

四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響

세명대학교 한의과대학 심계내과학교실 *
동의대학교 한의과대학 심계내과학교실 **
원광대학교 한의과대학 심계내과학교실 ***

南昌圭* · 金瑩均** · 文炳淳***

ABSTRACT

Effects of Samul-Tang Extract on Vascular Endothelial Cells from Hydrogen Peroxide-induced Injury

Chang-Kyu Nam*, Young-Kyun Kim**, Byung-Soon Moon***

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Se Myutn University

** Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongeui University

*** Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

This study is designed to investigate the effects of Samul-Tang extract on the response of lactic dehydrogenase(LDH) release, cellular activity, lipid peroxidation, DNA synthesis and the changes of total protein of bovine pulmonary artery endothelial cells(PAEC) from hydrogen peroxide(H_2O_2)-induced injury.

접수일 : 1999. 5. 24

심사일 : 1999. 7. 15

The results are as follows :

1. Samul-Tang significantly decreased H₂O₂-induced release of LDH from injured bovine PAEC.
2. Samul-Tang significantly repressed H₂O₂-induced cellular activity from injured bovine PAEC.
3. Samul-Tang significantly repressed H₂O₂-induced lipid peroxidation from injured bovine PAEC.
4. Samul-Tang significantly stimulated DNA synthesis in bovine PAEC.
5. Samul-Tang significantly repressed H₂O₂-induced changes of total protein volume from injured bovine PAEC.

Above results suggest that Samul-Tang can protect bovine PAEC from H₂O₂-induced injury. These results can be effectively applied to the prevention and cure of cardiovascular and cerebrovascular diseases.

Key Words : Samul-Tang extract(SMT), vascular endothelial cell, pulmonary artery endothelial cells(PAEC), hydrogen peroxide(H₂O₂)

I. 緒 論

四物湯은宋代 陳¹⁾의《太平惠民和劑局方》에 최초로 收錄된 以來, 歷代醫家들²⁻²²⁾에 의해 補血, 行血, 調血 및 活血하는 效能으로 血虛, 血瘀, 血滯, 血溢 등의 血과 關聯된 一切의 疾病을 治療하는데 活用되고 있으며, 最近에는 心血管疾患, 腦血管疾患 및 婦人科疾患 등에 廣範圍하게 應用되고 있다¹⁻³⁴⁾.

血管內皮細胞는 血管內膜의 가장 內層에 位置하여 血管壁이 血液成分에 侵襲되는 것을 保護하는 役割을 하고, 血小板機能을 抑制하는 prostaglandin(prostacyclin 혹은 PGI₂)을 生産하여 血液凝固를 防止하는 機能을 함으로써 血液의 正常

循環을 도와주지만 항상 血流에 의한 物理的 힘을 받고 있으므로 損傷되기 쉽다³⁵⁻³⁷⁾.

血管內皮細胞를 損傷시키는 因子로는 高血壓, 血流 등의 機械的刺戟과 活性酸素, 過酸化脂質 등의 化學物質이 있으며, 이로 인한 病理的 變化로 血小板의 粘著, 凝集 등을 形成하여 血栓, 塞栓症을 誘發하기도 하고, 動脈壁을 弱화시켜 血管內膜의 破裂, 動脈瘤와 出血 등을 招來하기도 한다³⁵⁻⁴³⁾.

四物湯에 關한 實驗的 研究로는 赤血球像⁴⁴⁾, 溶血性 貧血⁴⁵⁾, 血壓降下⁴⁶⁾, 造血效果⁴⁷⁾, 抗癌劑 副作用 抑制⁴⁸⁾ 및 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響⁴⁹⁾ 등이 報告되어 주로 血流의 變化 및 血液性狀에 關한 研究는 많으나, 血液循環에 影響을 미쳐 疾病을 일으키는 血管內皮細胞에 關한 研究는 아직 報告되지 않았다.

이에 著者는 四物湯이 血管內皮細胞에도 影響

을 미칠 것으로 생각되어 여러 濃度의 四物湯 抽出物을 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 損傷된 소의 肺動脈 血管內皮細胞에 投與하여 lactic dehydrogenase(LDH) 漏出 및 活性度, lipid peroxidation, DNA 合成, 總蛋白質 合成量의 變化에 미치는 影響을 實驗的으로 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 細胞柱

소의 肺動脈 血管內皮 細胞柱(bovine pulmonary artery endothelial cell line)를 American Tissue Type Culture(ATTC)로 購入하여 使用하였다. 細胞는 37°C, 5% CO₂ 培養器에서 유지하면서 매주 繼代培養(subculture)하면서 使用하였다. 培養은 M-199 培地를 使用하였으며, 10% 열-비동화 처리한 fetal bovine serum(FBS)과 1 mM/L glutamine, 500 U/ml penicillin 과 20µg/ml streptomycin을 添加하여 使用하였다. 繼代培養의 횟수는 ATTC로부터 細胞를 購入한 後 5회에서 12회 사이에서 使用하였으며, 培養細胞의 monolayers는 位相差顯微鏡(phase microscope)에 의하여 血管內皮細胞의 形態를 확인하며 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 四物湯의 處方內容은 《增補 萬病回春》⁷⁾에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 益山韓方病院에서 精選하여 使用하였고, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

四物湯의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	12g
當歸	Angelicae Gigantis Radix	12g
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	8g
川芎	Cnidii Rhizoma	6g
總量(Total amount)	38g	

2. 方法

1) 檢液의 調製

四物湯 500g을 3,000ml 蒸溜水와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 後 냉각시키고, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 上清液을 取한 다음 여과지로 여과한 濾液을 감압회전증발기를 利用하여 감압농축한 다음 동결건조기로 완전히 건조하여 試料를 製造하였다. 試料를 細胞에 接種하기 前에 0.22µm pore의 여과지로 여과멸균하여 濃度를 調整한 다음 使用하였다.

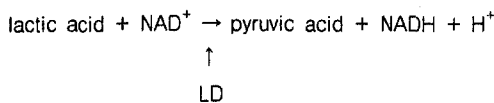
2) 細胞의 培養

Bovine pulmonary artery endothelial cell line을 購入하여 37°C, 5% CO₂ 培養器에서 繼代 培養하면서 使用하였다. 75 cm² 플라스크에 培養하면서 키운 pulmonary artery endothelial cell(PAEC) 細胞柱를 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 溶液으로 trypsinization하여 收穫한 後 그 중 일부를 採取하여 0.1% trypan blue로 染色하고 位相差顯微鏡下에서 hemocytometer를 利用하여 細胞의 數를 測定하였다. 살아있는 細胞의 數를 확인한 後, 細胞數가 1-1.5×10⁵cells/ml가 되도록 培養液을 利用하여 稀釋하였다. 稀釋된 細胞를 6wells, 24wells, 96wells의 flat bottom의 plate에 옮겨 심어서 37°C, 5% CO₂ 培養器에 培養하였다. 細胞가 plate에서 confluency가 되도록 자란 後에 M-199 培養液에 四物湯 抽出物을 여

러 농도로 희釋하여 well에 添加해 주었다. 그 後 37℃, 5% CO₂ 培養器에서 16시간 동안 培養한 後 well로부터 四物湯 抽出物을 함유한 培養液을 除去하고 細胞를 Ham's Balanced Salt Solution(HBSS)을 利用하여 2회 洗滌하였다. 그 直後에 62.5 μM과 125 μM H₂O₂에 2시간과 4시간 동안 露出하여 酸化에 의한 損傷(oxidant stress)을 誘發하였다.

