

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 배양심근세포고사에 미치는 四物湯의 방어효과

박중운, 한상혁<sup>1)</sup>, 김도환<sup>1)</sup>, 문병순<sup>1)</sup>

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의학전문대학원<sup>1)</sup>

### Protective Effects of *Samul-tang* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cell Apoptosis in Cultured Cardiomyoblast Cells

Jong-Un Park, Sang-hyok Han<sup>1)</sup>, Do-hwan Kim<sup>1)</sup>, Byung-Soon Moon<sup>1)</sup>

Department of Circulatory internal medicine and Professional Graduate School of Oriental Medicine<sup>1)</sup>, Wonkwang University

**Objectives :** This study was designed to investigate the protective mechanisms of *Samul-tang* (SMT) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells.

**Methods :** The cultured cells were pretreated with SMT and exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The cell damage was assessed by using MTT assay. Also, we used Hoechst staining, Western blotting analysis.

**Results :** SMT significantly reduced both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death and chromatin fragmentation. The decrease of Bcl2 expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was inhibited by SMT. In addition, the increase of Bax expression was also inhibited by SMT. In particular, Fas expression, which is generally recognized as cell death inducing signal by Fas/FasL interaction, was markedly decreased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a time-dependent manner, whereas this decrease was completely prevented by SMT. The cotreatment of SMT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H9c2 cells also induced the phosphorylation of ERK in a time-dependent manner. Moreover, PD098059, a specific inhibitor of ERK1/2, attenuated the protective effect of SMT on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. Furthermore, the protective effect of SMT was significantly blocked by treatment of SB203580, a specific inhibitor of p38.

**Conclusions :** Taken together, this study suggests that the protective effects of the water extract of SMT against oxidative damages may be mediated by the modulation of Bcl2 and Bax expression via the regulation of ERK and p38 signaling pathway. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(4):58-68)

**Key Words:** *Samul-tang*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced, Apoptosis, Cardiomyoblast cell.

## 서론

四物湯은宋代 陳<sup>1)</sup>의《太平惠民和劑局方》에 처음

수록된 이래 역대 의가<sup>2,5)</sup>들에 의해 補血, 調血 및 活血의 기본방제로 血虛 및 血不調로 발생하는 제증을 치료하는데 사용되어 왔으며, 최근에는 심혈관계질환, 뇌혈관계질환, 부인과질환 등에 광범위하게 응용되고 있다<sup>6,7)</sup>. 최근 생활환경의 변화로 인해 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 심혈관계질환이 계속 증가하는 추세에 있으며 이러한 질환들은 결국 심장

· 접수 : 2001년 8월 17일 · 채택 : 9월 27일  
· 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대 익산한방병원 2내과  
(Tel. 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail: moonbs58@hanmail.net)

에 허혈상태를 초래하여 심근세포의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>8,9)</sup>.

허혈성 심장질환은 관상동맥의 죽상동맥경화, 대동맥 협착증, 혹은 판막질환 등의 폐색성 병변에 의해 혈류가 저류 혹은 차단되어 허혈을 야기함으로써 심근에 산소와 에너지원의 공급이 부족하게 되고 또한 허혈상태에서 발생한 비정상적인 활성산소는 세포막의 지방을 과산화 시키고 각종 효소나 단백질을 산화시켜 심근세포에 치명적인 손상을 유발하게 되므로 결국 지속적인 허혈상태는 심근괴사나 경색을 초래하여 사망까지 이르게 한다<sup>8,10)</sup>. 이러한 허혈성 심장질환은 약물이나 수술적인 요법 등으로 재관류(reperfusion)하여 혈류를 회복시켜야 한다<sup>11)</sup>. 그러나 허혈상태가 지속된 이후에 실시된 재관류 치료는 오히려 심근세포손상을 회복시키지 못하고 심근세포에서 O<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 또는 OH 등의 활성산소를 발생시킴으로써 심근세포의 손상을 초래하는 재관류손상을 유발시킨다<sup>11,12)</sup>.

따라서 血虛 및 血不調로 인한 심혈관계질환 등에 활용되는 四物湯이 심근세포의 산화적 손상에 대해 일정한 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 시행하였다.

四物湯에 관한 실험적 연구로는 造血效果<sup>13)</sup>, 혈압강하효과<sup>14)</sup>, 고점도혈증의 개선효과와 항혈전효과<sup>15)</sup>, 면역기능에 미치는 영향<sup>16)</sup>, 혈관내피손상 회복<sup>17)</sup>, 노화로 인한 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향<sup>18)</sup> 등이 보고되었으나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 배양심근세포고사에 미치는 四物湯의 방어효과에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 四物湯이 허혈상태에서 야기되는 심근세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 究明하고자 생쥐의 심장에서 분리하여 배양 심근세포주인 H9c2에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 심근세포손상에서 四物湯이 세포생존율, DNA 분절, Bcl2, Bax 및 Fas 단백질의 발현, cytochrome c 방출, p38과 ERK1/2의 저해제인 SB203580, PD98059의 영향 및 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 세포주

