

원 저

培養心筋細胞의 酸化的 損傷에 대한 四物湯의 防禦效果

조권일¹⁾, 정승원¹⁾, 장재호¹⁾, 이대용¹⁾, 박세욱^{1),2)}, 이인²⁾, 신선호²⁾, 문병순^{1),2)}

원광대학교 한의학전문대학원¹⁾
원광대학교 한의과대학 심계내과학교실²⁾

Protective Effects of Samul-tang on Oxidative Stress induced Death of H9c2 Cardioblast Cells

Kwon-Il Cho¹⁾, Seung-Won Jung¹⁾, Jae-Ho Jang¹⁾, Dae-Yong Lee¹⁾, Sae-Wook Park^{1),2)},
In Lee²⁾, Sun-Ho Sin²⁾, Byung-Soon Moon^{1),2)}

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University¹⁾
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University²⁾

Objectives : The water extract of *Samul-tang* (SMT) has traditionally been used for treatment of ischemic heart and brain damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of SMT rescues cells from these damages.

Methods : This study was designed to investigate the protective mechanisms of SMT on oxidative stress-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. Treatment with H₂O₂ markedly induced death of H9c2 cardiomyoblast cells in a dose-dependent manner.

Results : The characteristics of H₂O₂-induced death of H9c2 showed apparent apoptotic features such as DNA fragmentation and morphological change. However, SMT significantly reduced both H₂O₂-induced cell death and morphological change. The decrease of Bc-2 expression by H₂O₂ were inhibited by SMT. In addition, the increase of Bax expression was also inhibited by SMT. The cotreatment of SMT and H₂O₂ in H9c2 cells also induced the phosphorylation of ERK in a time-dependent manner. Moreover, PD98059, a specific inhibitor of ERK1/2 attenuated the protective effects of SMT on H₂O₂-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. These results suggest that both ERK1/2 signaling pathways play important roles in the protective effects of SMT on H₂O₂-induced apoptotic death of H9c2 cells.

Also, the expression profile of proteins in H₂O₂ cardiomyoblast cells were screened by using two-dimensional (2-D) gel electrophoresis. Among 300 spots resolved in 2-D gels, the comparison of control versus apoptosis cells revealed that signal intensity of 17 spots increased and 11 spots decreased.

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 Bcl-2 and Bax expression via the regulation of the ERK signaling pathway.

Key Words: *Samul-tang*, oxidative stress, H9c2 cardioblast cells

緒 論

- 접수 : 2004년 9월 5일 · 논문심사 : 2005년 1월 24일
- 채택 : 2005년 2월 19일
- 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의
산한방병원 내과2
(Tel. 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail :
mbs@wonkwang.ac.kr)

四物湯은 宋代 陳¹⁾의 《太平惠民和劑局方》에 “四物湯 調益榮衛 滋養血 治衝任虛損 血虛血滯 月水不調...”라고 처음 수록된 이래 血虛 및 血不和로 인한 제반증상을 치료하는 기본방제로 頭暈目眩, 面色萎

黃,心悸,舌淡,脈細 等症을 치료하는데 활용되어 왔으며, 최근에는 造血, 血流改善, 物質代謝促進, 免疫機能의 增進 등에 광범위하게 응용되고 있다²⁻¹¹⁾.

최근 전 세계적으로 증가추세에 있는 심혈관계 질환(cardiovascular disease)은 주요 사망원인이 되고 있으며, 우리나라에서도 가장 큰 비중을 차지하고 있다¹²⁾. 이 과정에서 발생하는 활성산소종에 의한 산화성 손상은 심혈관계 질환의 주요 발생 원인인자로 작용하고 있다^{13,14)}. 죽상동맥경화, 대동맥협착증과 같은 혈관질환은 허혈을 초래하여 심근에 산소 공급이 부족해 지는데, 이때 재관류시 심근세포에서 O²⁻, H₂O₂, OH⁻ 등의 활성산소종이 발생하여 심근세포 손상을 초래한다^{15,16)}.

四物湯은 滋陰養血하는 熟地黃과 補血養肝하는 當歸, 柔肝止痛養血하는 白芍藥 및 活血行滯하는 川芎으로 구성되어있으며, 血虛 및 血不和로 인한 허혈성 심장질환의 기본 방제로 활용되고 있으므로 심근세포의 산화적 손상에 대한 방어효과 및 기전을 실험적으로 究明하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

四物湯에 관한 실험적 연구로는 혈관내피손상 회복²⁾, 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향³⁾, 造血效果^{4,5)}, 혈압강하효과⁶⁾, 고점도혈증의 개선효과와 항혈전효과⁷⁻⁸⁾, 면역기능에 미치는 영향⁹⁻¹⁰⁾ 및 H₂O₂에 의한 배양심근세포에 대한 방어효과 등이 보고되어 있다.

본 실험에서는 四物湯 추출액이 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 생존율에 미치는 영향과 세포의 형태적 변화, Bax와 Bcl-2 단백질 및 ERK1/2 저해제에 대한 효과 그리고 2-Dimensional gel electrophoresis를 이용하여 H₂O₂에 의해 유도되는 세포독성에 대한 방어기전에 관여하는 신호전달 단백질들의 발현양상을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

1) 세포주

Embryonic rat 심장에서 유래한 H9c2(CRL1446) 심근세포주는 ATCC (American Type Culture

Table 1. Prescription of Samul-tang.

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	<i>Radix Rehmanniae</i>	12 g
當歸	<i>Radix Angelicae Gigantis</i>	12 g
白芍藥	<i>Radix Paeoniae</i>	8 g
川芎	<i>Rhizoma Cnidii</i>	6 g
Total amount		38 g

Collection)로부터 구입하여 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 四物湯의 처방내용은 《太平惠民和劑局方》¹¹⁾에 의거하였으며, 약재는 圓光大學校 益山韓方病院에서 구입하여 정선한 후 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 <Table 1>과 같다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl-2, Bax 등의 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase 와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)은 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 검액조제

四物湯 100g을 물 1 l 와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음, 거르로 여과하고 3,200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporator)로 농축한 다음, -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, Freeze Dryer로 동결건조시

킨 후 17.8g의 시료를 얻어 세포에 투여하기 전 농도를 조정하여 사용하였다.