3) LDH release assay

上記의 方法을 利用하여 培養하고 62.5 μM과 125 μM H₂O₂에 露出하여 酸化에 의한 損傷을 誘發하고 24 wells에 培養한 PAEC로부터 培養液內로 漏出되는 LDH의 level을 測定하였다. 4시간 동안 H₂O₂에 露出한 後 各 wells로부터 HBSS 緩衝液을 구하여 4℃에 보관하였다. 細胞의 monolayers는 1mg/ml digitonin으로 1시간 동안 37℃에서 處理하여 細胞膜을 溶解한 後 溶解液을 수거하였다. 수거한 HBSS 分획과 digitonin 分획의 檢체량 50 μl와 효소기질액 LD(Gilford) 1.0 ml를 섞어 30℃, 340nm에서 Gilford Impact 400E를 利用하여 自動測定하였으며, 測定原理는 다음과 같다.



細胞로부터 漏出되는 LDH의 백분율은 다음의 공식을 利用하여 결정하였다.

$$\text{Percent release} = \frac{\text{LDH activity in HBSS}}{\text{activity} + \text{LDH activity in digitonin}}$$

4) 細胞 活性 測定을 위한 MTT assay

Mosmann 등⁵⁰⁾의 方法을 약간 變형하여 實施

하였다. PAEC를 4시간 동안 H₂O₂에 露出한 後 96wells에 있는 各各의 細胞層을 HBSS 緩衝液으로 洗滌하였다. 살아있는 細胞의 mitochondria dehydrogenase에 의해 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)가 spectrophotometer로 測定 可能한 blue formazan product로 cellular reduction되는 것에 根據하여 MTT assay를 實施하였다. 各 實驗條件에서 細胞를 培養한 後 生理食鹽水에 溶解한 MTT 溶液(最終濃度 1mg/ml) (Sigma Co., MO., U.S.A.)을 各 well에 100 μl씩 넣고 37℃에서 4시간 동안 反應시킨 後 10% SDS 溶液 100 μl를 添加하여 formazan crystal이 溶解되도록 한 後 各各의 實驗條件에서 細胞를 37℃에서 12시간 동안 培養하고, 形成된 formazan crystal을 測定하기 위하여 plate를 잘 흔든 後 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.)로 620 nm에서 吸光度를 測定하였다.

5) Lipid peroxidation

PAEC를 2시간 동안 H₂O₂에 露出한 後 6 wells에 있는 各各의 細胞層의 上清液을 收集하여 -20℃에 보관하였다. 細胞의 monolayers는 scraper를 利用하여 除去하고 收集하였다. 脂質酸化의 程度는 細胞培養 洗滌液인 HBSS 緩衝液 內의 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 測定하여 그 變化를 觀察하였으며, 細胞內의 TBARS의 變化는 Yagi 등⁵¹⁾의 方法에 의하여 測定하였다. 要約하면 12N H₂SO₄ 2.0ml와 10% phosphotungstic acid 0.3ml를 HBSS 上清液과 細胞溶解液에 加하고 10분 동안 常溫에 放置한 다음 TBA reagent(a mixture of equal volumes of 0.67% TBA aqueous solution and glacial acetic acid) 1.0ml를 加하였다. 反應液을 95℃ 水槽에서 60분 동안 加熱하였으며, 흐르는 물에 冷却한 다음 n-butanol 4.0ml를 加하고 反應液을 30초 동안 振盪한 後 2,000rpm에서 10

분 동안 원심분리한 다음 n-butanol층을 제거하고 515nm excitation과 함께 553nm에서 螢光測定法을 利用하여 測定하였다. 螢光測定値는 tet-aehxpropane으로 준비한 표준검량선과 비교하여 계산하였다.

6) Assay for ^3H -thymidine incorporation into DNA

細胞를 trypsinization으로 한 後 10% FBS를 포함한 M-199 培養液에 再懸濁하여 1×10^4 cells/ml의 濃度로 조절하여 48 wells plate에 培養하였다. 20시간 동안 37°C, 5% CO₂ 培養器에서 培養한 다음 M-199 培養液으로 2회 洗滌하고 2% FBS를 포함한 M-199 培養液으로 四物湯 抽出物을 稀釋하여 細胞에 加하였다. ^3H thymidine incorporation을 測定하기 위하여 모든 plate를 37°C, 5% CO₂ 培養器에서 90분 동안 더 培養한 다음 $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -thymidine을 各 well에 添加하고 plate를 37°C, 5% CO₂ 培養器에서 6시간 동안 培養하였다. 各 well을 HBSS로 洗滌하고 10% trichloroacetic acid(TCA) 0.5ml로 4°C에서 30분 동안 고정하였다. 10% TCA를 除去하고 0.2N NaOH에 녹인 0.1% SDS 溶液 0.5ml를 各 well에 加하였다. DNA를 溶解하기 위하여 60°C에서 2시간 동안 培養하였다. 溶解液은 liquid scintillation cocktail 10ml와 혼합하여 radioactivity를 liquid scintillation counter를 利用하여 測定하였으며, 모든 檢査는 最少한 2번씩 實施하였다.

7) 總蛋白質 合成量 測定

Sulfurhodamine B(SRB) 檢索法은 細胞가 合成한 總蛋白質을 測定하는 方法으로 SRB는 細胞를 밝은 분홍색으로 染色시킨다. 各 實驗條件에서 培養한 細胞에 50% cold TCA를 50 μl /well씩 加하여 最終濃度 10%에 達하게 하여 4°C에서 1시간 동안 방치하고 蛋白質 침전에 의해 細胞를 고

정하였다. 蒸溜水로 5회 洗滌하고 나서 1% acetic acid에 溶解시킨 0.4% SRB 溶液 50 μl /well을 加하여 常溫에서 30분간 染色한 後 1% acetic acid로 5회 洗滌하여 結合하지 않은 染色物을 除去하였다. 細胞를 잘 건조시킨 後 10 mM/L unbuffered tris(hydroxy) aminomethane(Tris base) 150 μl 로 SRB-bound protein을 잘 溶解시키고 ELISA reader를 利用하여 540 nm에서 吸光度를 測定하였다.

8) 統計 處理

實驗結果의 統計處理는 Mac Stat View TM + 512를 利用하여 student's t-test에 準하였고, 實驗値의 表現은 Mean \pm SE로 하였다.

