

丹川丸이 Hydrogen Peroxide에 의한 심근세포 독성에 미치는 영향

나영훈 · 박상범 · 정승원 · 윤종민 · 이 인¹ · 문병순*

원광대학교 한의학 전문대학원, 1: 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실

Effects of *Dancheonhwan* on Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyoblasts

Yeong Hun Na, Sang Beom Bak, Seung Won Jeong, Jong Min Yun, In Lee¹, Byung Soon Moon*

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The water extract of *Dancheonhwan* (DCH) has been used to treat ischemic brain and heart damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of DCH rescues cells from ischemic damage. Therefore, this study was designed to investigate the protective mechanisms of DCH on the H₂O₂-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. Treatment of H₂O₂ markedly decreased the viability of H9c2 cardiomyoblast in a dose-dependent and time-dependent manner. The nature of H₂O₂-induced toxicity of H9c2 cells resulted from apoptotic death confirmed with genomic DNA fragmentation. DCH increased the viability of H₂O₂-treated H9c2 cells by about 23%, and partially suppressed the genomic DNA fragmentation and PARP cleavage. H₂O₂ also activated caspase-3 protease and -9 protease, but not both caspase-6 protease and -8 protease. H₂O₂ induced the mitochondria dysfunction, including mitochondria membrane permeability transition (MPT) and cytosolic release of cytochrome c from mitochondria, which was prevented in part by pretreatment of DCH. N-acetylcystein (NAC), a free-radical scavenger, alone increased the viability of H₂O₂-treated H9c2 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, the combination of NAC with DCH significantly increased the viability of the H₂O₂-treated H9c2 cells in a dose-dependent manner. These data indicate that DCH has the protective effect on ROS-induced apoptosis of cardiomyoblast H9c2 cells.

Key words : *Dancheonhwan*(丹川丸), Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis, H9c2 Cardiomyoblasts

서 론

丹川丸은 원광대학교 부속 익산한방병원 처방모음집¹⁾에 수록된 처방으로서 丹蔘과 川芎으로 구성되어 있으며 허혈성 뇌혈관질환과 심혈관질환 등의 예방 및 치료제로 활용하고 있다.

丹蔘은 性味が 苦, 微寒, 無毒하고, 心 · 心包 · 肝 三經에 작용하여 活血調經 · 行血 · 祛瘀 · 涼血消癰 · 生新血 등의 효능이 있으며, 血滯經閉, 血虛血瘀, 癥瘕積聚, 心悸失眠, 血邪心煩 등의 병

증을 치료한다²⁻¹⁰⁾. 川芎은 性味が 辛, 溫, 無毒하고, 肝 · 膽 · 心包 三經에 작용하여 活血行氣 · 開鬱 · 養新血 · 祛風止痛 등의 효능이 있으며, 男婦一切血病, 氣鬱血鬱, 肢體麻痺, 一切心痛 등의 병증을 치료한다²⁻¹⁰⁾. 따라서 丹川丸은 活血祛瘀 · 行氣止痛 등의 효능이 있어 瘀血로 인한 각종 질환과 허혈성 뇌혈관질환 및 심혈관질환에 多用되고 있다.

전 세계적으로 자연 사망의 주요 원인인 심혈관계 질환의 발병인자에 관한 연구에서 허혈상태시 발생하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 주된 인자로 작용하고 있는데, superoxide (O²⁻), hydroxy radical (OH) 및 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 포함하는 ROS는 세포고사(apoptosis)와 세포괴사

* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원

· E-mail : mbs@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-2264

· 접수 : 2004/03/19 · 수정 : 2004/04/22 · 채택 : 2004/05/21

(necrosis)를 유발하며, 심혈관계 질환의 발병에도 세포고사가 일어난 세포에서 과량의 ROS가 생성되고, 항산화제는 세포고사를 억제하고 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 허혈로 인한 심근세포 손상을 방지하기 위해서는 산화적 손상에 의한 심근세포 독성에 효과적인 약물의 개발 연구가 진행되어야 한다.

丹蔘과 川芎에 대한 실험적 연구로는, 丹蔘의 항산화 효과¹¹⁾, 암세포에 대한 세포독성과 세포고사를 통한 항암효과¹²⁾, 고지혈증 및 죽상 동맥경화증의 억제효과¹³⁾, 川芎의 혈전증 및 고점도 혈증 억제효과¹⁴⁾, 등이 보고되었고, 丹川丸에 대한 실험적 연구로는, 사람 뇌세포의 산화적 손상에 대한 보호효과가 보고¹⁵⁾되었다.

이에 저자는 活血祛瘀, 行氣止痛의 효능으로 허혈성 심혈관 질환의 치료에 활용되고 있는 丹川丸이 허혈상태의 심근세포에서 발생하는 산화적 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 랫트의 배아(embryo) 유래 심근 세포주인 H9c2 세포에 ROS인 H₂O₂를 처리하여 ROS에 의한 세포독성을 관찰하였으며, H₂O₂에 의한 세포독성에 대한 丹川丸의 효과와 기전을 연구하기 위하여, 丹川丸을 전처리한 후 세포 생존율, DNA 분절, PARP 분절, caspase-3 protease와 caspase-9 protease의 활성화, 미토콘드리아 막전위 변화, cytochrome c의 방출에 미치는 영향을 관찰하고 항산화제인 NAC을 이용하여 표적 분자를 탐색하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

H9c2 (CRL1446)는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험하였다.

2) 약제

이 실험에 사용된 丹川丸의 처방내용은 원광대학교 부속 익산한방병원 처방모음집¹⁾에 의거하였으며, 약제는 원광대학교 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였고, 한 첩 분량은 다음과 같다.

Table 1. 丹川丸의 處方構成 (Prescription of Dancheonhwan)

한약명	생약명	중량 (g)	%
丹蔘	Saivae miltiorrhizae Radix	10.00	50
川芎	Cnidii Rhizoma	10.00	50
Total amount		20.00	100

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 Duplecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아혈청(fetal bovin serum; FBS)은 GIBCO BRL사 (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하였다. MTT (methylthiozyl-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)와 기타 시약은 Sigma사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Cytochrome c와 PARP 등에 대한 항체는 Santa Cruz사 (San Diego, CA, USA)에

서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (HRP)와 Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)는 Amersham사 (Buckingham, England)에서 구입하였으며, Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega사 (Medison, WI)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

실험에 사용된 약제는 물을 용매로 추출하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물은 丹川丸 100g을 물 1ℓ와 함께 환저 플라스크에서 3시간 가열한 다음, 거즈로 여과한 수용액을 3,200rpm으로 20분 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 상층액을 농축기(rotary evaporator)로 농축한 다음 12시간 이상 동결 건조하였다. 최종적으로 동결 건조된 20.0g 시료를 얻었고 100mg/ml의 농도로 DMSO로 용해하여 본 실험에 사용하였다.

