

한약 처방 25종에 대한 간 보호 효과 비교 연구

진성은 · 정수진 · 신현규 · 하혜경*

한국한의학연구원 한약방제연구그룹

Hepatoprotective Effects of 25 Herbal Formulas in Primary Rat Hepatocytes

Seong Eun Jin, Soo-Jin Jeong, Hyeun-Kyoo Shin, Hyekyung Ha*

Herbal Medicine Formulation Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine

The purpose of this study is to investigate the protective effects of 25 herbal formulas on acetaminophen (APAP) or D-galactosamine (D-GalN)-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. Cell viability was measured using by Cell Counting Kit-8. 15 kinds of herbal formulas significantly reversed the cell viabilities of D-GalN-treated rat hepatocytes compared with D-GalN alone ($p < 0.05$). In particular, 9 herbal formulas (Bangpungdongseong-san, Bojungikgi-tang, Galgeun-tang, Gumiganghwal-tang, Guibi-tang, Sagunja-tang, Samsuem, Pyeongwi-san and Yijin-tang) showed the potent protective effects. However, 8 herbal formula exerted weak protective effects and 2 herbal formula did not exert effects on hepatotoxicity by D-GalN. On APAP-induced hepatotoxicity, 7 kinds of herbal formulas increased the viabilities of hepatocytes compare with APAP alone ($p < 0.05$). These results could be provide a valuable information for the future *in vivo* or clinical studies to predict the hepatoprotective effects of herbal formulas.

Key words : Herbal formula, Hepatoprotection, Primary rat hepatocytes, Cell viability

서 론

최근 유해물질로부터 간 보호 또는 간 기능 개선효과가 있고, 합성 화합물에 비해 부작용이 적은 천연물에 대한 연구가 주목을 받고 있다. 한의학에서도 한약 제제 또는 처방의 간 기능 향상 및 간 질환 치료제의 개발을 위한 연구가 시도되고 있다.¹⁾ 그러나 한약은 민간요법 및 과거 임상 경험에 의존하여 섭취되는 경우가 많기 때문에 안전성이 검증되지 않고 무분별하게 사용되고 있으며, 한약의 기능성 및 유용성을 과학적으로 입증하는 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 건강보험급여 한약제제 처방 56종,²⁾ 한약처방의 종류 및 조제 방법에 관한 규정에 의한 처방 100종³⁾ 그리고 한방 의료기관 다빈도 한약 처방 29종⁴⁾ 중 중복되는 다빈도 한약 처방 25종의 간 보호 효능을 비교 실험하였다.

Acetaminophen (APAP, N-acetyl-p-aminophenol)은 세계적으로 널리 사용되는 진통 및 해열제로 치료 복용량의 85-90%는

sulfuric acid 및 glucuronic acid와 포함되어 간독성 없이 배설되지만, 4-10%는 cytochrome P450에 의해 대사 활성이 일어나 반응성이 높은 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)이 생성된다. APAP를 과량으로 섭취하면 많은 양의 NAPQI가 생성되어 간 손상이 유발되며, 다른 약물과 함께 복용하는 등 여러 원인에 의해 간독성을 유발할 수 있다.⁵⁻⁶⁾ Galactosamine (D-GalN)은 galactose 대사 장애를 통해 간세포의 지방변화, 염증세포 침윤 및 간세포 괴사 등 간염과 유사한 간독성을 유발한다.⁷⁻⁹⁾ 따라서 본 연구에서 다빈도 한약 처방 25종의 간 보호 효능을 확인하기 위해 흰쥐의 일차 배양 간세포에서 APAP 및 D-GalN으로 간독성을 유발하고 한약 처방의 전처리가 세포생존율에 어떤 영향을 미치는지 관찰함으로써 간 보호 효과의 유무를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 다빈도 한약 처방 구성은 선행연구로 발표된 것과 같으며¹⁰⁻¹³⁾, 구성 한약재는 광명당제약 (Ulsan, Korea)에서 구입하였다. 구입한 한약재는 이제현 교수 (Dongguk University,

* 교신저자 : 하혜경, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원

· E-mail : hkha@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9513

· 접수 : 2013/07/01 · 수정 : 2013/08/09 · 채택 : 2013/08/14

Gyeongju, Korea)와 서영배 교수 (Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가 감별 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본은 한국한의학연구원 한약방제연구그룹에 보관하였다. 각각의 처방에 따라 구성 약재를 무게 비율로 배합하여 10배수의 물을 넣어 100℃에서 2시간 동안 전탕 (Cosmos 660, 경서기계) 한 후 동결건조기 (PVTFD100R, 일신랩)를 이용하여 분말화하였다. 전탕액을 100 mL씩 취한 뒤 동결건조 하여 건조물 무게를 측정하였고, 이를 전체 약재 무게에 대해 환산하여 수율을 측정하였다(Table 1). 처치 시에는 동결건조 된 검체분말 100 mg을 PBS 1 mL에 용해시킨 뒤 0.2 µm filter로 여과하여 보존용액을 100 mg/mL 농도로 조제하고 이를 희석하여 사용하였다.

Table 1. Yields of herbal formula extracts

Herbal formula	Yield (%)	Herbal formula	Yield (%)
<i>Bangpungdongseong-san</i>	17.7	<i>Samchulgeonbi-tang</i>	24.5
<i>Banhabakchulcheonma-tang</i>	17.6	<i>Samsoeum</i>	18.6
<i>Bojungikgi-tang</i>	25.4	<i>Samul-tang</i>	33.3
<i>Galgeun-tang</i>	12.6	<i>Sipjeondabo-tang</i>	22.9
<i>Gumiganghwal-tang</i>	22.8	<i>Socheongryong-tang</i>	21.7
<i>Guibi-tang</i>	24.3	<i>Ssanghwa-tang</i>	25.5
<i>Hwanglyeonhaedok-tang</i>	17.1	<i>Sosiho-tang</i>	22.9
<i>Insampadok-san</i>	24.3	<i>Palmul-tang</i>	25.9
<i>Jaeumganghwa-tang</i>	20.8	<i>Pyeongwi-san</i>	23.4
<i>Ojeok-san</i>	21.0	<i>Yijin-tang</i>	18.5
<i>Oryeong-san</i>	22.7	<i>Yijung-tang</i>	24.8
<i>Oyaksungi-san</i>	24.4	<i>Yukmijwhang-tang</i>	27.0
<i>Sagunja-tang</i>	22.3		

2. 시약

Hepatocyte Isolation System은 Worthington Biochemical Corporation (NJ, USA)에서 구입하였으며, Williams' E medium 과 primary hepatocyte maintenance supplements (dexamethasone, penicillin-streptomycin, insulin, transferrin, selenium complex, BSA, linoleic acid)는 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Cell Counting Kit-8 (CCK-8)는 Dojindo (Kumamoto, Japan)에서 구입하였으며, acetaminophen (APAP) 과 D-galactosamine (D-GalN), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

3. 간세포 분리 및 배양

동물은 6주령의 Sprague-Dawley 계통의 웅성 흰쥐를 대한바이오링크로부터 구입하여 7일 동안 순화시킨 후 체중이 200~250 g 되었을 때 간세포 분리시험에 사용하였다. 일반 고형 사료와 상수도수를 자유 섭취하도록 하였고, 사육환경은 23±3℃의 온도와 40~60%의 습도에서 12 시간씩 명암주기를 조절하여 관리하였다.

