

원 저

平肝開鬱止血湯이 毒性藥物에 의한 肝組織 損傷에 미치는 影響

오세광, 김원일, 김우환

동의대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effect of *Pyunggangaeuljihyul-tang* (*Pinggankaiyuzhixue-tang*) on Toxic Agent Induced Liver Cell Damage

Se-Kwang Oh, Won-Il Kim, Woo-Hwan, Kim

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Donggeui University

Objective : This study was undertaken to determine if *Pyunggangaeuljihyul-tang* (*Pinggankaiyuzhixue-tang*, PG) has a protective effect against cell injury induced by various toxic agents in rabbit liver.

Methods : Cell injury *in vitro* was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH), and that *in vivo* was estimated by measuring alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity in serum. Lipid peroxidation was examined by measuring malondialdehyde, a product of lipid peroxidation.

Results : PG prevented the LDH release by CCl₄, mercury, menadione, and tert-butyl hydroperoxide treatment *in vitro* in liver slices. The extent of protection by 2% PG was similar to that of 10 μ M N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine, a potent antioxidant, in tert-butyl hydroperoxide-induced LDH release. PG also prevented lipid peroxidation and depletion of cellular ATP induced by Hg. Hg causes morphological changes including cell necrosis and its effect was significantly prevented by PG. When rats were treated intraperitoneally with 0.5 ml/kg of CCl₄, serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities were increased compared with the control, which was significantly inhibited by pretreatment of PG. PG also prevented reduction in GSH and lipid peroxidation induced by CCl₄.

Conclusion : These results suggest that PG exerts a protective effect against various toxic agents by its antioxidant action in liver tissues. Thus, PG may be used in prevention and treatment of drug-induced liver cell injury. However, the precise mechanisms of PG protection remain to be determined. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(3):96-107)

Key Words: *Pyunggangaeuljihyul-tang* (*Pinggankaiyuzhixue-tang*), liver cell, toxic agents, antioxidant

서 론

平肝開鬱止血湯은 傳¹⁾에 의하여 立方된 처방으로서, “婦人有懷抱甚鬱 口乾 舌渴 嘔吐 吞酸而 血下崩者”에 사용되었으며, 疎肝解鬱·涼血止血의 효능이 있어 肝氣의 울결로 인한 병증에 응용하고 있다²⁾.

본 처방은 부인과질환에 주로 응용되어 왔지만, 근래 간세포손상에 대한 항산화 작용 등 肝에 대한 연

· 접수 : 2003년 4월 30일 · 논문심사 : 2003년 5월 3일
· 채택 : 2003년 6월 28일
· 교신저자 : 김원일, 울산광역시 남구 신정동 479-13 동의대학교 울산한방병원 3내과 김 원일
(Tel: 052-226-8103, Fax: 052-256-0665 E-mail: omdstar@dongeui.ac.kr)

구^{3,5)}가 진행되어 왔다.

우리 몸의 세포속에는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화제 활동을 하는 물질을 가지고 있어 세포의 정상적인 대사과정 중에 발생하는 반응성 소기들은 이들 효소나 물질들에 의해 제거되고 있다. 그러나 그 발생하는 양이 많거나 항산화제 역할을 하는 이들의 체내농도가 감소하게 되면 세포는 손상을 받아서 여러 가지 질병을 유발시키는 원인이 된다^{6,7)}.

따라서 본 연구에서는 平肝開鬱止血湯의 肝損傷에 대한 방지 효능을 확인하기 위해서 시험관내 및 생체실험을 실시하였는데, 시험관내실험에서는 사염화탄소, menadione, tert-butyl hydroperoxide(tBHP), 수은 등의 여러 가지 독성약물에 의해 유발된 간세포손상을 어떤 기전으로 보호하는지를 조사하였으며, 생체실험에서는 사염화탄소를 이용하여 간세포손상을 유발한 후 혈청 중 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST)를 측정하고 간조직내의 환원성 glutathione(GSH) 및 산화성 glutathione(GSSG)의 함량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 동물 및 약제

1) 동물

실험동물은 시험관내실험용으로 체중 1.5~2.0 kg 되는 Newzealand-White종 토끼를, 생체실험용으로는

체중 200~300g 되는 Sprague-Dawley계 흰쥐를 암수 구별없이 전문사육실(라이프 사이언스, 대구)에서 구입하여 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용된 약제는 시중에서 구입하여 정선된 것을 사용하였고, 처방은 傳靑主女科⁸⁾에 기재된 것으로 하였으며, 1첩에 해당하는 각 약물 분량은 Table 1과 같다.

2. 방법

1) 平肝開鬱止血湯의 제조

平肝開鬱止血湯의 2첩 분량을 증류수 2,000ml 속에 넣고 4시간 동안 가열 추출한 후 여과하고 rotary evaporator로 감압농축하여 약 100ml가 되게 하여 이를 원액으로 사용하였다.

2) 생체 실험

실험동물을 정상군·대조군·실험군의 세 군으로 나누어 정상군은 아무런 처리를 하지 않았으며, 대조군은 사염화탄소만을 처리하였고, 실험군은 사염화탄소를 처리하기 24시간 전과 사염화탄소를 처리한 당일 平肝開鬱止血湯을 각각 1회 2.5ml/kg씩 2회 복강내로 투여한 군이다. 사염화탄소는 0.5ml/kg을 콩기름에 녹여 복강내로 투여하였다. 약물처리 24시간 후 혈청 내 ALT와 AST의 활성을 측정하여 간기능의 변화를 조사하였다.

3) 肝組織 절편의 제작

실험용 토끼를 희생시킨 후 간장을 들어내어 100mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 40mM Tris-HCl(pH, 7.5)로 된 냉한 용액을 간동맥 내에 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3~0.5mm 두께의 간조직 절편을 만들어 사용하였다.

4) 肝組織에 대한 독성약물의 처리

조직절편 약 50mg을 4ml의 incubation 용액이 들어 있는 비커 속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker 내에 서 100% 산소를 계속 공급하면서 37℃에서 incubation하였다. 기본 incubation 용액의 조성은 130mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 5mM glucose,

Table 1. Prescription of Pyunggangaeuljhyul-tang (PG).