2) H9c2 심근 세포주 배양

H9c2는 10% 우태아혈청이 함유된 DMEM 배지로 CO₂ 세포 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 계대 배양하였다. 계대 배양한 세포를 분주하고, 12시간 후에 약제를 처리하여 본 실험에 사용하였다.

3) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포 배양판 (24-well plate)에 세포(1×10⁵세포수/ml)를 1ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기에서 배양한 후 시료를 각각의 실험조건에 합당하게 처리하였다. 각각의 배양 세포에 MTT 용액 (5mg/ml in PBS)을 배양액의 1/10을 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100μl/well을 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 분광 광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 실험군과 대조군의 결과를 백분율로 산정하였다.

4) DNA 추출 및 전기영동

배양된 세포로부터 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 배양된 세포는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척 후 수거하여, nuclear lysis buffer (100mM NaCl₂, 40mM Tris-Cl, pH 7.4, 20mM EDTA, 0.5% SDS)로 용해한 후 RNase를 37°C에서 30분 반응시켰다. 이 세포 용해액은 단백질 침전용 완충용액을 첨가하여 단백질을 제거하고, isopropanol로 탈수 침전시킨 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조기로 건조하였다. 분리된 DNA는 TE 완충용액 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)을 첨가하여 DNA를 완전히 용해한 다음 DNA 5μg을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색, UV 등을 이용하여 DNA 분절을 관찰하였다.

5) 미토콘드리아 막전위 측정

미토콘드리아 막전위 변화는 JC-1 염색시약을 이용하여 관찰하였다. 염색방법을 요약하면, 배양된 세포는 JC-1(2μg/ml)을

부가하여 세포 배양기에서 30분 반응시켰다. 염색 후 세포는 PBS로 세척하고 형광현미경 (Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다. JC-1은 100×의 농도로 에탄올에 희석한 후 최종농도가 2 µg/ml가 되도록 하여 사용하였다.

6) Caspase계 cystein protease 활성화 측정

H9c2 세포 (1×10⁶)를 PBS로 세척한 후 4°C에서 15분 lysis buffer (1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 10mM Tris/HCl, pH 8.0, 5mM EDTA, 2mM dithiothreitol[DTT], 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin)로 용해하고, 13,000rpm으로 15분 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid (BCA, Sigma Co. MO, USA)법으로 단백질을 정량하고, 분석 완충용액 (100mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% Chaps, 2mM DTT, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시킨 후 Fluorometer (Molecular Devices Co, USA)로 형광의 밝기를 측정하였다. Caspase-3 protease와 caspase-9 protease의 효소적 활성 측정은 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylco-umarin (AMC, Calbiochem Co. CA, USA)과 Ac-LEHD-AFC 50µM을 이용하였고, 이들 형광기질의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380nm, 400nm)와 emission wavelength (460nm, 505nm)를 사용하였다.

7) Western blot analysis

배양된 H9c2 세포는 PBS로 2회 세척한 후 수거하였다. 각 세포는 70µl 파쇄용액 (50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin)을 첨가하여 4°C에서 30분 반응시키고, 13,000rpm에서 20분 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액의 단백질은 BCA 법으로 정량하고, 동량의 단백질을 2×sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분 가열한 후 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동한 후 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하로 2시간 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시키고, TBS-T 완충용액으로 세척한 후 PARP 및 cytochrome c에 대한 항체를 0.01% (v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응시켰다. Blot을 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시킨 후 TBS로 3번 세척하고 ECL kit를 이용하여 ECL 필름에 감광시켰다.

8) 통계처리

실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 세포독성

ROS는 여러 종류의 세포에서 세포고사를 유도하는 것으로

밝혀져 있다. 따라서 ROS 생성물질인 H₂O₂를 H9c2 세포에 농도별로 12시간 처리한 후 H₂O₂에 의한 세포독성을 MTT 분석법으로 확인하였다. H₂O₂를 10, 50, 100 및 250µM씩 처리하여 심근세포의 생존율을 관찰한 결과, 각각 88±1.3%, 75±3.2%, 56±7.9% 및 33.8±6.4%로 처리한 농도에 의존적으로 세포독성을 나타냈으며, 250µM 이상의 농도에서는 약 30% 세포 생존율을 나타내었다 (Fig. 1A). H₂O₂에 의한 세포독성을 시간별로 알아보기 위하여 250µM H₂O₂를 시간별로 처리한 후 세포 생존율을 MTT 분석법으로 조사하였다. 250µM H₂O₂를 처리한 4시간까지는 86.2±8.3%의 생존율을 보였으나, 12시간 실험군의 생존율은 29.9±4.5%로 시간 의존적으로 감소하였다(Fig. 1B).

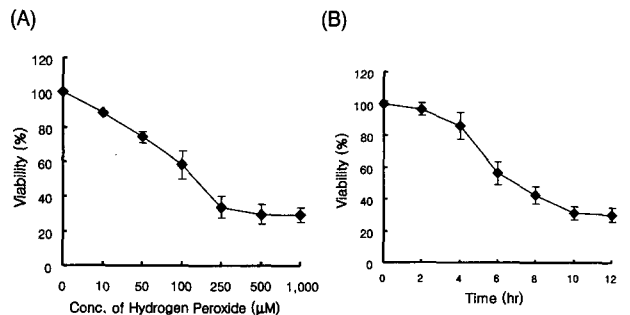


Fig. 1. H₂O₂ induced the cytotoxicity of H9c2 cells in a dose-dependent (A) and time-dependent manner (B). Cell viability was measured by MTT assay. Results are expressed as mean±standard deviation (S.D.) of triplicates.

2. 丹川丸이 H₂O₂에 의한 세포독성에 미치는 영향

丹川丸이 H9c2 심근세포에서 H₂O₂에 의한 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 丹川丸을 농도별로 2시간 전처리하고 250µM H₂O₂를 처리한 후 심근세포의 생존율을 MTT 분석법으로 확인하였다. 丹川丸 1,000µg/ml을 단독으로 처리한 실험군은 98.7±3.2%의 생존율로 현저한 세포독성을 관찰할 수 없었다. 丹川丸을 100, 250, 500 및 1,000µg/ml의 농도로 2시간 전처리한 후 H₂O₂를 12시간 처리한 H9c2 세포의 생존율은 각각 31.5±5.1, 32.5±7.3, 34.9±6.4, 그리고 41.6±7.3%로서 대조군에 비교하여 현저히 감소하였다(Fig. 2). 이 결과는 250µM H₂O₂가 심근세포에 매우 높은 수준으로 빠르고 심한 세포독성을 유도하여 丹川丸의 ROS에 대한 심근세포 보호효과가 미약한 것으로 판단되었다.

