근거로 조제하였다.

清肺瀉肝湯 520g을 물 3000cc와 함께 5000cc의 플라스크에 넣어 3시간 煎湯하고 16겹의 거즈로 여과한 후 동결건조기에 넣어 -60℃에서 72시간 동결 건조하여 건조 분말 94.13g을 얻었다. 수득율은 18.10%이었다.

Table 1. Prescription of Chungpyesagantang

藥材名	學名	重量(g)
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	16
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	8
蘘本	<i>Ligustici Rhizoma</i>	8
萊菔子	<i>Raphani Semen</i>	4
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	4
白芷	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	4
大黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	4
計		52

다. 시료

청폐사간탕 투여 및 CCl₄로 처리한 실험 종료일에 급식을 중단하고 다음날 혈액 및 간을 적출하였다.

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

간의 적출은 혈액 채취 이후에 시행하였으며, 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

사염화탄소(Carbon tetrachloride, CCl₄, Junsei chem. co., Ltd., Japan)를 Olive oil(Shinyo pure chemicals

co., Ltd., Japan)과 1:1로 혼합한 뒤 0.2ml를 SD-Rar에 복강 주입하여 간독성을 유발하였다.

나. 군분리 및 청폐사간탕 투여

청폐사간탕의 간독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Normal군, NS+CCl₄군, CP+CCl₄군(이하 본문에서 청폐사간탕은 CP라고 줄인다), CCl₄+NS군, CCl₄+CP군으로 나누었다.

Normal군은 CCl₄처치를 하지 않은 정상군이다. NS+CCl₄군은 Normal Saline (NaCl 9g / 증류수 1000 ml, 대한약품공업주식회사, 한국)을 5일간 연속 경구 투여하고 CCl₄로 처리한 군이며, CP+CCl₄군은 청폐사간탕을 5일간 연속 경구 투여하고 CCl₄로 처리한 군이다. CCl₄+NS군은 CCl₄ 처리 후 24시간 뒤부터 5일간 연속 Normal Saline을 경구 투여한 군이며 CCl₄+CP군은 CCl₄ 처리 후 24시간 뒤부터 5일간 연속 청폐사간탕을 경구 투여한 군이다.

NS+CCl₄군은 CP+CCl₄군의 간보호효과를 확인하기 위한 대조군으로 사용되었고, CCl₄+NS군은 CCl₄+CP군의 간독성치료효과를 확인하기 위한 대조군으로 사용되었다.

청폐사간탕 282mg을 증류수 10ml에 녹여 매일 0.2ml씩 존대를 이용하여 경구투여 하였으며, Normal Saline은 동량을 같은 방법으로 경구투여 하였다.

이상의 실험과정을 도표화하면 다음과 같다.

3. 측정항목 및 방법

가. 생화학 검사

상기의 방법으로 얻어진 혈청을 이용하여 생화학 검사를 실시하였다. 검사항목은 AST(Asparate amino-

transferase), 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 이용하였다.

나. Cytochrome p450의 mRNA 발현

1) Total RNA 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 RNazol B(Friendswood, Texas)를 사용하였다. -80℃에 보관 중이던 간 조직 0.2g을 homogenizer(Corning, 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, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액만 버린 후, 가라앉은 pellet에 70% Diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma, USA)-treated ethanol로 세척하여 12,000rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 이후에 상층액을 완전히 제거하고 공기 중에 3분간 방치하였다가 0.1% DEPC-treated H₂O에 녹여 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)에서 260/280 nm로 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, 2.5pmole oligo dT를 전체 20µl 되게 넣어 준 다음 60℃에서 10분간 반응시키고, 42℃에서 30분간 annealing하였다.

PCR은 1µl의 RT product에 0.5µl primer (100 pmol), 10X PCR buffer 5µl, 2.5mM dNTP 1µl, taq polymerase 1µl에 sterilied H₂O를 첨가하여 총부피가 25µl가 되도록 하였다. 반응은 94℃에서 5분간, 95℃에서 60초, 54℃에서 1분, 72℃에서 90초동안 25 cycle 반응시키고 72℃에서 5분간 신장하였다.

