

갈근탕의 사염화탄소에 의한 간세포 독성 억제효과

오수영 · 서상희 · 이지혜 · 이지선 · 마진열*

한국한의학연구원

Protective Effect of Galgeun-Tang Against CCl₄ Induced Hepatotoxicity

Su Young Oh, Sang Hee Seo, Ji Hye Lee, Ji Seon Lee, Jin Yeul Ma*

Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Galgeun-tang (GGT) has been a great source for treating cold diseases in the folk medicine recipe. Carbon tetrachloride (CCl₄) is one type of hepatotoxin that can eventually cause liver injury. During the experiment, we first studied the protective effects of GGT against CCl₄-induced hepatotoxicity. GGT was pretreated for 3 h, and 1% CCl₄ was added to mouse primary liver cells. After 4 h, ROS generation and expression of antioxidant enzymes (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx)) were analyzed by FACS and real time PCR. Also, the activities of ALT and LDH were measured using cultured medium. The hepatic levels of TNF-alpha and iNOS, which are related to inflammation and stress response gene, HSP72 and HO-1 were analyzed by PCR or real time PCR. Liver tissues were analyzed by HE stain. From the observation, we discovered that GGT treatment protects CCl₄-induced hepatotoxicity, and that GGT pretreatment decreases ROS generation, TNF-alpha and iNOS expression. However, gene expression of CAT, SOD, GPx, HSP72 and HO-1 were increased by GGT. These results lead to the conclusion that GGT has protective effects against CCl₄-induced hepatotoxicity.

Key words : Galgeun-tang, hepatotoxicity, carbon tetrachloride

서론

갈근탕은 전통적으로 한방에서 널리 사용해 오고 있는 처방으로서, 갈근, 감초, 작약, 마황, 대조, 계피, 생강의 7가지 한약재로 이루어져 있다. 이러한 갈근탕은 다양한 가감방, 합방 등의 방법을 이용하여 사용되고 있다^{1,3}). 갈근탕은 주로 감기, 두통, 편두통 및 진경, 오한, 발열 등에 주로 사용되어왔으며 그 외에도 중이염, 축농증, 편도선염, 신경증, 결막염 등에 광범위하게 응용되고 있다⁴). 또한 갈근탕의 의학적 효과는 주로 알레르기, 소염, 진통 등과 같은 면역반응에 있는 것으로 알려져 있으므로 연구 주제와 대상질병 역시 이와 관련된 것들이 대부분이다. 대체 약물로서 천연물질에 대한 관심이 증가하면서 한약재인 갈근탕의 효능 검증을 위해 다양한 실험을 통한 과학적 검증 연구가 이루어지고 있다. 최근 갈근탕의 복합처방전인 승마갈근탕의 경우, NF-kappa B의 신호전달계를 통하여 항염증반응을 보이고, 갈근탕이 과골세포의 분화를 억제시킨다는 연구결과가 발표되었다

* 교신저자 : 마진열, 대전시 유성구 전민동 엑스포로 483, 한국한의학연구원

· E-mail : jyuma@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9466

· 접수 : 2011/06/30 · 수정 : 2011/08/02 · 채택 : 2011/08/10

^{5,6}). 또한 rat에서 장티푸스 백신의 피하주사 하였을 때 일어나는 발열 및 산소고갈과 같은 스트레스를 갈근탕의 치료로 인해 억제할 수 있음이 알려져 있고⁷), 갈근탕의 주성분인 갈근의 경우, 아질산염 소거작용 및 간독성 보호 효능이 있음이 밝혀졌다⁸).

간독성 물질로서 간 독성 매커니즘에 대한 연구에서 널리 사용되고 있는 사염화탄소 (carbon tetrachloride, CCl₄)는 간 세포 내에서 약물 대사 효소인 cytochrome P-450에 의해 trichloromethyl free radical (CCl₃)가 형성되고 그 결과 trichloromethylperoxy radical (CCl₃O₂)가 생성되어 세포막의 지질 또는 다른 분자들의 손상을 유발하고 결국 세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹¹). 본 연구에서는 CCl₄로 인한 간세포 손상 모델을 사용하여 갈근탕의 간보호 효과를 확인하고자 하였다.