Embryonic rat 심장에서 유래한 H9c2(CRL1446) 심근세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

#### 2) 약제

본 실험에 사용된 四物湯은 陳師文<sup>1)</sup>의 《太平惠民和劑局方》에 기재된 내용에 의거하였으며, 약제는 원광대학교 익산한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Prescription of Samultang

韓藥名	生藥名	重量
熟地黃	Radix Rehmanniae(Rehmannia glutinosa Liboschitz)	12 g
當歸	Radix Angelicae Gigantis(Angelica gigas Nakai)	12 g
白芍藥	Radix Paeoniae(Paeonia lactiflora Pall)	8 g
川芎	Rhizoma Cnidii(Cnidium officinale Makino)	6 g
總量		38 g

#### 3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dubblecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였으며 배양용기(96-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. MTT(methylthiozyl-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), Hoechst 33342는 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하였고, SB203580, PD98059는 Calbiochem사(San Diego, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였다. Fas, p38, phospho p38, Bcl2, Bax 등의 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, U.S.A.)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하였고, anti-cytochrome c 항체는 Pharmingen사(San Diego, CA, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega사(Medison, WI, U.S.A.)에서 구입하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액조제

검액은 물을 용매로 사용한 추출방법을 이용하여 조제하였다. 음건된 四物湯 100g을 물 1 l 와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거르기로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시켜 19.0g의 시료를 얻어 세포에 투여하기 전 농도를 조정하여 사용하였다.

### 2) H9c2 심근세포주 배양

세포주는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서(37℃, 5% CO<sub>2</sub>) 10% fetal bovine serum(FBS: PAA Laboratories, Austria)이 포함된 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였다.

48시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 계대배양하면서 분주 12시간 후에 약재를 처리하여 세포 고사와 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 3) 세포생존율 측정

세포 활성도는 MTT assay<sup>19)</sup>를 이용하였다. 세포 배양판(96-well plate)에 세포( $1 \times 10^5$  세포수/ml)를 100  $\mu$ l/well씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정화 시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음, MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 1/10이 되도록 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100  $\mu$ l/well을 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 ELISA 분석기로 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co, Medison, WI, U.S.A.)를 이용하였다.

먼저 四物湯이 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 다음 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm 의 Spectrophotometer(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량 하였다. DNA 5 $\mu$ g을 1.8 % agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### 5) Hoechst staining

세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 먼저 四物湯 등으로 처리된 세포들을 4% 포르말데히드(formaldehyde) 용액에서 10분 고정시킨 후 생리식염수(PBS, pH 7.4)로 2회 세척하였고, Hoechst 33342의 염색은 생리식염수에 10 $\mu$ M이 되도록 희석하여 1시간 염색한 후 다시 생리식염수로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

### 6) Cytochrome c release 측정

세포질내 cytochrome c release는 streptolysin O를 사용하는 Barry 등<sup>20)</sup>의 방법을 약간 변형시켜 이용하였다. 먼저 적절한 시간동안 약재가 처리된 H9c2세포를 포집 한 후 cold PBS로 2회 세척하였다. 이 포집된 세포를 10<sup>6</sup> 세포당 60unit의 streptolysin O가 100  $\mu$ l의 stabilization buffer(20mM Hepes, pH7.5, 250mM sucrose, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM sodium EDTA, 1mM sodium EGTA, 1mM dithiotheritol, 0.1mM PMSF, 5 $\mu$ g/ml pepstatin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin)에 들어가도록 조정하여 37℃에서 20분간 반응 시킨 후 30분 동안 원심분리하여 cytochrome c를 함유하는 상층액 만을 얻었다. 얻어진 세포질 추출물에 2 $\times$ sample buffer를 섞어

100℃에서 3분간 끓인 후, 15% Sodium Dodesyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-

PAGE)를 시행하였다. 이후의 과정은 western blotting 과 동일한 방법을 사용하였다.

7) Western blotting analysis

배양된 H9c2 세포에 四物湯 처리 후 세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얼은 세포는 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2×sample buffer와 섞어 100℃에서 3분간 끓인 후, sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 30V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Fas, p38, phospho p38, Bcl2 및 Bax 등에 대한 항체를 Tris-buffered saline(TBS)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (TBS로 1:1000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

8) 통계처리

실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며 p-value가 최대치 0.05이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험 성적

1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 H9c2 심근세포주의 세포생존율의 변화

H9c2 심근세포에 직접적으로 산화적 손상을 일으킬 수 있는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 다양한 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포생존율을 측정한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05mM 농도에서는 H9c2 심근세포가 약 73.5%의 생존율을 나타내었고, 0.1mM의 농도에서는 약 31.8%의 생존율을 보였으며, 0.2mM의 농도에서는 약 25.6%의 세포생존율을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Effects of Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on the Viability of H9c2 Cells in a Dose Dependent Manner

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Viability (%)
0	100±10.0
0.05	73.46±7.3
0.1	31.78±3.1*
0.2	25.56±2.5*
0.4	21.24±2.0**
0.6	19.12±2.0**
0.8	18.15±1.8
1	14.97±1.5

\* p<0.001, \*\* p<0.0001 vs. control group.