韓藥名	生藥名	重量(g)
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	37.5
白朮	<i>Atractylodis Macrocephale Rhizoma</i>	37.5
當歸	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	37.5
牡丹皮	<i>Mountan Cortex Radicis</i>	11.25
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	11.25
三七根	<i>Pseudoginseng Radix</i>	11.25
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	7.5
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	7.5
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	3.75
total amounts		165.0

10mM Tris-HCl(pH 7.5)로 되어 있으며, 독성약물을 처리할 때는 이들 약물이 들어 있는 용액 내에서 60분 동안 incubation하였다. Incubation후에 조직을 들어내어 세포의 손상정도를 조사하기 위하여 lactate dehydrogenase(LDH)나 ALT의 유출을 측정하였으며, 또한 세포손상이 지질의 과산화와 연관이 있는지는 그 생성물인 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하여 평가하였다. 본 실험에서 平肝開鬱止血湯의 효과를 조사할 때는 용액 내에 적당한 농도로 녹여 사용하였다.

5) LDH 유출 측정

약물로 처리된 간조직 절편을 들어내어 증류수를 넣고, 마쇄시켜 만든 조직액과 incubation 용액을 각각 50 μ 취하여 LDH 활성을 LDH 측정kit(Sigma Chemical, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

6) 지질의 과산화 측정

간조직의 지질의 과산화는 그 산물인 MDA를 측정하여 평가하였다. 간조직 내 MDA 함량은 Uchiyama와 Mihara의 方法⁸⁾으로 측정하였는데, 간단히 설명하면 H₂O₂나 Hg로 처리된 간조직 절편을 차가운 1.15% KCl 용액(5% wt/vol) 속에서 파쇄하였다. 이 조직파쇄 균질액 0.5ml에 1% 인산용액 3ml과 0.6% thiobarbituric acid 용액 1ml을 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536와 520nm에서 측정하였다. MDA 값은 단백질 1mg 당 pmoles로 표시하였다. 단백질 농도는 Bradford⁹⁾의 방법으로 측정하였다.

7) GSH의 함량 측정

GSH 함량은 Anderson의 방법¹⁰⁾으로 측정하였다. 0.248mg/ml NADPH(143mM sodium phosphate, 6.3mM Na₄-EDTA, pH 7.5를 함유하고 있는) 용액 700 μ l, 6mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB) 용액 100 μ l와 증류수 198 μ l를 cuvette에 넣어 30 $^{\circ}$ C에서 15분간 데운 후 시료 2 μ l를 넣고 섞은 다음, 266U/ml GSSG reductase 10 μ l를 첨가하여 412nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였고 단위는 μ g/mg protein으로 나타내었다.

8) 조직 내 ATP 함량 측정

조직 내 ATP 함량은 luciferin/luciferase bioluminescence assay로 측정하였는데, 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 토끼의 간조직 절편 40~50 mg 정도에 0.1M perchloric acid와 0.1% Triton X-100 2ml를 넣고 homogenizer(Con Torgue NO. 7265)로 균등질을 만들었다. 이들 균등질을 5분 동안 얼음 속에 보관한 후, 3,000r.p.m.에서 10분 동안 원심분리하고 상층액 10 μ l를 증류수 1ml와 잘 혼합한 후, 증류수 10배 내지 100배 희석을 실시하였다. ATP 함량은 희석한 시료 5 μ l에 20mg/ml의 luciferin/ luciferase를 45 μ l 첨가하여 luminometer(EG & Berthold, Germany)를 사용하여 측정하였다.

9) 형태학적 연구

간조직 절편을 정상 용액, 0.5mM 수은이 함유된 용액, 수은이 함유된 용액에 2% 平肝開鬱止血湯이 들어 있는 용액 내에서 60분간 incubation한 후 간조직을 들어내어 1mm로 잘라 1/2 Karnovsky 고정액에 고정하였으며, 통상적인 전자현미경 조직표본 제작 과정을 거쳐 조직을 epon에 embedding하였다. Ultramicrotome으로 1 μ m 두께의 조직을 잘라서 toluidine blue 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

10) 통계처리

성적은 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검정하였고, p 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

실험 결과

1. 시험관내 실험

1) 간조직 절편에서 LDH 유출에 대한 사염화탄소 및 平肝開鬱止血湯의 영향

사염화탄소가 간세포의 손상을 유발하는지를 시험관내 실험을 통해 확인하기 위해 여러 농도의 平肝開鬱止血湯이 들어 있는 용액 내에서 1mM의 CCl₄를 간조직 절편에 처리하고 LDH 유출 정도를 조사하였다. 조직 절편을 1mM CCl₄에 노출시켰을 때 LDH 유출은 6.97 \pm 0.69%에서 26.57 \pm 3.36%로 약

3.8배 증가함으로써 CCl₄가 시험관 내에서도 간조직 손상을 일으키고 있음을 알 수가 있다(Fig. 1).

사염화탄소를 처리한 용액 내에 平肝開鬱止血湯을 0.05~2% 농도로 첨가하였을 때 平肝開鬱止血湯의 농도에 비례하여 사염화탄소에 의한 LDH 유출이 감소하여 平肝開鬱止血湯의 농도가 0.5%보다 높은 농도일 때 감소 현상은 통계적 유의성을 보였고, 2%일 때는 그 값이 5.15±0.43%로 정상 수준까지 감소하였다. 사염화탄소를 처리하지 않은 정상 조직에서도 平肝開鬱止血湯을 2% 농도로 처리하였을 때 LDH 유출이 平肝開鬱止血湯을 처리하지 않았을 때와 비교하여 유의한 감소를 보였다.

2) GSH 함량에 대한 平肝開鬱止血湯의 영향

平肝開鬱止血湯이 들어있는 용액과 들어있지 않은 용액 내에서 사염화탄소를 처리하여 조직 내 GSH 함량을 측정된 결과 사염화탄소는 LDH 유출을 현저히 증가시키는 1mM 농도에서 GSH 함량을 45.72±4.43μmole/g protein에서 9.03±1.82μmole/g protein으로 감소하였다. 그러나 사염화탄소를 처리하는 용액 내 平肝開鬱止血湯을 첨가한 경우에는 LDH 유출이 감소하는 것과 일치하여 GSH 함량도 18.11±2.29μmole/g protein으로 유의한 증가 현상을 보였다(Fig. 2).

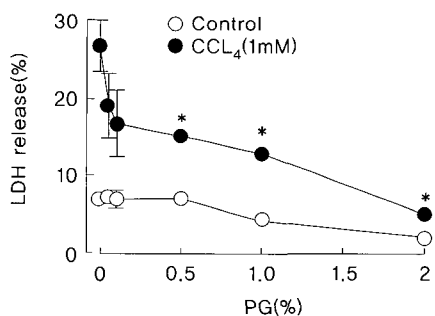


Fig. 1. Dose-dependency of protective effect of Pyung-gangaeuljihyul -tang(Pinggankaiyuzhixue-tang, PG) on CCl₄-induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with various concentrations of PG in the presence or absence of 1mM CCl₄ for 60min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean±SE of five experiments. *p<0.05 compared with no PG.