2) H9c2 심근세포주 배양

Embryonic rat 심장에서 유래한 세포주인 H9c2(ATCC, CRL1446)는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여 세포 죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3) 세포생존율 측정

세포 활성도는 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵세포수/ml)를 1ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 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 100μl/well을 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음, 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Flow cytometry 분석

세포고사 현상을 조사하기 위하여 propidium iodide(PI)로 H9c2 세포의 DNA를 염색한 후 FACS Vantage flow cytometry를 이용하여 sub G₀/G₁ 세포 분획을 측정하였다. 세포는 150μM의 H₂O₂를 처리한 후, 포집하여 차가운PBS로 세척하고, 70% 에탄올로 4℃에서 4시간 고정한 후 PI(50μg/ml)가 포함된 PBS와 실온에서 10분 반응시켰다. FACS Vantage flow cytometry를 이용하여 DNA양에 비례한 세포의 주기를 측정하였으며, 그 정보의 분석은 Cell Quest Software(Becton Dickinson)를 이용하였다.

5) 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H9c2 세포에 四物湯을 처리한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는

formaldehyde(3.7%)가 포함된 0.5% crystal violet 용액으로 실온에서 5분 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 위상차 현미경(Phase contrast microscope, Nikon, TE300, Japan)으로 관찰하였다.

6) Western blot analysis

배양된 H9c2 세포에 四物湯 등을 처리한 후 세포를 포집하여 차가운 생리식염수로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin)과 4℃에서 30분 처리하였다. 13,000rpm에서 20분 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질: 200μg)은 2×sample buffer와 섞어 100℃에서 5분 끓인 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. Bcl-2와 Bax에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 ECL kit을 사용하여 ECL 필름에 발색하였다.

7) 2-D gel electrophoresis

(1) 시료 준비와 등전위 전기영동(sample preparation Isoelectric focussing(IEF))-1차 분리 : 배양된 H9c2 세포에 한약재와 H₂O₂를 처리한 일정 시간 후에 포집하여 sample lysis buffer(8M urea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 20mM Tris base, 0.2% ampolyte)를 상온에서 가한 후 5초 간격으로 1분 동안 sonication한다. 고속 원심분리기로 13,000rpm, 18℃, 20분의 조건으로 원심분리하고 상층액을 취하여 BCA법으로 정량하였다. Bio-rad사에서 구입한 isoelectronic focussing 기계를 20℃로 맞춘 후 준비된 sample과 rehydration buffer (8M urea, 2% CHAPS, 0.2% IPG buffer, bromophenol

blue, 18mM DTT)를 rehydration tray에 분주하고, 상용화된 IPG strip(Bio-rad)을 떼어내어 sample solution에 strip이 gel면에 닿도록 sliding하였다. 1시간 후 mineral oil을 strip 위에 덮어주어 gel이 마르거나 urea가 적출되지 않도록 하고, 11-15시간동안 방치 후 strip을 IEF tray로 옮기고, mineral oil로 덮은 다음, IEF를 Bio-rad사에서 제공하는 방법으로 수행한 후 strip을 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

(2) 2-dimentional electrophoresis(2-D)-2차 분리 : IPG strip을 이차원 분리 과정인 SDS-PAGE에서 사용하는 SDS buffer system으로 평형화(equilibration) 후 strip에 SDS equilibration buffer I (50mM Tris-Cl(pH 8.8), 6M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, bromophenol blue, 2% DTT, 2.5% Idoacetamide, 1% DTT)을 충분히 잠기도록 넣고, 20분 반응시킨 후 SDS equilibration buffer II (buffer I + 2.5% Idoacetamide)를 넣고 20분 반응시켰다. 미리 준비해 둔 SDS-PAGE에 IPG strip을 gel쪽이 유리판 앞으로 향하도록 하여 SDS gel 상단에 엮었다. Strip의 acidic한 부분에 단백질 size marker(Bio-rad)를 적제한 후 agarose를 40-50℃로 식힌다음, 천천히 IPG strip 위쪽에 흘러 넣어 strip을 고정하고 1-2분 후 agarose가 굳은 것이 확인되면 전기영동을 실시하였다. Polyacryamide gel의 silver staining은 Pharmacia사에서 제공하는 kit을 사용하였으며, gel내에 단백질을 불용화시키고 방해되는 compound를 제거하는 fixation 단계(30분), image 형성을 증가시키는 sensitization(30분), silver nitrate나 ammomiactal silver를 사용한 silver impregnation(20분), 마지막 단계인 2-5분의 development로 수행하였다. 2-D gel을 분석하기 위하여 먼저 imaging system을 이용하여 gel spot을 digital form으로 얻은 후 이를 analysis software(PDQUEST, Bio-rad Co.)를 이용하여 분석하였다.

8) 통계처리

실험결과와 통계처리는 student's *t*-test에 준하여 처리하였으며, *p*-value가 최대치 0.01(*p*<0.01) 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

結果

1. H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포 죽음에서 四物湯이 세포생존율에 미치는 영향

산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포의 독성을 알아보기 위하여 다양한 농도의 H₂O₂를 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 50μM 저농도에서 약 73%이상의 세포생존율을 나타내었고, 100μM 농도에서는 31%로 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었으며, 200μM의 농도에서는 25%로 급격한 세포생존율 감소를 나타내었다(미발표 성적). 또한 H₂O₂의 시간 의존적인 세포독성을 확인하기 위하여 약 70%의 세포생존율 감소를 나타낸 150μM 농도의 H₂O₂를 다양한 시간별로 처리하여 측정한 결과, 4시간 후부터 약 88.3%로 세포생존율이 감소하기 시작하였고, 6시간 이후에는 59.4%로 급격한 세포생존율 감소가 관찰되었으며, 12시간 이후에는 29.2%의 세포생존율을 나타내어 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었다(미발표 성적).