2. 세포생존율에 대한 四物湯의 효과

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발된 심근세포고사에서 四物湯의 방어효과를 알아보기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1mM 이상에서 유의한 심근세포고사를 유발시켜 약 30%의 세포생존율을 보이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15mM 농도를 세포손상조건으로 결정하여 다양한 농도의 四物湯을 30분 전 처리한 후 H9c2 심근세포고사가 방지되는지를 측정할 결과 0.075mg/ml와 0.15mg/ml의 저농도 四物湯에서는 H9c2 심근세포가 약30%의 생존율을 보였으나 0.3mg/ml의 四物湯을 처리한 경우에는 약58.8%의 세포생존율을 나타내었으며, 0.6mg/ml, 1.2mg/ml의 농도에서는 각각 약89.0%, 85.3%의 생존율을 나타내

Table 2. Effects of Samul-tang(SMT) Extract on the Viability of Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in H9c2 Cells in a Dose Dependent Manner

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.15mM)	SMT(mg/ml)	Viability(%)
-	0	100±10.0
+	0	29.05±3.0
+	0.075	28.98±3.0
+	0.15	30.21±3.0
+	0.3	58.76±6.0
+	0.6	89.03±9.0**
+	1.2	85.31±8.5*

\* p<0.01, \*\* p<0.001 vs. only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group.

어 유의성 있는 생존율 증가를 나타내었다(Table 2).

3. DNA 분절에 대한 四物湯의 효과

0.15mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 직접 처리하여 세포고사를 유도한 후, 세포고사 과정에서 전형적으로 나타나는 DNA 분절현상을 관찰하고 四物湯을 다양한 농도로

30분 전 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 DNA를 추출한 다음 1.5% agarose gel electrophoresis법을 이용하여 ethidium bromide 염색을 통하여 조사하였다. 그 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM) 단독처리에 의해 초래되었던 DNA 분절현상이 四物湯 농도 의존적으로 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 1). 또한 Hoechst staining에 의한 세포의 형광 현미경하에서의 관찰에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의해 나타났던 DNA 분절(Fig. 2B)이 점차 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 2C, D). 특히, 四物湯 0.6mg/ml 처리시 DNA 분절이 사라지면서 chromatin condensation이 관찰되었고(Fig. 2C) 四物湯 1.2mg/ml 처리시에는 대조군(Fig. 2A) 수준으로 회복되었다(Fig. 2D).

4. Bcl2 및 Bax 단백질 발현에 대한 四物湯의 효과  
四物湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의해 유도된 심근세포의 산화적 손상기전에서 세포고사조절에 관여하는 Bcl2 및 Bax 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H9c2세포에 四物湯(0.6mg/ml, 1.2mg/ml)

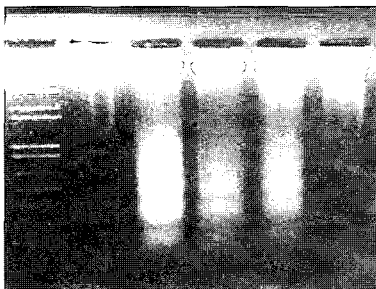


Fig.1. Agarose gel electrophoresis showed ladder pattern of DNA fragmentation.

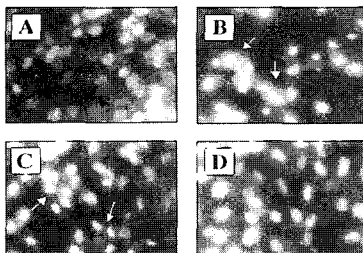


Fig.2. Hoechst staining showed DNA fragmentation and chromatin condensation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H9c2 cardiac myoblasts. A) control B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only C) with SMT 0.6mg/ml and D) with SMT 1.2mg/ml.

을 30분 전처리 한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)를 처리한 세포를 6시간 이후 포집하여 세포 파쇄액을 얻어 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착을 거친 후 Bcl2 및 Bax에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. 그 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM) 단독처리시 발현이 감소되었던 Bcl2 단백질이 四物湯 처리시 농도 의존적으로 증가하여 대조군 수준으로 회복되었으며 (Fig. 3), Bax 단백질의 경우에는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM) 처리에 의해 발현되었던 단백질의 양이 四物湯 농도에 비례하여 점차 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 4).

5. Fas 단백질의 발현에 대한 四物湯의 효과

세포고사과정에서 Fas단백질의 발현과 이에 대한 四物湯의 효과를 관찰하기 위하여 Bcl2 및 Bax에서와 동일한 과정의 실험을 시행하였다. 그 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)처리 4시간 후부터 Fas 단백질의 발현 감소가 관찰되어 6시간 이후부터는 단백질을 관찰할 수 없었다(Fig. 5). 또한 四物湯을 각각 0.6mg/ml, 1.2mg/ml의 농도로 처리하였을 경우 현저한 생존을 회복과 함께 발현이 감소되었던 Fas 단백질이 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 6).



Fig.3. Protective effect of *Samul-tang*(SMT) on decreased the expression Bcl2 protein in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated H9c2 cells.