3) Menadione에 의한 세포손상에 대한 平肝開鬱止血湯의 영향

간조직에 1 mM menadione을 처리했을 때 LDH 유출이 5.19±0.59%에서 22.19±1.38%로 현저하게 증가하였으며, 여기에 平肝開鬱止血湯을 0.1%에서 5%까지 변화시켜 첨가한 결과 LDH 유출은 0.5% 농도에서 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

4) Oxidant에 의한 세포 손상에 대한 平肝開鬱止血湯의 영향

平肝開鬱止血湯이 oxidant에 의한 세포손상을 직접 방지할 수 있는지를 확인하기 위하여 2% 平肝開鬱止血湯이 들어있는 용액과 들어있지 않은 용액 내에서 간조직을 1mM tBHP에 노출시켜 관찰하였다. 平肝開鬱止血湯이 없는 정상용액 내에서는 1mM tBHP에 의해 LDH 유출이 5.21±0.57%에서 22.49±1.41%로 증가하였다. 그러나 平肝開鬱止血湯을 첨가한 경우에는 LDH 유출이 6.39±1.59%로 거의 정상 수준까지 감소하였다. 平肝開鬱止血湯과 항산화제인 N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine(DPPD)의 효과를 비교하기 위하여 平肝開鬱止血湯 대신 DPPD를 10μM 첨가하여 관찰한 결과 tBHP에 의한 LDH 유출이 4.93±1.09%까지 감소하였다. 이러한 실험결과

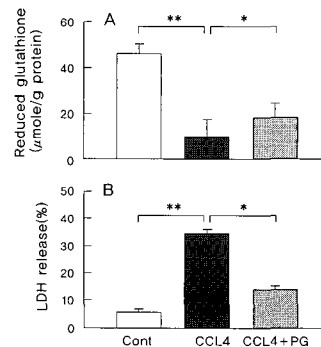


Fig. 2. Effect of PG on CCl₄-induced alterations in reduced glutathione and LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with 1mM CCl₄ in the presence or absence of 2% PG for 60min at 37°C, and glutathione and LDH release were measured. Data are mean±SE of five experiments. *p<0.05, **p<0.01. Cont, control.

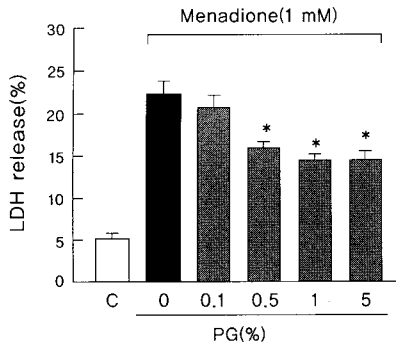


Fig. 3. Dose-dependency of protective effect of PG on menadione-induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with various concentrations of PG in the presence or absence of 1mM menadione for 60min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five experiments. **p*<0.05 compared with no PG. C, control.

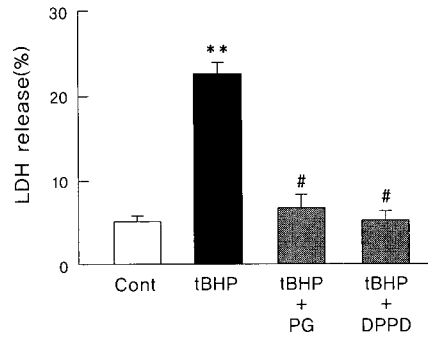


Fig. 4. Effect of PG and DPPD as a positive control on 1mM tBHP induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with 1mM tBHP in the presence or absence of 2% PG or 10µM DPPD for 60min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five experiments. ***p*<0.01 compared with control(Cont); #*p*<0.05 compared with tBHP alone.

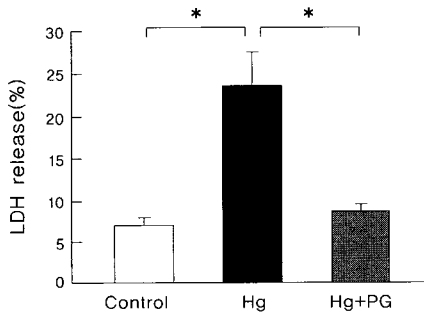


Fig. 5. Effect of PG on Hg-induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.5mM HgCl₂ in the presence or absence of 2% PG for 60min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five experiments. **p*<0.05.

2% 平肝開鬱止血湯이 10µM의 DPPD와 유사한 항산화 효력을 가지고 있음을 나타낸다(Fig. 4).

5) 수은에 의한 세포손상에 대한 平肝開鬱止血湯의 영향

수은이 간조직에서 지질의 과산화를 증가시켜 세포 손상을 일으키는지와, 수은에 의한 손상을 平肝開鬱止血湯이 방지효과를 나타내는지 조사하였다. 간조직에 0.5mM 수은을 처리했을 때 LDH 유출이 6.97±0.88%에서 23.25±4.04%로 증가하였고, 여기에 2% 平肝開鬱止血湯을 첨가하였을 때는 8.52±

1.03%로 감소하였다(Fig. 5).

수은이 간조직 손상을 일으키는 농도에서 지질의 과산화를 일으키는지를 조사한 결과, 0.5mM 수은을 처리했을 때 지질의 과산화가 98.60±12.05pmole MDA/mg protein에서 191.36±11.47pmole MDA/mg protein로 증가하였고, 2% 平肝開鬱止血湯을 첨가하였을 때 96.43±10.85pmole MDA/mg protein로 정상 수준까지 감소하였다(Fig. 6).

6) ATP 함량에 대한 平肝開鬱止血湯의 영향

平肝開鬱止血湯이 수은에 의한 세포 내 ATP 함량 변화에 영향을 미치는지를 조사하였다. 간조직에 0.5mM 수은을 처리한 결과 조직 내 ATP함량이 25.12±1.87nmole/g protein에서 10.72±1.06nmole/g protein으로 감소하였다. 그러나 용액 내 平肝開鬱止血湯을 2% 되도록 첨가하였을 때는 ATP 함량이 20.45±1.58nmole/g protein으로 회복되었다 (Fig. 7).