간세포는 Berry¹⁴⁾의 collagenase perfusion 방법을 기초로 하여 Worthington Biochemical사 (NY, USA)의 Hepatocyte Isolation System을 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 흰쥐에 pentobarbital sodium (엔도발 주사제, 한림제약, 서울)을 복강 주사하여 마취시킨 뒤, 간문맥을 통해 37℃로 가온된 HBSS buffer를 주입하면서 하대정맥을 절단하여 간으로부터 혈액을 유

출시켰다. 혈액이 완전히 제거되면 collagenase 용액 (collagenase 225 U/mL, elastase 0.3 U/mL and DNase 10 U/mL)을 15 분 동안 관류시켜 간세포를 분리하였다. 팽창된 간을 적출하여 Leibovitz L-15 배지에 넣고 막을 찢어 세포를 유출시킨 후, cell strainer (70 µm; BD Bioscience, NJ, USA)를 통과시켜 얻은 단일 세포액을 1000×g에서 3분간 원심분리 시켰다. Leibovitz L-15 배지로 2번 반복하여 세척한 후 primary hepatocyte maintenance supplements가 포함된 Williams' E 배지로 현탁 시켰다. Collagen type I으로 코팅된 T-75 플라스크 (BD Bioscience)에 간세포 현탁액을 분주한 후 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 18 시간 동안 배양하였다.

4. 세포생존율 평가

한약 추출물의 세포 독성을 알아보기 위해 흰쥐로부터 분리한 간세포를 collagen type I 이 코팅된 96 well plate에 2×10⁴ cells/well씩 분주하여 18 시간 배양한 후, 각 추출물을 농도별로 처리하여 48 시간 동안 배양하였다. 이어서 CCK-8 용액을 10 µL 씩 첨가하여 4 시간 동안 배양하고 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad. MN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교하여 상대적인 세포생존율 (% of control)을 계산하였으며, Table 2에 나타내었다.

Table 2. Cell viabilities of herbal formula extracts in primary rat hepatocytes

Herbal formula	Concentration (µg/mL)	Cell viability (% of control)
<i>Bangpungdongseong-san</i>	125	86.06 ± 3.97
	250	80.52 ± 2.47
	500	81.72 ± 1.99
<i>Banhabakchulcheonma-tang</i>	125	92.37 ± 3.66
	250	101.25 ± 6.26
	500	91.61 ± 6.68
<i>Bojungikgi-tang</i>	125	92.64 ± 2.31
	250	96.57 ± 2.07
	500	96.18 ± 0.32
<i>Galgeun-tang</i>	125	85.50 ± 0.52
	250	89.71 ± 2.38
	500	90.01 ± 2.30
<i>Gumiganghwal-tang</i>	125	89.26 ± 2.19
	250	102.85 ± 1.62
	500	98.21 ± 2.77
<i>Guibi-tang</i>	125	86.06 ± 2.76
	250	86.49 ± 2.44
	500	81.65 ± 4.24
<i>Hwanglyeonhaedok-tang</i>	125	93.82 ± 0.89
	250	95.05 ± 2.18
	500	99.92 ± 1.14
<i>Insampadok-san</i>	125	91.87 ± 2.20
	250	90.30 ± 1.58
	500	99.15 ± 3.08
<i>Jaeumganghwa-tang</i>	125	91.79 ± 2.43
	250	91.03 ± 1.67
	500	95.22 ± 2.60
<i>Ojeok-san</i>	125	90.42 ± 1.73
	250	90.10 ± 0.88
	500	80.42 ± 1.06

Herbal formula	Concentration (µg/mL)	Cell viability (% of control)
<i>Oryeong-san</i>	125	99.95 ± 0.83
	250	109.58 ± 1.44
	500	106.89 ± 2.49
<i>Oyaksungi-san</i>	125	107.92 ± 3.29
	250	115.68 ± 6.81
	500	104.85 ± 5.54
<i>Sagunja-tang</i>	125	102.49 ± 3.21
	250	96.82 ± 5.27
	500	98.20 ± 3.40
<i>Samchulgeonbi-tang</i>	125	93.11 ± 0.80
	250	88.67 ± 1.87
	500	86.72 ± 2.58
<i>Samssoeum</i>	125	90.88 ± 1.75
	250	94.77 ± 2.09
	500	89.55 ± 1.09
<i>Samul-tang</i>	125	91.49 ± 3.20
	250	77.87 ± 2.02
	500	76.83 ± 2.39
<i>Sipjeondabo-tang</i>	125	88.51 ± 0.74
	250	83.96 ± 0.78
	500	89.97 ± 1.75
<i>Socheongryong-tang</i>	125	96.05 ± 1.65
	250	92.66 ± 3.17
	500	88.83 ± 2.11
<i>Ssanghwa-tang</i>	125	92.49 ± 1.69
	250	94.36 ± 1.02
	500	95.01 ± 1.26
<i>Sosiho-tang</i>	125	95.29 ± 2.12
	250	107.25 ± 2.07
	500	106.97 ± 2.39
<i>Palmul-tang</i>	125	83.40 ± 1.44
	250	88.03 ± 1.28
	500	82.99 ± 2.74
<i>Pyeongwi-san</i>	125	93.97 ± 3.72
	250	87.22 ± 3.30
	500	83.24 ± 2.56
<i>Yijin-tang</i>	125	81.79 ± 2.05
	250	82.67 ± 3.05
	500	80.71 ± 2.94
<i>Yijung-tang</i>	125	102.47 ± 1.55
	250	97.70 ± 1.73
	500	97.80 ± 3.96
<i>Yukmjiwhang-tang</i>	125	88.16 ± 1.93
	250	88.21 ± 3.38
	500	81.19 ± 2.85

Cells were treated with the indicated concentrations of herbal formula extracts for 48 h. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Data are expressed as mean ± SEM (n=4).