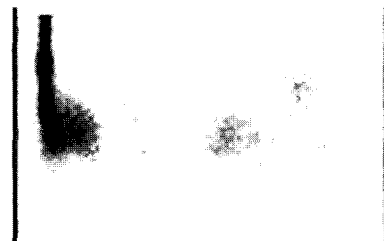


Fig.4. Protective effect of *Samul-tang*(SMT) on induced the expression Bax protein in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated H9c2 cells.

6. Cytochrome c release에 대한 四物湯의 효과

四物湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의해 유도된 심근세포의 산화적 손상기전에서 cytochrome c의 방출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.3mg/ml, 1.2mg/ml 농도의 四物湯을 전 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리, 세포질 추출액만을 얻은 후 western blotting을 통해 세포질 내 방출된 cytochrome c를 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)로 단독처리한 경우 방출되었던 cytochrome c의 양이 0.3mg/ml, 1.2mg/ml 농도의 四物湯을 전 처리한 경우에는 四物湯 농도에 비례하여 점차 감소하였다(Fig. 7).



Fig. 7. Protective effect of *Samul-tang*(SMT) on the release of cytochrome c in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated H9c2 cells.

7. 四物湯과 p38 저해제와 ERK1/2 저해제에 의한 세포생존을 변화

四物湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의해 유도된 심근세포의 산화적 손상기전에서 p38과 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 p38의 저해제로 알려진 SB203580와 ERK1/2의 저해제인 PD98059를 각각 四物湯(1mg/ml)과 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)를 처리하여 세포생존율의 변화를 측정하였다. 四物湯(1.0

mg/ml)에 의해 85.7%로 회복되었던 세포생존율이 SB203580 0.1μM 농도 처리에 의해 약 80.7%로 감소되었으며 1μM 농도 처리에 의해서는 44.9%로 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내기 시작하였으며 10μM 농도 처리시에는 약 47.1%로 세포생존율이 감소되었다(Table 3). 또한 ERK1/2의 저해제인 PD98059 5μM 처리에 의해 약 77.1%로 세포생존율이 감소되었고 10μM 농도의 처리에 의해서는 약 63.1%의 생존율을 나타내어 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내기 시작하였으며 20μM 농도 처리시에는 약 51%로 세포생존율이 감소하였다(Table 4).

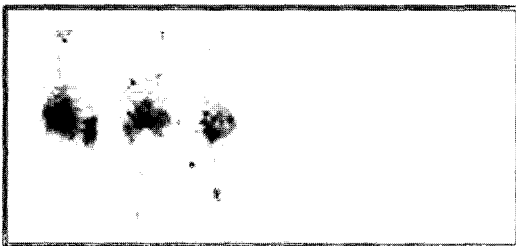


Fig. 5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced the degradation of Fas protein in a time-dependent manner

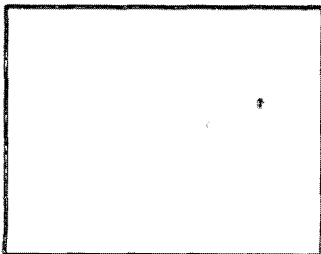


Fig. 6. Protective effect of *Samul-tang*(SMT) on degraded Fas protein in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated H9c2 cells.

Table 3. Effects of p38 Inhibitor, SB203580 and *Samul-tang*(SMT) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cell Death of H9c2

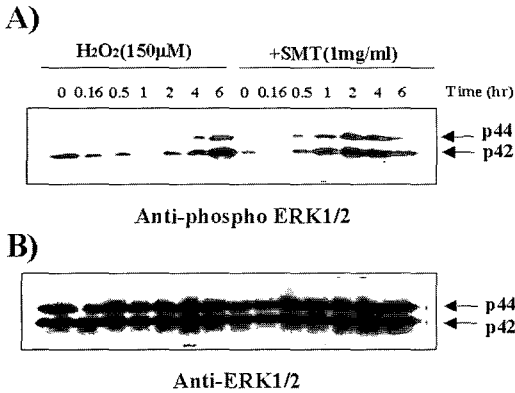
H2O2 (0.15mM)	SMT (1mg/ml)	SB203580(μM)	Viability (%)
-	-	0	100±10.0
+	-	0	31.91±3.0
+	+	0	85.65±8.5
+	+	0.1	80.73±8.0
+	+	1	44.87±4.0*
+	+	10	47.13±4.5*

\*p<0.01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SMT combined group

Table 4. Effects of ERK1/2 Inhibitor, PD98059 and *Samul-tang*(SMT) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cell Death of H9c2

H2O2(0.15mM)	SMT (1mg/ml)	PD98059(μM)	Viability (%)
-	-	0	100±10.0
+	-	0	29.15±3.0
+	+	0	87.63±8.0
+	+	5	77.09±5.7
+	+	10	63.08±6.0*
+	+	20	50.96±5.0**

\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SMT combined group



**Fig.8.** Effects of *Samul-tang*(SMT) on ERK1/2 activation on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cell death of H9c2. Cell lysates were collected, and equal amounts of protein separated by 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-phospho ERK1/2 antibody(A). The same immunoblots were stripped and reprobed with anti-ERK1/2 antibody(B).