재료와 방법

1. Hepatic primary 세포 배양

간세포 일차배양은 Berry와 Friend의 방법을 변형한 2단계 collagenase 관류법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 수컷

ICR 마우스에 졸레틸과 림폰을 복강 내로 주사하여 마취한 후 개복하였으며, 간문맥에 24 guage catheter를 삽관하여 Krebs-Ringer-HEPES 완충용액으로 관류시키고 collagenase (sigma, USA)로 구성된 소화용액을 순환 시켰다. 간세포가 소화된 후 간막을 벗겨 간세포가 유리되게 하였으며, nylon mesh를 사용하여 여과하였다. 여과액은 400 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상등액을 버리고 침전된 간세포를 BSA (sigma, USA)가 포함된 완충용액에 현탁시켜 다시 원심 분리하였다. 침전된 간세포를 배양액에 다시 현탁시켜 세포 현탁액을 얻은 뒤, 간세포 농도가 2×10^6 cells/ml이 되도록 조절하여, gelatin으로 미리 도포된 배양용기에 이식하였다. 배양액으로는 10% FBS (Hyclone, USA), 500 U/ℓ insulin (Roche, Switzerland), 2 mM L-glutamine (Lonza, Switzerland), 15 mM HEPES (Lonza, Switzerland), 10^5 U/ℓ penicillin, 100 mg/ℓ streptomycin (Gibco, USA)를 포함하는 William's E media (Gibco, USA)를 사용하였으며, 일정한 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 CO₂ 5%의 혼합기체를 공급하여 배양하였다.

2. 시료의 추출 및 제조

본 실험에서 사용한 갈근탕의 구성처방인 갈근, 대조, 작약은 영천현대약업사 (영천시, 한국)에서 구입하였으며, 마황, 계피는 풍산제약 (안동시, 한국)에서, 건강은 백제허브 (대전, 한국)에서, 감초는 미릉생약 (영천시, 한국)에서 각각 구입하였다. 본 연구에서는 전탕추출법 (경서추출기 cosmos-660, 한국)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 각 한약재들은 16.7 리터의 생수 (화이트, 한국)에 1 시간 동안 침적시킨 다음 180 분간 열탕 추출하였고, 동결건조기 (일신 FD5512, 한국)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다.

3. MTT assay

세포에 CCl₄를 0.5%로 처리 한 뒤 24 시간 후 배양액과 MTT 시약이 10:1의 비율이 되도록 MTT 시약을 첨가하여 2 시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 배양접시의 각 well에 DMSO를 150 ul씩 첨가하여 30 분정도 흔들어 준 뒤 ELISA reader를 이용하여 wave length 590 nm에서 흡광도를 측정한다.

4. ALT와 LDH assay

ALT, LDH의 측정은 세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 측정하였다. ALT의 활성은 Chemilab GPT kit (IVD Lab Co. Ltd. 한국)를 사용하여 제공된 시험방법에 준하여 측정하였으며, LDH는 Cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 사용하여 Colorimetric assay 방법으로 측정하였다.

5. FACS analysis

세포에 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF) (Invitrogen, USA) 용액을 첨가하여 30 분간 처리하였다. 이후, 트립신으로 세포를 분리하고 원심분리 후, PBS 300 ul에 현탁한

세포를 가지고 fluorescence-activated cell sorting를 실시하였다.