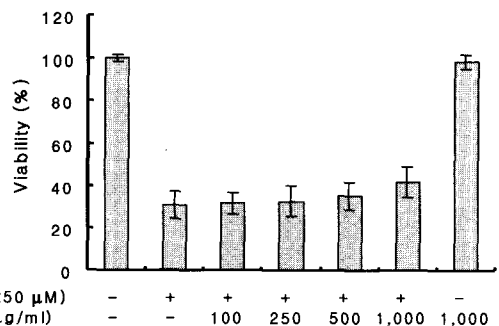


Fig. 2. Effect of *Dancheonhwan* on the H₂O₂-induced cytotoxicity of H9c2 cells. Cells were pretreated with *Dancheonhwan* for 2 hrs and followed by the addition of H₂O₂ for 12 hrs. Cell viability was determined with MTT. Results are expressed as mean±S.D. of triplicates.

따라서, 세포고사를 약 50% 유발할 수 있는 낮은 농도의 H₂O₂ 처리군에서 丹川丸의 보호효과를 알아보려고 H₂O₂ 농도를 세분하여 세포고사를 유도하고, 이때 丹川丸의 보호효과를 조사하였다. H9c2 세포에 H₂O₂를 100, 150, 200 및 250μM로 처리한 12시간 후, 세포의 생존율을 MTT 분석법으로 알아본 결과, 각각 60.5±4.6%, 54.2±5.3%, 47.5±2.6% 및 32.8±5.9%로 나타났다(Fig. 3). 이 결과에서 약 50%의 세포 생존율을 보이는 200μM H₂O₂를 실험 조건으로 결정하였다.

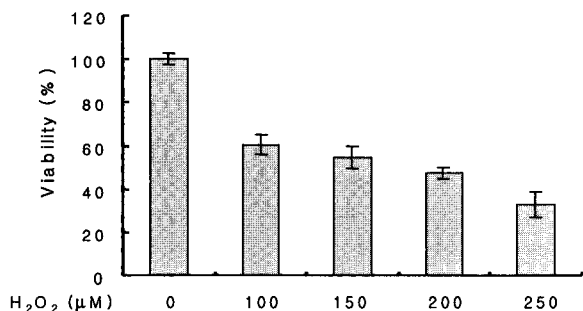


Fig. 3. H₂O₂ decreased the viability of H9c2 in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of H₂O₂ for 12 hrs, and cell viability was determined by MTT assay. Results represent as mean±S.D. of triplicates.

H₂O₂를 단독으로 200μM 처리한 12시간 후에 세포의 생존율은 46.5±5.2%로 나타났으나, 丹川丸을 250, 500, 및 750μg/ml의 농도로 2시간 전처리한 후 200μM H₂O₂를 12시간 처리한 심근세포의 생존율은 각각 47.8±6.2, 51.7±4.8 및 58.3±3.8%로 생존율이 증가하였으며, 특히 丹川丸 1,000μg/ml 농도에서 생존율은 69.3±2.8%로 약 23% 정도 증가하여 丹川丸이 H₂O₂에 의한 산화적 손상으로부터 H9c2 세포를 보호함을 알 수 있었다(Fig. 4).

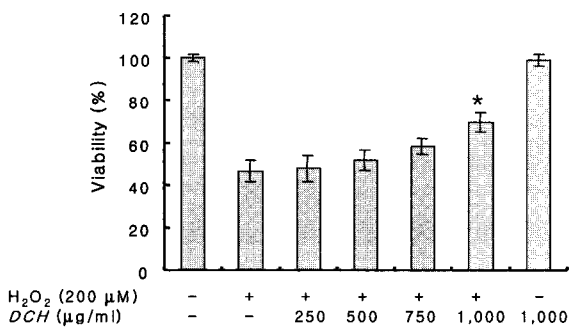


Fig. 4. *Dancheonhwan* prevented the H₂O₂-induced cytotoxicity of H9c2 cells. Cells were pretreated with *Dancheonhwan* for 2 hrs and followed by treatment of H₂O₂ for 12 hrs. Cell viability was determined by MTT assay. Results represent as mean±S.D. of three independent experiments. *P<0.05 by student's t-test, compared to the H₂O₂-treated cells.

3. 丹川丸이 H₂O₂에 의한 DNA 분절에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 H9c2세포의 세포독성과 이에 대한 丹川丸의 보호 기전을 구명하기 위하여, 1,000μg/ml 丹川丸을 2시간 전처리한 실험군과 200μM H₂O₂를 단독 처리한 실험 대조군의 genomic DNA를 추출하여 분절 정도를 비교하였다. H₂O₂를 단독 처리한 실험 대조군에서 DNA 분절은 4시간부터 시간 의존적으로 증가하였고(Fig. 5A), 丹川丸을 2시간 전처리한 후 H₂O₂를

12시간 처리한 세포주의 DNA 분절은 감소하였다(Fig. 5B).

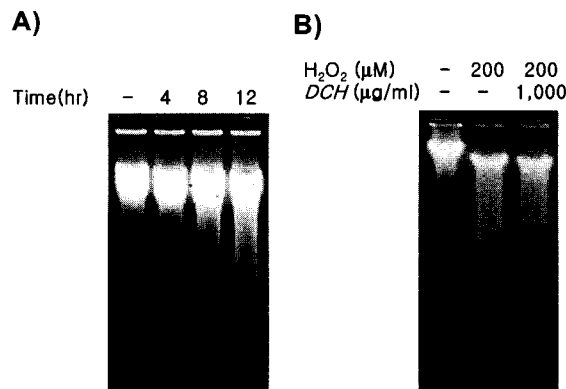


Fig. 5. *Dancheonhwan* partially inhibited genomic DNA fragmentation of H9c2 cells by H₂O₂. H₂O₂ induced the genomic DNA fragmentation of H9c2 cells in a dose-dependent manner (A). *Dancheonhwan* protected cells from the H₂O₂-induced genomic DNA fragmentation. Cells were pretreated with and without *Dancheonhwan* for 2 hrs before treatment of H₂O₂ for 12 hrs (B). Genomic DNA from cells was isolated, subjected on 1.5% agarose gel, and visualized under UV light.

4. 丹川丸이 H₂O₂에 의한 PARP 분절에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 genomic DNA 분절에 관여하는 caspase-3 protease의 활성을 확인하기 위하여 그 기질인 PARP 분절 여부와 이에 대한 丹川丸의 영향을 조사하고자, 200μM H₂O₂만을 단독 처리한 대조군과 1,000μg/ml 丹川丸을 전처리한 후에 H₂O₂를 처리한 실험군의 PARP 분절을 Western blot 분석법으로 비교 분석하였다. H₂O₂ 단독 처리에 의하여 PARP 분절은 4시간부터 진행되어 8시간과 12시간 처리군에서의 모든 PARP는 분절되었다. 그러나 丹川丸을 전처리한 실험군의 PARP 분절은 4시간에 감소하기 시작하여 8시간과 12시간 실험군 모두에서 대조군과 비교하여 현저한 감소를 나타냈다(Fig. 6).