각각의 PCR product는 5µl씩 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 EtBr로 염색하고, UV transilluminator(Spectroline TR-302, USA) 위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기

Table 2. Schedule of Experimental Study

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

- : Normal Saline oral feeding
- : CCl₄ injection
- ◆ : Chungpyesagantang oral feeing
- ◎ : Blood sampling and Hepatectomy

(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'ACCACCAGCACAACTCTGAGA3'

Antisense primer :

5'CAATTCCATGCGGGCCAGGCC3'

다. 항산화 활성 측정

1) 시료준비

① 균질액의 준비

효소활성도 측정을 위하여 전체 조직의 4배 용량의 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 4°C에서 균질화 하였다. 이 균질액을 1000 × 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°C 하에서 실행하였다.

② Cytosol 분획

Cytosolic fraction은 균질액 준비에서 얻어진 상층액에 ethanol : chloroform(5:3) 용액을 0.4배량을 첨가하여 섞어 준 다음 10,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻어 Superoxide Dismutase측정에 사용하였다. 위의 모든 실험은 4°C 하에서 실행하였다.

③ Mitochondria 분획

Mitochondria 분획은 균질액의 준비에서 얻은 상층액을 600 × g에서 15분간 원심분리하여 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아를 모아 Catalase 활성도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 위의 모든 실험은 4°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 µg/µl)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 µg/µl에 BCA 용액 100µl를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준곡선으로 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 µl와 BCA 용액 100µl를 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540nm에서 측정하

여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

3) LPO(Lipid Peroxidation)의 활성도 측정

조직내 지질 과산화물의 함량 측정은 Ohkawa¹⁴ 등의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 조직 마쇄 균질액을 1,000 × g에서 15분간 원심분리한 후 20% 간조직 균질액 0.1ml에 8.1% Sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma, USA) 0.1ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 0.75 ml와 2.1 % Thiobarbituric acid(TBA, Sigma, USA) 0.5 ml를 가한 다음 100°C에서 30분 동안 반응시키고 실온에서 냉각한 다음 혼합액을 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 그리고 TBA 반응물질이 존재하는 상층액을 취하여 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)에서 540nm로 흡광도를 측정한 후, 조직 단위 당 과산화지질의 농도를 산출하였다.

4) GSH(Glutathione)의 활성도 측정

간조직의 GSH 함량은 Ellman¹⁵의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 간조직 균질액을 1,000 × g에서 15분간 원심분리한 후 상층액 0.2ml에 증류수 0.3ml, 4% sulfosalicylic acid(Sigma, USA) 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 1,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 발색제인 1 mM의 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB, Sigma, USA) 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 분광광도계에서 402nm로 흡광도를 측정하였다.

5) GST(Glutathione-S-Transfe-rase)의 활성도 측정

GST 활성도 측정은 Hibig¹⁶ 등의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간조직 균질액 50 µl, 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 890 µl, 100mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzen-ε(CDNB; Sigma, USA) 10 µl, 20mM GSH 50 µl를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 10분 간격으로 60분간 측정하였다. 활성도는 분당 mg 단백질로 나타내었다.

6) Glutathione Reductase의 활성도 측정

Glutathione Reductase의 활성측정은 Racker¹⁷의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간조직 균질액 20 µl, 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 2.5 µl, 26.978mM EDTA 100 µl, 66.01 mM glutathione disulphide (GSSG; Sigma, USA) 200 µl, 9.148mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH; Sigma, USA) 50 µl를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 10분

간격으로 60분간 측정하였다. 활성도는 분당 mg 단 백질로 나타내었다.

7) Glutathione Peroxidase의 활성도 측정

Glutathione Peroxidase의 활성측정은 Flohe¹⁸ 등의 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, 294.37 mM 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 402 nm로 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 2.93 ml에 가한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 여기에 50mM hematoxylin(Sigma, USA) 60 μ l를 첨가한 후 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) Catalase의 활성도 측정

조직 내의 Catalase 활성도는 Goth and Vitai¹⁹의 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) 0.5 ml에 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 흡광도변화를 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 Jamall²⁰ 등의 방법에 따라 측정하였다.