7) 형태학적인 변화에 대한 平肝開鬱止血湯의 효과
平肝開鬱止血湯이 수은에 의한 간조직 손상에 미치는 효과를 형태학적으로 조사하였다(Fig. 8). 간조직 절편을 정상 용액 내에서 60분간 incubation하였을 때 다각형의 간세포 속에는 무형질의 세포질에 과립상의 물질이 고루 분산되어 있고, 둥근 핵을 가

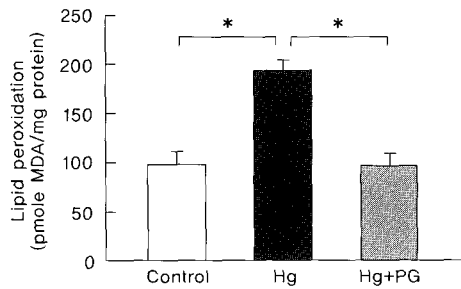


Fig. 6. Effect of PG on Hg-induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.5mM HgCl₂ in the presence or absence of 2% PG for 60min at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of five experiments. **p*<0.05.

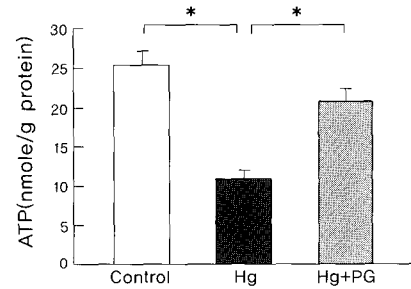


Fig. 7. Effect of PG on Hg-induced alterations in ATP content in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.5mM HgCl₂ in the presence or absence of 2% PG for 60min at 37°C and ATP content was measured. Data are mean ± SE of five experiments. **p*<0.05.

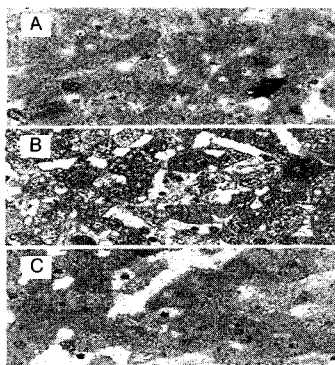


Fig. 8. Light photomicrographs of effect of PG on Hg-induced morphological changes in rabbit liver tissues. The tissues were incubated for 60min at 37°C in various media and fixed with 1/2 Kamovsky solution. Samples were processed for embedding in Epon. Sections (1µm) were prepared using ultramicrotome and stained with toluidine blue. A, control; B, 0.5mM Hg; C, 0.5mM Hg plus 2% PG. Magnitude ×40.

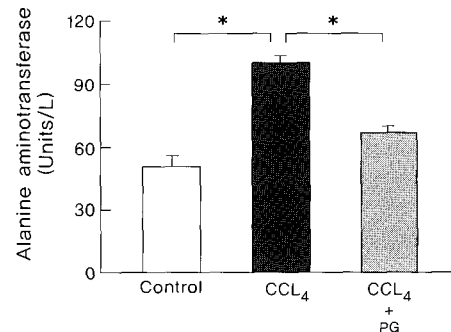


Fig. 9. Effect of PG on serum ALT activity in rats treated with CCl₄. Rats were pretreated with 2.5ml of PG for 24hr before and 24hr after injection of 0.5ml/kg CCl₄. Data are mean ± SE of five experiments. **p*<0.05.

지고 있는 정상 간세포 소견을 보였다(Fig. 8A). 간조직 절편을 0.5mM 수은이 들어 있는 용액 내에 노출시켰을 때 간세포들은 세포질이 없는 밝은 빈 공간이 많이 나타났고, 대부분의 핵은 정상군에 비해 커져 있고 핵질이 변성되어 밝게 나타남으로써 세포괴사 현상을 보였다(Fig. 8B). 그러나 수은을 처리하기 전에 2% 平肝開鬱止血湯을 처리하였을 때는 세포 속에 세포질이 짙게 차있고 세포의 형태나 세포 내 소기관들이 정상적인 세포와 유사한 모양을 보임으로

써 수은에 의한 형태학적인 변화가 平肝開鬱止血湯에 의해 방지되고 있음을 알 수가 있다(Fig. 8C).

2. 생체 실험

1) 혈청 내 ALT 및 AST 활성의 변화

대조군에서의 ALT 활성은 정상군의 55.88 ± 6.72Units/L에서 101.13 ± 4.17Units/L로 약 2배 정도 증가함으로써 사염화탄소 주입에 의해 간기능의 장애가 유발되었음을 보였다. 이러한 혈청 ALT 활성의 증가는 平肝開鬱止血湯을 注入한 경우 87.34 ± 3.39Units/L로 유의한 감소 현상을 보임으로써 사염화탄소 주입에 의한 간기능 장애를 平肝開鬱止血湯

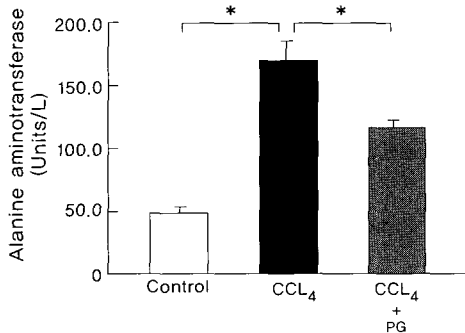


Fig. 10. Effect of PG on serum AST activity in rats treated with CCl₄. Rats were pretreated with 2.5 ml of PG for 24hr before and 24hr after injection of 0.5 ml/kg CCl₄. Data are mean ± SE of five experiments. *p < 0.05.

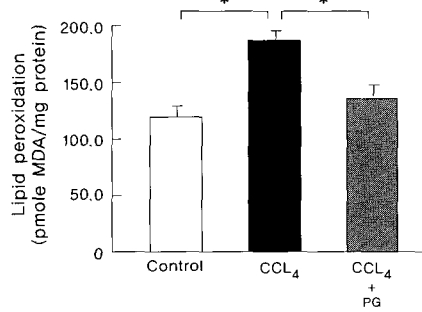


Fig. 11. Effect of PG on lipid peroxidation of liver tissues in rats treated with CCl₄. Rats were pretreated with 2.5 ml of PG for 24hr before and 24hr after injection of 0.5 ml/kg CCl₄. Data are mean ± SE of five experiments. *p < 0.05.