6. PCR과 real time PCR

Total RNA를 RNA 분리 Kit (intron, 한국)을 이용하여 분리한 후 Qiagen Omniscript RT kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Table 1에 있는 프라이머를 사용하여 94°C 5분, [94°C (30초), T°C (30초), 72°C (30초)] * 40 cycles, 72°C 10분의 조건으로 PCR을 진행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 확인하고 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 image J를 이용하여 값으로 나타내었다. Real time PCR은 cDNA을 이용하여 94°C 5분, [94°C (10초), T°C (20초), 72°C (30초)] * 40 cycles, 72°C 10분의 조건으로 진행하였다.

Tabel 1. PCR 및 real time PCR에 필요한 프라이머 시퀀스 및 Tm 온도

Gene	sequence	Tm
Actin	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA-3'	56°C
	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC C-3'	
iNOS	5'-CCT CCT CCA CCC TAC CAA GT-3'	60°C
	5'-CAC CCA AAG TGC TTC AGT CA-3'	
TNF-alpha	5'-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C-3'	60°C
	5'-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3'	
Ho-1	5'-AAC AAG CAG AAC CCA GTC T-3'	50°C
	5'-TGT CAT CTC CAG AGT CTT C-3'	
HSP72	5'-ACC AAC GAC AA GGG CCG CCT-3'	50°C
	5'-ACT TGT CCA GCA CCT TCT TC-3'	
CAT	5'-CTC GGT TTC CCG TGC AAT CAG-3'	50°C
	5'-GTG CAG CCA GTA ATC ACC AAG-3'	
SOD	5'-GGA CCT CAT TTT AAT CCT CAC TCT AAG-3'	50°C
	5'-TGC CCA GGT CTC CAA CAT G-3'	
SPx	5'-TCT GCA GAT ACC TGT GAA CTG-3'	50°C
	5'-TAG TCA GGG TGG ACG TCA GTG-3'	

7. 실험동물 및 사육환경

실험에 사용된 동물은 수컷 ICR 마우스 (오리엔트 바이오, 한국) 5주령을 사용하였으며, 일주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 사용하였다. 실험은 실험동물윤리위원회의 승인을 거쳐 이루어졌으며, 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명은 12시간 명암주기 (점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 그리고 실험동물용 고품사료 (PMI nutrition, USA)와 물은 자유 섭취 조건으로 하였다.

8. HE stain

실험은 한국한의학연구원 동물 실험실에서 실시되었으며, 5주령 수컷 ICR 마우스를 사용하였다. 실험동물은 입고 후 일주일간 순화시키고, 체중 범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시한 후 실험에 사용하였다. 실험물질은 동결건조한 것을 saline에 각 용량별로 용해하여 사용하였으며, 3일간 매 1회 일정한 시간에 disposable zonde (Fuchigami, Japan)를 사용하여 강제 경구 투여하였다. 간 독성 유발은 마지막 물질투여 30분 후 실시하였으며, CCl₄를 olive oil에 50배 희석 한 것을 10 ml/kg 용량으로 복강 투여하여 이루어졌다.

간 조직은 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후, 일정한 두께로 삭정한 다음, 탈수 및 함수 과정을 거쳐 파라핀에 포매 하였다. 포매된 조직은 2~3 μm 두께로 박절한 후, Hematoxylin-Eosin (HE)으로 염색하였고, 광학현미경 (Olympus Optical Co. Olympus BX50, Japan)으로 간 조직의 손상 정도를 관찰하였다. 관찰한 조직에 대하여는 광학현미경에 부착된 디지털 카메라 (Olympus Optical Co. Olympus DP70, Japan)를 이용해 사진 촬영하였다.

결 과

1. Cell viability assay

CCl₄에 의한 세포 독성이 갈근탕 전 처리에 의해 감소되는 지 확인하기 위하여 MTT assay 방법을 이용하였다. 갈근탕을 3 시간 동안 마우스의 primary cell에 전 처리한 후 CCl₄를 24 시간 동안 처리하였다. Fig. 1에서 보이는 것처럼 CCl₄ 단독 처리한 경우, 약 40% 정도의 세포 생존율을 보였으나, 갈근탕을 전 처리한 샘플은 30%가 더 증가하였음을 알 수 있었다.