냉동시킨 간조직의 일부(0.6 g)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(2.7g p-dimethyl-amino-benzaldehyde + 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 Kim²¹등의 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 0.38 ml에 10mM p-nitrophenyl- β -D-glucuro-nide(Sigma, USA) 0.02 ml, 효소액 0.1ml를 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 0.5N NaOH 0.5ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1ml를 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 0.05 미만(p<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 實驗結果

1. Cytochrome p450의 mRNA발현에 미치는 영향

CP+CCL₄군에서만 대조군에 비하여 mRNA의 발현이 감소하였고 다른 군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1).

2. 항산화 활성에 미치는 영향

가. LPO(Lipid Peroxidation)에 미치는 영향

LPO의 활성함량은 Normal군이 1.82 \pm 0.07nmol/g

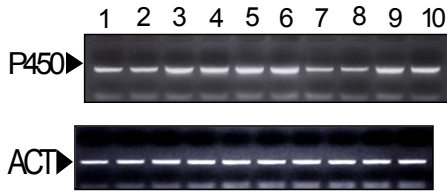


Fig. 1. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum Cytochrome p450 mRNA in Rats Injured by CCl₄ Solution

M± S.D. : Mean±Standard Deviation
 1·2 : Normal(Not treated group)
 3·4 : NS+CCl₄(Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed)
 5·6 : CCl₄+NS(Normal Saline feed group after CCl₄ injection)
 7·8 : CP+CCl₄(Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagan-tang feed)
 9·10 : CCl₄+CP(Solid extract of Chungpyesagan-tang feed group after CCl₄ injection)

을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 2.02±0.10nmol/g, CP+CCl₄군은 1.81±0.07nmol/g, CCl₄+NS군은 2.38±0.11nmol/g, CCl₄+CP군은 1.96±0.05nmol/g을 나타내어 CCl₄+CP군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

나. GSH(Glutathione)에 미치는 영향

GSH의 활성함량은 Normal군이 0.40±0.03nmol/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 0.20±0.05nmol/mg, CP+CCl₄군은 0.49±0.01nmol/mg, CCl₄+NS군은 0.30±0.07nmol/mg, CCl₄+CP군은 0.58±0.02nmol/mg을 나타내어 실험군 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

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

GST의 활성함량은 Normal군이 125.75±13.15umol/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 69.50±12.50umol/mg, CP+CCl₄군은 192.50±5.07umol/mg, CCl₄+NS군은 174.25±12.53umol/mg, CCl₄+CP군은 204.25±6.13umol/mg을 나타내어 실험군 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

라. Glutathion Reductase에 미치는 영향

Glutathion Reductase의 활성함량은 Normal군이 182.25±10.01umol/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 192.83±11.38umol/mg, CP+CCl₄군은 211.00±10.23umol/mg, CCl₄+NS군은 201.08±8.47umol/mg, CCl₄+CP군은 240.75±10.40umol/mg을 나타내어 CCl₄+CP군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 5).

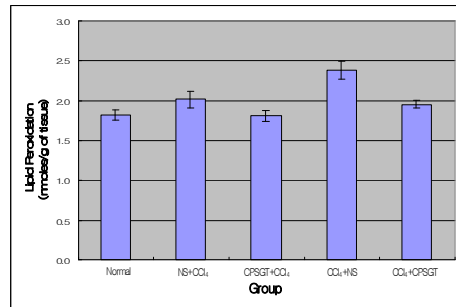


Fig. 2. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum LPO in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 CP+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagan-tang feed
 CCl₄+NS: Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+CP: Solid extract of Chungpyesagan-tang feed group after CCl₄ injection

* : P<0.05

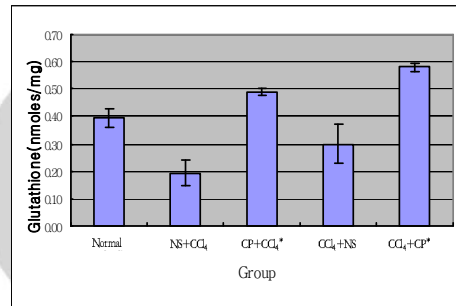


Fig. 3. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum GSH in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 CP+CCl₄: Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagan-tang feed
 CCl₄+NS: Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+CP: Solid extract of Chungpyesagan-tang feed group after CCl₄ injection

* : P<0.05

CP군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 5).