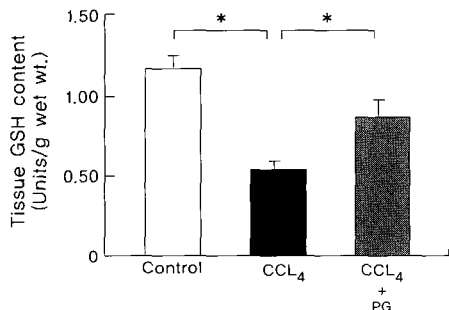


Fig. 12. Effect of PG on reduced glutathione(GSH) content of liver tissues in rats treated with CCl₄. Rats were pretreated with 2.5 ml of PG for 24hr before and 24hr after injection of 0.5 ml/kg CCl₄. Data are mean ± SE of five experiments. *p < 0.05.

肝開鬱止血湯의 영향

사염화탄소를 생체 내에 처리하여 간손상이 유발 되었을 때 그 손상이 반응성 산소기에 의해 초래되었는지를 확인하기 위하여 간조직 지질의 과산화 정도를 측정하였다(Fig. 11). 여기에 나타난 바와 같이 사염화탄소를 처리한 대조군에서 지질의 과산화는 정상군 조직에서의 118.21 ± 11.36 pmole MDA/mg protein에 비해 186.33 ± 8.24 pmole MDA/mg protein로 증가하였다. 그러나 사염화탄소를 처리하기 전에 平肝開鬱止血湯을 주입한 경우에는 지질의 과산화가 122.91 ± 12.29 pmole MDA/mg protein로 억제되었다.

3) Glutathione 함량에 대한 사염화탄소 및 平肝開鬱止血湯의 영향

본 실험에서 사염화탄소를 처리했을 때 GSH 및 GSSG 함량의 변화를 조사한 결과 GSH 함량은 1.17 ± 0.08 μmole/g wet wt.에서 0.54 ± 0.05 μmole/g wet wt.로 감소하였고, GSSG의 함량은 0.26 ± 0.04 μmole/g wet wt.에서 0.87 ± 0.05 μmole/g wet wt.로 증가하였다. 그러나 사염화탄소를 처리하기 전에 平肝開鬱止血湯을 주입한 경우에는 GSH 함량은 0.87 ± 0.11 μmole/g wet wt.로 증가하였고, GSSG 함량은 0.65 ± 0.05 μmole/g wet wt.로 감소하였다(Fig. 12, 13).

이 방지하는 효과가 있음을 알 수 있다(Fig. 9).

간기능 손상정도를 평가하는 지표인 혈청 AST 활성에 대한 영향을 조사하였다(Fig. 10). 여기에 나타난 바와 같이 ALT 활성의 변화에서와 유사하게 사염화탄소를 주입한 경우 AST 활성은 정상군의 47.03 ± 5.45 Units/L에 비해 대조군에서 169.27 ± 15.29 Units/L로 증가하였고, 사염화탄소를 처리하기 전에 平肝開鬱止血湯을 주입한 실험군에서는 AST 활성이 135.42 ± 5.58 Units/L로 유의한 감소 현상을 보였다.

2) 간조직의 지질 과산화에 대한 사염화탄소 및 平

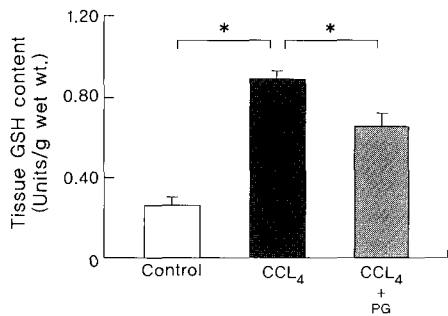


Fig. 13. Effect of PG on oxidized glutathione(GSSG) content of liver tissues in rats treated with CCl₄. Rats were pretreated with 2.5 ml of PG for 24hr before and 24hr after injection of 0.5 ml/kg CCl₄. Data are mean ± SE of five experiments. *p < 0.05.

고찰

平肝開鬱止血湯은 傳¹⁾에 의해 처음 立方된 처방으로서, 白朮 · 白芍藥 · 當歸 · 牡丹皮 · 生地黃 · 三七根 · 荊芥 · 甘草 및 柴胡로 구성되어 있다¹⁾.

본 처방의 구성을 분석해 보면 보혈제인 當歸에 白芍藥을 配伍하여 養血 · 柔肝 · 止痛하는 작용이 있고, 行氣劑인 柴胡에 白芍藥을 配伍하면 肝氣와 肝血이 조화되는 작용을 하여 肝氣鬱結로 인한 頭暈目眩 · 胸脇疼痛 · 月經不調를 치료한다. 柴胡와 甘草의 배합에서는 甘草의 緩急調和의 작용과 해독의 작용이 상합하여 舒肝解毒하며 지통작용을 한다. 淸熱涼血劑인 生地黃은 滋陰養血하고 白芍藥과 配伍하여 養血하면서 陰을 수렴하므로 血虛 · 血熱의 崩漏 · 月經不調?吐血 등을 치료하고, 活血祛瘀劑인 牡丹皮와 지혈제인 三七根은 서로 相乘하여 각종 출혈성 질환에 응용¹²⁾될 수 있으나 본 처방을 간손상에 응용한 경우는 거의 없었다.

근래 平肝開鬱止血湯을 사용한 연구로는 金³⁾, 許⁴⁾, 金⁵⁾ 등의 실험에서 平肝開鬱止血湯이 간조직에서 반응성 산소기에 의한 세포 손상을 방지하는 효과를 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 平肝開鬱止血湯이 반응성 산소기를 발생시켜 세포 독성을 나타내는 것으로 보고¹³⁻¹⁶⁾되고 있는 몇 가지 독성 약물들에 의

한 간조직 손상에 平肝開鬱止血湯이 어떤 효과를 나타내는지 조사하고자 하였다.

반응성 산소기는 간조직에서 허혈/재관류에 의한 세포 손상, 그리고 사염화탄소, menadione, 수은, 알콜, paraquat 등 여러종류의 독성물질에 의한 간세포 손상의 병인으로 인정되고 있기 때문에^{13-15, 17-19)} 반응성 산소기를 제거하거나 발생을 억제하는 약물이 개발된다면 여러 가지 형태의 간조직 손상을 방지하거나 예방할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 반응성 산소기를 발생시켜 간조직 손상을 유발하는 것으로 알려진 몇 가지 독성약물들에 의한 간조직 손상을 平肝開鬱止血湯이 방지할 수 있는지를 조사하고자 하였다.

본 실험에 사용된 사염화탄소는 체내에서 대사된 생성물이 간에 독성을 나타내는데^{18,20,21)}, 이러한 간기능 장애에 관여하는 반응성 산소기는 여러 가지 병적상태에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌기 때문에 실험적으로 간독성을 유발하는 약물로 많이 이용하고 있다^{22,23)}.