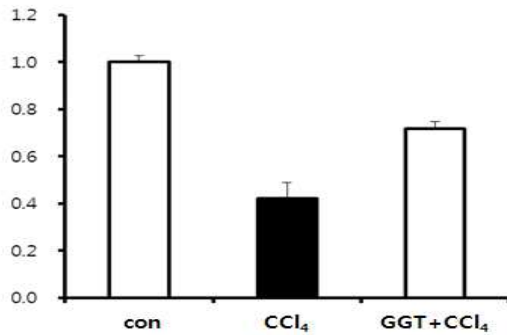


Fig. 1. GGT protects hepatic primary cells against CCl₄-induced cell death. Cells were pretreated with GGT (400 ug/ml) for 3 h and then were added 0.5% CCl₄. After 24 h, cell viability was measured during MTT assay. con: control sample.

2. 세포독성 검사

갈근탕의 전 처리로 인해 CCl₄에 의해 유발되는 세포독성이 감소되는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 마우스의 간에서 확보한 primary cell에 갈근탕을 3 시간 동안 전 처리 하였다. CCl₄를 4 시간 동안 처리한 후 세포배양 배지를 수거한 후 세포독성의 지표인 LDH의 발생량을 검사하였고, 간 독성의 지표인 ALT의 량을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과, 갈근탕 전 처리한 샘플군에서 CCl₄로 인한 LDH와 ALT의 발생량이 감소되었다. 이러한 결과는 갈근탕이 CCl₄로 인해 발생하는 세포독성을 감소시킴을 보여준다.

3. 활성산소 생성 조사

갈근탕의 활성물질 생성 억제 효과를 확인하기 위하여, primary cell에 갈근탕을 전 처리한 후 CCl₄를 4 시간 동안 처리한 후 FACS를 이용하여 세포내에 활성산소의 발생량을 측정할 결과, CCl₄에 의해 유발되는 활성산소는 갈근탕 전 처리에 의해

감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

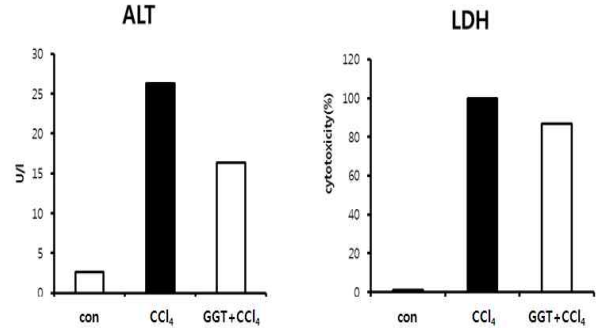


Fig. 2. GGT decreases levels of secreted ALT and LDH in hepatic primary cells. Cells were pretreated with GGT (400 ug/ml) for 3 h and then treated with 0.5% CCl₄ for 4 h. ALT and LDH levels were measured in cultured media.

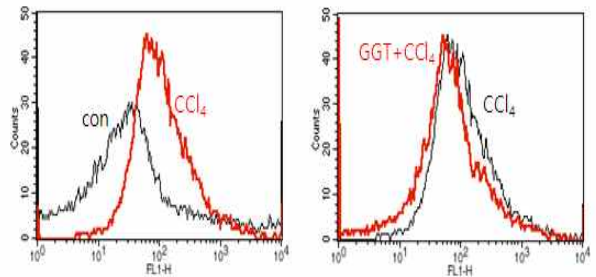


Fig. 3. GGT pretreatment decrease CCl₄-induced ROS generation. Hepatic primary cells were pretreated with GGT (400 ug/ml) for 3 h and then added with 0.5% CCl₄. After 4 h, cells were incubated with DCF and analyzed by FACS to detect intracellular ROS levels.