마. Glutathione Peroxidase에 미치는 영향

Glutathione Peroxidase의 활성함량은 Normal군이 16.86±1.60unit/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 21.90±1.29unit/mg, CP+CCl₄군은 31.37±0.71unit/mg,

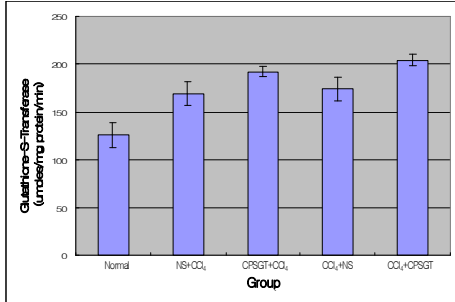


Fig. 4. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum GST in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 CP+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagan-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+CP : Solid extract of Chungpyesagan-tang feed group after CCl₄ injection

* : P<0.05

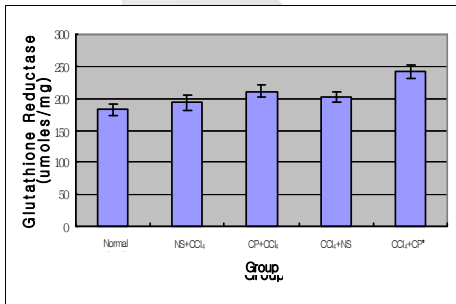


Fig. 5. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum Glutathione Reductase In Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 CP+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagan-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+CP : Solid extract of Chungpyesagan-tang feed group after CCl₄ injection

* : P<0.05

CCl₄+NS군은 26.48±0.61unit/mg, CCl₄+CP군은 36.08 ±1.33unit/mg을 나타내어 실험군 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

바. SOD(Superoxide Dismutase)에 미치는 영향

SOD의 활성함량은 Normal군이 328.18±17.21unit/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 348.48±16.46unit/mg, CP+CCl₄군은 370.60±28.76unit/mg, CCl₄+NS군은 346.94±16.04unit/mg, CCl₄+CP군은 380.95±9.98unit/mg을 나타내었다. CCl₄+CP군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 7).

사. Catalase의 활성도에 미치는 영향

Catalase의 활성함량은 Normal군이 361.38±10.98 umoles/mg을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 363.75±9.34umoles/mg, CP+CCl₄군은 409.00±10.22umoles/mg, CCl₄+NS군은 374.55±6.44umoles/mg, CCl₄+CP군은 419.70±7.13umoles/mg을 나타내어 실험군 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

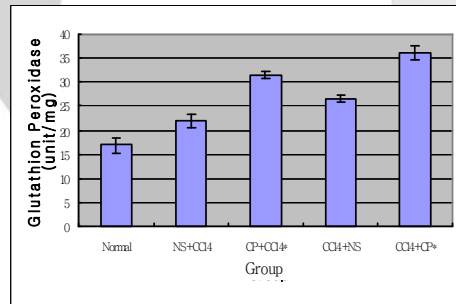


Fig. 6. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum Glutathione Peroxidase in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

M±S.D. : Mean±Standard Deviation
 Normal : Not treated group
 NS+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Normal Saline feed
 CP+CCl₄ : Solid extract of CCl₄ injection group after Chungpyesagan-tang feed
 CCl₄+NS : Normal Saline feed group after CCl₄ injection
 CCl₄+CP : Solid extract of Chungpyesagan-tang feed group after CCl₄ injection

* : P<0.05

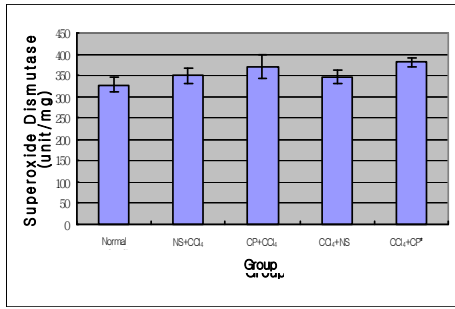


Fig. 7. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum SOD in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