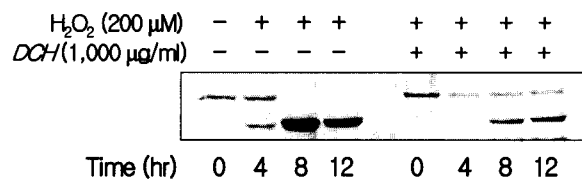


Fig. 6. *Dancheonhwan* partially protected the H₂O₂-induced PARP cleavage of H9c2 cells. Cells were pretreated with *Dancheonhwan* for 2 hrs before treatment of H₂O₂ for 12 hrs. Protein extracted from each cells was fractionated in 10% SDS-polyacrylamide gel and then subjected to Western blot analysis with anti-PARP antibody.

5. 丹川丸이 H₂O₂에 의한 caspase 활성화에 미치는 영향

1) 丹川丸이 H₂O₂에 의한 caspase-3 protease 활성에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 세포고사에서 effector caspase로서 caspase-3 protease와 caspase-6 protease의 관련성을 알아보기 위하여, caspase-3 protease와 caspase-6 protease의 형광 기질을 이용한 효소 활성도 분석법으로 caspase 활성을 조사하였다. H₂O₂(200μM)를 단독 처리한 H9c2 세포의 caspase-6 protease 활성은 유의한 변화가 없었으나, caspase-3 protease의 활성은 2시간 후에 1.8±0.53배 증가하였고, 6시간 후에 최고치인 6.9±0.59배로 증가하였다가 점차 감소하였다(Fig. 7).

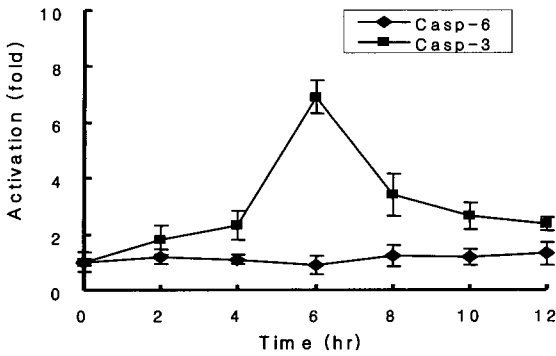


Fig. 7. H₂O₂ induced the activation of caspase-3 protease. Cells were treated with H₂O₂(200μM) for the indicated time periods. Caspase activity from the lysate was determined by using fluorogenic tetrapeptide as a substrate. Data represent mean±S.D. of triplicates.

H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에 대한 丹川丸의 보호 기전을 알아보기 위하여 H₂O₂를 단독 처리한 대조군과 1,000μg/ml 丹川丸을 2시간 전처리한 후 H₂O₂를 처리한 실험군의 caspase-3 protease 활성도를 비교한 결과, H₂O₂를 2, 4시간 처리한 실험군의 활성은 각각 1.2±0.21, 1.4±0.32배로 감소하였고, 6시간 처리한 실험군은 4.6±0.46배로 유의한 감소가 관찰되었다. 그러나, H₂O₂를 처리한 8시간 이후부터는 점차 감소하여 정상 수준으로 복귀하였다(Fig. 8).

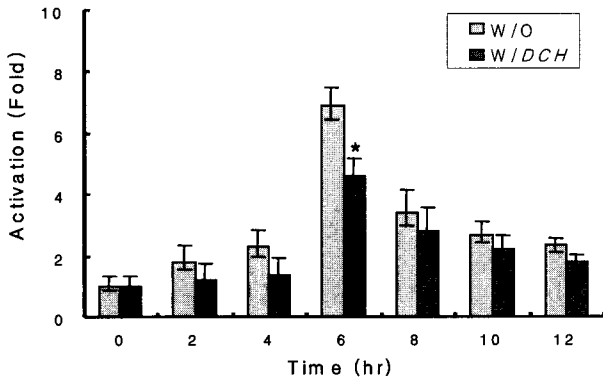


Fig. 8. *Dancheonhwan* partially suppressed the H₂O₂-induced activation of caspase-3 protease. Cells were pretreated with *Dancheonhwan* (1,000μg/ml) for 2 hrs before treatment with H₂O₂(200μM) for the indicated time periods. Caspase activity from the lysate was determined by using fluorogenic tetrapeptide as a substrate. Data represent mean±S.D. of triplicates. *P<0.05 by student's t-test, compared to the control cells treated with H₂O₂ for 6 hrs.

2) 丹川丸이 H₂O₂에 의한 caspase-9 protease 활성화에 미치는 영향

丹川丸이 caspase-3 protease 활성을 억제한 결과(Fig. 8)로부터 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에 대한 丹川丸의 보호효과를 매개하는 표적 물질을 탐색하기 위하여 initiator caspase인 caspase-8 protease 및 caspase-9 protease의 활성을 분석하여 丹川丸의 효능 기전을 알아보았다. H9c2 세포에 200μM H₂O₂를 단독 처리한 후, 각각의 caspase 활성을 조사한 결과, caspase-8 protease 활성의 유의한 증가는 없었으나, caspase-9 protease의 활성은 2, 4시간 후에 각각 4.6±0.38과 15.7±1.52배로 현저히 증가하였으며 6, 8, 10, 및 12시간 후에는 각각 5.9±1.2, 3.8±0.62, 3.1±0.48, 및 2.9±0.56배로 시간 의존적인 감소를 나타냈다(Fig. 9). 이상의 결과는 H₂O₂가 H9c2 세포의 미토콘드리아에 영향을

주어 initiator caspase인 caspase-9 protease가 활성화되었고, 이 caspase의 활성이 세포고사 기전으로 작용하였다고 판단된다.

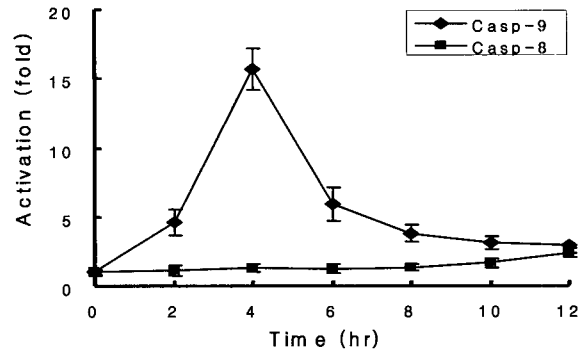


Fig. 9. H₂O₂ induced the activation of caspase-9 protease. Cells were treated with H₂O₂(200μM) for the indicated time periods. Catalytic activity of caspase-8 protease and -9 protease was determined by using fluorogenic tetrapeptide as substrates. Data represent mean±S.D. of triplicates.