4. 항산화제 효소 유전자의 발현 조사

활성산소의 억제와 함께 항산화제 효소의 발현이 갈근탕에 의해 조절되는지 확인하기 위하여, 세포에 갈근탕을 3 시간동안 전 처리 후, CCl₄를 4 시간동안 처리하였다. 분리한 RNA에서 제작한 cDNA로 real time PCR 방법을 이용하여 catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD)와 Glutathione peroxidase (GPx) 유전자의 발현을 확인한 결과, 특히 GPx의 발현량이 갈근탕 전 처리한 경우에 높아졌다(Fig. 4).

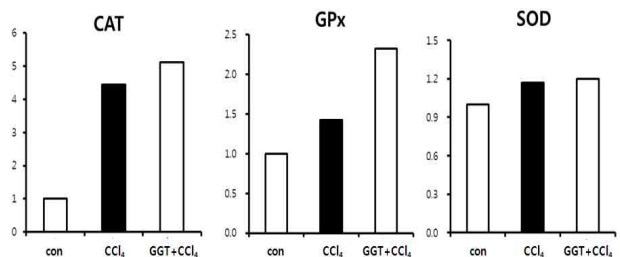


Fig. 4. GGT pretreatment elevated mRNA expression of antioxidant enzymes. Cells were pretreated with GGT (400 ug/ml) for 3 h and then treated with 0.5% CCl₄. After 4 h, CAT, GPx and SOD mRNA expressions were analyzed by real time PCR.

5. TNF-alpha 그리고 iNOS 유전자의 발현 조사

CCl₄는 간세포에서 염증반응물질인 TNF- α 와 iNOS의 발현을 증가시킨다고 발표되었다^{12,13}). 따라서 본 연구에서는 마우스의 간 조직에서 확보한 primary cell에서 CCl₄에 의해 TNF- α 와 iNOS의 발현 변화를 조사하고, 갈근탕의 전 처리에 의해 이들 유전자의 발현이 조절되는지 확인하였다(Fig. 5). Primary cell에 갈근탕을 24 시간 동안 전 처리한 후 CCl₄를 4 시간 동안 처리한 세포에서 RNA를 추출하였고 cDNA를 합성하였다. PCR 및 real time PCR을 이용하여 이들 유전자의 발현을 확인한 결과, 갈근탕을 전 처리한 샘플에서 CCl₄에 의해 유발되는 TNF- α 와 iNOS의 유전자 발현은 갈근탕 전 처리에 의해 억제됨을 확인하였다.

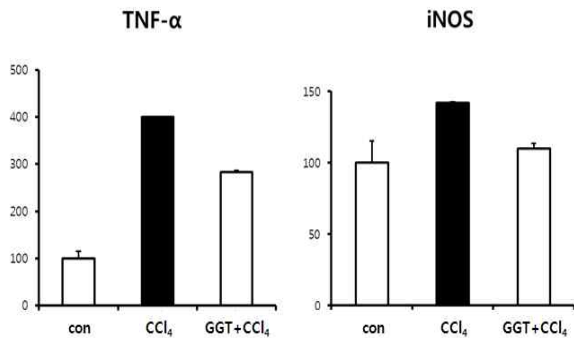


Fig. 5. GGT pretreatment regulates the expression of TNF- α and iNOS. Cells were pretreated with GGT (400 ug/ml) for 3 h and then treated with 0.5% CCl₄ for 4 h. The expression levels of TNF- α and iNOS mRNA were analyzed by PCR.