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

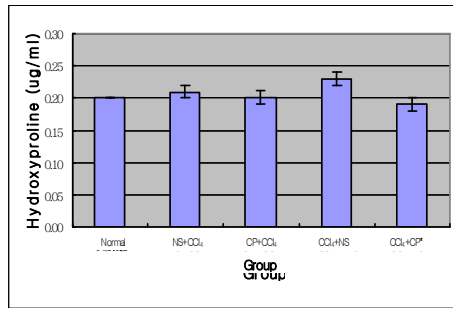


Fig. 9. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum Hydroxyproline in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

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

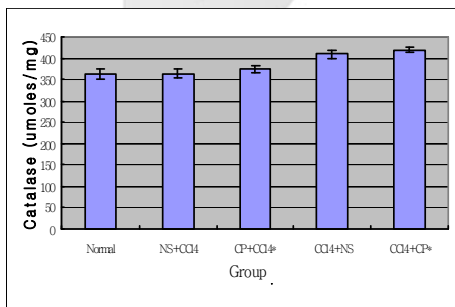


Fig. 8. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum Catalase in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

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

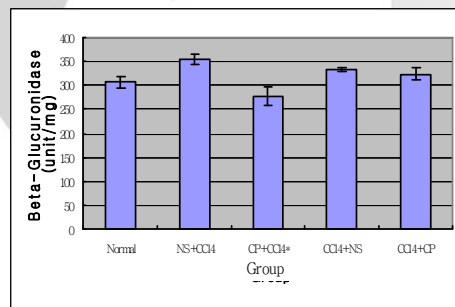


Fig. 10. Effect of Chungpyesagan-tang on the Serum β-Glucuronidase in Rats Injured by CCl₄ Solution (P<0.05)

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

아. Hydroxyproline의 활성도에 미치는 영향

Hydroxyproline의 활성함량은 Norm-al군이 $0.20 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 $0.21 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$, CP+CCl₄군은 $0.20 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$, CCl₄+NS군은 $0.23 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$, CCl₄+CP군은 $0.19 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다. CCl₄+CP군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 9).

자. β -Glucuronidase의 활성도에 미치는 영향

Beta-Glucuronidase의 활성함량은 Normal군이 $307.15 \pm 12.61 \text{unit/mg}$ 을 나타내었으며, NS+CCl₄군은 $354.33 \pm 11.09 \text{unit/mg}$, CP+CCl₄군은 $276.65 \pm 19.14 \text{unit/mg}$, CCl₄+NS군은 $333.68 \pm 3.30 \text{unit/mg}$, CCl₄+CP군은 $323.33 \pm 12.47 \text{unit/mg}$ 을 나타내었다. CP+CCl₄군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 10).

IV. 考 察

肝은 疏泄, 藏血, 主筋의 機能이 있으며 인체의 모든 代謝機能의 中心이 되고, 解毒作用을 하는 중요한 臟器이다^{2,22,23}. 또한, 肝은 生化學的 機能이 多樣하고 활발하여 人體內 모든 代謝機能의 中心이라 할 수 있다. 즉, 모든 외부에서 들어온 물질은 肝의 代謝經路를 踏아 蓄積되거나 再分配되며 또한 肝은 모든 外部, 內部の 毒物物質을 水溶性 形態로 變化하여 體外로 排出시켜 解毒作用을 修行하며 肝細胞의 고유한 기능으로 Albumin 및 여러 단백질들을 생성하여 보급해주고 기타 生체활성 물질들의 생성 및 처리기능이 있다²⁴.