H₂O₂에 의하여 활성화가 유도되는 caspase-9 protease에 대한 丹川丸의 영향을 알아보기 위하여, H₂O₂만을 처리한 대조군과 丹川丸을 2시간 전처리한 후 H₂O₂를 처리한 실험군의 caspase-9 protease 활성을 비교한 결과, H₂O₂를 4시간 처리한 실험군의 caspase-9 protease 활성은 9.8±1.48배로 나타나 대조군에 비교하여 약 36%정도 유의한 감소가 관찰되었으며, H₂O₂ 처리 6시간 이후에는 점차 감소하여 정상 수준으로 복귀하였다(Fig. 10).

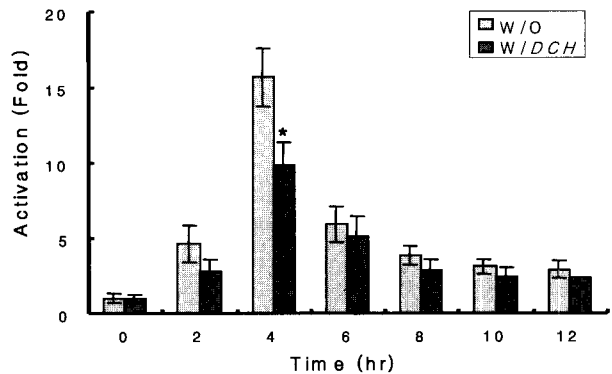


Fig. 10. *Dancheonhwan* partially suppressed the H₂O₂-induced activation of caspase-9 protease. Cells were pretreated with *Dancheonhwan* (1,000μg/ml) for 2 hrs before treatment with H₂O₂(200μM) for the indicated time periods. Caspase activity from the lysate was determined by using fluorogenic tetrapeptide as a substrate. Data represent mean±S.D. of triplicates. *P<0.05 by student's t-test, compared to the control cells treated with H₂O₂ for 4 hrs.

6. 丹川丸이 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 막전위 변화에 미치는 영향

H₂O₂가 H9c2 세포의 미토콘드리아 막전위 변화를 유도할 가능성을 확인하고 이에 대한 丹川丸의 영향을 알아보기 위하여 JC-1을 이용하여 미토콘드리아를 형광 염색하였다. 대조군인 DMSO를 처리한 H9c2 세포의 미토콘드리아는 오렌지색의 형광을 발하면서 세포질에 점상(punctuated) 형태로 나타났다(Fig. 11A). 200μM H₂O₂를 처리한 실험군 세포의 미토콘드리아는 오렌지와 녹색 형광을 나타내면서 세포질과 핵에 미반성(diffuse)으로 산재하였으며, 이와 같은 현상은 미토콘드리아의 막전위에 변화가 있음을 반영한다(Fig. 11B). 丹川丸 1,000μg/ml을 전처리

한 실험군 세포의 미토콘드리아는 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 막 전위 변화가 부분적으로 억제되어 정상 대조군과 유사한 옐록색 형광이 세포질에 점상으로 분포하였다(Fig. 11C).

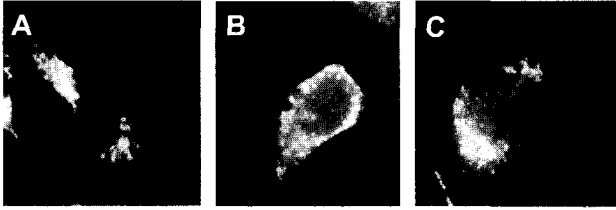


Fig. 11. *Dancheonhwan* partially protected the mitochondrial membrane permeability transition of H9c2 cells by H₂O₂. Cells were treated with (A) and without H₂O₂(200μM) (B), or pretreated with *Dancheonhwan* (1,000 μg/ml) before treatment with H₂O₂ for 8 hrs (C). Cells were stained with JC-1 and visualised under fluorescent microscope.

7. 丹川丸이 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 cytochrome c의 방출에 미치는 영향

H9c2 세포에 H₂O₂를 처리한 후 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome c의 방출과 이에 대한 丹川丸의 영향을 Western blot 분석법으로 조사하였다. H₂O₂(200μM)를 처리 후 3 시간에 H9c2 세포의 미토콘드리아에서 cytochrome c의 방출이 일어났고, 9시간까지 시간 의존적으로 증가하였다. 그러나 1,000μg/ml 丹川丸을 전처리한 실험군에서 cytochrome c의 방출은 대조군에 비교하여 현저히 억제되었다. 특히 丹川丸을 처리한 실험군에서 cytochrome c의 방출은 12시간에 최고 수준으로 나타났으며, 실험 대조군에 비하여 약 60% 수준이었다(Fig. 12).

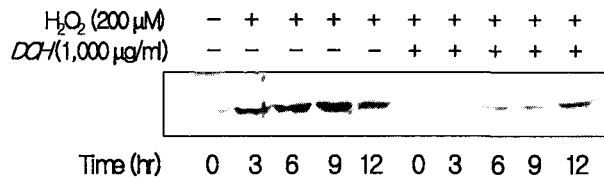


Fig. 12. *Dancheonhwan* partially protected the cytochrome c release from mitochondria. Cells were treated with H₂O₂ for 10 hrs or pretreated with *Dancheonhwan* for 2 hrs before treatment with H₂O₂ for 10 hrs. Fractions of cytosolic and mitochondrial were carried out to measure cytochrome c expression by western blot analysis.

8. 丹川丸의 항산화 효과가 세포고사에 미치는 영향

丹川丸이 H₂O₂와 같은 ROS에 의한 H9c2 세포고사를 방어하는 효과가 있는 결과들로부터 丹川丸의 기능을 매개하는 표적 분자를 탐색하기 위하여 항산화제 N-acetylcystein (NAC)을 1, 2.5, 5, 및 10mM의 농도별로 2시간 전처리한 후 200μM H₂O₂를 처리하고 세포 생존율을 조사하였다. NAC는 200μM H₂O₂에 의한 세포독성으로부터 H9c2 세포를 농도 의존적으로 보호하였으며, 특히 10mM NAC 전처리는 H₂O₂에 의한 세포 생존율을 95% 정도로 회복하였다(Fig. 13).

또한 丹川丸과 NAC의 상호작용을 조사하기 위하여 丹川丸 (1,000μg/ml)과 NAC를 다양한 농도로 2시간 전처리 후, 200μM H₂O₂를 12시간 처리하고 H9c2 세포의 생존율을 측정하였다. 항산화제 NAC는 丹川丸의 H9c2 세포 보호효과를 농도 의존적

로 증가시켰다(Fig. 14). NAC(2.5mM)와 丹川丸을 500, 750, 및 1,000μg/ml의 농도로 2시간 전처리한 후, H₂O₂를 12시간 처리한 심근세포의 생존율은 丹川丸 농도에 의존적으로 유의한 증가를 나타냈다. 이상의 결과는 丹川丸과 항산화제가 synergistic한 작용기전으로 H₂O₂에 의한 H9c2 세포독성으로부터 심근세포를 보호하였다고 판단된다(Fig. 15).