III. 實驗 成績

1. PAEC의 LDH 漏出에 미치는 影響

PAEC를 H₂O₂와 함께 培養을 하면 H₂O₂의 濃度依存的으로 LDH가 增加하는 것을 볼 수 있었다. 특히 H₂O₂ 65 μM 과 125 μM 을 處理한 實驗群에서 31.6 \pm 2.7과 52.4 \pm 3.9로 매우 有意性(p<0.01)있는 增加를 나타냈다(Table 1).

Table 1. DOSE RESPONSE of H₂O₂-INDUCED LDH RELEASE from PAEC

H ₂ O ₂ Concentration (μM)	0	20	65	125	250
LDH Release (% of total)	12.3 \pm 1.1	17.6 \pm 1.5	31.6 \pm 2.7	52.4 \pm 3.9	56.8 \pm 4.2
	1	5	7**	9**	2**

Confluent PAEC monolayers in 24 well culture plates were incubated with various concentrations of H₂O₂ in HBSS for 4 hrs. The reaction was stopped by removing the HBSS and adding digitonin(1mg/ml) to each well. Both HBSS and digitonin

fractions were assayed for LDH activity. % release = LDH in HBSS/[LDH in HBSS + LDH in digitonin]. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control : **, p<0.01.

이러한 細胞損傷으로 因한 LDH의 培養液內로의 漏出은 4시간과 6시간 동안의 H₂O₂의 培養으로 매우 有意性(p<0.01)있게 나타났다(Table II).

Table II. TIME COURSE of H₂O₂-INDUCED LDH RELEASE from PAEC

Experimental Group(μM)	LDH Release(% of total)			
	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs
CONT	7.9±0.8	11.1±1.4	13.2±1.2	16.5±1.6
62.5	8.4±0.9	21.3±1.8*	41.4±3.1**	56.5±4.5**
125	8.7±1.0	27.5±1.9**	65.6±4.7**	72.4±5.7**

CONT : H₂O₂ concentration of 0μM.

Cell monolayers were incubated with H₂O₂(62.5μM, 125μM) for the time intervals as shown. Both HBSS and digitonin fractions were assayed for LDH release. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

H₂O₂의 處理로 誘導되는 LDH의 漏出에 對한 四物湯 抽出物의 效果를 調査하였다. 四物湯 抽出物만을 投與하였을 때에는 對照群으로서 LDH 漏出의 큰 變化를 찾아볼 수 없었다. 四物湯 抽出物을 12.5μg/ml에서 150μg/ml의 濃度까지 PAEC와 함께 16시간 동안 preincubation하면 H₂O₂를 投與한 實驗群에서도 LDH의 漏出이 점차 減少하는 것을 볼 수 있었다. 특히 四物湯 抽出物 50μg/ml 이상의 濃度에서 有意性(p<0.05, p<0.01) 있는 效果를 나타냈다(Table III).

Table III. EFFECT of SAMUL-TANG(SMT) EXTRACT on H₂O₂-INDUCED RELEASE of LDH

H ₂ O ₂ Concentration (μM)	LDH Release(% of control)					
	SMT 0μg/ml	SMT 12.5μg/ml	SMT 25.0μg/ml	SMT 50.0μg/ml	SMT 100.0μg/ml	SMT 150.0μg/ml
CONT	11.4±1.0	11.2±0.6	12.7±0.9	10.7±0.9	11.7±1.1	12.1±1.2
62.5	36.5±2.5	27.1±1.9	21.4±2.5*	20.1±1.7**	10.2±0.8**	9.3±0.6*
125	57.8±3.9	51.8±4.1	48.7±3.1	38.6±2.9*	20.3±1.7**	17.5±1.4**

CONT : H₂O₂ concentration of 0μM.

Confluent cells were preincubated with various concentrations of Samul-Tang (SMT) extract for 16 hrs washed and then incubated with H₂O₂(62.5μM, 125μM) for 4 hrs. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control value at 0 point of the individual curve ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

2. PAEC의 活性度에 미치는 影響

內皮細胞의 培養細胞數가 增加함에 따라 620 nm에서 MTT의 吸光度가 점차 增加하는 것을 볼 수 있었다. 24시간의 培養時間에서는 직선의 相關關係를 나타냈다. 그리고 細胞의 增加를 24시간과 96시간 사이의 增加程度를 觀察하였다(Table IV).

Table IV. CORRELATION between THE NUMBER of ENDO-THELIAL CELLS and MTT ABSORBANCE

Number of Cells (×10 ³ per well)	MTT Absorbance(620 nm)			
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
1.0	0.11±0.02	0.24±0.02	0.25±0.02	0.31±0.03
2.0	0.23±0.03	0.28±0.04	0.30±0.04	0.64±0.07
4.0	0.32±0.03	0.52±0.06	0.63±0.07	0.93±0.09
8.0	0.54±0.04	0.74±0.08	0.88±0.10	1.19±0.09
16.0	0.71±0.06	0.89±0.09	1.04±0.09	1.27±0.11

PAEC monolayers at concentrations of 750-15,000 cells/well were seeded in 96 well plates and incubated for 24, 48, 72 and 96 hrs, respectively. After culture medium was removed, MTT (final concentration of 0.4 mg/ml) was added to all wells. Plates were incubated at 37°C for 5 hrs, developed and MTT absorbance was measured at 620 nm. The value represents the mean±SE of 6 samples.

H₂O₂를 처리하면 농도依存的으로 細胞의 活性度가 有意性(p<0.05, p<0.01) 있게 減少하였고, 특히 4시간과 6시간에 이러한 反應은 有意性(p<0.05, p<0.01) 있게 나타났다(Table V, VI).

Table V. DOSE RESPONSE of H₂O₂-INDUCED DAMAGE of CELL VIABILITY

H ₂ O ₂ Concentration(μM)	MTT Absorbance(620 nm)	Decreasing Rate of Cell Viability(%)
CONT	1.43±0.12	-
25	1.38±0.13	6.99
50	0.91±0.10*	29.4
100	0.25±0.03**	82.5
200	0.26±0.04**	81.8

CONT : H₂O₂ concentration of 0μM.

Monolayers in 96 well culture plates were incubated with various concentrations of H₂O₂ in HBSS for 4 hrs. After wells were washed with HBSS, MTT assay was performed to determine the cell viability. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

Table VI. TIME COURSE of H₂O₂-INDUCED DAMAGE of CELL VIABILITY

H ₂ O ₂ Concentration (μM)	MTT Absorbance(620 nm)			
	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs
CONT	1.31±0.11	1.43±0.14	1.39±0.11	1.40±0.12
50	1.25±0.09	1.21±0.12	0.92±0.10*	0.87±0.09*
100	1.11±0.09	0.78±0.08**	0.29±0.04**	0.26±0.03**

CONT : H₂O₂ concentration of 0μM.