이러한 H₂O₂에 의해 유발된 심근세포의 세포죽음에서 四物湯이 미치는 세포생존율의 변화를 알아보기 위하여 다양한 농도의 한약재를 30분 전처리한 후 H₂O₂(150μM)를 처리하여 세포죽음이 방지되는지를 MTT 방법으로 측정하였다. 그 결과 300μg/ml의 四物湯을 처리하였을 경우 약 20%의 세포생존율 증가를 나타내기 시작하였으며, 600μg/ml 이상에서는 60% 이상의 세포생존율이 현저하게 증가되어 H₂O₂에 의한 직접적인 산화적 손상에 대한 방어효과를 확인하였다(Fig. 1).

2. 四物湯이 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 형태적 변화에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 형태적 변화를 알아보기 위하여 crystal violet 염색을 통해 위상차 현미경으로 세포의 형태적 변화를 관찰하였다. 먼저 H₂O₂(150μM) 6시간 단독처리시 세포수의 감소와 세포의 응축 등의 변화가 관찰되었으나(Fig. 2B), 四物湯(600μg/ml)의 30분 전처리에 의하여 세포수와 형

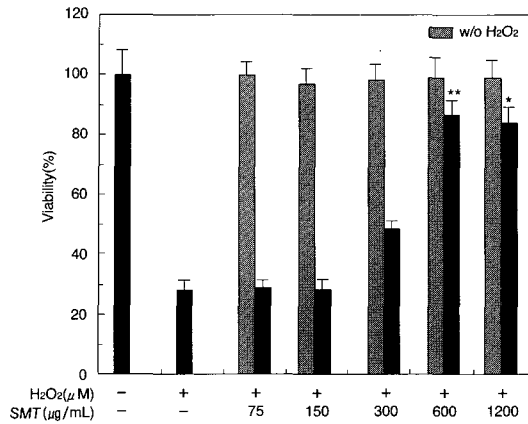


Fig. 1. Effects of *Samul-tang* extract on the viability of H₂O₂ induced-cell death in H9c2 cells in a dose dependent manner. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ by student's *t*-test, compared with only H₂O₂ treated group.

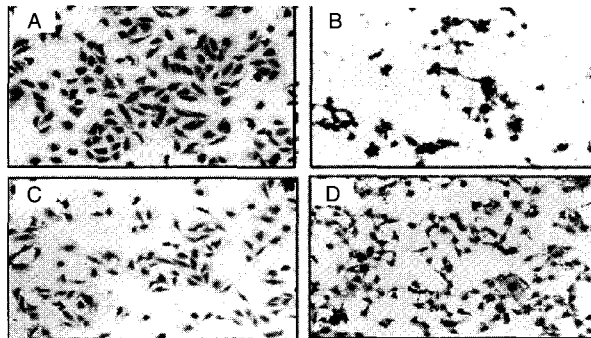


Fig. 2. Morphology of H9c2 cells treated with H₂O₂ alone or *SMT*/H₂O₂. Cells were treated with H₂O₂ alone or *SMT*/H₂O₂ for 6hr. Then, cells stained with crystal violet and observed under phase contrast microscopy. (A) Control cells, (B) H₂O₂-treated cells, (C) *SMT*-treated cells and (D) H₂O₂-treated cells with 600 μg/ml *SMT*.

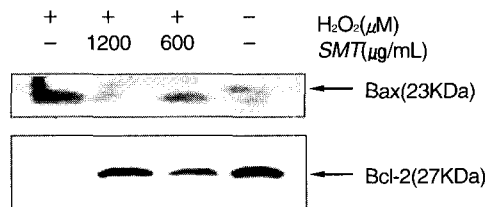


Fig. 3. Protective effects of *SMT* on increased the expression Bax protein and decreased the expression Bcl-2 in H₂O₂-treated H9c2 cells. Cells were treated with 150 μM H₂O₂. Cell lysates were prepared and analyzed by western blotting with anti-Bax and Bcl-2 antibodies.

태가 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 3D). 이때, 四物湯 단독처리에 의한 세포수 및 형태적 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 3C).

3. 四物湯이 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포 고사에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향

150 μ M H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 산화적 손상에 대해 방어효과를 나타내는 四物湯이 세포고사 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl-2 단백질군 즉, Bax 그리고 Bcl-2의 발현 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 이를 위해 배양된 H9c2 심근세포에 四物湯 600, 1200 μ g/ml를 각각 30분 전처리한 후 H₂O₂(150 μ M)를 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액으로부터 여러 단백질의 발현을 Western blotting 방법으로 조사하였다. 먼저 H₂O₂ 단독으로 다양한 시간동안 처리하여 시간 의존적인 Bax의 발현 증가와 Bcl-2의 발현 감소를 관찰하여 발현의 최대 시간을 6시간으로 결정하고 다음 실험을 시행하였다(미발표 성적). 그 결과, H₂O₂ 처리시 발현이 증가되었던 세포고사 촉진 단백질인 Bax의 발현이 四物湯 전처리에 의하여 농도존적으로 감소하였다. 또한 H₂O₂ 처리시 발현이 감소되었던 세포고사 억제 단백질인 Bcl-2 단백질도 四物湯 전처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 3).