한편, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)를 단독 처리한 경우와 四物湯(1mg/ml)을 함께 처리한 경우의 ERK1/2(p44, p42) 활성의 western blotting 비교에서는, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM) 단독 처리군에서는 6시간 이후에 ERK1/2가 활성화되어 나타났으나(Fig. 8A) 四物湯(1mg/ml)을 함께 처리한 경우에는 ERK1/2의 활성이 四物湯 처리 1시간 후부터 활성을 보이기 시작하여 2시간대에 최고치에 도달하였고 4시간 이후에는 활성이 계속 유지되었다(Fig. 8B).

### 고 찰

심혈관계질환은 전 세계적으로 자연사망의 주요한 원인 질환으로서 허혈상태에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 손상이 심혈관계 질환의 주 발생 원인 인자로 작용하고 있다<sup>10)</sup>. 이러한 활성산소는 쌍을 이루지 못한 최외각 전자를 하나 이상 보유하면서 독립적으로 존재하는 산소종(oxygen species)이라고 정의할 수 있다. 활성산소는 자외선, X-선 및 γ-선 등의 전리방사선(ionizing radiation)에 노출되거나 대기 오염물질, 발암물질 또는 활성산소를 발생시키는

Bleomycin, Adriamycin 등의 특별한 화학물질에 노출되었을 때 체내에서 발생할 수 있고, 이외에 정상적인 생체 방어작용 중에도 발생할 수 있다. 정상적인 생체 내에서는 활성화된 neutrophils, xanthine oxidase, mitochondrial respiration, 아라키돈산 대사 등의 다양한 과정을 통해서 생성되지만 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등의 생체 방어작용에 의해서 소실된다. 하지만 과도한 활성산소의 발생은 이러한 방어체계의 능력을 초과하게 되어 세포손상을 초래한다<sup>21,22)</sup>.

허혈성 심장질환은 관상동맥경화, 대동맥협착증 혹은 판막질환 등으로 심장에 일시적 혹은 지속적인 허혈(ischemia)이 야기되는 상태를 의미한다<sup>8,9,23)</sup>. 이러한 심장의 허혈상태는 심장활동의 근원인 심근세포에 산소와 에너지원의 공급이 부족하게 함으로써 일시적인 심근허혈로 인한 일과성의 통증이 나타나는 협심증을 일으키거나, 허혈의 상태가 심한 경우에는 심근의 괴사나 경색으로 진행되어 사망을 일으키기도 한다<sup>8,9,23)</sup>. 허혈상태의 심근세포는 20분 이내에 괴사가 일어나기 시작하고 허혈상태가 3시간 이상 계속되면 심근세포의 대부분에서 경색이 일어나 손상은 비가역적인 상태가 되므로 빠른 시간안에 관상혈류를 재개시켜야 한다<sup>11)</sup>. 허혈로 인한 심근세포손상은 회복이 가능한 시기에는 혈전용해약물의 투여, 경피적 경혈관 관상동맥 확장술, 관상동맥 우회술 등 내과적 혹은 외과적 방법으로 혈류를 재개시켜 줌으로써 심근세포의 대사이상 및 수축능력의 저하를 정상으로 회복시킬 수 있으며, 회복여부는 허혈의 정도나 허혈의 지속기간에 따라 영향을 받게 된다<sup>9,23)</sup>. 그러나 어느 정도 허혈상태가 지속되었을 때에는 정상 혈류를 다시 심근으로 보내어도 심근 손상이 회복되기보다는 오히려 더욱 악화되고 기능이 마비되어 임상적으로 부정맥, 심실세동, 심정지, 심근세포의 사망 등을 초래하기도 하는데 이는 재관류(reperfusion)시에 심근세포에서 O<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH 등의 활성산소가 발생하기 때문이다<sup>12)</sup>. 이러한 손상을 재관류손상(reperfusion injury), 혹은 산소재공급 손상(oxygen paradox)이라고 한다<sup>11,12)</sup>.

四物湯은 歷代 醫家<sup>1-5)</sup>들에 의해 血虛證에 대한 補血, 調血 및 活血의 기본방제로 사용되어 왔다. 특히 方<sup>2)</sup>은 補血, 和血, 調經한다고 하였으며, 汪<sup>3)</sup>은 一切의 血虛와 婦人經病을 치료한다 하였고, 趙<sup>4)</sup>는 血證의 通治方으로서 一切 血虛와 血熱, 血燥 등을 치료한다고 하였으며, 黃<sup>5)</sup>은 血病을 통치한다고 하였다.