Cell monolayers in 96 well plates were incubated with H₂O₂(50μM, 100μM) for the time intervals as shown. MTT assay was carried out to measure the cell viability. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

四物湯 抽出物을 5μg/ml의 濃度에서 160μg/ml의 濃度까지 投與하면 對照群에서는 細胞活性의 減少가 나타나지 않았으며, H₂O₂50μM과 100μM 濃度로 處理한 實驗群에서는 細胞活性의 減少가 四物湯 抽出物의 濃度增加에 따른 細胞活性의 增加를 볼 수 있었다. 특히 四物湯 抽出物 濃도가 40μg/ml 以上일 때 有意性(p<0.05, p<0.01) 있는 效果를 나타냈다(Table VII).

Table VII. EFFECT of SAMUL-TANG(SMT) EXTRACT on H₂O₂-INDUCED DAMAGE of CELL VIABILITY

Concentration of SMT Extract(μg/ml)	MTT Absorbance(620 nm)		
	H ₂ O ₂ 0μM	H ₂ O ₂ 50μM	H ₂ O ₂ 100μM
CONT	1.31±0.11	0.51±0.04	0.17±0.01
5	1.33±0.12	0.56±0.05	0.21±0.01
10	1.35±0.14	0.60±0.05	0.23±0.02
20	1.40±0.15	0.74±0.04*	0.26±0.03
40	1.49±0.13	1.03±0.10**	0.34±0.04*
80	1.54±0.14	1.11±0.11**	0.85±0.07**
160	1.59±0.16	1.14±0.10**	0.97±0.10**

CONT : Samul-Tang(SMT) extract concentration of 0μg/ml.

PAEC monolayers were preincubated with various concentrations of Samul-Tang(SMT) extract for 16 hrs washed and then incubated with H₂O₂(50μM, 100μM) or HBSS for 4 hrs. After washing, cell viability was measured by MTT assay. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

3. PAEC의 lipid peroxidation에 미치는 影響

H₂O₂ 25 μM에서 200 μM 濃度を PAEC에 處理하면 HBSS의 培養液에서 TBARS의 蓄積이 發生하게 되어 細胞의 脂質過酸化를 觀察할 수 있었다. 50 μM 以上の 濃度에서 100% 以上の 매우 有意性(p<0.01) 있는 TBARS의 增加效果를 나타냈으며, 특히 2시간과 4시간에서 매우 有意性(p<0.01) 있는 反應을 나타냈다(Table VIII, IX).

Table VIII. DOSE RESPONSE of H₂O₂-INDUCED LIPID PEROXIDATION of PAEC

H ₂ O ₂ Concentration(μM)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)	Decreasing Rate of Cell Viability(%)
CONT	38.1±2.1	-
25	39.3±2.4	3.1
50	75.7±5.8**	98.7
100	93.6±7.6**	145.6
200	89.5±8.1**	134.9

CONT : H₂O₂ concentration of 0 μM.

Monolayers in 6 well culture plates were incubated with various concentrations of H₂O₂ for 2 hrs. HBSS fraction was collected and the cell viability was measured by thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay. TBA reactive substances(TBARS) are expressed as pmol/10⁶cells based on a standard curve of tetraethoxypropane. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; **, p<0.01.

Table IX. TIME COURSE of H₂O₂-INDUCED LIPID PEROXIDATION of PAEC

H ₂ O ₂ Concentration(μM)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)				
	30 min	1 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs
CONT	53.1±4.1	53.3±4.3	56.7±3.9	56.1±3.7	54.4±4.5
50	62.4±5.2	73.9±7.1	126.5±9.8**	130.2±9.9**	74.5±6.1
100	89.6±8.5*	90.1±8.5*	143.5±11.3**	157.6±11.1**	98.4±8.9*

CONT : H₂O₂ concentration of 0 μM.

Confluent cells in 6 well plates were incubated with H₂O₂(50 μM, 100 μM) for the time intervals as shown. HBSS fraction was determined with TBA fluorometric assay. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

H₂O₂의 投與없이 四物湯 抽出物만을 投與하였을 때에는 TBARS의 增加 樣相을 觀察할 수 없어 四物湯 抽出物이 細胞毒性으로 인한 脂質過酸化에 影響을 미치지 않아 TBARS의 濃度가 낮게 유지되는 것을 觀察하였고, H₂O₂를 投與하였을 때 四物湯 抽出物을 preincubation한 實驗群에서는 四物湯 抽出物의 濃度增加에 따라 H₂O₂의 投與로 誘發된 TBARS의 蓄積이 四物湯 抽出物의 濃度 依存的으로 有意性(p<0.05, p<0.01) 있게 減少하였다(Table X).

Table X. EFFECT of SAMUL-TANG(SMT) EXTRACT on H₂O₂ INDUCED LIPID PEROXIDATION of PAEC

Concentration of SMT Extract(μg/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)		
	H ₂ O ₂ 0 μM	H ₂ O ₂ 50 μM	H ₂ O ₂ 100 μM
CONT	41.6±3.5	167.4±13.5	182.6±13.5
10	40.5±3.4	152.4±12.1	164.8±12.5
20	41.8±3.5	146.1±9.9	151.1±13.1
40	42.3±3.9	118.6±8.7*	133.2±11.3*
80	41.2±3.7	64.4±5.6**	68.8±6.1**
160	41.9±3.1	56.5±4.1**	57.4±5.2**

CONT : Samul-Tang(SMT) extract concentration of 0 μg/ml.

Confluent PAEC monolayers were incubated with various concentrations of Samul-Tang(SMT) extract for 16 hrs washed and then incubated with H₂O₂(50 μM, 100 μM) or HBSS for 2 hrs. TBARS in HBSS fraction was determined. The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

4. PAEC의 DNA 合成에 미치는 影響 四物湯 抽出物의 濃度を 增加시킴에 따라 細胞

의 수가 점차로 증가하였고($p < 0.01$), 핵산합성의 증가는 세포의 증가에 4物湯抽出物の 濃度依存的으로 有意性($p < 0.05$, $p < 0.01$)있게 증가하였다 (Table XI).

Table XI. DOSE RESPONSE of SAMUL-TANG(SMT) EXTRACT on THE ^3H -THYMIDINE ACTIVITY of PAEC

Concentration of SMT Extract ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Dose Response of SMT on PAEC	
	Cells/mm(% of control)	^3H cpm(% of control)
CONT	100	100
5	111.3 \pm 9.2	76.1 \pm 5.7
10	120.3 \pm 10.2	82.0 \pm 6.9
20	183.7 \pm 14.3**	132.6 \pm 11.3*
40	232.6 \pm 16.2**	138.4 \pm 9.5**
80	275.7 \pm 18.3**	143.4 \pm 10.3**
160	323.5 \pm 25.1**	151.5 \pm 12.8**

CONT : Samul-Tang(SMT) extract concentration of $0\mu\text{g}/\text{ml}$.

