

黃連 추출물이 산소자유기에 의해 손상된 배양 심근세포에 미치는 영향

양상철 · 권강범 · 조현익 · 민영기 · 허재혁 · 김구환 · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of Rhizoma Coptidis Water Extract in Cultured Rat Myocardial Cells

Sang Cheol Yang, Kang Beom Kwon, Hyun Ik Cho, Young Gi Min, Jae Hyuk Heo, Gu Hwan Kim, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To test the protective effect of herbal medicine on myocardial damage against oxygen free radical-induced myocardiotoxicity, cytotoxicity was examined using MTT, Beating rate and TBARS assay in the presence of water extract of Rhizoma Coptidis. Myocardial toxicity was evaluated in neonatal rat cardiomyocytes in cultures. The results of these experiments were obtained as follows : Xanthine oxydase/hypoxanthine resulted in a decrease in viability, beating rate and in a increase in lipid peroxidation in cultured myocardial cells. Rhizoma Coptidis water extract shows effects of protection from the cardiocyte toxicity induced by xanthine oxydase/hypoxanthine treatment such as increases in beating rate. Rhizoma Coptidis water extract shows effects of protection from the cardiocyte toxicity induced by xanthine oxydase/hypoxanthine treatment such as decreases in lipid peroxidation. These results show that xanthine oxydase/hypoxanthine elicits toxic effects in cultured myocardial cells derived from neonatal rat, and suggest that water extract of Rhizoma Coptidis is very effective in the prevention of xanthine oxydase/hypoxanthine-induced cardiotoxicity.

Key words : Rhizoma Coptidis, xanthine oxydase/hypoxanthine, Myocardial cell, Cardiotoxicity, Lipid peroxidation

서 론

黃連은 毛茛科(미나리아재비과; Ranunculaceae)에 속한 다년 생초목인 黃連 및 同屬 近錄植物의 根莖이다. 가을에 채취하여 根莖과 鬚根을 제거하고 약재로 사용한다¹⁾. 黃連은 berberine을 주성분으로하며 coptinine, palmatine, jateorrhizine, worenine, magnoflorine 등을 함유하며 산성물질로서는 ferulic acid가 존재한다²⁾. 산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하고 있으며, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데^{3,4)}, 특히 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비

를 촉진시키고^{3,4)}, 세포내 Ca²⁺의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래하는 물질이다^{5,6)}. 산소자유기는 배양심근세포에 독성을 나타내며 이런 독성에 대하여 한약재 전탕액이 방어효과를 나타낸다고 보고되고 있다^{7,9)}. 黃連의 다양한 약리작용이 보고¹⁰⁻¹⁸⁾되어 있으나 산소자유기의 독성에 대한 연구는 접할 수 없었다.

이에 저자는 黃連 전탕액의 배양 심근세포 독성에 대한 방어효과를 구명하기 위하여 먼저 XO/HX에 의한 백서의 배양 심근세포 독성 효과를 MTT 정량을 이용하여 조사하였으며 이에 대한 黃連 전탕액의 방어효과를 심근세포 박동수 측정, lipid peroxidation 정량을 통하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

동물은 계통의 건강상태가 양호한 생후 3일된 백서를 사용하였다.

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6846

· 접수: 2002/07/22 · 수정: 2002/08/29 · 채택: 2002/09/24

2. 세포배양

심장조직에서 분리된 심근세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 1,000rpm에서 20분간 원침시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분 동안 항온기에 넣은 다음 pasteur pipette으로 3, 4회 분쇄한 후 800×g에서 10분간 원침시킨다. 원침된 세포를 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 penicillin G(25 unit/ml)가 첨가된 혼합액에 부유시킨 다음 96-multiwell plate(Gibco)에 1×10^6 cell/well의 세포 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 XO/HX가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 실험전 배양액을 버리고 세포를 PBS로 3-4회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

3. 전당액의 제조 및 처리

실험에 사용한 약제는 黃連 200g을 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 30.84g의 분말 시료를 얻었다. 실험에 사용한 각각의 검액을 여러 농도로 하여, 백서의 배양 심근세포를 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 각각 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨 후 이들 黃連 전당액이 XO/HX의 심근세포 독성에 미치는 효과를 조사하였다.