本方은 熟地黃, 當歸, 白芍藥, 川芎으로 구성되어 있으며 熟地黃은 滋陰補血하는 효능이 있으며<sup>3,24)</sup> 심혈관계와 관련된 약리작용으로는 소량으로는 혈관수축, 대량으로는 혈관확장작용을 나타내며<sup>25)</sup>, 강심작용<sup>25,26)</sup>과 혈압강하, 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 작용<sup>25)</sup> 등이 있다. 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하는 효능이 있으며<sup>3,24)</sup> 약리작용은 비타민 B12, 니코틴산, 엽산 등을 함유하고 있어 조혈작용을 통한 항빈혈효과를 가지며 혈압강하 작용<sup>25,26)</sup>, 혈소판 응집억제 작용, 말초혈관확장작용, 혈중 콜레스테롤 저하 및 관상동맥혈류량 증가작용 등이 있다<sup>25)</sup>. 白芍藥은 養血斂陰, 柔肝止痛, 溫中收汗하는 효능이 있으며<sup>3,24)</sup> 약리작용으로는 관상혈관과 말초혈관을 확장시키며 혈압을 강하시키고<sup>25,26)</sup> 혈소판응집을 억제하는 작용 등이 있다<sup>25)</sup>. 川芎은 活血行氣, 祛風止痛하는 효능이 있으며<sup>24)</sup> 약리작용으로는 심근수축력을 증가시키고 심박수를 저하시키며 관상동맥 혈류량을 개선시키고 혈관확장작용과 혈압강하<sup>25,26)</sup>, 혈소판응집을 억제하며 혈중콜레스테롤 저하 및 동맥경화를 억제하는 작용 등이 있다<sup>26)</sup>. 따라서 四物湯은 補血, 調血, 活血의 기본方劑로 血虛證으로 인한 심혈관계질환 등에 광범위하게 응용되고 있다<sup>6,7)</sup>.

이에 저자는 四物湯이 H9c2 심근세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도되는 세포독성<sup>27)</sup>에 미치는 영향과 그 기전을 究明하고자 생쥐의 심장에서 분리하여 배양 심근세포주인 H9c2에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 심근세포손상에서 四物湯이 세포생존율, DNA 분절, Bcl2, Bax 및 Fas 단백질의 발현, cytochrome c 방출, p38과 ERK1/2의 저해제인 SB203580, PD98059의 영향 및 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

H9c2 심근세포에 직접적으로 산화적 손상을 일으킬 수 있는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 다양한 농도별로 처리하여 세포

생존율의 변화를 측정된 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 농도의존적으로 세포생존율이 감소하였으며, 특히, 0.1mM이상의 고농도에서는 약 70% 이상의 세포 생존율 감소가 관찰되었다.

따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발된 심근세포고사에서 四物湯의 방어효과를 조사 한 결과 0.3mg/ml의 四物湯을 전처리 하였을 경우 약 25% 이상의 생존율 증가를 보였고, 0.6mg/ml 이상에서는 85% 이상으로 세포 생존율이 회복되어 四物湯의 방어 효과를 확인할 수 있었다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도되는 H9c2 심근세포죽음이 DNA의 분절을 보이는 세포고사(apoptosis)에 의한 것임은 이미 보고되어 있으며<sup>28)</sup> 저농도의 활성산소에 의해서는 세포고사의 전형적인 특징인 DNA의 분절이 보고되었다<sup>27,29)</sup>.

따라서 四物湯이 세포고사과정에서 DNA 분절 현상에 미치는 영향을 관찰 한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15mM) 단독처리에 의해 초래되었던 사다리형의 DNA 분절현상이 四物湯 전처리에 의하여 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 또한 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 형광현미경으로 관찰한 결과에서도, DNA 분절현상이 四物湯 전처리에 의하여 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다.

세포고사를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암 유발 유전자 산물의 하나인 Bcl2는 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포 증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절, 즉 세포의 고사를 억제(anti-apoptotic)하는 기능이 있다<sup>30)</sup>. 한편 Bcl2 family에 속하는 Bax 단백질은 세포 고사를 촉진(pro-apoptotic)시키는 단백질로 처음 밝혀졌으며 Bcl2와의 hetero 혹은 homodimer를 형성함으로써 세포 고사의 조절에 깊이 관여하고 있다고 알려져 왔다<sup>18,31)</sup>.

따라서 四物湯이 Bcl2 및 Bax의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM) 단독으로 다양한 시간동안 처리하여 시간 의존적인 Bax의 발현 증가와 Bcl2의 발현 감소를 관찰하여 발현의 최대 시간을 6시간으로 결정하고 실험을 시행한 결과,



Bcl2 단백질이 四物湯 전처리에 의해 농도 의존적으로 증가하였고, 또한 Bax 단백질의 경우에는 四物湯 전처리에 의해 농도의존적으로 점차 감소되는 것을 확인하였다. 결과적으로 四物湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도성 H9c2 심근세포에서 세포고사를 억제하는 Bcl2 단백질과 세포고사를 촉진하는 Bax 단백질의 발현을 조절하여 세포고사를 억제시키는 것으로 나타났다.

Fas는 Fas-L에 결합함으로써 세포의 고사를 유발시킨다고 알려진 세포막의 단백질이다. Fas는 UV irradiation, 바이러스 감염, wild-type p53, hypoxia 등에 의해 림프구 및 hepatocytes 등에서 발현되어 진다. resting 상태의 림프구는 Fas의 발현이 낮거나 없는 상태이며 세포의 활성화시 발현이 증가되어 Fas-FasL 매개성 세포고사를 촉진시키게 된다<sup>32,33</sup>.