4. 四物湯이 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포고사에서 ERK1/2 저해제에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 심근세포 손상에 관여하는 세포고사 신호전달계를 조사하기 위하여 ERK1/2의 저해제로 알려진 PD98059를 전처리한 후 세포 생존율의 변화와 이때 관련단백질의 발현 변화를 MTT 방법 및 Western blot으로 각각 조사하였다. 먼저 다양한 농도의 PD98059, 四物湯(1200 μ g/ml)을 각각 30분 전처리한 후 H₂O₂(150 μ M)을 처리하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 四物湯 전처리에 의해 회복되었던 세포생존율이 PD98059 농도 의존적으로 감소하기 시작하여 10 μ M의 PD98059 처리시 약 51%로 감소

하였다(Fig. 4A). 또한 H₂O₂(150 μ M)에 의한 ERK1/2의 활성 변화를 시간별로 알아본 결과, H₂O₂ 처리 6시간 이후에 활성화되었다. 그러나 四物湯에 전처리시 ERK1/2의 활성이 1시간 후부터 활성을 보이기 시작하여 2시간대에 최고치에 도달하였고, 4시간 이후의 활성은 계속 유지되었다(미발표 성적). 따라서 四物湯 전처리에 의하여 최고 활성화 되었던 2시간 후에 ERK1/2의 저해제인 PD98059를 처리하였다. 그 결과 四物湯 전처리에 의하여 활성화 되었던 ERK1/2의 인산화가 PD98059 처리에 의해 세포생존율의 감소와 함께 억제되었다(Fig. 4B).

5. 四物湯이 2-D을 통한 단백질의 발현에 미치는 영향

배양된 H9c2 세포에 H₂O₂(150 μ M) 단독 6시간 처리군과 四物湯(600 μ g/ml) 30분 전처리 후 H₂O₂(150 μ M)을 6시간 처리한 세포를 포집하여, 파쇄한 후 단백질 추출물(250 μ g)에 대하여 2-D electrophoresis를 시행하였고, 단백질 spots은 silver staining으로 가시화 하였다. Fig. 5에서는 단백질 250 μ g을 2-D gel 상에서 분리하여 약 300여개의 spots을 비교하였다. 이때 四物湯 단독 처리군에서는 세포 생존율에 변화가 없음을 PI 염색에 의한 Flow cytometry를 통하여 분석하였으며, H₂O₂(150 μ M) 단독 처리시 발생하였던 59%의 세포고사 현상이 四物湯(600 μ g/ml) 전처리에 의하여 8%로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 6A 와 B). 또한 H₂O₂에 의한 세포고사에서는 대조군에 비하여 17개 부분의 유의한 증가와, 11개 부분의 감소가 관찰되었다(Fig. 5A and B). 또한 四物湯 전처리를 통하여 H₂O₂에 의해 증가하였던 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 18, 19, 21 및 27번 spots이 대조군 수준으로 감소하였으나, 10, 11 및 12번 spots은 현저한 감소가 관찰되지 않았다(Fig. 7). 또한, H₂O₂에 의한 세포고사에서 발현이 감소되었던 14, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26 및 28번 spots은 대조군 수준으로 현저한 증가를 보였다(Fig. 7). 그러나 四物湯 단독 처리에 의해서는 대조군에 비하여 현저한 spots의 변화를 관찰할 수 없었다(미발표 성적).

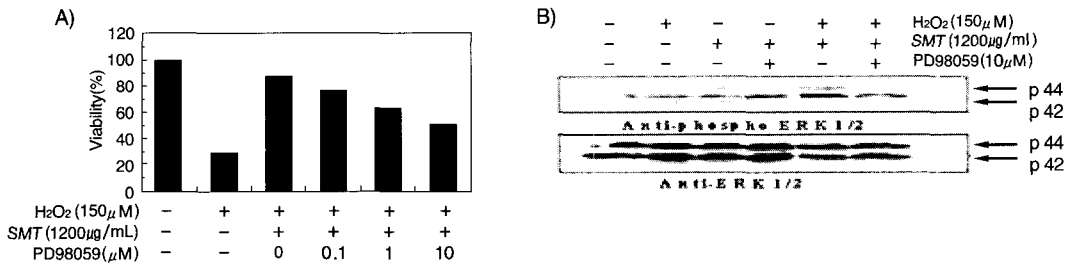


Fig. 4. Effects of ERK1/2 inhibitor, PD98059 and *Samul-tang*(SMT) on H₂O₂-induced cell death of H9c2.

Cells were treated with 150 μM of H₂O₂. (A) Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. (B) 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. The same immunoblots were stripped and reprobed with anti-ERK1/2 antibodies.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ by student's *t*-test, compared with only H₂O₂ treated group.

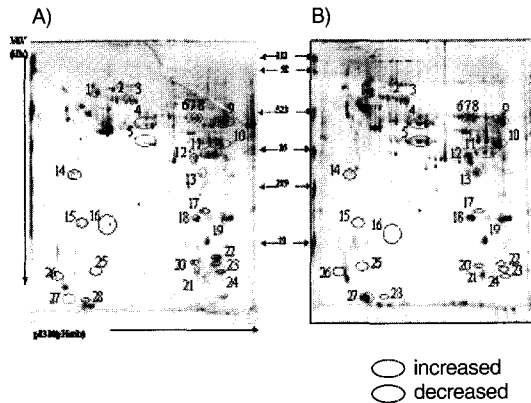


Fig. 5. Silver staining of 2D-PAGE in H9c2 cells.

Numbered protein spots were following treatment with H₂O₂. Molecular weight (MW) and isoelectric point(pI) of a set of protein identified in the pattern.

(A) Control cells, (B) H₂O₂-treated cells.