6. Heat shock protein 72 및 heme-oxygenase-1 유전자의 발현 조사

Heat shock protein (HSP)은 분자 샤페론의 일종으로, 환경적, 병리적 및 대사적 스트레스로부터 단백질의 3차원적 구조를 유지시켜 세포의 손상을 최소화하며 세포막을 통한 단백질 수송이나 새로운 단백질 합성과 같은 세포내 항상성 유지에 중요하게 작용한다^{14,15}). 또한 Heme oxygenase-1 (HO-1)은 heme을 대사 시키는 효소로서 염증성 자극에 대한 반응으로 발현되고 항염작용이 있는 것으로 알려져 있다^{16,17}). 이러한 HO-1은 여러 가지 산화적 스트레스에 의해 증가된다¹⁸). 본 연구에서는 CCl₄에 의한 HSP72 및 HO-1의 발현이 증가되지만, 이들 발현은 갈근탕의 전 처리에 의해 더욱 증가됨을 관찰하였다(Fig. 6).

7. H&E staining 을 통한 갈근탕의 간보호 효과 확인

간에 대한 조직병리학적 검사 결과, 대조군과 비교시 CCl₄ 투여군 및 모든 시험 물질 투여군에서 담관의 증식, 섬유화, 지방증 및 간세포주위의 염증이 관찰되지 않았다(Fig. 7). 그러나 대조군과 비교시 CCl₄ 투여군에서 간세포의 괴사 및 염증세포 침윤이 관찰되어, CCl₄에 의해 간의 손상이 유발되었음을 확인할 수 있었다. 이에 반해 갈근탕을 투여한 군의 경우, CCl₄ 투여군에 비해 갈근탕 투여군에서 간세포의 괴사는 그 정도가 작게 관찰되었다. 그 외 염증세포침윤의 정도는 CCl₄ 투여군에 비해 갈근탕 투여군에서 그 정도의 차이가 없다고 판단되었다.

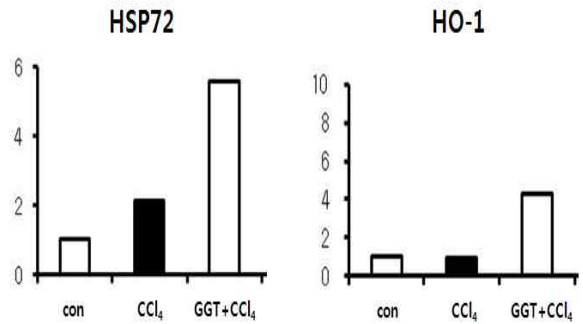


Fig. 6. GGT pretreatment regulates the expression of HSP72 and HO-1. Cells were pretreated with GGT (400 ug/ml) for 3 h and then treated with 0.5% CCl₄ for 4 h. HSP72 and HO-1 mRNA were analyzed by real time PCR.

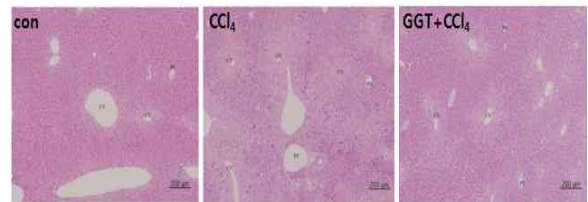


Fig. 7. Pathological changes in mouse liver by HE staining. The hepatocellular necrosis were decreased in GGT treated sample compare to CCl₄ alone treated cells. PV: portal vein, CV: central vein.

고찰 및 결론

갈근탕은 주로 몸은 비교적 건강하면서도 두통에 열이 나고 오한이 들고 목덜미가 빠근하고 식은 땀이 나고 얼굴과 눈이 붓고 인후통증, 감기몸살 등의 증상이 있을 때 사용된다⁴). 이러한 갈근탕의 7가지 구성 약재중에 특히 주약인 갈근을 포함하여 작약, 감초의 경우 간 기능에 좋은 약재로 널리 알려져 있다. 갈근의 열수추출물은 카드늄 중독을 경감시키는 효과를 보인다¹⁹)고 발표되는 등, 천연물에 대한 관심이 높아지면서 많은 연구가 진행되고 있다.