이러한 산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포죽음 과정에서 Fas단백질의 발현과 이에 대한 四物湯의 효과를 관찰하기 위하여 Bcl2 및 Bax에서와 동일한 과정의 실험을 시행하였다. 그러나 Fas-L에 결합함으로써 세포의 고사를 유발시킨다고 알려진 세포막 단백질인 Fas 단백질의 발현 양상은 특이하였다. H9c2 심근세포를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)로 처리한 다음 다양한 시간 동안 Fas 단백질의 발현양상을 관찰한 결과, Fas 단백질의 발현이 4시간 이후에 감소하기 시작하여 6시간 이후에는 완전히 사라졌다. 그러나 四物湯 전처리시에는 농도의존적인 세포생존을 회복과 비례하여 Fas 단백질의 발현도 대조군 수준으로 회복되었다. 이러한 결과는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도성 세포고사과정에서 Fas의 역할에 대한 추가적인 연구의 필요성을 시사한다.

Cytochrome c는 정상적으로는 mitochondria의 intermembrane space에 존재하여 respiratory chain에서의 전자전달자의 역할을 수행한다<sup>34</sup>. 그러나 apoptotic signal 자극 등에 의한 mitochondria의 membrane permeability potential의 변화가 야기되면 cytochrome c가 초기에 세포질로 방출되며 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, dATP 등과 함께 complex를 형성하여 caspase-9을 활성화시킨다<sup>34</sup>. 이러한 cytochrome c의 방출기전에 대한 것은 아직 충분히 밝혀져 있지 않지만 방출을 저해하는 Bcl2 및 Bcl-

XL 과 방출을 촉진하는 Bax 등에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있다<sup>34</sup>.

따라서 四物湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의해 유도된 심근세포의 산화적 손상기전에서 cytochrome c의 방출에 미치는 영향을 조사한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)로 단독 처리한 경우에 방출되었던 cytochrome c의 양이 四物湯을 전 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우에는 四物湯 농도의존적으로 점차 감소하였다.

MAPK는 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막에서 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호 전달계이다. 포유동물에서 MAPK는 지금까지 3가지 (ERK, JNK/SAPK, p38) 이상이 발견되어 이들이 family를 이루고 있다<sup>35</sup>. MAPK는 MAPKKK→MAPKK→MAPK로 연결된 protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후, 여러 가지의 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포반응을 유발한다<sup>36</sup>. 성장 인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고 자외선 등의 스트레스, 그리고 TNF 등의 염증성 사이토카인은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화한다<sup>37,38</sup>. 그러나 이 경로들은 완전히 독립된 것이 아니어서, 자극이나 세포의 종류에 따라서 여러 가지의 MAPK가 서로 다른 정도로 활성화되고, 이에 따라 서로 다른 기질을 서로 다른 정도로 인산화함으로써, 다양한 신호에 따르는 세포 반응의 특이성을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>37</sup>.

따라서 四物湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의한 심근세포의 산화적 손상기전에서 p38과 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 p38의 저해제로 알려진 SB203580와 ERK1/2의 저해제인 PD98059를 각각 四物湯(1mg/ml)과 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)를 처리하여 세포생존율의 변화를 측정하였다. 그 결과 四物湯에 의해 회복되었던 세포생존율이 SB203580 농도의존적으로 세포생존율 감소가 관찰되어 四物湯이 p38의 활성화와 세포생존에 밀접한 관련이 있음을 보여 주고 있다. 또한 ERK1/2의 저해제인 PD98059 농도의존적으로 세포생존율이 감소되는 것으로 관찰되어 四物湯의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 심근세포고사에 대한 방어효과가 저해되는 것을 확인하였다.

또한 Western blotting을 통해 ERK1/2(p44, p42)의 활성을 확인한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.15mM)에 의해 일어나는 H9c2 심근세포고사에서는 6시간 이후에 ERK1/2가 활성화되어 나타났으나 四物湯을 전처리한 경우에는 ERK1/2의 활성이 四物湯 처리 1시간 후부터 활성을 보이기 시작하여 4시간 이후에도 활성이 계속 유지되어 四物湯에 의한 세포생존의 기전이 ERK1/2의 활성화 경로와 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 0.1mM 이상의 농도에서부터 심근세포에 급격한 독성을 나타내기 시작하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15mM의 농도로 유도된 심근세포 독성에 대하여 四物湯은 0.6mM 농도에서부터 분명한 세포생존을 증가와 함께 DNA 분절과 chromatin의 응축을 억제시켜 심근세포고사에 대한 뚜렷한 방어작용을 나타내었다. 또한 이러한 심근세포손상에 대한 四物湯의 방어기전은 Bcl2의 발현 증가, Bax와 Fas 단백질의 발현 감소, cytochrome c의 방출억제, p38과 ERK1/2의 활성화를 통하여 산화적 손상에 대한 방어작용을 나타낸 것으로 사료된다.