6. 간세포에서의 간 보호 효과 측정

예비시험을 통해 분리한 간세포에 40 mM의 APAP와 4 mM의 D-GalN을 각각 처리했을 때 간독성이 유의성 있게 (p<0.01) 관찰 되었으므로, 본 시험에서는 간독성 유발을 위해 APAP와 D-GalN의 농도를 각각 40 mM과 4 mM로 선택하여 사용하였다(Fig. 1).

일차 배양 간세포를 collagen- I 이 코팅된 96 well plate에 2×10⁴ cells/well씩 분주하여 18 시간 배양한 후, 다빈도 한약 처방 추출물 (0-500 µg/mL)을 처리하였다. 2 시간 배양 후 APAP (40 mM) 및 D-GalN (4 mM)을 각각 처리하고, 46 시간 동안 배양하여 독성을 유발하였다. 이어서 CCK-8 용액을 10 µL씩 첨가하여 4 시간 동안 배양하고 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad. MN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였

다. 측정값은 APAP 또는 D-GalN 처리군과 비교하여 상대적인 세포생존율 (% of APAP 또는 % of D-GalN)을 계산하였으며, Table 3과 4에 나타내었다.

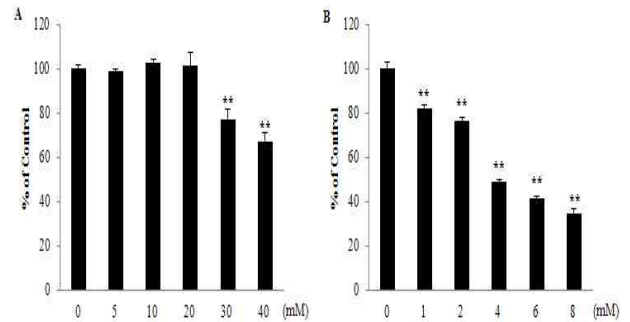


Fig. 1. Hepatotoxicities of acetaminophen (A) and D-galactosamine (B) in primary rat hepatocytes. Cells were treated with the indicated concentrations of acetaminophen or D-galactosamine for 48 h. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Data are expressed as mean±SEM (n=4). #p<0.01 indicates significant differences from the normal cells. **p<0.01 indicate significant differences from the normal cells.

7. 통계처리

모든 실험값은 mean ± SEM으로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA 검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 한약 처방의 세포독성

25종의 한약 처방 추출물의 흰쥐의 일차 배양 간세포에 대한 독성을 평가한 결과, 갈근탕, 구미강활탕, 반하백출천마탕, 보중익기탕, 사군자탕, 삼소음, 소시호탕, 십전대보탕, 쌍화탕, 오령산, 오약순기산, 이중탕, 인삼폐독산, 자음강화탕 및 황련해독탕은 500 µg/mL에서 세포생존율이 90% 이상으로 500 µg/mL 이하 농도에서는 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 반면, 소청룡탕과 오적산은 250 µg/mL, 사물탕, 삼출건비탕 및 평위산은 125 µg/mL 이하에서 세포독성이 없는 것으로 관찰되었으며, 귀비탕, 방풍통성산, 육미지황탕, 이진탕 및 팔물탕은 125 µg/mL에서 81.79~88.16%의 세포생존율을 나타내었다.

2. 한약 처방의 전처리가 APAP로 유발된 간독성에 미치는 영향

25종의 한약 처방 추출물이 APAP에 의해 유발된 간세포의 독성에 미치는 영향은 Table 3과 같다. APAP (40 mM)를 처리하여 46 시간 동안 간세포를 배양한 결과, 세포생존율은 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 보중익기탕, 사물탕, 삼출건비탕, 오약순기산, 육미지황탕, 이중탕 및 황련해독탕의 전처리는 일부 농도에서 APAP 처리군에 비해 세포생존율이 증가하는 것으로 나타났다으나 농도 의존적인 효과는 없었다.

3. 한약 처방의 전처리가 D-GalN으로 유발된 간독성에 미치는 영향

25종의 한약 처방 추출물이 D-GaIN에 의해 유발된 간세포의 독성에 미치는 영향은 Table 4에 나타내었다. 간세포에 D-GaIN (4 mM)을 처리하여 46 시간 동안 배양한 결과, 대조군에 비해 세포생존율이 현저히 감소하였다. 갈근탕, 구미강활탕, 귀비탕, 반하백출천마탕, 방풍통성산, 보중익기탕, 사군자탕, 사물탕, 삼소음, 삼출건비탕, 쌍화탕, 오적산, 이진탕, 평위산 및 황련해독탕을 전처리한 후 D-GaIN으로 간독성을 유발한 결과 D-GaIN만 처리한 군에 비해 세포생존율이 유의적으로 증가하였다 (p<0.05). 특히 갈근탕, 구미강활탕, 귀비탕, 방풍통성산, 보중익기탕, 사군자탕, 삼소음, 이진탕 및 평위산은 최종 농도 500 µg/mL에서 D-GaIN 처리군보다 50% 이상 세포생존율을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 한편 십전대보탕, 오약순기산, 육미지황탕 및 자음강화탕을 전처리한 결과 높은 농도에서만 D-GaIN 단독 처리군에 비해 세포생존율이 증가하는 것으로 나타났으며, 소시호탕, 소청룡탕, 이중탕 및 팔물탕은 일부 농도에서 D-GaIN으로 유발된 독성에 대해 보호 효과를 나타냈으나 농도의존적인 효과는 없었다.