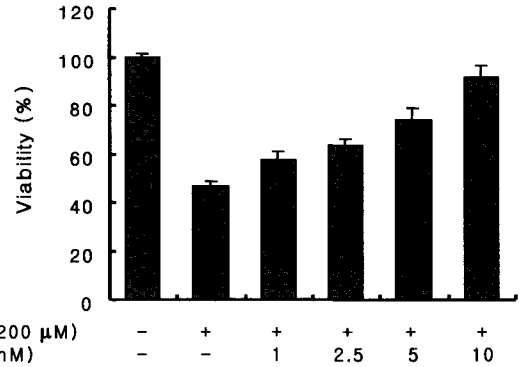


Fig. 13. N-acetylcystein (NAC) protected the H₂O₂-induced apoptosis of H9c2 cells. Cells were pretreated with various concentration of NAC for 2 hrs and followed by the addition of 200μM H₂O₂ for 12 hrs. Cell viability was measured by MTT assay.

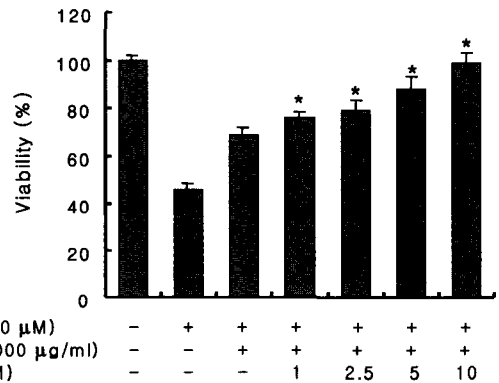


Fig. 14. NAC synergistically increased the protective effect of *Dancheonhwan* on H₂O₂-induced apoptosis of H9c2 cells. Cells were pretreated with *Dancheonhwan* only or *Dancheonhwan* plus NAC for 2 hrs before treatment with H₂O₂ for 12 hrs. Viability was determined with MTT assay. *P<0.05 by student's t-test, compared to the cells treated with H₂O₂ only for 12 hrs.

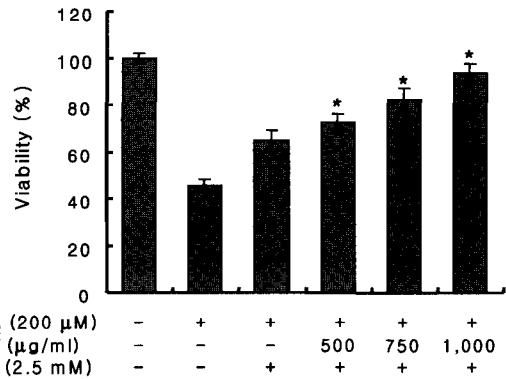


Fig. 15. *Dancheonhwan* synergistically increased the protective effect of NAC on H₂O₂-induced apoptosis of H9c2 cells. Cells were pretreated with NAC only, or *Dancheonhwan* plus NAC for 2 hrs before treatment with H₂O₂ for 12 hrs. Viability was determined with MTT assay. *P<0.05 by student's t-test, compared to the cells treated with H₂O₂ only for 12 hrs.

고찰

심혈관계 질환은 병변 부위의 세포로부터 활성 산소종(ROS)과 활성 질소종(reactive nitrogen species) 등이 과다 생성되며, 이것이 세포독성의 유발 기전으로 제시되고 있다. 활성 산소종은 활성화된 호중구(neutrophils)에서 xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡, 그리고 아라키돈산 대사과정을 포함하는 세포의 정상적인 대사에 의해서 생성된다. ROS의 하나인 H₂O₂는 원형질막 NADPH oxidase, peroxisome에 존재하는 oxidase와 미토콘드리아 전자전달계에 의해 생성되며, 생물체에서 신호 전달물질, 물질대사의 중간산물, 방어체계의 세포 독성물질, 그리고 병리학적 세포독성 물질로서 다양한 기능을 수행한다. 이러한 ROS의 과도한 생성은 산화적 스트레스를 유발하여 세포괴사와 세포고사 같은 세포독성을 초래하나, 그 기전은 명확하지 않다. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 hem oxygenase 등이 세포 내에서 활성 산소종의 환원을 대사하여 여러 경로로 생성되는 활성 산소종의 독성으로부터 세포를 보호하는 기능을 하지만¹⁹⁾, 세포고사가 일어난 세포에서 과량의 ROS가 생성되고, 항산화제는 세포고사를 억제하고 있음이 밝혀졌다. 이러한 산화적 스트레스는 스트레스의 종류와 ROS에 피폭된 세포의 감수성에 따라서 세포독성이 다양하게 나타난다. 동맥경화, 대동맥 협착증, 혈관질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈을 야기할 수 있으며, 치료의 목적으로 약물이나 수술적인 요법에 의한 재관류(reperfusion)시에 심근세포에서 O², H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 ROS가 발생되어 더욱 심각한 산화적 세포독성을 초래한다. 이러한 혈류장애는 韓醫學에서 瘀血과 유사한 개념을 공유하고 있다. 瘀血은 체내에 있는 혈액이 정체된 병리산물로서, 혈관에서 이탈하여 체내에 쌓여 있거나 혈액의 운행이 不暢하여 經脈이나 臟腑에 저체된 혈액을 말한다. 瘀血이란 용어는 張仲景²⁰⁾의 《傷寒論·辨陽明脈證并治》, 《金匱要略·驚悸吐衄下血胸滿瘀血病脈證治》, 《金匱要略·婦人雜病脈證并治》등에 처음으로 나타난 이래 清代 王^{21,22)} 등은 여러 질환에 대하여 瘀血에 의한 病因論을 주장하였다. 이러한 瘀血의 원인은 外傷跌倒, 氣滯, 氣虛, 血寒, 血熱 등이고, 주된 治法은 活血化瘀이며, 원광대학교 부속 한방병원에서는 活血化瘀 효능을 가진 처방으로서 丹川丸을 허혈성 뇌혈관 질환과 심혈관질환의 예방 및 치료제로 활용한다.