4. XO/HX의 제조 및 처리

본실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로 XO의 경우 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

5. 세포독성 및 방어효과 검증

1) MTT 정량

세포생존을 측정하기 위한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) 정량¹⁹⁾은 XO/HX를 처리한 배양 심근세포를 PBS로 3회 세척한 다음, 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양한 후 하였다. 배양 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merck)를 처리한 다음 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

2) 심근세포 박동수(beat rate, BR) 측정²⁰⁾

배양 심근세포의 BR의 측정을 위하여 일정 시간 배양한 심근세포에 여러 농도의 XO/HX이 포함된 배양액에서 24시간 동안 배양한 후 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 분당 심근세포의 박동수를 대조군과 비교하였다.

3) Lipid peroxidation 정량²¹⁾

XO/HX과 한약재를 일정시간 동안 처리한 후 배양 심근세

포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 측정된 것으로, 위의 액에 12N_{H2SO4}와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0 ml와 0.3 ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료후 TBA(thiobarbituric acid)를 1.0 ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

6. 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

실험성적

1. XO/HX가 배양 심근세포의 생존율에 미치는 영향

1) 심근세포 생존율 : MTT 정량

XO가 배양 심근세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 5~50 mU/ml 농도로처리한 배양 심근세포에 세포생존율을 MTT 정량법에 의하여 측정된 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 25 mU/ml, 50 mU/ml XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 47.8% (p<0.05), 36.5%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

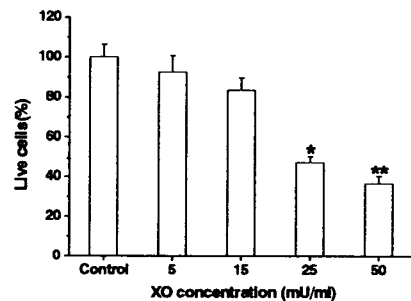


Fig. 1. Dose-response relationship of XO treatment in cultured rat myocardial cells. Cultures were exposed to various concentrations of XO for 54 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate mean±SE(n=5). Significant differences from the control group are marked with asterisk. *p<0.05, **p<0.01

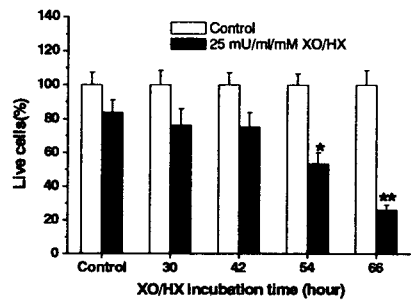


Fig. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with 25 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments. Asterisk indicate the significant differences between groups. *p<0.05, **p<0.01

또한 25 mU/ml의 XO가 포함된 배양액에서 심근세포를 30~66시간동안 배양 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 조사하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 54시간, 66시간에서 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

2. XO/HX의 심근세포 손상에 대한 黃連 전탕액의 영향

1) 심근세포 박동수의 측정

(1) XO/HX가 심근세포의 박동수에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 심근세포 박동수를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 1~30 mU/ml XO의 농도가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 54시간 동안 처리한 후 세포의 박동수 변동을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 박동수가 감소하였으며 20 mU/ml, 30 mU/ml XO의 처리에서는 심근박동수가 대조군100%(112±11.6 beats/min)에 비하여 각각 37.5%(p<0.05), 21.4%(p<0.01)로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 3).

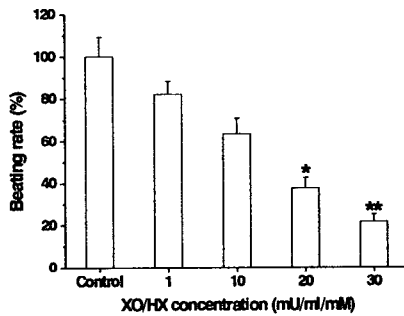


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 54 hours. Beating rate was measured by count of beating frequency per minute. Control value represent 112±11.6 beat/min. The values are the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. *p<0.05, **p<0.01

(2) XO/HX에 의해 감소한 심근세포 박동수에 미치는 黃連 전탕액의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 黃連 전탕액의 효과를 심근세포 박동수의 측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 20 mU/ml 농도에서 54시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 20~160 µg/ml의 黃連 전탕액이 포함된 배양액에서 전처리한 후 심근세포 박동수를 조사하였다. 그 결과를 보면 XO/HX를 처리하지 않고 黃連 전탕액을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 43.3%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 黃連 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수 감소효과가 감약되어 XO/HX에 의한 독성을 방어하였다. 특히 80 µg/ml, 160 µg/ml 黃連 전탕액을 전처리한 경우에 生地黃 전탕액을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 각각 76.0%(p<0.05), 85.2%(p<0.05)로 XO/HX에 의한 감소효과를 유의하게 억제하였다 (Fig. 4).