Table 3. Effects of herbal formula extracts on acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes

Herbal formula	Concentration (µg/mL)	Cell viability	
		% of Control	% of AP
<i>Bangpungdongseong-san</i>	0	70.61 ± 5.18	100.00 ± 7.33 [#]
	125	69.71 ± 6.07	98.72 ± 8.60
	250	67.58 ± 1.01	95.71 ± 1.44
	500	75.22 ± 3.17	106.52 ± 4.49
<i>Banhabakchulcheonma-tang</i>	0	71.32 ± 2.84	100.00 ± 3.98 [#]
	125	65.97 ± 3.19	92.50 ± 4.47
	250	60.01 ± 3.79	84.14 ± 5.31
	500	72.05 ± 3.27	101.03 ± 4.59
<i>Bojungikgi-tang</i>	0	43.87 ± 0.99	100.00 ± 2.26 [#]
	125	43.38 ± 1.98	98.89 ± 4.52
	250	49.32 ± 1.67	112.43 ± 3.81 [*]
	500	45.21 ± 2.71	103.04 ± 6.17
<i>Galgeun-tang</i>	0	45.89 ± 2.94	100.00 ± 6.40 [#]
	125	46.93 ± 1.22	102.27 ± 2.67
	250	42.01 ± 2.88	91.54 ± 6.27
	500	35.39 ± 0.86	77.13 ± 1.88
<i>Gumiganghwal-tang</i>	0	60.56 ± 1.01	100.00 ± 1.67 [#]
	125	50.17 ± 0.73	82.84 ± 1.21
	250	40.45 ± 3.88	66.79 ± 6.41
	500	42.90 ± 2.08	70.85 ± 3.43
<i>Guibi-tang</i>	0	65.61 ± 3.04	100.00 ± 4.64 [#]
	125	61.63 ± 3.01	93.94 ± 4.59
	250	61.76 ± 1.34	94.13 ± 2.05
	500	68.47 ± 3.63	104.36 ± 5.53
<i>Hwanglyeonhaedok-tang</i>	0	76.35 ± 2.86	100.00 ± 3.75 [#]
	125	87.11 ± 4.46	114.09 ± 5.84 ^{**}
	250	70.60 ± 1.81	92.46 ± 2.37
	500	82.92 ± 1.52	108.61 ± 1.99
<i>Insampadok-san</i>	0	55.71 ± 0.59	100.00 ± 1.05 [#]
	125	50.48 ± 2.90	90.61 ± 5.20
	250	42.77 ± 1.59	76.77 ± 2.85
	500	47.32 ± 1.79	84.93 ± 3.21
<i>Jaemganghwa-tang</i>	0	47.62 ± 3.49	100.00 ± 7.32 [#]
	125	48.98 ± 3.87	102.86 ± 8.13
	250	41.89 ± 1.00	87.97 ± 2.11
	500	45.64 ± 2.06	95.85 ± 4.32
<i>Ojeok-san</i>	0	37.52 ± 1.42	100.00 ± 3.78 [#]
	125	35.81 ± 0.70	95.44 ± 1.88

Herbal formula	Concentration (µg/mL)	Cell viability	
		% of Control	% of AP
<i>Oryeong-san</i>	250	33.71 ± 1.01	89.84 ± 2.70
	500	35.96 ± 0.90	95.85 ± 2.40
	0	68.54 ± 1.39	100.00 ± 2.03 [#]
	125	67.79 ± 2.44	98.90 ± 3.57
<i>Oyaksungi-san</i>	125	62.15 ± 1.95	90.69 ± 2.85
	250	63.70 ± 1.52	92.95 ± 2.22
	0	63.07 ± 0.79	100.00 ± 1.25 [#]
	125	70.75 ± 3.47	112.17 ± 5.50 [*]
<i>Sagunja-tang</i>	250	69.95 ± 2.75	110.91 ± 4.35 [*]
	500	72.25 ± 2.96	114.55 ± 4.69 ^{**}
	0	63.62 ± 3.54	100.00 ± 5.57 [#]
	125	64.87 ± 3.46	101.96 ± 5.45
<i>Samchulgeonbi-tang</i>	250	66.81 ± 5.15	105.01 ± 8.10
	500	69.02 ± 2.92	108.49 ± 4.59
	0	36.08 ± 1.01	100.00 ± 3.79 [#]
	125	53.83 ± 2.47	149.20 ± 6.85 ^{**}
<i>Samsoeum</i>	250	34.57 ± 1.10	95.82 ± 3.05
	500	32.31 ± 0.53	89.55 ± 1.48
	0	73.65 ± 2.37	100.00 ± 3.21 [#]
	125	76.85 ± 0.76	104.35 ± 1.03
<i>Samul-tang</i>	250	72.46 ± 3.47	98.39 ± 4.71
	500	70.97 ± 3.76	96.37 ± 5.11
	0	57.45 ± 3.04	100.00 ± 5.29 [#]
	125	55.77 ± 3.38	97.07 ± 5.88
<i>Sipjeondabo-tang</i>	250	62.99 ± 1.52	109.64 ± 2.64
	500	66.88 ± 2.45	116.41 ± 4.27 ^{**}
	0	48.50 ± 1.84	100.00 ± 3.79 [#]
	125	47.18 ± 2.00	97.26 ± 4.12
<i>Socheongryong-tang</i>	250	42.04 ± 2.01	86.66 ± 4.14
	500	40.77 ± 4.06	84.05 ± 8.36
	0	48.39 ± 1.89	100.00 ± 3.91 [#]
	125	49.57 ± 2.31	102.44 ± 4.77
<i>Ssanghwa-tang</i>	250	49.43 ± 0.91	102.15 ± 1.88
	500	43.16 ± 1.89	89.20 ± 3.90
	0	86.94 ± 1.61	100.00 ± 1.85 [#]
	125	91.23 ± 1.89	104.94 ± 2.17
<i>Sosiho-tang</i>	250	88.76 ± 1.90	102.09 ± 2.19
	500	86.18 ± 2.31	99.13 ± 2.66
	0	76.42 ± 2.28	100.00 ± 2.98 [#]
	125	79.28 ± 1.66	103.75 ± 2.17
<i>Palmul-tang</i>	250	81.38 ± 1.44	106.49 ± 1.89
	500	81.18 ± 2.72	106.22 ± 3.56
	0	44.42 ± 2.09	100.00 ± 4.70 [#]
	125	39.28 ± 1.00	88.43 ± 2.70
<i>Pyeongwi-san</i>	250	38.07 ± 1.57	85.70 ± 3.53
	500	35.12 ± 1.09	79.05 ± 2.45
	0	62.32 ± 0.98	100.00 ± 1.57 [#]
	125	61.94 ± 1.46	99.40 ± 2.34
<i>Yijin-tang</i>	250	63.60 ± 0.99	102.05 ± 1.59
	500	66.42 ± 2.21	106.57 ± 3.54
	0	32.64 ± 1.24	100.00 ± 3.79 [#]
	125	29.20 ± 2.24	89.49 ± 6.85
<i>Yijung-tang</i>	250	36.04 ± 3.89	110.43 ± 11.92
	500	28.51 ± 0.77	87.35 ± 2.36
	0	77.16 ± 0.37	100.00 ± 0.48 [#]
	125	80.60 ± 1.52	104.45 ± 1.97
<i>Yukmijihwang-tang</i>	250	78.97 ± 0.96	102.34 ± 1.24
	500	85.27 ± 3.07	110.51 ± 3.98 ^{**}
	0	70.67 ± 5.10	100.00 ± 7.21 [#]
	125	80.82 ± 2.84	114.37 ± 4.02 [*]
	250	75.85 ± 4.11	107.33 ± 5.82
	500	71.78 ± 4.17	101.58 ± 5.91