丹川丸은 丹蔘과 川芎으로 구성된 처방으로 丹蔘은 唇形科(꿀풀과, Labiatae)에 속한 多年生草本인 丹蔘의 根으로서 赤蔘·山蔘·木羊乳·逐馬의 異名이 있다. 본 약재는 活血調經·行血·祛瘀·涼血消癰·生新血·養血安神·益氣 등의 효능이 있어 血虛血瘀, 血滯經閉, 風痺不隨, 癥瘕積聚, 心悸失眠, 血邪心煩 등의 병증의 치료에 유용하다. 또한, 약리작용으로는 관상동맥 혈류량 증가, 말초혈관확장을 통한 혈압강하, 혈청지질감소, 항근작용, 혈당강하, 안정, 진통작용 등이 있으며 최근에는 혈전 폐색성 혈관염, 고혈압, 동맥경화성의 심장병, 알레르기성 자반병, 재생불량성 빈혈, 과립구 결핍증 등에 응용되고 있다²⁻¹⁰⁾. 川芎은 繖形科(미나리과, Umbelliferae)에 속한 多年生草本인 川芎의 根莖으로서 芎藭·杜芎·胡芎·蛇避草의 異名이 있다. 본 약재는 活血行

氣·開鬱·養新血·祛風止痛·燥濕 등의 효능이 있어 男婦一切血病, 癥結宿血, 氣鬱血鬱, 一切心痛, 肢體麻痺 등의 병증을 치료한다. 또한, 약리작용으로는 관상동맥 혈류 증가, 혈소판 응집억제, 말초혈관확장, 항근작용 등이 있으며, 소량으로는 대뇌 억제, 혈압상승, 자궁수축작용 등이 있고, 대량으로는 혈압강하, 심장의 마취, 자궁마비, 소장수축 억제작용 등이 있으며, 협심증, 고혈압, 폐색성 뇌혈관질환, 월경곤란, 난산, 경련 등의 병증에 응용한다²⁻¹⁰⁾. 따라서 丹川丸은 活血祛瘀·行氣止痛하는 효능이 있으므로 血液運行이 阻滯되어 혈류순환장애를 발생시키는 동맥경화증, 동맥협착증, 뇌혈관질환, 관상동맥질환 등에 응용할 수 있다.

최근 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약재의 효과에 대한 연구로는 朴의 H₂O₂에 의한 培養心筋細胞枯死에 미치는 四物湯의 防禦效果, 孫²³⁾의 丹蔘飲 煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響, 權²⁴⁾의 XO/HX에 의해 損傷된 培養心筋細胞에 미치는 乳香·沒藥 煎湯液의 效果, 韓²⁵⁾의 失笑散 煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 영향 등 많은 연구 결과가 보고되고 있다. 이에 저자는 丹川丸이 산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 랫트 심장에서 유래한 세포주인 H9c2에 丹川丸을 전처리한 후 H₂O₂로 세포고사를 유도하여 세포 생존율, DNA 분절, PARP 분절, caspase 활성화도, 미토콘드리아 막전위 변화, cytochrome c의 방출을 관찰하고, NAC을 이용하여 표적 분자를 탐색하였다.

심근 세포주 H9c2 세포에 H₂O₂를 농도별, 시간별로 처리한 후 세포 생존율을 측정된 결과, H₂O₂를 250μM까지 처리시 세포 독성이 농도 의존적으로 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 세포 독성이 크게 증가하지 않았으며(Fig. 1A), 시간대별로 12시간까지 250μM H₂O₂를 처리시 시간 의존적으로 세포독성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). H₂O₂ 처리로 유도한 세포독성에 대한 丹川丸의 억제 및 심근세포 보호효과를 알아보기 위하여 丹川丸을 전처리한 후 H₂O₂를 처리한 결과, 250μM H₂O₂로 처리한 경우는 큰 유의성이 없었으나(Fig. 2), 약 47%의 세포 생존율을 보이는 200μM H₂O₂로 처리한 세포독성은 1,000μg/ml 丹川丸 전처리에 의하여 23%가 감소되어 세포 생존율이 46%에서 69%로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4). 이로써 丹川丸이 과도한 ROS에 의한 세포독성은 억제하지는 못하였으나, 약 50% 생존율을 보이는 세포독성 조건하에서는 심근세포 보호효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 세포고사 과정에서 전형적으로 나타나는 genomic DNA 분절이 관찰되어 H₂O₂ 처리에 의한 심근 세포주 세포독성의 기전은 세포고사에 의한 것으로 밝혀졌고, 丹川丸의 전처리에 의해 DNA 분절의 감소를 관찰하였다(Fig. 5). 이로써 H₂O₂는 심근세포의 고사를 유발하며, 丹川丸은 H₂O₂ 유도성 심근세포고사를 억제하고, 심근세포 보호효과가 있는 것을 확인하였다. 세포고사 신호전달체계에 관여하는 중요한 경로에는 여러 가지의 자극에 의하여 세포내에 존재하는 initiator caspase인 caspase-8 protease 및 caspase-9 protease가 활성화되고, 이것이 effector caspase인 caspase-3 protease 및 caspase-6 protease 등을 활성화시키는 caspase 경로가 있다. 세포막의 death receptor와 상호작용하여 활성화되는 caspase-8 protease와 미토콘드리아

에서 유리되는 cytochrome c에 의해 활성화되는 caspase-9 protease는 effector caspase를 활성화시켜 하방에 위치한 PARP 분절을 통하여 DNA합성을 방해하여 결국에는 세포고사를 일으킨다. 丹川丸이 ROS 유도성 세포고사를 억제하는 효과의 기전을 구명하기 위하여 H₂O₂에 의한 세포고사의 신호전달 경로를 관찰한 결과, H₂O₂는 세포고사의 특징의 하나인 PARP 분절을 유도하였고(Fig. 6), 그의 상방에 위치한 effector caspase-3 protease의 활성을 증가시켰으며(Fig. 7), initiator caspase인 caspase-9 protease를 활성화시켰다(Fig. 9). 이상의 결과로부터 H₂O₂는 미토콘드리아에 작용하여 initiator caspase인 caspase-9 protease를 활성화시킴으로써 세포고사를 유도하는 것으로 나타났으며, 丹川丸을 전처리한 경우에는 H₂O₂ 유도성 심근 세포고사의 중요한 marker인 PARP 분절을 억제하고(Fig. 6), caspase-3 protease와 caspase-9 protease의 활성화를 억제하는 효과가 있는 것을 관찰하였다(Fig. 8, 10). 따라서 丹川丸은 미토콘드리아로부터 진행되는 세포고사를 억제하는 보호효과가 있었다. 세포 외부의 자극에 의한 세포고사에서 많은 자극은 미토콘드리아 막전위 변화를 유발하는 것으로 밝혀져 있다. 특히 세포질내에 증가된 ROS는 막전위의 변화에 영향을 주는 주된 인자로 보고되어 있다. 미토콘드리아 막전위 변화는 세포고사 신호전달의 중요한 경로로서 미토콘드리아 cytochrome c의 방출을 유발하고, 방출된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 caspase-9 protease를 활성화시킴으로써 세포고사를 유발한다²⁶⁻²⁸⁾. H₂O₂가 미토콘드리아에 작용하는 기전과 이에 대한 丹川丸의 효과를 알아보기 위하여 JC-1 염색법으로 미토콘드리아 막전위 변화를 관찰하고, Western blot analysis로 미토콘드리아 cytochrome c의 방출을 관찰하였다. H₂O₂는 막전위 변화와 cytochrome c의 방출을 유도하고, 이에 대해 丹川丸이 부분적으로 억제하는 효과가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 11, 12). 이는 H₂O₂ 처리에 의한 ROS에 의한 세포고사에서 丹川丸이 미토콘드리아 cytochrome c의 방출을 억제함으로써 세포고사를 억제하는 보호효과가 있음을 시사하고 있다. 丹川丸이 세포고사를 억제하는 표적분자를 탐색하기 위하여 ROS에 대한 항산화제인 NAC을 전처리한 후 H₂O₂로 유도된 세포고사를 관찰하고, NAC과 丹川丸을 병용처리 후 H₂O₂로 유도된 세포고사를 관찰하였다. NAC은 H₂O₂ 유도성 세포고사를 농도 의존적으로 억제하였고(Fig. 13), 丹川丸과 NAC을 병용처리시 H₂O₂ 유도성 세포고사에 대하여 유의한 억제효과를 나타냈다(Fig. 14, 15). 이로써 H₂O₂에 의해 생성된 라디칼이 미토콘드리아를 표적으로 세포고사를 유도하는 것을 확인할 수 있었으며, 이때 NAC은 생성되는 라디칼을 제거하여 세포고사를 억제하였고, 丹川丸과 병용처리시 丹川丸 처리 농도에 따라서 농도 의존적으로 세포 생존율이 거의 100%까지 나타났다. 따라서 丹川丸은 H₂O₂로부터 생성되는 유리 라디칼을 제거함으로써 세포고사를 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 丹川丸은 H₂O₂에 의해 손상된 심근세포에서 생성되는 ROS의 양을 감소시키고, ROS에 의한 심근세포고사를 억제시키는 효과가 있어서 산화적 손상으로 유발되는 허혈성 심혈관질환의 예방 및 치료에 유용하게 활용될