사염화탄소가 간세포의 손상을 유발하는지를 시험관내 실험을 통해 확인하기 위해 LDH 유출 정도를 조사한 결과, 조직 절편을 1mM 사염화탄소에 노출시켰을 때 LDH 유출은 6.97 ± 0.69%에서 26.57 ± 3.36%로 약 3.8배 증가함으로써 사염화탄소가 시험관 내에서도 간조직 손상을 일으켰으며(Fig. 1), 사염화탄소를 처리한 용액 내에 平肝開鬱止血湯의 농도에 비례하여 사염화탄소에 의한 LDH 유출이 감소하였다. 平肝開鬱止血湯의 농도가 0.5%보다 높은 농도일 때 감소 현상은 통계적 유의성을 보였고, 2% 일 때는 그 값이 5.15 ± 0.43%로 정상 수준까지 감소하였으며, 사염화탄소를 처리하지 않은 정상 조직에서도 平肝開鬱止血湯을 2% 농도로 처리하였을 때 LDH 유출이 平肝開鬱止血湯을 처리하지 않았을 때와 비교하여 유의한 감소를 보였다. 따라서 平肝開鬱止血湯은 사염화탄소 처리에 의한 LDH의 증가를 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

그리고 간세포 손상에 따른 세포 내 GSH의 함량

에 미치는 平肝開鬱止血湯의 효과를 확인하기 위하여 平肝開鬱止血湯이 들어 있는 용액과, 들어있지 않는 용액 내에 사염화탄소를 처리하여 조직 내 GSH 함량을 측정된 결과, 平肝開鬱止血湯을 넣지 않은 군에서는 사염화탄소가 LDH 유출을 현저히 증가시키는 1mM 농도에서의 GSH 함량은 $45.72 \pm 4.43 \mu\text{mole/g protein}$ 에서 $9.03 \pm 1.82 \mu\text{mole/g protein}$ 으로 감소하였다. 그러나 사염화탄소를 처리하는 용액 내 平肝開鬱止血湯을 첨가한 경우에는 LDH 유출이 감소하는 것과 일치하여 GSH 함량도 $18.11 \pm 2.29 \mu\text{mole/g protein}$ 으로 유의한 증가 현상을 보였다(Fig. 2). GSH는 여러 독성물질에 의한 세포 손상을 방지하는 해독 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포 내에서 항산화제 역할을 하고 있기 때문에 어떤 약물이 세포 내 GSH의 농도를 증가시키게 되면 여러 독성물질에 대한 방어 능력이 증가됨은 잘 알려져 있다^{24,25}. 그러나 본 실험에서 平肝開鬱止血湯이 사염화탄소에 의한 세포 내 GSH의 감소현상을 방지한 결과가 반응성 산소기를 제거하는 작용에 기인하였는지, 직접 세포 내 GSH의 생성을 증가시켰는지는 알 수가 없다.

Menadione은 간세포에서 반응성 산소기를 발생시켜 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다^{14,15}. 따라서 平肝開鬱止血湯이 항산화작용에 의해 세포손상을 방지한다면 menadione에 의한 LDH 유출을 감소시킬 수 있을 것이다. 간조직에 1mM menadione을 처리했을 때 LDH 유출은 $5.19 \pm 0.59\%$ 에서 $22.19 \pm 1.38\%$ 로 현저하게 증가하였으며, 여기에 平肝開鬱止血湯을 0.1%에서 5%까지 변화시켜 첨가한 결과 LDH 유출은 0.5% 농도에서 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

平肝開鬱止血湯이 oxidant에 의한 세포 손상을 직접 방지할 수 있는지를 확인하기 위하여 2% 平肝開鬱止血湯이 들어 있는 용액과 들어 있지 않는 용액 내에서 간조직을 1mM tBHP에 노출시켜 관찰하였다. 平肝開鬱止血湯이 들어있지 않은 정상 용액 내에서는 1mM tBHP에 의해 LDH 유출이 $5.21 \pm 0.57\%$ 에서 $22.49 \pm 1.41\%$ 로 증가하였다. 그러나 平肝開鬱止血湯을 첨가한 경우에는 LDH 유출이 $6.39 \pm 1.59\%$ 로

거의 정상 수준까지 감소하였다. 平肝開鬱止血湯의 효과를 항산화제인 N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine(DPPD)의 효과와 비교하기 위하여 平肝開鬱止血湯 대신 DPPD를 $10 \mu\text{M}$ 첨가하여 관찰한 결과 tBHP에 의한 LDH 유출이 $4.93 \pm 1.09\%$ 까지 감소하였다. 이러한 실험결과는 2% 平肝開鬱止血湯이 $10 \mu\text{M}$ 의 DPPD와 유사한 항산화 효과를 가지고 있음을 나타낸다(Fig. 4).

사염화탄소와 마찬가지로 반응성 산소기를 발생시켜 세포독성을 나타내는 것으로 알려진 수은^{17,26}을 이용하여 平肝開鬱止血湯의 방지 효과를 조사하였는데, 간조직에 0.5mM 수은을 처리했을 때의 LDH 유출이 $6.97 \pm 0.88\%$ 에서 $23.25 \pm 4.04\%$ 로 증가하였고, 여기에 2% 平肝開鬱止血湯을 첨가하였을 때는 $8.52 \pm 1.03\%$ 로 감소하였으며(Fig. 5), 수은이 간조직 손상을 일으키는 농도에서 지질의 과산화를 일으키는지를 조사한 결과, 0.5mM 수은을 처리했을 때 지질의 과산화가 $98.60 \pm 12.05 \text{pmole MDA/mg protein}$ 에서 $191.36 \pm 11.47 \text{pmole MDA/mg protein}$ 로 증가하였고, 2% 平肝開鬱止血湯을 첨가하였을 때 $96.43 \pm 10.85 \text{pmole MDA/mg protein}$ 로 정상 수준까지 감소하였다(Fig. 6).

미토콘드리아는 독성물질들에 의해 쉽게 손상을 받기 때문에 이로 인해 나타나는 전형적인 특징 중의 하나는 세포 내 ATP 고갈임이 잘 알려져 있으며²⁸, 특히 수은은 미토콘드리아막을 탈분극시킴으로써 ATP를 고갈시키는 것으로 보고되고 있다²⁹.