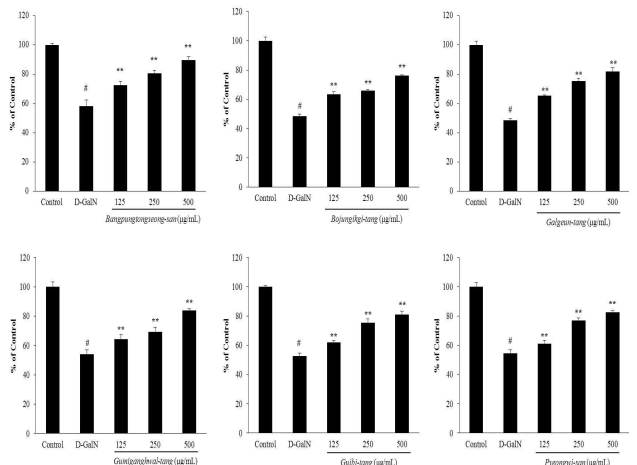
Cells were pretreated with the indicated concentrations of herbal formula extracts for 2 h and treated with APAP (40 mM) for 46 h. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Data are expressed as mean ± SEM (n=4). #p<0.01 indicates significant differences from the normal cells. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences from the APAP-treated cells.

Table 4. Effects of herbal formula extracts on D-galactosamine (D-GalN)-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes

Herbal formula	Concentration (µg/mL)	Cell viability	
		% of Control	% of D-GalN
<i>Bangpungtongseong-san</i>	0	58.26 ± 4.18	100.00 ± 7.17 [#]
	125	72.58 ± 2.63	124.57 ± 4.52**
	250	80.75 ± 1.97	138.60 ± 3.38**
	500	89.73 ± 2.40	154.01 ± 4.12**
<i>Banhabakchulcheonma-tang</i>	0	59.27 ± 2.63	100.00 ± 4.44 [#]
	125	69.39 ± 3.05	117.07 ± 5.14*
	250	70.92 ± 4.07	119.65 ± 6.86**
	500	75.95 ± 2.95	128.14 ± 4.98**
<i>Bojungikgi-tang</i>	0	48.41 ± 1.45	100.00 ± 3.00 [#]
	125	63.60 ± 1.54	131.36 ± 3.19**
	250	66.00 ± 0.88	136.34 ± 1.82**
	500	76.32 ± 0.55	157.65 ± 1.14**
<i>Galgeun-tang</i>	0	48.67 ± 1.05	100.00 ± 2.15 [#]
	125	65.33 ± 0.43	134.22 ± 0.88**
	250	75.28 ± 1.74	154.67 ± 3.57**
	500	81.87 ± 2.76	168.22 ± 5.66**
<i>Gumiganghwal-tang</i>	0	53.99 ± 3.00	100.00 ± 5.55 [#]
	125	64.15 ± 3.42	118.81 ± 6.34**
	250	69.31 ± 3.00	128.38 ± 5.56**
	500	83.82 ± 1.09	155.25 ± 2.02**
<i>Guibi-tang</i>	0	52.46 ± 2.17	100.00 ± 4.14 [#]
	125	61.84 ± 1.35	117.88 ± 2.58**
	250	75.25 ± 2.78	143.43 ± 5.30**
	500	80.85 ± 2.27	154.11 ± 4.33**
<i>Hwanglyeonhaedok-tang</i>	0	78.02 ± 1.05	100.00 ± 1.35 [#]
	125	87.23 ± 2.16	111.81 ± 2.76**
	250	93.85 ± 1.76	120.29 ± 2.25**
	500	96.23 ± 1.65	123.34 ± 2.11**
<i>Insampadok-san</i>	0	51.04 ± 2.76	100.00 ± 5.40 [#]
	125	56.41 ± 1.43	110.54 ± 2.80
	250	54.05 ± 2.98	105.91 ± 5.83
	500	56.41 ± 2.09	110.54 ± 4.09
<i>Jaumganghwa-tang</i>	0	59.08 ± 0.66	100.00 ± 1.11 [#]
	125	62.99 ± 1.39	106.62 ± 2.35
	250	61.96 ± 1.77	104.88 ± 2.99
	500	68.62 ± 2.96	116.15 ± 5.01*
<i>Ojeok-san</i>	0	49.26 ± 1.42	100.00 ± 2.89 [#]
	125	56.61 ± 1.18	114.92 ± 2.40**
	250	61.00 ± 1.41	123.84 ± 2.86**
	500	69.23 ± 1.40	140.53 ± 2.85**
<i>Oryeong-san</i>	0	62.40 ± 2.77	100.00 ± 4.44 [#]
	125	65.96 ± 1.36	105.71 ± 2.18
	250	64.59 ± 2.15	103.52 ± 3.44
	500	67.17 ± 3.06	107.65 ± 4.90
<i>Oyaksungi-san</i>	0	68.70 ± 2.69	100.00 ± 3.91 [#]
	125	68.52 ± 1.05	99.74 ± 1.52
	250	77.37 ± 4.68	112.62 ± 6.81
	500	99.34 ± 6.06	144.61 ± 8.82**
<i>Sagunja-tang</i>	0	56.74 ± 1.57	100.00 ± 2.77 [#]
	125	68.96 ± 4.50	121.55 ± 7.93**
	250	73.63 ± 3.42	129.78 ± 6.02**
	500	93.61 ± 2.85	164.99 ± 5.03**
<i>Samchulgeonbi-tang</i>	0	49.76 ± 1.11	100.00 ± 2.22 [#]
	125	56.02 ± 1.00	112.59 ± 2.01**
	250	58.12 ± 0.78	116.81 ± 1.57**
	500	70.42 ± 1.29	141.52 ± 2.60**
<i>Samsoeum</i>	0	62.61 ± 1.61	100.00 ± 2.57 [#]
	125	73.49 ± 3.99	117.38 ± 6.38*
	250	77.99 ± 4.55	124.57 ± 7.27**
	500	103.11 ± 2.47	164.70 ± 3.95**