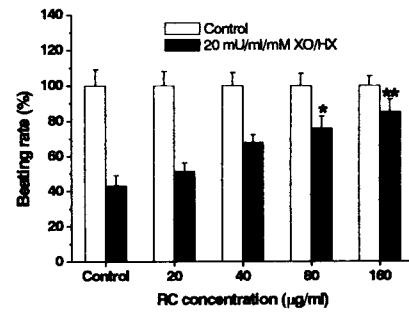


Fig. 4. Dose-response relationship of Rhizoma Coptidis(黃連, RC) water extracts for beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of agents for 3 hours, and then exposed to 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 54 hours. Beating rate was measured by count of beating number per minute. The values represent the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the XO/HX treated group are marked with asterisk. *p<0.05, **p<0.01

2) Lipid peroxidation 정량

(1) XO/HX가 lipid peroxidation에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 5~40 mU/ml의 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 54시간 동안 처리한 후 TBARS와 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율의 감소와 TBARS의 증가를 보였다. 특히 20 mU/ml, 40 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 TBARS의 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 20 mU/ml XO 처리에서 나타났다(Fig. 5).

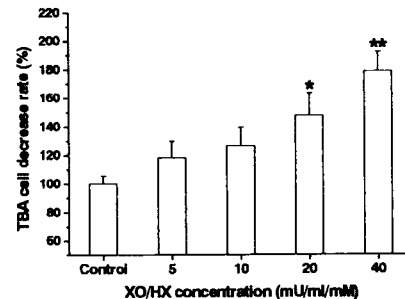


Fig. 5. Dose-response relationship of XO/HX on lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 54 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/106 cells. Control value are represented 32.6±3.8 pmol/106 cells. The values are the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. *p<0.05, **p<0.01

(2) XO/HX에 의해 증가한 lipid peroxidation에 미치는 黃連 전탕액의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 黃連 전탕액의 효과를 TBA fluorometric assay를 통하여 lipid peroxidation양의 측면에서 조사하기 위하여 MCV값인 20 mU/ml XO/0.1 mM HX의 농도에서 54시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 15~100 µg/ml의 黃連 전탕액이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 XO/HX를 처리하지 않고 黃連 전탕액을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml

XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 69.6%가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 黃連 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 黃連 전탕액을 전처리한 경우에 黃連 전탕액을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 169.6%에 비하여 110.2%로 나타나 통계적으로 유의($p<0.01$)하게 감소하였다 (Fig. 6).

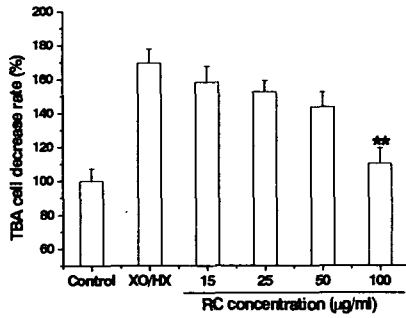


Fig. 6. Dose-response relationship of Rhizoma Coptidis(黃連, RC) water extracts for lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 54 hours. Amount of lipid peroxidation was measured by TBA fluorometric assay (TBARS). The values represent the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. ** $p<0.01$

고찰

黃連은 毛茛菪科(미나리아재비과; Ranunculaceae)에 屬한 多年生草本인 黃連 및 同屬 近錄植物의 根莖으로서¹⁾ 性味는 苦寒無毒하며 歸經은 心, 肝, 胃, 大腸經으로 淸熱燥濕, 淸心除煩, 瀉火解毒의 效能으로 嘔吐, 瀉痢, 心熱神煩, 神昏, 謔語, 火毒癰瘍, 耳目腫痛, 口舌生瘡 등의 증을 다스리는데 응용되어져 왔으며²⁾, berberine을 主成分으로하며 coptinine, palmatine, jateorrhizine, worenine, magnoflorine 등을 함유하며 산성물질로서는 ferulic acid가 존재한다고 알려져 있다³⁾. 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 각종 독성물질의 유해 또는 무해에 대한 검정이 활발히 진행되고 있는 실정이며²³⁻²⁵⁾ 심근세포와 같은 각종 세포종을 병변의 모델로 하여 질환의 병인에 대한 기전을 비롯하여 작용현상 및 치료적 방법의 접근에 대한 활발한 연구를 진행중에 있다^{26,27)}. 산소자유기는 정상상태에서 산화-환원작용이나 사립체의 산화인산화작용에 의하여 소량 형성되며 항산화제인 superoxide dismutase(SOD)나 사립체와 세포질내의 glutathione peroxidase 및 catalase에 의하여 소실되고²⁸⁾, 저산소증이나 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소자유기는 세포막의 지방을 과산화시킬뿐만아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포 및 조직의 손상을 초래하게 된다²⁹⁾. 이러한 산소자유기에 의하여 심근독성이 유발된다고 보고된 바 있다³⁰⁾. 본 실험에 사용된 산소자유기인 XO/HX는 Zhang 등의 보고³¹⁾에 의하면 LDH 활성도를 증가시키고 심근세포 박동수를 감소시키며 ATP 양을 감소시켜 심근세포에 독성을 일으킨다 하였다.