따라서 平肝開鬱止血湯이 수은에 의한 세포 내 ATP 함량 변화에 영향을 미치는지를 조사하기 위해 간조직에 0.5mM 수은을 처리한 결과 조직 내 ATP 함량이 $25.12 \pm 1.87 \text{nmole/g protein}$ 에서 $10.72 \pm 1.06 \text{nmole/g protein}$ 으로 감소하였으며, 용액 내 平肝開鬱止血湯을 2% 되도록 첨가하였을 때는 ATP 함량이 $20.45 \pm 1.58 \text{nmole/g protein}$ 으로 회복되었다(Fig. 7).

平肝開鬱止血湯이 수은에 의한 간조직 손상에 미치는 효과를 형태학적으로 조사한 결과(Fig. 8), 간조직 절편을 정상 용액 내에 60분간 incubation하였을 때 다각형의 간세포 속에는 무형질의 세포질에 과립

상의 물질이 고루 분산되어 있고, 둥근 핵을 가지고 있는 정상 간세포 소견을 보였으며(Fig. 8A), 간조직 절편을 0.5mM 수은이 들어 있는 용액 내에 노출시켰을 때 간세포들은 세포질이 없는 밝은 빈 공간이 많이 나타났고, 대부분의 핵은 정상군에 비해 커져 있고 핵질이 변성되어 밝게 나타남으로써 세포괴사 현상을 보였다(Fig. 8B). 그러나 수은을 처리하기 전에 2% 平肝開鬱止血湯을 처리하였을 때는 세포 속에 세포질이 차있고 세포의 형태나 세포 내 소기관들이 정상적인 세포와 유사한 모양을 보임으로써 수은에 의한 형태학적인 변화가 平肝開鬱止血湯에 의해 방지되었으므로(Fig. 8C), 平肝開鬱止血湯은 간세포에서 기능 장애 뿐만 아니라 형태학적인 변화도 유의하게 방지하였음을 알 수 있다.

시험관내 실험을 통해 平肝開鬱止血湯이 여러 가지 독성약물에 의한 간조직 손상을 방지하고 있음을 보였는데, 이러한 결과가 생체실험에서도 나타날 수 있는지를 확인하기 위하여 실험 동물에 사염화탄소를 처리하여 간기능 장애를 유발시킨 후 平肝開鬱止血湯이 이를 방지할 수 있는지를 조사하였다. 사염화탄소는 0.5ml/kg을 공기름에 녹여 복강내로 투여한 결과, 대조군에서의 ALT 활성은 정상군의 55.88 ± 6.72 Units/L에서 101.13 ± 4.17 Units/L로 약 2 배 정도 증가함으로써 사염화탄소 주입에 의해 간기능의 장애가 유발되었음을 보였다. 이러한 혈청 ALT 활성의 증가는 平肝開鬱止血湯을 주입한 경우 87.34 ± 3.39 Units/L로 유의한 감소 현상을 보임으로써 사염화탄소 주입에 의한 간기능 장애를 平肝開鬱止血湯이 방지하는 효과가 있음을 알 수 있으며(Fig. 9), 혈청 AST 활성에 대한 실험에서도 ALT 활성의 변화와 유사하게 사염화탄소를 주입한 경우 AST 활성은 정상군의 47.03 ± 5.45 Units/L에 비해 대조군에서 169.27 ± 15.29 Units/L로 증가하였고, 사염화탄소를 처리하기 전에 平肝開鬱止血湯을 주입한 실험군에서는 AST 활성이 135.42 ± 5.58 Units/L로 유의한 감소 현상을 보였으므로(Fig. 10) 平肝開鬱止血湯이 사염화탄소에 의한 간기능 장애를 방지하고 있음을 확인하였다.

사염화탄소가 간독성을 나타내는 데는 CCl_3 radical의 생성이 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌고, 따라서 이 반응성 산소기에 의한 간조직의 지질 과산화가 사염화탄소에 의한 간기능 장애와 관련되어 있을 것으로 인정되어 왔다^{18,30}.

이에 사염화탄소를 생체 내에 처리하여 간손상이 유발되었을 때 그 손상이 반응성 산소기에 의해 초래되었는지를 확인하기 위하여 간조직 지질의 과산화 정도를 측정하였다. 그 결과 사염화탄소를 처리한 대조군에서 지질의 과산화는 정상군 조직에서의 118.21 ± 11.36 pmole MDA/mg protein에 비해 186.33 ± 8.24 pmole MDA/mg protein로 증가하였으며, 사염화탄소를 처리하기 전에 平肝開鬱止血湯을 주입한 경우에는 지질의 과산화가 122.91 ± 12.29 pmole MDA/mg protein로 억제되었다(Fig. 11). 그러므로 사염화탄소만을 처리한 대조군에서는 간조직 내 MDA 함량이 정상군에 비해 유의하게 증가함으로써 지질의 과산화가 사염화탄소에 의한 간기능 장애에 중요한 역할을 하고 있음을 암시하고 있으며, 이와 같은 지질의 과산화는 平肝開鬱止血湯을 투여한 실험군에서 억제됨으로써 平肝開鬱止血湯이 사염화탄소에 의한 간기능 손상을 방지하는 효과가 항산화 작용을 통해 나타날 가능성을 강력히 시사하고 있다.

GSH는 여러 독성약물에 의한 세포 손상을 방지하는 해독 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포 내에 존재하는 항산화제 역할을 하고 있는 물질로^{24,25} 독성약물을 방지할 때 산화성인 GSSG로 전화되게 된다. 따라서 조직에 독성약물이 작용하게 되면 일반적으로 GSH 함량이 감소하고 GSSG의 함량은 증가하게 된다. 본 실험에서 사염화탄소를 처리했을 때 GSH 및 GSSG 함량의 변화를 조사한 결과 GSH 함량은 1.17 ± 0.08 μ mole/g wet wt.에서 0.54 ± 0.05 μ mole/g wet wt.로 감소하였고, GSSG의 함량은 0.26 ± 0.04 μ mole/g wet wt.에서 0.87 ± 0.05 μ mole/g wet wt.로 증가하였으며, 이러한 양상은 이전 연구자들의 보고³¹와 일치하고 있는데, 사염화탄소를 처리하기 전에 平肝開鬱止血湯을 주입한 경우에는 GSH 함량은 0.87 ± 0.11 μ mole/g wet wt.로 증가하였고, GSSG 함량은 $0.65 \pm$

0.05µmole/g wet wt.로 감소하였다(Fig. 12, 13).