Herbal formula	Concentration (µg/mL)	Cell viability	
		% of Control	% of D-GalN
<i>Samul-tang</i>	0	58.55 ± 1.91	100.00 ± 3.25 [#]
	125	68.03 ± 1.38	116.19 ± 2.35**
	250	79.40 ± 4.08	135.60 ± 6.96**
	500	82.55 ± 2.74	140.99 ± 4.68**
<i>Sipseondabo-tang</i>	0	47.72 ± 1.59	100.00 ± 3.33 [#]
	125	51.79 ± 2.73	108.52 ± 5.71
	250	51.71 ± 1.16	108.35 ± 2.43
<i>Socheongryong-tang</i>	0	47.19 ± 3.01	100.00 ± 6.37 [#]
	125	52.64 ± 0.46	111.53 ± 0.98
	250	52.96 ± 3.03	112.22 ± 6.43*
<i>Ssanghwa-tang</i>	0	55.76 ± 0.92	100.00 ± 1.65 [#]
	125	61.37 ± 1.95	110.05 ± 3.51**
	250	64.72 ± 1.05	116.07 ± 1.88**
<i>Sosiho-tang</i>	0	63.41 ± 1.48	100.00 ± 2.34 [#]
	125	76.29 ± 2.36	120.31 ± 3.72**
	250	79.67 ± 1.65	125.63 ± 2.61**
<i>Palmul-tang</i>	0	37.76 ± 2.27	100.00 ± 6.00 [#]
	125	42.44 ± 2.91	112.39 ± 7.72
	250	46.18 ± 2.57	122.30 ± 6.79**
<i>Pyeongwi-san</i>	0	54.33 ± 2.46	100.00 ± 4.53 [#]
	125	61.14 ± 2.06	112.55 ± 3.79**
	250	76.77 ± 1.80	141.31 ± 3.31**
<i>Yijin-tang</i>	0	38.53 ± 1.35	100.00 ± 3.52 [#]
	125	43.23 ± 1.59	112.20 ± 4.13*
	250	47.77 ± 0.69	123.98 ± 1.79**
<i>Yijung-tang</i>	0	66.99 ± 1.67	100.00 ± 2.49 [#]
	125	74.23 ± 3.24	110.80 ± 4.84**
	250	80.28 ± 1.45	119.83 ± 2.17**
<i>Yukmijihwang-tang</i>	0	71.55 ± 1.50	100.00 ± 2.10 [#]
	125	66.48 ± 2.57	92.92 ± 3.58
	250	78.21 ± 0.93	109.30 ± 1.31
	500	120.06 ± 5.64	167.80 ± 7.88**

Cells were pretreated with the indicated concentrations of herbal formula extracts for 2 h and treated with D-GalN (4 mM) for 46 h. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Data are expressed as mean ± SEM (n=4). #p<0.01 indicates significant differences from the normal cells. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences from the D-GalN-treated cells.



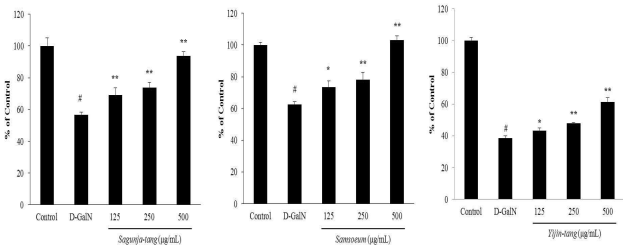


Fig. 2. Effects of herbal formula extracts on D-galactosamine (D-GalN)-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. Cells were pretreated with the indicated concentrations of herbal formula extracts for 2 h and treated with D-GalN (4 mM) for 46 h. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Data are expressed as mean±SEM (n=4). #p<0.01 indicates significant differences from the normal cells. *p<0.05 and **p<0.01 indicate significant differences from the D-GalN-treated cells.

고 찰

합성 화합물에 비해 부작용이 적고 안전한 천연물에 대한 관심이 증가하면서 한방에서는 한약 처방의 기능성 및 신뢰성에 대한 근거 마련을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 간 질환 치료제로 사용되고 있는 합성 의약품인 interferon과 malotilate를 대신할 수 있는 한약 제제 및 처방의 개발이 주목받고 있으며, 문헌 조사 결과 귀비탕,¹⁵⁾ 대시호탕¹⁶⁾ 및 화간진¹⁷⁾ 등의 한약 처방과 강활,¹⁸⁾ 구기자,¹⁹⁾ 금은화,²⁰⁾ 시호,²¹⁾ 영경규,²²⁾ 인삼,²³⁾ 인진쑥,²⁴⁾ 토복령,²⁵⁾ 헛개나무²⁶⁾ 및 황백²⁷⁾ 등의 단일 한약재들의 간 보호 효과가 보고되어 있다. 또한 건강의료보험, 한약 조제치침서 및 한방의료기관 다빈도 처방에 따라 선정된 25종의 한약 처방에 대해 발표된 연구를 전통의학 정보 포털 (OASIS, <http://oasis.kiom.re.kr>) 및 기타 학술 D/B (PubMed, DBpia)에서 검색한 결과 방풍통성산,²⁸⁾ 보중익기탕,²⁹⁾ 사군자탕,³⁰⁾ 사물탕,³¹⁾ 소시호탕,³²⁻³³⁾ 쌍화탕,³⁴⁾ 오령산,³⁵⁻³⁶⁾ 인삼패독산,³⁷⁾ 평위산³⁸⁾ 및 황련해독탕³⁹⁻⁴⁰⁾은 간 보호 효과에 대해 보고되어 있으며, 소청룡탕⁴¹⁾ 및 십전대보탕⁴²⁾은 간 대사에 관해 보고된 바 있다.