이에 저자는 XO/HX를 이용하여 산소자유기를 유발시켜 심

근세포에 대한 독성을 조사하고 이 독성에 대한 黃連 전탕액의 방어효과를 조사하였다. 실험에서는 먼저 XO/HX의 심근독성효과를 MTT assay를 이용하여 조사하였다. MTT assay는 세포의 생존율을 측정하는 방법으로서 이 실험에서 XO/HX를 처리한 후 위의 방법에 의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 생존율을 감소시켜 (Fig. 1-2) 세포에 독성을 유발하여 Takahashi 등²⁰⁾, Zhang 등³¹⁾이 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 XO/HX의 독성에 대하여 黃連 전탕액의 방어효과를 심근세포 박동수를 이용하여 조사하였다. 먼저 XO/HX의 심근세포 박동수에 대한 효과를 조사한 결과 처리한 XO/HX의 농도에 비례하여 박동수가 감소하여 세포에 독성을 나타냈으며 20 mU/ml XO의 농도에서 대조군에 비하여 약 50%의 감소효과를 보여(Fig. 3) 전 실험자들의 결과와 일치하였다. 20 mU/ml XO의 심근세포 박동수의 감소효과에 대하여 黃連 전탕액을 3시간 동안 전 처리할 경우 처리한 黃連 전탕액의 농도에 비례하여 심근세포 박동수의 감소가 억제되어 방어효과를 나타냈다(Fig. 4). 특히 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 黃連 전탕액을 전 처리 한 경우 통계적으로 유의한 억제효과를 나타냈다. 지질의 과산화 반응은 보통 생성 산물인 Malondialdehyde (MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 생성되는 붉은색의 물질(TBA reactive substance, TBARS)을 측정하여 표시하는데²¹⁾ 지질과산화반응에서 XO/HX의 독성을 조사한 결과 농도 의존적으로 TBARS양을 증가시켰다(Fig. 5). 이러한 결과는 XO/HX에 의해 심근세포에 독성이 유발되었다는 것을 알 수 있었으며 20 mU/ml XO의 농도에서 대조군에 비하여 50%의 증가를 보였다. 黃連 전탕액을 전처리한 후 XO/HX의 노출에 의한 TBARS양을 조사한 결과 농도의존적으로 TBARS양의 증가를 억제시켰다(Fig. 6). 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 黃連 전탕액을 전처리한 군에서는 유의한 억제효과를 나타냈다.

위의 결과는 黃連 전탕액은 배양 심근세포에 항산화효과가 있으며 이 같은 효과는 세포의 박동수와 지질 과산화반응의 억제를 통하여 이루어짐을 시사하고 있다. 앞으로 이런 방어효과와 기전적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결론

黃連 전탕액이 심근세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심근세포에 黃連 전탕액을 전처리한 후 XO/HX의 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

XO/HX는 농도와 시간 의존적으로 심근세포 생존율의 감소를 나타냈다. 黃連 전탕액은 XO/HX에 의하여 유발된 심근세포 박동수의 감소에 대하여 유의한 억제효과를 나타냈다. 黃連 전탕액은 XO/HX에 의하여 유발된 심근세포의 lipid peroxidation의 증가에 대하여 유의한 억제효과를 나타냈다.