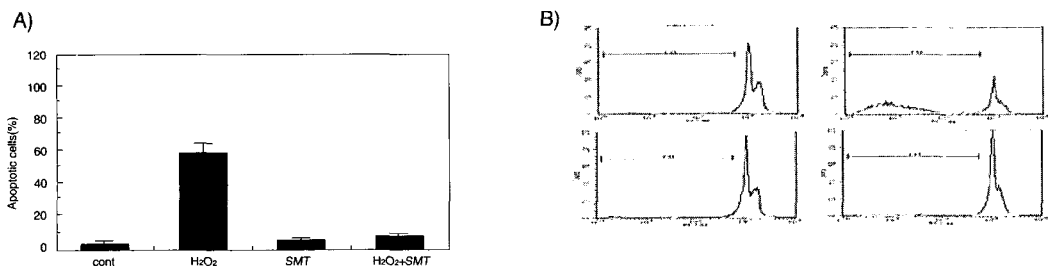


Fig. 6. Viability of H₂O₂-treated H9c2 cells.

(A) Cell viability was measured by flow cytometry analysis as described in Materials and Methods.

(B) Sub-G1 represents fragmented DNA contents (%). Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

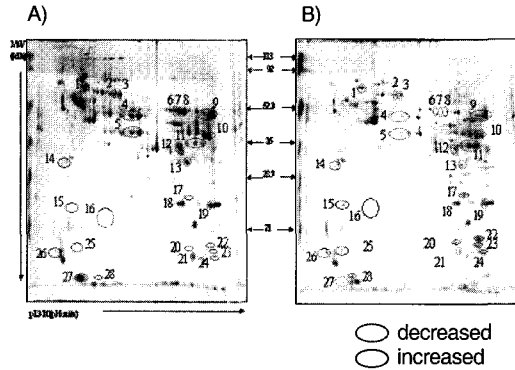


Fig. 7. Silver staining of 2D-PAGE in H9c2 cells.

Numbered protein spots were following treatment with H_2O_2 . Molecular weight (MW) and isoelectric point(pI) of a set of protein identified in the pattern.

(A) H_2O_2 -treated cells, (B) H_2O_2 -treated cells with 600 μ g/ml SMT.

考 察

활성산소종이란 singlet 산소를 함유하고 있는 물질을 총칭하는 것으로 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH^-) 등이 있다. 여러 활성산소종 중에서 H_2O_2 가 가장 주목을 받고 있는 이유는 구리나 철과 같은 전이금속과 반응하지 않는 한 상대적으로 안정되어 있고, 쉽게 세포막을 통과할 수 있으므로 외부의 자극에 반응하여 빠른 시간내에 생성, 소멸되어야 하는 신호전달 물질로 적합하기 때문이며, 호기성 생물의 대사과정 산물인 H_2O_2 는 fentom 반응을 통하여 hydroxyl radical로 전환되어 여러 생체 조직에 손상을 일으킬 수 있는 생체 독성 물질이기 때문이다. 활성산소는 세포내의 산화효소가 촉매로 작용하는 산소의 환원반응에서 발생하며, 이것이 세포성분과 임의로 반응하여 산화체 혹은 과산화체를 형성하는데, 이렇게 형성된 산화체는 단백질, 효소, DNA 등 각 세포성분의 본래 기능을 상실하게 한다. 활성산소종은 활성화된 neutrophils, xanthine oxidase, mitochondrial respiration, arachidonic acid metabolism 등의 다양한 과정을 통해서 생성된다. 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등의 세포내 생리적 방어체계가 작

동하지만 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 방어 체계의 능력을 초과하게 되어 결국 세포손상을 야기시킨다. 최근의 보고에 의하면 활성산소는 심혈관계 통의 허혈-재관류 손상¹¹⁾뿐만 아니라 암발생¹²⁾에도 관여하며, 특히 연령의 증가에 따라 활성산소가 과도하게 축적되면 생체에 불리하게 작용하여 노화의 원인이 된다고 한다¹³⁾.

虛血性 心疾患은 관상동맥의 죽상경화 등에 의해 심근에 대한 혈류가 감소하여 산소의 공급과 요구사이 불균형을 초래하는 심장질환으로 임상적으로는 협심증, 심근경색증, 심인성 급사 및 심부전 등으로 나타난다^{14,15)}. 저산소증이나 무산소증은 적절한 혈액의 관류에도 불구하고 산소공급이 부족하거나 없는 상태를 말하며, 허혈은 혈액의 관류가 저하되어 조직의 산소공급이 결핍되고 대사 산물의 처리과정에 지장을 초래하는 상태이다¹⁶⁾. 저산소성 세포괴사가 일어나기 전에 다시 관류를 회복시키면 역으로 세포손상이 가속화되는데 심근세포에서 O_2^- , H_2O_2 , 그리고 OH^- 등의 활성산소종이 발생하기 때문이다. 심근 허혈의 가장 흔한 원인은 심외막 관상동맥의 죽상동맥경화성 질환이며¹⁷⁾, 역학적 연구 결과 관상동맥 질환을 조기에 유발하는 몇가지 중요한 위험인자에는 가족력, 연령, 남자, 고지혈증, 고혈압, 비만, 흡연, 당뇨병

그리고 여성의 저에스트로겐증 등이 포함된다^{18,19)}.

虛血性 心疾患은 한의학에서 胸痺·胸痛·厥心痛·卒心痛·眞心痛 등의 범주에 속하며, 心絞痛이라고도 한다^{20,21)}. 眞心痛에 대해서는 《內經·舉痛論》에 “寒氣客於背俞之脈 脈澁 血虛而心痛 相引而痛...”이라 하였으며²²⁾, 이 질환의 발생원인은 寒邪內侵, 情志失調, 飲食不當, 汚血 등과 유관하며, 年老體虛하거나 혹은 過勞하면 이러한 발생원인의 영향 하에서 쉽게 발병한다고 하였다²³⁻²⁵⁾.