肝疾患은 肝의 生理的 機能이 內外要因에 의하여 그 機能을 喪失하게 되면 발생되는데 그에 대한 원인인자로는 Virus, 化學性 세균감염, 곰팡이, 기생충, 毒物物質 또는 藥物, 食物性 알카로이드, 알콜, 음식물(특히 Aflatoxin, 人工색소), 虛血(Shock), 면역질환, 담도폐쇄결석, 디스토마 등이 있으며 이로 인해 주로 바이러스성 간질환, 알콜성 간질환, 중독성 간질환 등이 발생된다². 韓醫學에서의 肝疾患의 誘發要因으로는 六淫七情, 酒毒, 氣鬱, 瘀血, 房室過多, 飲食失調, 體質虛弱 등이 있으며²³, 이러한 요인들은 肝의 疏泄의 失調를 초래케하여 肝鬱, 肝陽上昇, 肝火熾盛, 肝陰血不足, 血瘀 등의 病理

現狀이 나타나고 이로 인해 肝疾患이 나타난다²⁵.

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, 麻木, 麻痺, 痙攣, 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 있다².

韓醫學에서는 肝疾患과 관련된 症候로는 文獻上으로 勞倦傷, 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 酒傷 등에서 찾아볼 수 있으며, 그 治療는 清熱利濕, 健脾益腎, 調理脾胃, 疏肝利氣, 消積行氣, 養肝, 活血, 化痰, 逐水 등으로 종합된다^{26,27}.

韓醫學에서는 현재까지 실험적으로 肝障礙에 미치는 간기능 개선효과에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔는데 金²⁸은 乾栗蟻螬湯이 CCl₄로 誘發된 肝損傷 白鼠에 미치는 영향을, 金³이 肝疾患에 대한 韓方治療劑에 관한 研究를, 安⁴ 등이 柴芩湯이 肝損傷에 미치는 影響을, 柳⁵가 補心清肝湯이 肝臟의 酵素活性에 미치는 影響에 관한 研究를, 李⁶가 鹿茸이 肝組織에 미치는 影響에 관한 研究를, 任⁷ 등이 清肝健脾湯의 茵陳 增量이 損傷肝에 미치는 影響을, 崔⁸가 小柴胡湯 및 柴芩湯이 CCl₄에 의한 肝損傷에 미치는 影響을, 洪⁹ 등이 清肝湯이 GOT, GPT, ALP, LDH의 活性도를 정상에 가깝게 回復시킨다고 하였으며, 姜¹⁰이 清肝解鬱湯 煎液과 清肝解鬱湯 加金銀花 煎液이 肝細胞의 再生에 효과적이라고 報告하는 등 많은 실험연구가 진행되었으며 效能이 확인되었다.

또한, 清肺瀉肝湯에 대한 최근의 研究로는 김²⁹의 清肺瀉肝湯이 생쥐의 Lipopolysaccharide 유발關節炎에 미치는 영향을, 崔³⁰가 급성기 중풍환자에 대한 清肺瀉肝湯의 임상적 효능을, 金³¹의 清肺瀉肝湯이 昇汞中毒家兔의 肝 및 腎臟機能에 미치는 影響을 연구한 것이 있다.

清肺瀉肝湯은 太陰人 肝受熱裏熱病의 燥熱病에 使用하는 處方으로 元¹¹의 『東醫四象新編』에서 처음 命名되었다. 이는 李濟馬¹²의 『東醫壽世保元』의 太陰人 肝受熱裏熱病論에 “太陰人 燥熱也...當用熱多寒少湯 加藁本 大黃”이라 記載되어 있으며, 熱多寒少湯에 大黃 1錢을 加한 處方이다. 處方內容은 葛根 4錢, 黃芩, 藁本 各 2錢, 萊菔子, 桔梗, 升麻, 白芷, 大黃 各 1錢으로 太陰人 虛勞夢泄證에 大便秘結이 있는 症을 治療하는 方劑로, 臨床에서 中風

으로 인한 中腑二便閉, 癩疹, 燥, 火, 六鬱, 酒積, 水積, 蟲積, 下消, 夢遺(精), 白淫, 氣痛, 癰疽, 癲狂, 吐血, 尿血, 熱痰, 鬱痰, 痰塊, 流注痰 등을 治療하며 產後 胎衣不下로 인한 腹痛 및 歷節風 등을 治療하는데 使用하여 진다¹¹⁻¹³.