이상의 결과에서 XO/HX는 심근세포에 독성을 나타냈으며 黃連 전탕액을 전처리하면 유의한 방어효과를 보였다. 위의 결과를 토대로 黃連에 대한 항산화제로서의 가능성에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(HMP-CO-03-0003)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.310-312, 1986.
2. 和漢藥物學 : 高本敬次郎, 서울, 南山堂, pp.129-130, 1996.
3. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carrla V., Moroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.* 51:1960-1963, 1988.
4. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carrla V., Moroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.* 10:1035-1041, 1990.
5. Mayer M. L., Westbrook G. L. : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J. Physiol.* 394:501-527, 1987.
6. Zeman S., Lloyd C., Meldrum B., Leigh P. N. : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20:219-231, 1994.
7. Kwon K. B., Jo H. I., Kim G. H., Kim S. B., Lee H. S., Hwang W. J., Park S. T., Ryu D. G. : Effects of Myrrha Water Extract on Rat Myocardial Cells in Cultures. *J. Korean Oriental Med.* 21(2):79-86, 2000.
8. Son C. S., Kwon K. B., Kim S. B., Lee H. S., Seo E. A., Lee H. S., Ryu D. G. : Effects of Dansamyeum Water Extract on Heart Beating Rate in Cultured Mouse Myocardial Cells. *Korean Journal of Oriental Medical Physiology & Pathology* 15(2):241-245, 2001.
9. Son C.S., Kwon K.B., Jung J.S., Hwang I.J., Kim W.K., Kim H.C., Oh K.S., Lee H.S., Ryu D.G.: Effects of Dansam-yeum Water Extract on LDH Activity of Myocardial Cells damaged by Reactive Oxygen Species. *Korean Journal of Oriental Medical Physiology & Pathology.* 15(4):621-625. 2001.
10. 山原條二 : Berberine型 알카로이드의 行動藥理學의 研究 (第1報) 黃連 및 그의 含有成分의 中樞抑制作用, 日藥理誌 72, pp.899-908, 1976.
11. 山原條二 : 同上 (第2報) Tetrahydroberberine 및 그의 關聯化合物의 中樞抑制作用, 日藥理誌 72, pp.909-927, 1976.
12. 內炭精一 : 베르베린의 藥理作用 知見補遺, 日藥理誌 53, pp.63-74, 1957.
13. H. Fukuda, K. Watanabe, Y. Kudo : Some Observations on the Cardiovascular Effects of 9-Substituted Berberines. *Chem. Pharm. Bull.* 18. pp.1299-1304, 1970.
14. 島本暉郎, 內炭精一, 井上邦夫 : Berberine의 抗 curare 作用, 日藥理誌 53, pp.75-80, 1957.
15. 桑野重昭 : 黃連 및 그 成分의 藥理, 生理學雜誌, 24:1-5, 1970.
16. E. A. Swabb, Y. H. Tai, L. Jordan : Reversal of cholera toxin-induced secretion in rat ileum by luminal berberine. *Am. J. Physiol.* p.241,248-252, 1981.
17. 赤松金芳 : 和漢藥, 醫齒藥出版, 東京, p.455, 1969.
18. 渡邊和夫, 渡邊裕司, 後藤義明 : 實驗的胃潰瘍에 대한 和漢藥處方의 效果, 和漢藥 심포지움 記錄, p.9,51-57, 1975.
19. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983.
20. K. Takahashi, Y. Fujita, T. Mayumi, T. Hama, T. Kishi : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm. Bull.* 35(1)326-334, 1987.
21. Buege J. A., Aust S. D. : Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymology" Vol. 52, Academic Press, New York. p.306, 1978.
22. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, pp.965-983, 1983.
23. Chung YT, Choi MK, Kim JJ, Kim JM, Park ST : A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. *J. Chonnam Med. Sci.* 1: 221-229, 1988.
24. Thompson J., Biggers T. D. : Effects of inhibitors of protein synthesis on the development of preimplantation mouse embryos. *Exp. Cell. Res.* 41:411-427, 1966.
25. Unuma T., Senda R., Muramatsu M. : Mechanism of nucleolar segregation-Differences in effects of actinomycin D and cyclohexamide on nucleoli of rat liver cells. *Electro Microscopy* 22:205-216, 1973.
26. Tasca R. J., Hillman N. : Effect of actinomycin D and cyclohexamide on RNA and protein synthesis in cleavage stage mouse embryo. *Nature* 225:1022-1025, 1970.
27. Park S. T., Kim J. J., Mun Y. J., Lim K. T., Choi M. K., Chung Y. T. : Effect of methylmercury on the fetal mouse cerebral neurons. *J. Environ.* 4:27-32, 1995.
28. Vannucci R. C., Vasta F., Vannucci S. J. : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.* 21, pp.524-529, 1987.
29. Cao W., Carney J. M., Duchon A., Floyd R. A., Chevion M. : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. 88, pp.233-238, 1988.
30. Myers M. L., Bolli R., Lekich R. F., Hartley C. J., Roberts R. : Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 72:915-921, 1985.
31. Zhang R., Pinson A., Samuni A. : Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes from oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 24(1):66-75, 1998.