Increasing concentration up to $160\mu\text{g}/\text{ml}$ of SamulTang(SMT) extract was used for stimulation experiments on PAEC in microtiter plates filled with M-199 and 2% FBS and inoculated with 104 cells/well. A control containing M-199 and 2% FBS was included. ^3H -thymidine was added as described earlier, after 90 hrs of incubation with the test samples. The cells were counted 6 hrs later and the DNA was extracted. Tests were done 6 times and the mean was calculated. The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

5. H_2O_2 에 의한 總蛋白質 合成量의 變化에 미치는 影響

다양한 濃度の H_2O_2 의 變化로 誘發한 PAEC의 總蛋白質 合成量의 變化는 H_2O_2 의 濃度增加에 따라 有意性있게 減少하는 結果를 나타냈다. 특히 H_2O_2 $50\mu\text{M}$ 과 $100\mu\text{M}$ 濃度에서 總蛋白質 合成量이 매우 有意性($p < 0.01$)있게 減少하였다(Table XII).

Table XII. DOSE RESPONSE of H_2O_2 -INDUCED TOTAL PROTEIN SYNTHESIS of PAEC

H_2O_2 Concentration (μM)	Total Protein(% of control)
CONT	100
25	95.6 \pm 6.4
50	58.4 \pm 4.6**
100	46.8 \pm 4.1**
200	46.4 \pm 4.7**

CONT : H_2O_2 concentration of $0\mu\text{M}$.

Monolayers in 6 well culture plates were incubated with various concentrations of H_2O_2 for 2 hrs. The cell proteins were measured by SRB assay. The change of total protein is expressed as % of control. The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; **, $p < 0.01$.

H_2O_2 處理 時間의 變化에 따른 總蛋白質 合成量의 變化는 H_2O_2 處理 4시간 後의 總蛋白質의 合成量의 變化가 매우 有意性($p < 0.01$)있게 減少하는 樣相을 나타냈다(Table XIII).

Table XIII. TIME COURSE of H_2O_2 -INDUCED TOTAL PROTEIN SYNTHESIS of PAEC

H_2O_2 Concentration (μM)	Total Protein(% of control)				
	0 hr	1 hr	2 hrs	4 hrs	8 hrs
50	100	81.5 \pm 5.4	75.4 \pm 5.8*	57.2 \pm 4.6**	58.7 \pm 6.3*
100	100	76.4 \pm 6.1*	71.5 \pm 6.2*	51.4 \pm 4.8**	51.7 \pm 7.1*

Confluent cells in 6 well plates were incubated with H_2O_2 ($50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) for the time intervals as shown. The cell proteins were measured by SRB assay. The change of total protein is expressed as % of control. The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

四物湯 抽出物の 濃度增加에 따라 H_2O_2 로 減少하는 總蛋白質 合成量의 정도가 緩和되고 總蛋白質 合成의 정도가 恢復하는 樣相을 나타냈다. 本實驗群에서는 對照群의 PAEC의 總蛋白質의 合成量이 減少하는 정도가 甚한 것에 比하여 四物湯 抽出物을 處理한 實驗群에서는 總蛋白質 合成量의 減少정도가 有意性($p < 0.05$, $p < 0.01$) 있게 抑制되는 結果를 나타냈다(Table XIV).

Table XIV. EFFECT of SAMUL-TANG(SMT) EXTRACT on THE CHANGES of TOTAL PROTEIN VOLUME INDUCED by H_2O_2

Concentration of SMT Extract ($\mu g/ml$)	Total Protein(% of control)		
	H_2O_2 0 μM	H_2O_2 50 μM	H_2O_2 100 μM
CONT	100	59.4 \pm 4.3	52.8 \pm 4.3
10	100	62.1 \pm 5.2	57.8 \pm 6.1
20	100	65.8 \pm 6.1	61.5 \pm 5.3
40	100	72.8 \pm 8.1	68.5 \pm 6.2*
80	100	78.1 \pm 4.6*	75.4 \pm 5.7*
160	100	82.1 \pm 5.4*	80.3 \pm 5.5**

CONT : Samul-Tang(SMT) extract concentration of 0 $\mu g/ml$.

Confluent PAEC monolayers were incubated with various concentrations of Samul-Tang(SMT) extract for 4 hrs washed and then incubated with H_2O_2 (50 μM , 100 μM) or HBSS for 2 hrs. The cell proteins were measured by SRB assay. The change of total protein is expressed as % of control. The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from the group of SMT 0 $\mu g/ml$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

IV. 考察

血管內皮細胞는 血管內膜의 가장 內層에 位置하여 血管壁이 血液成分에 侵襲되는 것을 保護하는 役割을 맡고 있는 細胞로서, 內皮아래의 結合組織에 血小板이 結合하는 것을 막아주어 抗血栓

作用을 하고 選擇的 物質透過性 및 血管緊張을 調節하는 特性이 있다^{35,41}).

血管內皮細胞를 損傷시키는 因子로는 高血壓, 血流 등의 機械的刺戟과 活性酸素, 過酸化脂質 등의 化學物質로 알려져 있다⁴¹).

이러한 因子에 의하여 血管內皮細胞가 損傷되면 內皮細胞가 內膜에서 剝離되어 基底膜이 血流에 露出되고 그 局所에 血小板의 粘著·凝集·放出反應이 發生되어 粥狀動脈硬化發生 및 進展을 促進시킨다^{36-38,40-41}).

粥狀動脈硬化症은 血管內膜의 損傷, 血流의 異常 및 血液成分의 變化 등으로 誘發되며 주로 腦, 心臟, 腎臟, 下肢와 小腸의 血管에서 일어나 狹心症, 心筋梗塞 같은 心血管疾患과 腦血管疾患 등을 일으킨다^{35-36,38-39,41-43}).

四物湯은 宋代 陳¹⁾의 《太平惠民和劑局方》에 “調益營衛, 滋養氣血, 治衝任虛損, 月水不調 膈腹疼痛 崩中漏下 血瘕塊硬 發歇疼痛 將理失宜 胎動不安…”이라 하여 最初로 收錄된 以來, 歷代醫書²⁻²²)에 引用되어 왔으며, 張⁵²⁾의 芎歸膠艾湯에서 阿膠, 艾葉, 甘草를 去하여 變方한 處方이다.

本方은 熟地黃, 當歸, 白芍藥, 川芎으로 構成되어 있으며 個別藥材의 性味, 效能 및 藥理作用을 살펴보면, 熟地黃은 血中血藥으로서 甘 微溫하고 滋陰補血하며 骨髓에 作用하여 造血을 促進하고, 當歸는 血中主藥으로서 甘辛 溫하고 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하며 造血과 血液循環을 促進하고, 白芍藥은 陰分藥으로서 苦酸 微寒하며 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하고 體液保存과 鎮靜 및 間接的으로 補血에 關與하며, 川芎은 血中之氣藥으로서 辛 溫하고 活血行氣, 祛風止痛하고 血管神經에 作用하여 循環促進과 血液을 新陳代謝(祛瘀生新)시켜 補血에 關與하고 있는데^{9,23-24,31,34}), 熟地黃·白芍藥으로 陰血을 滋補하고, 當歸·川芎으로 活血行氣하여 血虛를 補養시키고 血滯를 通行하게 한다^{23,28}).