CCl₄는 간세포의 대사에 심한 장애를 초래하는 대표적인 물질로 알려져 있다. 최근 보원탕 및 발효알로에 등이 CCl₄에 의해 유도된 간독성에 대한 보호효능을 가지고 있음이 보고되었으나^{20,21}) CCl₄에 의한 간독성에 미치는 갈근탕의 영향에 관한 연구는 볼 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 CCl₄에 의한 간 독성 모델을 이용하여 갈근탕의 간 보호 효능을 확인하였다.

MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 이 방법을 이용하여 갈근탕의 전 처리로 인해 세포의 성장률이 높아짐을 확인하였다.

ALT는 간세포 안에 들어있는 효소로서 간세포가 파괴되거나 손상을 받으면 유출되어 혈중 농도가 증가하게 되는데, 급성이나 만성간염 시 이들 수치가 올라간다. 따라서 간염의 정도를

대략적으로 알려주는 검사로서 흔히 '간수치' 또는 '간염수치'라고 부른다. 본 연구에서 세포독성 비교를 위하여 ALT를 확인한 결과, CCl₄를 단독으로 처리한 경우, 대조군에 비해 간기능 지표인 ALT가 65.71182 (평균값)의 활성도를 보인 반면, 갈근탕을 전 처리한 경우의 ALT는 61.30432 (평균값)의 활성도를 보였다. 이와 함께, LDH assay는 대개 조직손상이나 세포 손상을 측정하는데 사용되는데, CCl₄ 단독의 경우 (100)에 비해 갈근탕 전 처리에 의해 낮은 값 (86.78031)을 나타내었다. 이러한 결과는 갈근탕의 전 처리에 의해 CCl₄의 세포독성이 감소됨을 보여준다.

세포 내에서는 산화적 스트레스로 인하여 활성산소 생성이 증가되고 항산화 능력이 감소되면서 여러가지 반응이 일어나는데, 갈근탕의 간세포 보호 기능을 확인하기 위하여 활성산소의 조절 및 항산화 효소의 발현 및 활성을 확인한 결과, 갈근탕에 의해 활성산소의 생성은 감소되고 항산화 효소의 발현 및 활성은 증가되었다. 이와 함께 염증관련 유전자의 발현을 조사한 결과, 위 결과와 상응하게도 TNF-alpha 및 iNOS의 발현이 갈근탕 전 처리에 의해 감소되었다. 또한 여러가지 스트레스에 대한 세포 보호 기능을 하는 것으로 알려져 있는 HSP72와 HO-1의 발현이 대조군에 비해 갈근탕 전 처리 샘플에서 증가되어 있음을 확인하였다.

간 기능의 상태를 확인하기 위하여 간조직의 형태학적 관찰을 HE staining을 통하여 진행하였다. 그 결과, 갈근탕을 전 처리한 경우에 대조군에 비하여 상대적으로 세포의 괴사가 작게 관찰되었다.

이러한 결과를 종합했을 때 갈근탕은 CCl₄에 의한 세포의 독성을 억제하고 결과적으로 세포의 괴사를 억제함을 알 수 있는데, 이러한 보호기능은 항산화 효과 및 염증 관련 유전자의 발현 억제 및 HSP72 및 HO-1과 같은 세포 보호 기능을 수행하는 단백질을 과 발현시킴으로써 이루어지는 것으로 추정된다.

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K11050의 지원을 받아 수행되었음

참고문헌

1. Chang, Q., Sun, L., Zhao, R.H., Chow, M.S., Zuo, Z. Simultaneous determination of ten active components in traditional Chinese medicinal products containing both Gegen (Pueraria lobata) and Danshen (Salvia miltiorrhiza) by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 19: 368-375, 2008.
2. Shin, J.M., Kim, Y.O., Baek, S.H. Free radical scavenging activity and kinetic behavior of the Galgeuntang water extract. *Ori. Pharm. Exp. Med.* 8: 32-38, 2008.
3. Wang, Y., Yao, Y., An, R., You, L., Wang, X. Simultaneous determination of puerarin, daidzein, baicalin, wogonoside

and liquiritin of GegenQinlian decoction in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogra. B.* 877: 1820-1826, 2009.