본 연구에서는 다빈도 한약 처방 25개 가운데 합성 의약품 복용시 유발되는 간 손상에 대한 보호 효과를 검색하기 위해 흰쥐의 일차 배양 간세포를 이용하였으며, APAP 및 D-GalN으로 간독성을 유발하였다. 일반적으로 *in vitro*에서 암 세포주를 이용한 세포배양시험에서는 효소의 발현이 정상 세포와는 다르게 나타나는데, 일차 배양 세포는 정상 동물에서 분리한 세포를 배양하게 되므로 *in vivo* 상태에서의 유사한 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있다.⁴³⁾

25종 처방 중에서 갈근탕, 구미강활탕, 귀비탕, 반하백출천마탕, 방풍통성산, 사군자탕, 삼소음, 쌍화탕, 오적산, 이진탕 및 평위산을 125-500 µg/mL 농도로 전처리한 결과 D-GalN으로 유도된 간독성에 대해 농도 의존적으로 보호 효과가 나타났으나 APAP로 유도된 간독성에 대해서는 보호 효과가 없었다. 따라서 이들 처방은 D-GalN에 의한 간 손상에 대해 선택적인 보호 효과를 가지는 것으로 판단되었다. 특히 귀비탕, 방풍통성산 및 이진탕은 500 µg/mL 농도로 단독 처리 시 세포생존율이 80%대로 정상 간세포에 대해서는 약한 독성을 나타냈지만 이들 처방을 전처리 한 후 D-GalN으로 간독성을 유발했을 때는 세포생존율이

150% 이상으로 나타나 약물에 의한 세포 손상 상태에서는 오히려 보호효과 있는 것으로 나타났다. 보중익기탕, 사물탕, 삼출건비탕 및 황련해독탕 (125-500 µg/mL)은 D-GalN으로 유도된 간독성에 대해서는 농도 의존적인 보호 효과를 가지는 것으로 나타났으나 APAP에 의한 간독성에 대해서는 일부 농도에서만 보호 효과가 나타난 것으로 보아 D-GalN에 의한 독성에 대해서만 작용할 것으로 사료된다. 한편 D-GalN으로 유도된 간독성에 대해 소시호탕, 소청룡탕, 십전대보탕, 오약순기산, 육미지황탕, 이중탕, 자음강화탕 및 팔물탕은 일부 농도에서 보호 효과가 나타났으나 오령산과 인삼패독산은 보호 효과가 없는 것으로 나타났다. 오약순기산, 육미지황탕 및 이중탕 역시 APAP에 의한 간독성에 대해 일부 농도에서 보호 효과가 나타났으나 농도 의존적인 효과는 없었으며 소시호탕, 소청룡탕, 삼소음, 오령산, 자음강화탕 및 팔물탕의 전처리에 의한 보호효과는 나타나지 않았다. 한편, 갈근탕, 십전대보탕 및 인삼패독산을 높은 농도로 처리한 후 APAP를 처리한 결과 APAP만 처리했을 때보다 간독성이 오히려 더 증가하는 것으로 나타나 이들 처방과 APAP를 함께 복용할 경우 주의가 요구된다.

결 론

다빈도 한약 처방 25종의 간 보호 효과를 연구한 결론은 다음과 같다.

흰쥐 일차 배양 간세포에 처방 추출물을 처리하여 APAP로 유발한 간독성에 대한 효과를 측정된 결과, 보중익기탕, 사물탕, 삼출건비탕, 오약순기산, 육미지황탕, 이중탕 및 황련해독탕 등 7종 처방은 일부 농도에서 APAP 단독 처리군에 비해 세포생존율이 증가하였으나 농도 의존적인 효과는 나타나지 않았다.

흰쥐 일차 배양 간세포에 처방 추출물을 처리하여 D-GalN으로 유발한 간독성에 대한 효과를 측정된 결과, 갈근탕, 구미강활탕, 귀비탕, 반하백출천마탕, 방풍통성산, 보중익기탕, 사군자탕, 사물탕, 삼소음, 삼출건비탕, 쌍화탕, 오적산, 이진탕, 평위산 및 황련해독탕 등 15종 처방은 D-GalN 단독 처리군에 비해 세포생존율이 50% 이상 증가하였다.

결론적으로 다빈도 한약 처방 25종 중 갈근탕, 구미강활탕, 귀비탕, 방풍통성산, 보중익기탕, 사군자탕, 삼소음, 이진탕 및 평위산 등 9종 처방이 D-GalN 유도 간독성에 대한 보호 효과가 있음을 확인하였다. 또한 본 연구 결과는 25종의 처방이 APAP 및 D-GalN에 의한 간 손상에 대해 선택적인 보호 효과를 가지며, 간세포의 손상을 완화하는 효능이 간독성 물질에 따라 달라질 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘한약 처방의 과