따라서 四物湯은 一切 血虛 및 血不和로 發生하는 諸證을 治療하는 方劑로서 補血活血과 調血

의 通治方으로 活用되어 왔으며, 最近에는 心血管疾患, 腦血管疾患 및 婦人科疾患 등에 廣範圍하게 應用되고 있다¹⁻³⁴⁾.

四物湯에 關한 實驗的 研究로는 洪 등^{44,47)}은 貧血 家兔의 RBC, Hemoglobin, Hematocrit值를 上升시켜 造血效果가 있음을 報告하였고, 姜⁴⁶⁾은 家兔의 血壓降下에 有意한 效果가 있음을 報告하였으며, 權⁵³⁾은 四物湯 및 季節別 活用力이 溶血性 貧血에 對하여 造血效果와 Hydrocortisone acetate로 誘發된 高粘度血症과 Endotoxin으로 誘發된 血栓症의 改善效果가 있음을 報告하였고, 咸⁵⁴⁾은 四物湯과 四物湯의 季節別 倍味 및 加味方이 免疫機能, 貧血症, 高粘度血症 및 血栓症에 效果가 있음을 報告하여 주로 血流의 變化 및 血液性狀에 關한 研究는 많으나, 血管內皮細胞에 關한 研究는 아직 報告되지 않았다.

이에 著者는 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響을 究明하기 위하여 여러 濃度의 四物湯 抽出物을 hydrogen peroxide로 損傷된 소의 肺動脈 血管內皮細胞에 投與하여 LDH 漏出 및 活性度, lipid peroxidation, DNA 合成, 總蛋白質 合成量의 變化를 觀察하였다.

本 研究에서는 血管內皮細胞의 損傷에 對한 四物湯의 恢復效果를 觀察하기 위하여 hydrogen peroxide에 의하여 誘發되는 酸化의 損傷의 模型을 確立하고 여기에 四物湯 抽出物을 加하여 損傷된 血管內皮細胞의 恢復效果를 觀察하였다.

自由基 특히 酸素自由基는 動脈硬化症, 老化나 癌의 誘發 뿐만 아니라 다양한 生物學的 機轉에도 關與하는 것으로 알려져⁵⁵⁻⁵⁷⁾. 그러나 아직 老化에 關與하는 機轉에 對해서는 완전히 밝혀져 있지 않았지만 特徵的인 形態의 自由基에 의한 損傷은 老化와 함께 增加하는 것으로 報告되고 있다^{56,58)}. 身體內에서는 生理的인 酸素代謝過程에서 遊離한 酸素自由基가 發生하는 것으로 알려져 있으며⁵⁹⁾, 酸素의 1價還元은 superoxide radical을 生成하고, 2價還元은 hydrogen peroxide를 生成한다. 老化에 미치는 自由基의 影響에 對한 理論

에 따르면 身體內的 抗酸化防禦作用은 老化에 따라 減少하며 이에 따라 體內에 酸素代謝의 產物인 自由基가 蓄積하게 된다⁵⁵⁻⁵⁶⁾.

本 實驗에서는 體內的 酸素自由基 環境을 人爲的으로 組成하기 위하여 hydrogen peroxide를 細胞 培養液內에 一定한 濃度로 投與하였다.

Hydrogen peroxide가 PAEC에서 細胞損傷을 誘發시키는 것을 細胞培養液內的 LDH 漏出과 細胞活性度の 減少 등으로 觀察할 수 있었으며, 이러한 結果는 다른 研究者들의 報告⁶⁰⁻⁶²⁾와 一致하고 있다. LDH는 細胞膜이 損傷되었을 때 細胞로부터 漏出되는 細胞內的 酵素이다. 本 實驗에서는 PAEC에 四物湯 抽出物을 加하여 培養하면 hydrogen peroxide로 誘發된 LDH의 細胞外 漏出의 增加를 抑制시키는 效果를 觀察할 수 있었다.

Hydrogen peroxide에 細胞를 露出시키면 細胞의 活性도가 減少하게 되는데 MTT assay를 통하여 四物湯 抽出物의 投與로 이러한 細胞의 損傷을 防禦하는 效果를 觀察할 수 있었다. 內皮細胞의 死亡率檢査는 trypan blue exclusion test를 통하여 施行하지만 定量的 檢査를 하기는 어렵다⁶¹⁾. 림프구와 化學療法 實施 後의 腫瘍細胞 生存率을 檢査하기 위하여 MTT assay가 많이 活用되므로⁶²⁾ PAEC의 活性度 測定을 위하여 利用하였다. MTT는 연한 노란색의 基質로서 살아있는 細胞와 培養할 때 강한 blue formazan 生成物을 만든다. MTT는 活性化된 mitochondria에 의해서만 만들어지기 때문에 MTT assay에 의해서 測定된 hydrogen peroxide로 誘發된 細胞活性度の 減少는 hydrogen peroxide가 PAEC의 mitochondria에 損傷을 주었다는 것을 의미하며, 四物湯 抽出物로 PAEC을 前處理하면 MTT formazan의 量이 增加하는 것은 이러한 細胞의 mitochondria의 損傷이 恢復된다는 것을 의미하고 四物湯 抽出物이 hydrogen peroxide로 因한 血管內皮細胞損傷의 防禦效果가 있다는 것을 本 實驗에서 보여준 것이다.

細胞損傷의 機轉을 分明하게 確認하기 위하여 hydrogen peroxide로 誘發한 脂質過酸化量을 測定하였다. 細胞膜의 콜레스테롤과 脂肪酸의 不飽和性結合은 自由基와 잘 結合하여 過酸化過程을 겪는다. 이것은 細胞膜의 磷脂質이 酸化性 損傷에 계속적으로 露出되는 이유를 說明하는 것이다⁵⁸⁾. 脂質過酸化의 過程은 不飽和性 fatty acyl chain 으로부터 水素原子가 離脫함으로써 發生하는 一連의 連結作用으로 이루어지며, 好氣性의 環境에서 酸素가 脂肪酸에 더해져 脂質過酸化遊離基를 發生하게 되고 한번 이러한 過程이 發生하게 되면 다른 不飽和脂肪酸으로 水素原子를 빼앗아 過酸化反應을 增進하게 된다. 이렇게 發生하는 脂質過酸化 水素產物들은 여러 가지의 反應性自由基로 變하게 된다. 例를 들어 lipid alkoxyl radicals, aldehyde, alkanes, lipid epoxides, alcohol 등이다⁶³⁻⁶⁵⁾. 脂質遊離基의 疏水性의 特性으로 많은 細胞膜 關聯 分子들과 反應이 發生하게 된다. 細胞膜 脂肪酸의 過酸化 後에 shorten-chain 脂肪酸의 存在로 因하여 膜透過性과 微細粘度에 影響을 미치게 된다⁶⁶⁻⁶⁷⁾. Thiobarbituric acid(T-BA)의 反應產物은 malondialdehyde의 形成, 즉 脂質過酸化 形成의 표시로서 使用된다. 脂質過酸化에 의하여 發生한 malondialdehyde는 細胞膜 成分의 cross-linking과 polymerization을 誘發하게 되며⁶⁶⁻⁶⁸⁾, 이러한 反應은 細胞膜의 變形性, 이온수송, 酵素活性和 細胞表面決定基의 凝集狀態 등 細胞內膜의 特性을 變化시킨다. 極限 狀態에서는 過酸化된 細胞膜은 凝集力을 잃게 되며⁶⁹⁾, 水溶性 脂質過酸化產物은 다른 細胞內 小器官으로 擴散하게 된다^{64-65,70)}.