本草의 效能에 있어서 淸肺瀉肝湯의 構成 中 葛根은 發散解熱, 活血散瘀하고, 黃芩은 抗菌消炎하고 調經安胎하며, 藜蘆本은 發散解表하고 祛濕止痛하며, 萊菔子是 消食, 化痰하며, 桔梗은 消痰, 利咽消腫, 排膿解毒하며, 升麻는 發汗透疹, 補益升提하고, 白芷는 排膿消腫하며, 大黃은 瀉下, 解熱하며, 化痰止血하는 效果가 있다³².

본 실험에 淸肺瀉肝湯은 일반적으로 혈류의 장애로 인한 간손상에 사용함을 응용하여 간손상의 정도와 간의 산화억제를 측정할 수 있는 혈청생화학 검사와 간의 산화억제와 환원성을 측정하기 위하여 LPO(Lipid Peroxidation), GSH(Glutathione), GST(Glutathione-S-Transferase), Glutathione Reductase, Glutathione Peroxidase, SOD(Superoxide Dismutase), Catalase, Hydroxyproline, β -Glucuronidase를 측정하였다.

실험군과 대조군의 설정은, 간의 손상 정도와 간손상의 회복을 측정하기 위하여 CCl_4 를 투여하기 전 Normal Saline과 淸肺瀉肝湯을 투여하여 비교하였고 CCl_4 를 투여한 후 Normal Saline과 淸肺瀉肝湯을 투여하여 비교하였다.

Cytochrome p450은 인체의 간대사효소로 발암물질을 활성화시키면서 mRNA를 발현시킨다³³. 본 실험에서 CP+ CCl_4 군은 대조군에 비하여 mRNA의 발현이 감소하였다(Fig. 1).

LPO(Lipid Peroxidation)은 간의 자동산화반응에 의해 부가된 생성물로서 알콜성 지방간, 급성간염, 만성활동성간염, 당뇨병에서 증가한다³³. 본 실험에서 LPO의 활성함량은 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

GSH(Glutathione)는 셀프히드릴화합물 중 가장 중요한 환원성 효소로 자체는 산화되고 지질은 환원시킨다³³. 본 실험에서 GSH의 활성함량은 CP+ CCl_4 군과 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3).

GST(Glutathione-S-Transferase)는 GSH의 -SH-를 -SS-로 변화시켜 환원시킨다³³. 본 실험에서 GST의

활성함량은 CP+ CCl_4 군과 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 4).

Glutathione Reductase는 GSH 환원효소이다³³. 본 실험에서 Glutathione Reductase의 활성함량은 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 5).

Glutathione Peroxidase는 항산화효소의 성분으로 간의 산화적 손상을 방지한다. 과산화수소(H_2O_2)나 지방과산화물질을 제거하는 반응에 관여하고 있을 때, 산화형 Glutathione은 Vit E와 더불어 불포화지방산의 과산화를 방지한다³³. 본 실험에서 Glutathione Peroxidase의 활성함량은 CP+ CCl_4 군과 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 6).

SOD(Superoxide Dismutase)는 활성산소를 제거시키는 효소로서 과잉생성된 활성산소를 해독하는 역할을 한다³³. 본 실험에서 SOD의 활성함량은 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 7).

Catalase는 인체의 적혈구, 간, 신장등의 세포내 Peroxisome이나 Mitochondria같은 소과립에 풍부하게 존재한다³³. 본 실험에서 Catalase의 활성함량은 CP+ CCl_4 군과 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 8).

Hydroxyproline은 Collagen 대사의 생화학적 지표로 섬유화를 일으키는 여러 가지 질환에서 측정한다³³. 본 실험에서 Hydroxyproline의 활성함량은 CCl_4 +CP군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 9).

β -glucuronidase는 정상적으로 신장에서 배설되는 효소로, 뇨중에서는 급성·만성 활동성 신우신염에서는 증가하고, 신장이나 요로계의 악성종양에서는 감소하는 경향을 나타낸다³³. 본 실험에서 β -Glucuronidase의 활성함량은 CP+ CCl_4 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 10).