4. 박영순. 한방의 약리해설. 서울, 아카데미서적, pp 196-202, 2002.
5. Lyu, S.A., Lee, S.Y., Lee, S.J., Son, S.W., Kim, M.O., Kim, G.Y., Kim, Y.H., Yoon, H.J., Kim, H., Park, D.I., Ko, W.S. Seungma-galgeun-tang attenuates proinflammatory activities through the inhibition of NF-kappaB signal pathway in the BV-2 microglial cells. *J Ethnopharmacol.* 107(1):59-66, 2006.
6. Shim, K.S., Park, H.Y., Lee, J.H., Ma, C.J., Choi, S.U., Lee, J.H., Ma, J.Y. Inhibitory Effect of Galgeun-tang on RANKL-induced Osteoclast Differentiation and Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 158-166, 2011.
7. 연구봉, 권창호. Rat 간 조직대사에 미치는 갈근탕의 영향에 관한 연구. *생약학회지* 5(2):141, 1974.
8. 윤이란, 최유정, 허정호, 최철웅, 성태종, 김윤근, 김종수. 갈근 및 녹차추출물의 아질산염 소거작용 및 간독성 보호효과. *Korean J Vet Serv.* 33(3):275-285, 2010.
9. Kamalakkannan, N., Rukkumani, R., Varma, P.S., Viswanathan, P., Rajasekharan, K.N., Menon, V.P. Comparative effects of curcumin and an analogue of curcumin in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 97: 15-21, 2005.
10. Castillo, T., Koop, D.R., Kaminura, S., Triadafilopoulos, G., Tsukamoto, H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology.* 16: 992-996, 1992.
11. Mico, B.A., Pohl, L.R. Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine. *Arch Biochem Biophys.* 225: 596-609, 1983.
12. Tipoe, G.L., Leung, T.M., Liong, E., So, H., Leung, K.M., Lau, T.Y., Tom, W.M., Fung, M.L., Fan, S.T., Nanji, A.A. Inhibitors of inducible nitric oxide (NO) synthase are more effective than an NO donor in reducing carbon-tetrachloride induced acute liver injury. *Histol Histopathol.* 21(11):1157-1165, 2006.
13. Park, S.W., Lee, C.H., Kim, Y.S., Kang, S.S., Jeon, S.J., Son, K.H., Lee, S.M. Protective Effect of Baicalin Against Carbon Tetrachloride - Induced Acute Hepatic Injury in Mice. *J Pharm Sci.* 106: 136-143, 2008.
14. Moseley, P.L. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann NY Acad Sci.* 856: 206-213, 1998.
15. Febbraio, M.A., Koukoulas, I. HSP72 gene expression

- progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* 89(3):1055-1060, 2000.
16. Ndisang, J.F. Role of Heme Oxygenase in Inflammation, Insulin-Signalling, Diabetes and Obesity. *Mediators of Inflammation.* 2010: 1-18, 2010.
 17. Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Mueller, S. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance. *Curr Drug Targets.* 11(12):1541-1550, 2010.
 18. Otterbein, L.E., Choi, A.M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(6):1029-1037, 2000.
 19. 정영희, 한성희, 신미경. 카드뮴을 급여한 흰쥐에서 갈근 열수 추출액의 해독작용효과. *Korean J. Dietary Culture.* 17: 456-464, 2002.
 20. 박종흠, 박선동, 박원환. Effect of Bowontang on Mouse Hepatotoxicity Induced by Carbon tetrachloride. *동국한의학 연구소 논문집.* 8(2):97-113, 2000.
 21. 임병락. 사염화탄소 유도 간독성에 대한 발효알로에의 보호 효과. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 36(3):240-245, 2008.