Dealdehyde는 cross-linking 要因으로 作用하며 老化色素인 lipofuscin을 形成하는 蛋白質 凝集作用을 한다⁷¹⁾. 脂質過酸化產物은 DNA adduct를 形成하며 DNA에 突然變異와 遺傳子 發顯樣相을 變化시킨다⁷²⁾. 脂質過酸化 過程과 그 產物은 細胞의 生存能力에 損傷을 입히며, 脂質過酸化의 蓄積效果는 動脈硬化症과 虛血性 再貫流 등을 포함한

많은 病理學的 條件을 만들어내는 機轉으로 理解된다^{64-65,69,72)}.

本 研究에서 PAEC와 함께 培養한 hydrogen peroxide는 脂質過酸化를 有意性있게 增加시키며, 이러한 結果는 다른 研究者들의 結果와 一致한다고 볼 수 있다^{60,73-74)}. 이것은 細胞損傷의 原因이 되는 것이며, LDH의 漏出으로 이러한 細胞膜의 損傷을 確認할 수 있었으며, MTT assay에 의하여 mitochondria의 機能喪失 등을 觀察할 수 있었다. Hydrogen peroxide로 處理하기 前에 四物湯 抽出物로 PAEC를 前處理하면 hydrogen peroxide에 의하여 誘發되는 脂質過酸化를 防止할 수 있다는 것을 確認할 수 있었다. 抗脂質過酸化의 效果는 四物湯 抽出物이 PAEC의 細胞膜과 mitochondria의 機能損傷을 防止한다는 것을 말한다.

또한 核酸의 合成을 자극하여 PAEC의 DNA 合成에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 四物湯 抽出物을 培養한 다음 동시에 3[H]-thymidine을 投與하여 培養한 後 細胞의 數를 測定하고 DNA를 抽出하였으며, hydrogen peroxide로 損傷된 PAEC의 總蛋白質 合成量의 變化를 測定하였다.

本 實驗에서는 四物湯 抽出物의 濃度依存的으로 細胞의 數와 核酸合成이 增加하였으며, hydrogen peroxide로 減少하는 總蛋白質 合成量을 正常으로 恢復시키는 效果를 觀察할 수 있었다.

以上の 結果로 hydrogen peroxide에 의하여 誘發되는 PAEC의 損傷은 細胞 培養液內로 LDH를 漏出하게 되고 細胞의 活性도가 減少하게 되며 결국 細胞膜의 脂質過酸化를 誘發하게 되고 總蛋白質 合成量을 減少시키는데, 四物湯 抽出物의 前處理는 이러한 LDH의 漏出과 細胞의 活性度減少 및 脂質過酸化를 防止하고 總蛋白質 合成量의 減少를 抑制시키는 機能을 하므로 酸素自由基에 의해 損傷된 血管內皮細胞를 恢復시키며 血管內皮細胞의 損傷을 抑制하는 效果가 있는 것으로 생각된다. 그러나 더욱 仔細한 防禦機轉은 계속해서 研究되어야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響을 究明하고자 여러 濃度의 四物湯 抽出物을 hydrogen peroxide로 損傷된 소의 肺動脈 血管內皮細胞에 投與하여 LDH 漏出 및 活性度, lipid peroxidation, DNA 合成, 總蛋白質 合成量의 變化를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 四物湯은 소의 PAEC에서 hydrogen peroxide로 誘發된 LDH 漏出을 有意性있게 減少시켰다.

2. 四物湯은 소의 PAEC에서 hydrogen peroxide로 誘發된 細胞活性度の 減少를 有意性있게 抑制시켰다.

3. 四物湯은 소의 PAEC에서 hydrogen peroxide로 誘發되는 脂質過酸化作用을 有意性있게 抑制시켰다.

4. 四物湯은 소의 PAEC의 DNA 合成 및 細胞의 數를 有意性있게 增加시켰다.

5. 四物湯은 소의 PAEC에서 hydrogen peroxide로 誘發된 總蛋白質 合成量의 減少를 有意性있게 抑制시켰다.

以上の 結果로 미루어 四物湯은 hydrogen peroxide로 損傷된 소의 肺動脈 血管內皮細胞를 恢復시키고 脂質過酸化를 防止하는 效果가 있으므로 血管內皮細胞의 損傷으로 誘發되는 心血管疾患이나 腦血管疾患 등의 豫防 및 治療에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 臺北, 旋風出版社,

版社, p.242, 1975.

2. 張子和 : 儒門事親, 臺北, 旋風出版社, p.38, 1978.

3. 方 廣 : 丹溪心法附餘(卷十九), 서울, 大星文化社, p.682, 1989.

4. 樓 英 : 醫學綱目(卷四), 臺南, 北一出版社, p.11, 1993.

5. 陳 言 : 陳無擇三因方(卷十八), 臺北, 臺聯國風出版社, p.10, 1978.

6. 李 梈 : 綱註醫學入門(卷四), 서울, 大星文化社, p.429, 1990.

7. 龔廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.189~190, 1991.

8. 張介賓 : 景岳全書(下卷), 서울, 大星文化社, p.469, 1988.

9. 汪詡庵 : 醫方集解, 臺北, 文光圖書有限公司, pp.144~145, 1986.

10. 程國彭 : 醫學心悟, 香港, 友聯出版社, p.145, 1961.

11. 吳 謙 : 醫宗金鑑, 北京, 人民衛生出版社, p.1157, 1982.

12. 唐容川 : 血證論, 上海, 上海人民出版社, pp.148~149, 1977.

13. 李用粹 : 證治彙補, 臺北, 旋風出版社, p.17, 1976.

14. 沈金鰲 : 沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, p.203, 1979.

15. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, p.667, 1983.

16. 徐靈胎 : 徐靈胎醫書全集(卷二), 臺北, 五州出版社, p.53, 1980.

17. 虞天民 : 醫學正傳, 서울, 成輔社, p.156, 344, 1986.