四物湯은 熟地黃, 當歸, 白芍藥, 川芎으로 구성되어 있다. 熟地黃은味甘 性微溫하며, 肝·腎經으로入하고, 滋陰, 補血하는 효능이 있어 陰虛血少, 腰膝萎弱, 月經不順, 心悸, 怔忡 등에 사용되며, 심장에 대해서 強心利尿하고, 骨髓에 작용하여 造血을 촉진시킨다. 當歸는 味辛 性溫하며, 肝, 心, 脾經으로入하고, 補血, 調經, 和血하는 효능이 있어 頭痛, 眩暈, 跌打損傷과 月經不順, 經閉 등의 婦人科 疾患에 사용되며, 자궁에 대한 수축작용, 적혈구 감소증, 조혈과 혈액순환 장애에도 쓰인다. 심혈관계에 대해서는 심근층의 불응기를 연장시키고 혈압을 낮추며, 관상동맥 확장, 항혈소판 작용, 혈중 콜레스테롤치 저하 등의 작용을 한다. 白芍藥은 味酸 性涼하며 肝, 脾經으로入하고, 柔肝止痛, 養血斂陰, 平抑肝陽의 효능이 있어 胸腹疼痛, 脇痛, 眩暈 등에 사용되며, 순환기계에서 작용하여 말초혈관을 확장시켜 혈압을 낮추고, 관상동맥의 혈류량을 증가시킨다. 川芎은 味辛 性溫하며 肝, 膽經으로入하고 行氣, 祛風, 活血, 止痛의 효능이 있어 血中の 氣藥으로 頭痛, 眩暈, 月經不順, 産後 瘀血塊痛에 사용되며, 심장에 대해서 직접 말초혈관을 확장시키고, 大量을 사용하면 혈압이 下降되며, 심근수축력을 증가시키고 심박동수를 저하시키며, 관상동맥 혈류량을 개선시키고 심근에서의 산소소비량을 감소시킨다. 또한, 항동맥경화증 및 항고콜레스테롤 제제로도 사용되며, 혈관신경에 작용하여 순환촉진과 혈액의 신진대사에 관여한다. 따라서 四物湯은 補血, 造血 및 活血의 대표적인 方劑로 血虛 및 血不和血로 인한 각종 혈액질환과 순환기계 질환에 광범위하게 활용되고 있다.

이에 저자는 본 실험에서 산화적 손상으로 인한 심근세포에서 四物湯의 방어작용 및 기전을 연구하기 위하여 四物湯 추출액을 전처리한 후 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 손상에서 세포독성^{26,27)}에 미치는 영향을 관찰하고 이때의 작용기전과 Bax, Bcl-2 단백질 및 ERK1/2 저해제에 대한 효과와 심근세포 고사를 억제하는 과정에 관여하는 신호전달 분자들의 발현 양상을 2-Dimensional gel electrophoresis를 이용하여 조사하였다.

먼저 H9c2 심근세포에 산화적 손상을 일으킬 수 있는 조건으로 H₂O₂를 다양한 농도별로 처리하여 세포생존율의 변화를 측정하였다. 100μM 이상에서 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈으며, 약 30%의 세포생존율을 보이는 150μM 농도의 H₂O₂를 손상의 조건으로 결정하였다. 또한 시간에 따른 세포생존율을 조사한 결과 처리 4시간 후부터 약 12%의 세포생존율이 감소하였으며, 6시간 이후에는 약 41%의 급격한 세포생존율의 감소가 발생하였고, 12시간 이후에는 약 30%의 세포생존율을 나타내었다. 상기와 같이 유발된 H9c2 심근세포의 세포죽음에서 四物湯의 방어효과를 알아보기 위하여 四物湯을 다양한 농도로 30분 전처리한 결과, 300μg/ml의 농도에서 20% 이상 세포생존율이 증가하기 시작하여 600μg/ml 이상에서는 89% 수준으로 현저한 세포생존율 회복을 나타내 H₂O₂에 의한 직접적인 산화적 손상에 대한 四物湯의 방어 효과를 확인하였다. 저농도의 활성산소에 의해서는 세포고사의 전형적인 특징인 DNA의 분절이 보고되었다^{28,29)}. 본 실험에서도 H₂O₂ 처리에 의한 세포고사 현상과 四物湯의 방어기전을 밝히기 위하여 Agarose gel electrophoresis와 Hoechst staining을 통하여 핵산의 변화를 관찰한 결과 H₂O₂에 의한 사다리모양의 DNA 분절이 四物湯의 농도에 의존적으로 사라졌으며, Hoechst staining에 의한 세포의 형광 현미경하에서의 관찰에서도 DNA 분절현상이 chromatin의 응축을 거쳐 대조군 수준으로 회복되었다(미발표 성적). 또한 crystal violet 염색을 통하여 세포의 형태적 변화를 관찰한 결과에서도 H₂O₂ 처리에 의한 세포의 응축과 세포수의 감소가 四物湯 전처리에 의해

대조군 수준으로 회복되었다.

세포고사를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암 유발 유전자 산물의 하나인 Bcl-2는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 밀접하게 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 종류가 존재한다³⁰. 이중 Bcl-2 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여하고 있다. 세포고사를 억제하는 Bcl-2의 작용기전은 산화환원반응의 조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase protease의 효소 활성조절, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절, 스트레스 연관 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 효소 활성을 조절한다고 알려져 있다³¹. 한편, Bax 단백질은 Bcl-2와는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있다. 특히 Bcl-2 단백질군은 c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 mitochondria의 막에 결합할 수 있다³². 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-XL을 과발현 시켰을 경우 미토콘드리아 막전위(MPT, $\Delta\psi_m$)의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다³³. 반대로 Bax나 Bak 단백질을 과발현 시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하였고, mitochondrial membrane depolarization을 유도함이 보고되었다³⁴.