이상과 같은 결과에서, 平肝開鬱止血湯은 독성약물에 의한 지질의 과산화를 방지하는 항산화작용을 가지고 있으며, 또한 세포 내 GSH의 함량의 감소를 방지하고, ATP 고갈을 억제함으로써 여러 가지 독성약물에 의한 간조직 손상을 방지하였다. 그러나 이러한 효과들에 대한 더욱 자세한 기전에 관해서는 앞으로 더욱 많은 연구를 진행해 보아야 할 것으로 생각된다.

결론

平肝開鬱止血湯이 독성약물에 의한 간조직 손상을 방지할 수 있는지 확인하기 위하여 시험관내 및 생체 실험을 통해 간세포 손상 및 간기능 장애를 유발시킨 다음 이에 대한 平肝開鬱止血湯의 효과를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간조직을 1mM 사염화탄소에 노출시켰을 때, 平肝開鬱止血湯은 대조군에 비해 농도의존적으로 LDH 유출이 감소하였고, 0.5% 이상의 농도에서 유의성있는 감소를 보였다. 2% 농도일 때는 정상 수준까지 감소하였으며, 정상 조직에서도 2% 농도로 처리하였을 때 LDH 유출의 유의성있는 감소를 보였다.
2. 간조직을 1mM 사염화탄소에 노출시켰을 때 대조군에 비해 平肝開鬱止血湯을 2% 처리한 실험군에서 GSH 함량의 유의성있는 증가를 보였다.
3. 간조직에 1mM menadione을 처리했을 때 대조군에 비해 平肝開鬱止血湯을 처리한 실험군에서 0.5% 농도에서 LDH 유출이 유의성있는 감소를 보였다.
4. 간조직을 1mM tBHP에 노출시켰을 때 대조군에 비해 平肝開鬱止血湯을 2% 농도로 처리한 실험군에서는 LDH 유출이 거의 정상 수준까지 유의성있게 감소하였다.
5. 간조직에 0.5mM 수은을 처리했을 때 대조군에 비해 平肝開鬱止血湯을 2% 농도로 처리한 실험군에서는 LDH 유출과 지질의 과산화가 거의 정

상 수준까지 유의성있게 감소하였다.

6. 간조직에 0.5mM 수은을 처리했을 때 대조군에 비해 平肝開鬱止血湯을 2% 농도로 처리한 실험군에서는 조직 내 ATP 함량이 유의성있게 회복되었다.
7. 형태학적인 변화를 조사한 결과 平肝開鬱止血湯은 수은에 의한 세포손상을 유의성있게 방지하였다.
8. 생체 실험 결과, 平肝開鬱止血湯은 사염화탄소에 의한 혈청 내 ALT 및 AST 활성의 증가를 유의성있게 억제하였으며, GSH의 감소나 지질 과산화의 증가도 유의성있게 방지하였다.

이상과 같은 실험 결과는 平肝開鬱止血湯이 항산화작용을 통하여 여러가지 독성약물에 의한 간조직 손상을 방지하는 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서 독성약물에 의한 간기능 장애의 치료나 예방에 이용될 가능성을 시사하고 있으며, 앞으로 平肝開鬱止血湯의 이러한 방지 효과에 대한 정확한 기전에 대해서는 더욱 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 葉天士. 傳靑主女科. 서울:대성문화사. 1984:88.
2. 貴陽中醫學院主編. 방제학. 귀주:귀주인민화원사. 1989:483-4.
3. 김병렬. 平肝開鬱止血湯이 HgCl2에 의한 간조직손상에 미치는 영향. 동의대학교 대학원 학위논문. 1997.
4. 허재영. 平肝開鬱止血湯이 Oxidant에 의한 간조직 지질의 과산화에 미치는 영향. 동의대학교 대학원 학위논문. 1998.
5. 김종국. 平肝開鬱止血湯이 간조직에서 반응성 산소기 제거작용에 미치는 영향. 동의대학교 대학원 학위논문. 1999.
6. Reiter RJ. Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. FASEB J. 1995;9:526-33.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now? J Lab Clin Med. 1992;119:598-620.
8. Uchiyama M, Mihara M. Determination of mal-

- onaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86:271-8.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-524.
 10. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985;113:548-54.
 11. 강극명, 포명혜. 방제대사전. 서울:의성당. 1991:283.
 12. 양기상. 한약의 배합과 응용. 서울:전통의학연구소. 1993:68-9,238,370,423.
 13. Recknagle RO, Glende EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal Cleavage. *Crit Rev Toxicol.* 1973;27:263-296.
 14. Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J Biol Chem.* 1982;25:12419-25.
 15. Beloqui O, Cederbaum AI. Microsomal interactions between iron, paraquat and menadione: effect on hydroxyl radical production and alcohol oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1985;242:187-96.
 16. Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. Renal oxidant response induced by mercury. *Kid Int.* 1996;50:1031-43.
 17. Andersen HR, Andersen O. Effects of dietary α -tocopherol and β -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol Toxicol.* 1993;73:192-201.
 18. Castillo T, Koop DK, Kamimura S, Triasafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 3E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology.* 1992; 16:992-996.
 19. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest.* 1988;81:1240-6.
 20. Alison MR. Regulation of hepatic growth. *Physiol Rev.* 1986;66:499-534.
 21. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222:1-15.
 22. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.
 23. Sipes IG, El Sisi AE, Sim WW, Mobley SA, Earnest DL. Reactive oxygen species in the progression of CCl4-induced liver injury. *Adv Exp Med Biol.* 1991;283:489-97.
 24. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-760.
 25. Starke PE, Farber JL. Endogenous defence against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1985;260:86-92.
 26. Nieminen AL, Gores GJ, Dawson TL, Herman B and Lemasters JJ. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1990;265:2399-408.
 27. Masaki N, Kyle ME, Serroni A and Farber JL. Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 270:672-80.
 28. Olafsdottir K, Pascoe GA and Reed DJ. Mitochondrial glutathione status during Ca²⁺ ionophore-induced injury to isolated hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1988;263:226-35.
 29. Nieminen AL, Dawson TL, Gores GJ, Kawanishi T, Herman B and Lemasters JJ. Protection by acidotic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibitors, ionophores and oxidant chemicals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167:600-6.
 30. Danni O, Chilrpotto E, Aragno M, Blasi F, Comoglio A, Belliardo F, Dianzani MU and Poli G. Lipid peroxidation and irreversible cell damage: Synergism between carbon tetrachloride and 1,2-dibromoethane in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991;110:216-22.
 31. Mao-Hua M, Wei A, Bao-Hong Z, Quing S, and De-Zheng G. Hepatic stimulator substance protects against acute liver failure induced by carbon tetrachloride poisoning in mice. *Hepatology.* 1993;17:638-44.