따라서 四物湯은 허혈상태에서 야기되는 심근세포의 산화적 손상에 대한 보호제로서 유효하게 활용될 수 있을 것으로 보이며 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

허혈상태에서 야기되는 심근세포의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 손상에 대한 四物湯의 방어효과를 究明하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 심근세포주인 H9c2의 세포고사에서 四物湯을 처리한 후 세포생존율, DNA 분절, Bcl2, Bax 및 Fas 단백질의 발현, cytochrome c 방출, p38과 ERK1/2의 저해제인 SB203580, PD98059의 영향, ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 四物湯은 0.3mg/ml 이상의 농도에서 농도의존적으로 세포생존율을 회복시켰다.
2. 四物湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 증가된 DNA의 분절과

chromatin의 응축현상을 억제하였다.

3. 四物湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 감소된 Bcl2 단백질을 농도 의존적으로 증가시켰다.
4. 四物湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 증가된 Bax 단백질을 농도 의존적으로 감소시켰다.
5. 四物湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 감소된 Fas 단백질을 농도 의존적으로 증가시켰다.
6. 四物湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 증가된 cytochrome c를 농도 의존적으로 감소시켰다.
7. 四物湯은 p38과 ERK1/2의 활성화를 통하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포고사를 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 四物湯은 허혈상태에서 야기되는 심근세포의 산화적 손상에서 DNA의 분절과 chromatin의 응축을 억제시켰으며 세포고사성 단백질의 발현조절을 통하여 방어효과를 나타내므로 허혈성 심장질환 등의 심혈관계질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社. 1975:242.
2. 方 廣. 新編丹溪心法附餘. 下卷. 서울:大成文化社. 1993:702-3.
3. 汪 昂. 醫方集解. 서울:大成文化社.1984:256-63.
4. 趙世衡. 素虛後世處方學. 서울:癸丑文化社. 1984:35.
5. 黃度淵. 證脈 方藥合編. 서울:南山堂. 1995:199-200.
6. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울:名寶出版社. 1992:254-63.
7. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂. 1998:163-70.
8. 醫學教育硏修院. 가정의학. 서울:서울대학교 출판부. 1996:295-319.
9. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울:도서출판정당. 1997:1157-65.
10. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. Oxidative stress and heart failure. Mol Cell Biochem. 1995;147:77-81.
11. 김현. 허혈성 전처치에 의한 심장보호 효과에 관한 연구. 중앙대학교 대학원. 1996.

12. Kloner RA, Przyklen K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation*. 1989;80:1115-27.
13. 홍무창. 四物湯 투여가 家兔의 赤血球像에 미치는 영향에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1978;1:117-20.
14. 姜昌洙. 四物湯 煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1984.
15. 權在龍. 四物湯 및 季節別 活用方이 血液에 미치는 影響. 대구한의과대학 대학원. 1988.
16. 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. 경산대학교 대학원. 1993.
17. 南昌圭. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 1999;20(1): 83-98.
18. 박종운, 이기상, 문병순. 四物湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 1998;19(1):185-201.
19. Kim YM, Talanian RV and Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase-3 like activity via distinct mechanism. *J Biol Chem*. 1997;72:311-338.
20. Heibein JA, Barry M, Motyka B, Bleackley RC. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ ) and cytochrome c release are caspase independent. *J Immunology* 1. 1999;163(9):4683-93.
21. Halliwell B and Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In *Free radicals in biology and medicine*. 2nd Ed. Clarendon Press. Oxford. 1989:22-31.
22. Shlafer M, Myers CL, Adkins S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19:1195-206.
23. 서울대학교 의과대학. 심장학. 서울. 서울대학교 출판부. 1994:247-57.
24. 백승희. 四物湯과 血概念의 關係. 대한한방부인과학회지. 1998;11(1): 31-47.
25. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 완역 중약대사전. 서울: 도서출판정담. 1998:169-71, 1160-2, 4841-3, 5259-61.
26. 김형균, 김형민, 송봉근, 이언정, 정현택. 한약의 약리. 서울:고려의학. 2000:90-1, 240, 285-7, 323.
27. Wu ML, Tsai KL, Wang SM, Wu JC, Wang BS, Lee YT. Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced intracellular acidification in cultured rat cardiac myoblasts. *Circ Res*. 1996;78(4):564-72.
28. Chen QM, Tu VC, Wu Y, Bahl JJ. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2000;373(1): 242-248.
29. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993;14: 126-130.
30. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide role of Bcl-2 and caspases. *CMLS*. 1998;54:427-445.
31. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 1982;17:229-259.
32. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem*. 1998;254:439-59.
33. Williams GT. Programmed cell death. apoptosis and oncogenesis. *Cell*. 1991;45: 1097-8.
34. Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC 3rd, Nunez G. ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. *Circ Res*. 1999;85(12):e70-77.
35. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinase. proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(13):5889-992.
36. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K. Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase c $\zeta$  during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem*. 2000;275(26):19921-7.
37. Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(8):1651-1664.
38. Xia Z, Dickens M, Raingaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-1331.