본 실험에서는 심근세포의 산화적 손상에 대해 방어작용을 하는 四物湯 처리시의 Bcl-2 및 Bax의 발현 양상 변화를 조사하였다. H₂O₂ 유도성 H9c2 세포고사에서 발현이 감소하였던 Bcl-2 단백질이 四物湯 처리시에는 농도 의존적인 증가와 함께 세포사멸촉진 단백질인 Bax의 발현감소를 유도하여 四物湯이 세포고사 관련 단백질의 발현을 조절하는 것으로 추정되었다. 또한 정상적으로는 mitochondria의 intermembrane space에 존재하여 respiratory chain에서의 전자전달자의 역할을 수행하며³⁵, 세포고사 초기에 cytochrome c가 세포질로 방출되며, 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, dATP 등과 함께 caspase-9을 활성화 시킨다. 이러한 cytochrome c의 방출기전에 대한 것은 아직 충분히 밝혀져 있지 않지만 Bcl-2 및

Bcl-XL (방출저해), 그리고 Bax (방출촉진) 등에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있다. 이어서 활성화된 caspase-9는 다음 단계의 caspase-3를 활성화 시키게 된다³⁶. 본 연구 결과에서는 H₂O₂ 처리에 의하여 mitochondria의 막전위 감소를 JC-1과 Rhodamon 123 형광염색을 통하여 확인하였고, cytochrome c의 세포질 내로의 방출을 Western blot을 통해 관찰하였으며, 또한 이러한 mitochondria의 기능장애에 의한 H9c2 심근 세포 고사가 四物湯에 의해 회복됨을 확인하였다(미발표성적).

한편 MAPK는 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막에서 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계이다. 포유동물에서 MAPK는 지금까지 3가지(ERK, JNK/SAPK, p38) 이상이 발견되어 이들이 family를 이루고 있다³⁷. MAPK는 MAPKKK→MAPKK→MAPK로 연결된 protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후 여러 가지의 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포반응을 유발한다³⁸. 성장 인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고 자외선 등의 스트레스, 그리고 TNF 등의 염증성 cytokaine은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화한다³⁹. 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 보고되었다⁴⁰. 본 실험에서는 ERK1/2의 저해제인 PD98059를 四物湯(1mg/ml)에 처리한 후 H₂O₂(150 μ M)를 처리하여 신호전달의 경로를 알아보았다. 그 결과 四物湯에 의해 회복되었던 세포생존율이 ERK1/2의 저해제인 PD98059에 의해 H₂O₂에 의한 세포죽음에 대한 四物湯의 방어효과가 저해되었고, Western blot을 통해 ERK1/2의 활성을 확인한 결과, H₂O₂ 단독처리시보다 이른 시간대에 활성화가 이루어져 세포생존의 기전은 ERK1/2의 활성화 경로가 밀접하게 관여되어 있는 것으로 생각된다.(미발표성적). 또한 ERK1/2의 저해제인 PD98059의 처리가 四物湯에 의한 세포고사

방어효과를 감소시켰으며, 이때 ERK1/2의 활성화도 억제하였다.

1980년 이래 20년 동안 유전자 조작기술의 발달과 더불어 DNA 및 RNA를 포함한 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되어 high-throughput 유전자 분석기술이 크게 발달되었다. 이를 이용하여 인간게놈 프로젝트가 진행되어 전체 인간 유전자의 염기 서열이 모두 밝혀졌으나 그 유전자에서 발현되는 단백질의 기능에 대한 연구는 현재 진행 중이다. 심혈관질환은 발병 후 심각한 합병증 및 지속적인 치료가 요구되는 질환으로 질병의 예방이 중요하다. 특히 고혈압 및 동맥경화증 등으로 인한 심혈관계 질환은 생활 습관이나 환경적인 영향과 함께 유전적 요인에 의해 질병발생률에 차이를 보이고 있으므로 유전적 위험요인의 규명으로 고위험군을 예측하고 이들에 대한 교육 및 환경적 요인의 조절을 통한 질병발생의 예방이 중요하게 인식되고 있다. 본 연구에서도 H_2O_2 와 四物湯 전처리 시 세포 내에서 발현되는 단백질들을 분리, 확인하기 위하여 기존의 생화학적 방법으로 2-D gel electrophoresis를 실시하였다. 그 결과 2-D gel electrophoresis를 이용하여 세포 단백질을 분리하였고, 약 300여개의 spots을 비교하여 H_2O_2 처리 시 유의하게 증가하는 17개의 spots과 감소하는 11개의 spots이 四物湯 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였다. 특히 H_2O_2 처리에 의해 발현이 증가하는 spots은 92kDa에서 35kDa의 분자량을 보이는 단백질이었으며, 발현이 감소하는 spots은 30kDa 미만의 단백질들로서 Bcl-2 단백질들일 가능성을 제시하였으며, 이때 발현이 증가 혹은 감소하는 각각의 spots은 MALD-TOF 등을 통한 정확한 아미노산 서열의 분석이 필요하며, 각 단백질의 기능에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 종합하면 $150\mu M$ 의 H_2O_2 와 H9c2 심근세포의 세포고사에서 세포의 형태적 변화, Bcl-2의 발현 감소 및 Bax의 발현 증가에 대한 방어효과를 보이는 四物湯은 DNA 분절 및 세포고사성 단백질의 발현조절을 통하여 H_2O_2 에 의한 H9c2 심근세포의 산화적 손상에 방어효과를 나타낸 것으로 생

각되며, 2-D gel electrophoresis를 통해 확인한 이들 단백질은 추후에 아미노산 서열 분석을 통하여 확인한 후에 산화적 손상에 방어효과를 나타내는 四物湯의 방어기전에서 단백질의 발현 형태, 단백질의 post-translational modification, 단백질-단백질 상호결합 profile 등의 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