수 있을 것으로 사료된다.

결론

丹川丸이 H₂O₂에 의한 심근세포 독성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 랫트의 배아 심장에서부터 유래한 심근세포주인 H9c2 세포에 丹川丸을 전처리하고 ROS 생성 물질인 H₂O₂를 처리하여 세포독성을 유도한 후 세포 생존율, DNA 분절, PARP 분절, caspase 활성화도, 미토콘드리아 막전위 변화, cytochrome c의 방출을 관찰하고, NAC을 이용하여 표적 분자를 탐색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

H₂O₂는 심근 세포주 H9c2 세포에서 농도 및 시간 의존적으로 세포독성을 유도하였다. DNA와 PARP 분절 등의 apoptotic marker를 확인함으로써 H₂O₂에 의한 H9c2 세포 독성기전은 세포고사 기전에 의해서 매개됨을 확인하였다. 丹川丸은 200μM H₂O₂에 의한 세포고사로부터 H9c2 세포의 생존율을 현저히 증가시켰다. 丹川丸은 H₂O₂에 의한 DNA와 PARP의 분절, caspase-3 protease와 caspase-9 protease의 활성을 억제하였다. 丹川丸은 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 막전위 손상을 억제하였다. 丹川丸은 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 cytochrome c의 방출을 억제하였다. 丹川丸과 NAC은 synergistic하게 작용하여 H₂O₂에 의한 세포고사로부터 H9c2 세포를 보호하였다.

이상의 결과들로부터 丹川丸은 H₂O₂에 의한 심근세포 H9c2 세포고사로부터 세포를 보호하는 작용이 있었으며, 그 작용기전은 丹川丸이 세포내 intrinsic caspases 활성화와 미토콘드리아의 기능이상을 억제하고 또한 세포내 ROS 양을 감소시키는 작용에 의한 것으로 생각한다. 따라서 협심증과 심근 경색증 등의 허혈성 심혈관계 질환의 치료 및 예방에 丹川丸을 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 원광대학교 익산한방병원 처방모음집, p. 124, 원광대학교 익산한방병원, 익산, 1998.
2. 吳普, 神農本草經, p. 24-5, 29-30, 醫聖堂, 서울, 1994.
3. 辛民教, 臨床本草學, p. 519-521, 530-2, 永林社, 서울 1997.
4. 鄭普燮, 辛民教, 鄉藥(生藥)大辭典, p. 418-419, 860-2, 서울, 永林社, 1990.
5. 申佶求, 申氏本草學, p. 519-521, 600-2, 壽文社, 서울, 1988.
6. 李尙仁, 本草學, p. 398-400, 419-20, 醫藥社, 서울, 1975.
7. 楊東喜, 本草備要解析, p. 29-30, 125-7, 醫聖堂 서울 1993.
8. 李時珍, 本草綱目, p. 758-760, 837-41, 人民衛生出版社, 北京, 1982.
9. 金晨壽, 標準本草學, p.107-108,367-70, 進明出版社, 서울, 1975.
10. 中華人民共和國衛生部藥典委員會, 中華人民共和國藥典, p. 26, 58-9, 人民衛生出版社, 北京, 1985.
11. 강혜숙 외, 단삼의 항산화효과에 대한 연구, 한국식품영양과학회 추계학술대회지, p. 98-9, 96년도, 1996.
12. 崔善美, 丹蔘의 抗癌活性和 apoptosis에 미치는 影響, 경희대

- 학교 대학원, 2000.
13. 李吉才, 丹蔘이 高脂血症 및 粥狀動脈硬化症에 미치는 影響, 동국대학교 대학원, 1995.
 14. 姜善泰, 李泰浩, 瘀血病態模型에 미치는 川芎 石菖蒲 및 半夏의 效能에 關한 實驗的 研究, 동의병리학회지 4, 57-73, 1989.
 15. 韓相赫, 丹川丸이 사람神經細胞의 酸化的 損傷에 미치는 影響, 원광대학교 한의학전문대학원, 2000.
 16. Halliwell B, Clement MV, Long LH Hydrogen peroxide in the human body, FEBS Lett, 486 10-3, 2000.
 17. Abe J, Berk BC., Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species, J. Biol. Chem, 274 21003-10, 1999.
 18. Clement M, Ponton A, Pervaiz S., Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu, FEBS Lett, 440 13-8, 1998.
 19. Kehrer Jp. Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Crit Rev Toxicol, 23 21-48, 1993.
 20. 張仲景, 仲景全書(全), p. 226, 396, 419-20, 集文書局, 台北, 1984.
 21. 王清任, 醫林改錯, p. 22-5, 臺聯國風出版社, 臺北, 1975.
 22. 唐容川, 血證論, p. 111-20, 力行書局有限公司, 臺北, 1973.
 23. 孫昶湜, 丹蔘飲 煎湯液이 培養 心筋細胞에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 2000.
 24. 權康範, XO/HX에 의해 損傷된 培養 心筋細胞에 미치는 乳香 · 沒藥 煎湯液의 效果, 원광대학교 한의학전문대학원, 2000.
 25. 韓東勳, 失笑散 煎湯液이 培養 心筋細胞에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 2000.
 26. Li p, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell 91 479-89, 1997.
 27. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES, Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation, J. Biol. Chem, 274 17941-5, 1999.
 28. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G., Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis, EMBO J, 18 3586-95, 1999.