이상의 결과를 종합해보면, CCl_4 로 유발된 급성 간손상에 淸肺瀉肝湯 투여는 혈청 생화학 검사에서는 큰 변화를 나타내지 않는 것으로 판단되었다. 그러나, 淸肺瀉肝湯을 먼저 투여한 실험군에서 발암물질을 유발하는 간대사효소인 Cytochrome p450의 mRNA 발현을 억제하는 것으로 나타내었고, 불

포화지방산의 과산화를 방지하는 GSH와 GST, Glutathione Peroxidase, Catalase의 활성에서 실험군 모두 유의한 증가를 나타낼 뿐만 아니라, CCl₄에 노출한 후 청폐사간당을 투여한 실험군에서는 활성산소를 제거하는 불포화지방산인 LPO가 감소하였고, Glutathione Reductase와 항산화물질인 SOD활성이 증가하였고, β-Glucuronidase도 CP+CCl₄군에서 활성을 저하시킨 것으로 보아 청폐사간당은 간의 항산화 작용이나 항암작용에 일정한 영향을 미치는 것으로 판단된다.

이상의 실험으로 볼때 청폐사간당은 간기능의 보호작용보다는 손상된 간의 기능회복에 유의성이 있는 것으로 추정된다. 그러나, 간의 보호효과에 대한 연구가 미흡하여 향후 임상 및 실험에서 약물 상호간의 기전 및 작용에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사려된다.

V. 결 론

참 고 문 헌

- 대한병리학회. 병리학. 고문사, 서울, 1994:735-737,761
- 金秉雲. 東醫肝系內科學. 東洋醫學研究院出版部, 서울, 1989:254-271.
- 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.
- 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.
- 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 관한 組織化學的 研究. 慶熙韓醫大 論文集. 1980;3:109-121.
- 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.
- 任宰訓, 우홍정, 김병운, 김정제. 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.
- 崔相昊. 小柴胡湯 및 柴苓湯이 CCl₄에 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.
- 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 관한 研究. 慶熙韓醫大 論文集. 1983;6:227-244.
- 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 관한 研究. 圓光大學校 大學院 3권. 507-519.
- 元持常. 東醫四象新編. 종합의원사, 서울, 1974:66-67.
- 李濟馬. 東醫壽世保元. 행림출판, 서울, 1986:110-118.
- 전국한의과대학 四象醫學教室. 四象醫學. 集文堂, 서울, 1994:483-484,553.
- 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. 1977;40:559-573.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 1959;82:70-77.

16. Hibig WH, Pabst MJ, Jaloby WB. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974;249:7130-7139.
17. Racker E. Glutathione Reducase from baker's yeast and beef liver. *J. Biol. Chem.* 1955;217:855-865.
18. Flohe L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-121.
19. 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.
20. 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.
21. Kim DH, Shim SB, Kim NJ, Jang IS. Beta-glucuronidase inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull.* 1999;22(2):162-164.
22. 金賢濟, 洪元植. 韓醫學辭典. 成輔社, 서울, 1993:126-130,227-300.
23. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 成輔社, 서울, 2004:139-140.
24. 서울대학교 의과대학. 소화기학 원론. 서울대학교 출판부, 서울, 1988:393-394.
25. 羅相孝, 裴文弘. 救肝開鬱湯이 白鼠肝臟의 四鹽化炭素中毒에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 7-1(7):19-27
26. 朴鎬湜, 李起男. 韓方消化器內科學. 圓光大學校 出版局, 이리, 1988:19-20.
27. 上海中醫學院. 中醫基礎學. 香港. 商務印書館, 1976:89.
28. 金政烈. 乾栗蟻螯湯이 CCl₄로 誘發된 肝損傷 白鼠에 미치는 影響. 尙志大學校 大學院 博士論文. 2004
29. 金주희, 박성식. 淸肺瀉肝湯이 생쥐의 Lipopolysaccharide 유발 關節炎에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2002;14(3):114-131.
30. 崔동중. 급성기 중풍환자에 대한 淸肺瀉肝湯의 임상적 효능. 대한한의학회지. 2002;23(4):9-14.
31. 金東圭, 柳基遠. 淸肺瀉肝湯이 昇汞中毒家兔의 肝 및 腎臟機能에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1983;4(1):3-29.
32. 陳存仁. 圖說 韓方 醫藥大辭典. 송악출판사, 서울, 1986.
33. 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.