結 論

허혈상태에서 야기되는 H_2O_2 에 의한 심근세포의 산화적 손상에 四物湯의 방어효과를 알아보기 위하여 四物湯을 전처리한 후 H_2O_2 에 의한 H9c2 배양 심근세포의 죽음을 유도하여 세포생존을 변화, 세포의 형태적 변화, Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현, ERK1/2의 저해제인 PD98059의 영향, ERK1/2의 활성화 및 2-D를 통한 단백질 발현을 조사, 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H_2O_2 는 $150\mu M$ 의 농도에서 H9c2 심근세포에 세포의 형태적 변화, Bcl-2의 발현 감소, Bax의 발현 증가를 보이는 전형적인 세포고사를 유도하였다.
2. 四物湯은 H_2O_2 에 의한 H9c2 심근세포의 세포생존율을 유의성 있게 증가시켰으며, H_2O_2 에 의한 세포의 형태적 변화를 억제하였다.
3. 四物湯은 H_2O_2 에 의해 발현이 감소한 Bcl-2 단백질을 농도 의존적으로 증가시켰다.
4. 四物湯은 H_2O_2 에 의해 발현이 증가한 Bax 단백질을 농도 의존적으로 감소시켰다.
5. 四物湯은 ERK1/2의 활성화를 통하여 H_2O_2 에 의한 세포고사를 유의성 있게 억제하였다.
6. 四物湯은 2-D를 통한 단백질의 발현 변화 분석에서 H_2O_2 에 의한 17개의 발현 증가된 spots과 감소된 11개의 spots을 대조군 수준으로 회복시켰다.

이상의 결과로 보아 四物湯은 H_2O_2 에 의해 야기되는 심근세포의 산화적 손상에서 Bax 및 Bcl-2 단백질군의 발현 조절과 ERK1/2의 활성화를 통해 방어효과를 나타내므로 虛血性 心臟疾患 등의 心血管系 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

參考 文獻

1. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社. 1975: 242.
2. 南昌圭. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1998.
3. 朴鍾雲. 四物湯이 老化白鼠 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1998.
4. 金世吉. 四物湯이 貧血家兔의 造血效果에 미치는 영향. 원광대학교 한의과대학 학위논문집. 1982;2: 143-152.
5. 洪茂昌 外. 四物湯 투여가 家犬의 赤血球像에 미치는 영향에 관한 연구. 경희대학교 한의과대학 논문집. 1978;1:117-120.
6. 姜昌洙. 四物湯 煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1984.
7. 河智容. 四物湯 및 四君子湯이 endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1988.
8. 權在龍. 四物湯 및 季節別 活用力이 血液에 미치는 영향. 대구한의과대학 대학원. 1988.
9. 申榮京. 四物湯의 季節別 倍味, 加味에 의한 생쥐의 體重變化 및 免疫機能에 미치는 影響. 대구한의과대학 대학원. 1988.
10. 咸昌植. 四物湯과 四物湯의 계절별 倍味 및 加味가 免疫機能과 血液에 미치는 영향. 경산대학교 대학원. 1996.
11. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. Science. 1985;227:375-381.
12. Yagi K. Serum lipid peroxide levels in subjects having certain diseases and in aging, in Miquel J, Quintanilha AT, Weber H(eds). Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. Boca Raton, CRC press. 1989;1:113-230.
13. 의학교육연수원. 家庭醫學. 서울:서울대학교 출판부. 1995:300-319.
14. 해리스 번역 편찬위원회. HARRISON' S 내과학. 서울:도서출판 정담. 1997:1157-1165.
15. 이원로 編著. Clinical Cardiology. 서울:고려의학. 1998:759-768.
16. 전국의과대학 교수 번역. 임상의학 오늘의 진단 및 치료. 서울:도서출판 한우리. 1999:401-432,
17. 趙鴻斌, 王雨亭 主編. 心腦血管病中醫證治學. 北京: 學術書刊出版社. 1990:113-143.
18. 全國 韓醫科大學 心系內科學 教室 編. 心系內科學. 서울:書苑堂. 1999:215-226,
19. 金完熙, 崔達永 共編. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1985:190-191.
20. 王永 註. 黃帝內經(靈樞). 서울:成輔社. 1975:278-279.
21. 虞天民. 醫學正傳. 서울:醫藥社. 1973:346.
22. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes: protection against free radical toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1996;159(3):175-84
23. 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
24. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. Chemotherapy -induced apoptosis. Adv. Pharmacol. 1997;41:461.
25. Naora, H., Nishida, T., Shindo, Y., Adachi, M., and Naora, H. Constitutively enhanced bcl expression is associated with the induction of inter-nucleosomal DNA cleavage by actinomycin D. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996;224:258-264.
26. Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev, 1999;13:1899-1911.
27. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. : Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. CMLS. 1998;54:427-445.
28. Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M. J., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science. 1989;245:301-305.

29. LiPF, Dietz R, Von Harsdorf R. 53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO*. 1999;18:6027-6036.
30. 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*, 1999;163(9):4683-93.
31. Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:783-789.
32. Kim Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase-3 like activity via distinct mechanism. *J. Biol. Chem*. 1997;272:311-338,
33. Chen WC, Chen CC. Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts: role of Ca^{2+} and the protein kinase c-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 1999;140(4):1639-48.
34. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K. Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase ζ during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem Jun*. 2000;275(26):199217.
35. Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(8):1651-64.
36. 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.
37. Mills PB, Mills K, Johnson AW, Clayton PT, Winchester BG. Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics.*, 2001; 1(6):778-86.
38. Wulfkuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF 3rd. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics*. 2001;1(10):1205-15.
39. Su CY, Chong KY, Chen J, Ryter S, Khardori R, Lai CC. A physiologically relevant hyperthermia selectively activates constitutive hsp70 in H9c2 cardiac myoblasts and confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(4):845-55.
40. Sandra S, Cristine L. G, John JL, Andrew ML, Angel MA, Anthony JM, Maria CR, and Anderson NL. Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis*. 2000;21:2129-37.