학적 근거 기반 구축 사업 (K13030)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Lee, H.C., Hwang, S.G., Kang, Y.K., Sohn, H.O., Moon, J.Y., Lim, H.B., Jeon, B.H., Lee, D.W. Influence of *Protactia brevitarsis* extract on liver damage induced by carbon tetrachloride and ethanol in rats. *J Life Sci* 11(5):405-414, 2001.
- 보건복지부 고시 제1999-23호, 1999. 8. 1.
- 보건복지부 고시 제1995-15호, 1995. 3. 15.
- 식품의약품안전처, 한국인의 한약 복용 실태 조사 연구, 2006.
- Guengerich, F.P., Kim, D.H., Iwasaki, M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 4(2):168-179, 1991.
- Bray, B.J., Rosengren, R.J. Retinol potentiates acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse: mechanistic studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 173(3):129-136, 2001.
- Decker, K., Keppler, D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 71: 77-106, 1974.
- Wang, J.F., Wendel, A. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine/endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem Pharmacol* 39(2):267-270, 1990.
- El-Mofty, S.K., Scrutton, M.C., Serroni, A., Nicolini, C., Farber, J.L. Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am J Pathol* 79(3):579-596, 1975.
- Seo, C.S., Huang, D.S, Lee, J.K., Ha, H., Chun J.M., Um, Y.R., Jang, S., Shin, H.K. Concentration of heavy metals, residual pesticides and sulfur dioxide of before/after a decoction. *Kor J Herbology* 23(4):51-58, 2008.
- Seo, C.S., Huang, D.S, Lee, J.K., Ha, H., Chun J.M., Um, Y.R., Jang, S., Shin, H.K. Concentration of heavy metals, residual pesticides and sulfur dioxide of before/after a decoction - In prescription of digestive system -. *Kor J Herbology* 24(1):111-119, 2009.
- Seo, C.S., Huang, D.S, Lee, J.K., Ha, H., Chun J.M., Um, Y.R., Jang, S., Shin, H.K. Concentration of heavy metals, residual pesticides and sulfur dioxide of before/after a decoction - In prescription consist of Sipjeondaebo-tang -. *J Korean Oriental Med* 30(4):108-117, 2009.
- Seo, C.S., Huang, D.S, Lee, J.K., Ha, H., Chun J.M., Um, Y.R., Jang, S., Kim, J.Y., Lee, S.W., Shin, H.K. Concentration of heavy metals, residual pesticides and sulfur dioxide of before/after a decoction. *J Sasang Constitutional Med.* 21(1):237-246, 2009.
- Berry, M.N., Edwards, A.M., Barritt, G.J. Isolated hepatocytes: Preparation, properties and applications. Burdon, R.H., Van Knippenberg, P.H., eds. Elsevier. Chapter 2. Amsterdam. New York. Oxford. 1991.
- 배창욱. 귀비탕이 acetaminophen으로 유도된 간중독 백서에 미치는 영향. 동국대 대학원. 2001.
- Kim, C.H., Kweon, Y.M., Lee, Y.T., Park, S.D. The preventive effect of Daeshiho-tang on liver damage induced by acetaminophen in the rats. *Kor J Oriental Med Prescription* 12(2):139-154, 2004.
- Park, C.S., Kim, G.Y., Lee, C.J., An, J.H., Kim, J.D., Nam, G.S. Protective effect of Whagan-Jeon (huaganjian) on acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Kor Oriental Med* 23(3):33-42, 2002.
- 정정숙. Acetaminophen의 간독성에 미치는 강황의 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
- 조연숙. 구기자 추출물성분의 간보호 효과에 관한 연구. 고려대학교 대학원. 2004.
- 정규영. Acetaminophen에 의한 간독성에 미치는 금은화의 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
- 강혜경. Acetaminophen에 의해 유도된 급성 간독성에 미치는 시호의 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
- 이성현. 고려영경귀의 항산화 및 간 보호활성과 Syringin의 분리. 강원대학교 대학원. 2008.
- Song, J.H., Park, M.J., Kim, E., Kim, Y.C. Effects of Panax ginseng on galactosamine-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* 34(5):341-347, 1990.
- 이상관. 사염화탄소 투여로 유발된 간 손상에 대한 인진쑥 추출물의 치료효과. 경북대학교 대학원. 2005.
- 김은주. 토복령추출물이 Acetaminophen 간독성에 미치는 효과. 덕성여대 대학원. 1993.
- 장준학. 사염화탄소에 의해 유도된 흰쥐의 간손상에 대한 헛개나무 메탄올 추출물의 보호효과. 대구가톨릭대학교 대학원. 2007.
- Kwak, C.G., Kim, J.E., Choi, D.Y., Jeong, H.S., Shin, S.W., Joo, M.S., Ha, K.T. Hepatoprotective effect of bark of *Phellodendron amurense* RUPR. on liver damage induced by carbon tetrachloride. *Kor J Oriental Physiol & Pathol* 25(4):620-627, 2011.
- 맹정균. 防風通聖散 (방풍통성산)이 CCl₄ 中毒白鼠의 血液像에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 1985.
- Hong, C., Ueno, K., Yofu, S., Takahashi, T., Sakamoto, Y., Iikura Y. Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41) on liver damage of mice induced by food allergy. *J Showa Med Assoc* 61(6):645-650, 2001.

30. Kim, Y.K., Cho, S.I. The effects of Sagunja-tang on liver injury of mice induced by CCl₄. 대한한의학방제학회지 9(1):375-385, 2001.
31. Kim, Y.C., Lee, J.H., Woo, H.J. Effect of Samul-tang (Siwu-tang) on procollagen synthesis in cultured murine hepatic non-parenchymal cells. Kor J Oriental Med, 24(4):120-126, 2003.
32. Araki, N., Noda, T., Ogawa, K. Cytochemical studies on the effect of intraperitoneal and oral administration of a traditional Chinese medicine (Sho-saiko-to) on the D-galactosamine-induced hepatic injury of rats. Acta histochemica et cytochemica 21(5):439-453, 1988.
33. Taira, Z., Yabe, K., Hamaguchi, Y., Hirayama, K., Kishimoto, M., Ishida, S., Ueda, Y. Effects of Sho-saiko-to extract and its components, baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. Food & Chem Toxicol 42(5):803-807, 2004.
34. Cho, T.Y., Shim, C.K., Lee, M.H., Kim, S.K. Effects of blended Chinese traditional medicine, Ssang Wha Tang, on hepatic clearance of sulfobromophthalein in Rats. J Kor Pharm Sci 17(2):89-93, 1987.
35. Shin, H.M., Kim, G.W., Kim, H.H., Shin, U.S. Effect of pretreatment with the Oryungsan on the hepatic superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in CCl₄-treated rats. 동의생리학회지 11(1):171-180, 1996.
36. 이준희, 강윤호. 오령산이 Galactosamine 유도 간독성 흰쥐의 antioxidant enzyme 활성과 lipid peroxidation에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 18(1):218-230, 1997.
37. 沈載然, 金秉雲. 人蔘敗毒散과 加味人蔘敗毒散이 鎮痛, 解熱 및 白鼠損傷肝에 미치는 影響. 慶熙漢醫大論文集 7:323-334, 1984.
38. Park, S.H., Kim, J.S., Ryu, B.H., Park, D.W., Ryu, K.W. A study on the effects of Pyungwee-san and compounding of medicine in Pyungwee-san on the movement of gastrointestinal smooth muscles, anticatharsis and central nervous system. J Oriental Chronic Diseases 6(1):184-196, 2000.
39. Yoshiji, O., Mutsumi, K.N., Takahiro, H., Teruaki, K. Effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract on disruption of hepatic antioxidant defense systems in rats treated with D-galactosamine. J Ethnopharmacol 94:323-329, 2004.
40. Kim, H.M., Liu, K.H. Screening for inhibitory effect on nine CYP isoforms by 20 herbal medications. J Life Sci 17:334-339, 2007.
41. 大西憲明. 藥物代謝酵素シトクロムP450活性に及ぼす韓方方劑の影響-小青龍湯を中心にして-. 日本東洋醫學雜誌 52(4-5):451-456, 2002.
42. 김한석. 십전대보탕액을 투여하여 가토간손상의 회복에 관한 실험적 연구. 대한한방내과학회지 1(1):78-84, 1976.
43. Jemnitz, K., Veres, Z., Torok, G., Toth, E., Vereczkey, L. Comparative study in the Ames test of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene metabolic activation using rat hepatic S9 and hepatocytes following *in vivo* or *in vitro* induction. Mutagenesis 19(3):245-250, 2004.