18. 武之望 : 濟陰綱目, 서울, 柳林文化社, p.16, 1975.

19. 李中梓 : 醫宗必讀, 臺南, 綜合出版社, p.213, 1976.

20. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社,

p.85, 1996.

21. 南山堂編輯局 譯：方藥合編，서울，南山堂，pp.199~200, 1990.

22. 周命新：醫門寶鑑，서울，東洋綜合通信教育院出版部，p.77, 1987.

23. 李尙仁，安德均，辛民教，盧昇鉉，李映鍾，金先熙：漢藥臨床應用，서울，成輔社，pp.267, 354, 357~361, 1986.

24. 成輔社編輯部 編譯：天真處方解說，서울，成輔社，pp.53~55, 1995.

25. 上海中醫學院 編：方劑學，香港，商務印書館香港分館，p.171, 1983.

26. 許濟群，王綿之：方劑學，北京，人民衛生出版社，pp.250~252, 1995.

27. 游士勳，張錦清：實用中醫方劑學，臺北，樂群出版事業有限公司，pp.383~385, 1983.

28. 申天浩 編譯：問答式方劑學，서울，成輔社，pp.144~147, 1992.

29. 李尙仁，金東傑，李映鍾，盧昇鉉，朱榮丞：方劑學，서울，永林社，pp.171~172, 1990.

30. 許鴻源，許照信：圖解常用漢方方劑，臺北，華安出版社，pp.334~335, 1980.

31. 全國韓醫科大學本草學教授 共編：本草學，서울，永林社，pp.409~410, 578~582, 1991.

32. 尹吉榮：東醫臨床方劑學，서울，明寶出版社，pp.254~255, 1985.

33. 金完熙：四物湯에 對한 考察，大韓韓醫學會誌，1979;1(2):309~315.

34. 康舜洙：바른 方劑學，서울，大星文化社，pp.122~123, 1996.

35. 해리슨내과학편찬위원회 편：내과학(1권)，서울，정담，pp.1189~1192, 1997.

36. 대한병리학회：병리학，서울，고문사，pp.439~440, 445~446, 448~449, 1997.

37. 박경아 역：조직학，서울，고려의학，p.294, 1992.

38. 대한당뇨병학회 編：당뇨병학，서울，고

려의학，p.383, 1992.

39. 金東輝 外：最新診斷과 治療，서울，藥業新聞 出版局，p.90, 1985.

40. 이정수，노민희，용준환，김덕훈：인체생리학，서울，정담，pp.263~264, 1994.

41. 徐舜圭：成人病·老人病學，서울，고려의학，p.114, 120, 1992.

42. 이중달：그림으로 설명한 병리학，서울，고려의학，pp.223~224, 1990.

43. 金春元：病理學，서울，新光出版社，pp.148~150, 1996.

44. 洪茂昌：四物湯 投與가 家兔의 赤血球像에 미치는 影響에 關한 研究，慶熙大學校大學院，1977.

45. 李相弦：四物湯 構成藥物의 配合이 白鼠의 溶血性 貧血에 미치는 影響，圓光大學校大學院，1993.

46. 姜昌洙：四物湯 煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 影響，圓光大學校 韓醫科大學 學位論文集，1981;1:381~398.

47. 金世吉：四物湯이 貧血家兔의 造血效果에 미치는 影響，圓光大學校 韓醫科大學 學位論文集，1982;2:143~152.

48. 安熙惠：四物湯의 抗癌劑 副作用 抑制에 關한 實驗의 研究，慶熙大學校大學院，1995.

49. 朴鍾雲：四物湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響，圓光大學校大學院，1997.

50. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immune Methods, 1983;65:55~63.

51. Yagi, K. : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem. Med., 1976;15:212~216.

52. 張仲景：金匱要略方論，臺北，臺聯國風出版社，p.94, 1973.

53. 權在龍 : 四物湯 및 季節別 活用方이 血液에 미치는 影響, 大邱韓醫科大學大學院, 1991.
54. 咸昌植 : 四物湯과 四物湯의 季節別 倍味 및 加味方이 免疫機能과 血液에 미치는 影響, 慶山大學校大學院, 1996.
55. Harman, D. : Aging, A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 1956;11:298~300.
56. Harman, D. : The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 1981;78 : 7124~7128.
57. Fridovich, L. : The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978;201:875~880.
58. Sawada, M., and Carlson, J. C. : Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech. Age Dev.*, 1987;41:125~137.
59. Freeman, B. A., and Crapo, J. D. : Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 1982;47:412~426.
60. Hart, C. M., Tolson, J. K., and block, E. R. : Supplemental fatty acids alter lipid peroxidation and oxidant injury in endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1991;206:L481~L488.
61. Kirkland, J. B. : Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells, role of activation fo poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991;1092:319~325.
62. Furukawa, T., Kubota, T., Suto, A., Takahara, T., Yamaguchi, H., and Takeuchi, T. : Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay. *J. Surg. Oncol.*, 1991;48:188~193.
63. Mead, J. F. : Free radical mechanisms. In, *Free Radicals in Biology*, ed. by W.A. Pryor, Academic Press. New York, 1976:51~68.
64. Sevanian, A., and Hochstein, P. : Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.*, 1985;5:365~390.
65. Sevanian, A., Wratten, M. L., Mcleod, L. L., and Kim, E. : Lipid peroxidation and phospholipase A activity in libosomes composed of unsaturated phospholipids. A struvtural basis for enzyme activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 961:316~327.
66. Hochstein, P., and Jain, S. K. : Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed. Proc.*, 1981;40:183~188.
67. Hochstein, P., Jain, S. K., and Rice Evans, C. : The physiological significance of oxidative perturbation in erythrocyte membrane lipids and proteins. In, *The Red Cell, Fifth Ann Arbor Conference*, ed. by G. J. Brewer, A. R. Liss Inc., New York, 1981:499~459.
68. Nielsen, H. : Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein. III. Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids*, 1981;16:215~222.
69. Pancifici, R. E., and Davies, K. J. A. : Protein, lipid and DNA repart systems in oxidative stress, the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 1991;37:166~180.
70. Comporti, M. : Biology of disease,

lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.*, 1985;53:599~623.

71. Davies, K. J. A. : Protein oxidation, protein cross-linking and proteolysis in the formation of lipofuscin. In, *Lipofuscin 1987. State of the Art*, ed. by L. Zs Nagy, Elsevier, Amsterdam, 1988:109~133.

72. Vaca, C. E., Wilhelm, J., and Harms-Rinigdahl, M. : Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res.*, 1988;195:137~149.

73. Balla, G., Vercellotti, G. M., Muller Eberhard, U., Eaton, J., and Jacob, H. S. : Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab. Invest.*, 1991;64:648~655.

74. Li, Lin and Benjamin, H. S. L. : Protection of vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury by gypenosides. *Phytotherapy Research*, 1993;7:299~304.