

# 시스플라틴 이독성에서 사물탕의 보호효과

박찬희 · 이정환 · 이상헌<sup>1\*</sup>

원광대학교 의과대학 미생물학교실, 1:이비인후-두경부외과학교실

## Protective Effect of Samul against Cisplatin in Primary Rat Organ of Corti Explant

Channy Park, Jeong Han Lee, Sang Heon Lee<sup>1\*</sup>

*Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology,  
1:Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wonkwang University, School of Medicine*

The water extracts of Samultang (Samul) has been used for treatment of ischemic heart and brain damage in Oriental traditional medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of Samul rescues cells from oxidative damages in cisplatin-induced ototoxicity. Cisplatin is a widely used chemotherapeutic agent that is also highly ototoxic. This study was designed to investigate the protective effects of Samul on cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OC1 auditory cells and organ of Corti explant culture. Cisplatin markedly decreased the viability of HEI-OC1 auditory cells. However, treatment of HEI-OC1 cells with Samul significantly reduced cisplatin-induced cell death and apoptotic characteristics through reduction of intracellular peroxide generation. Cisplatin induced cytotoxicity in isolated and cultured hair cell progenitors from postnatal rat cochleae. These progenitor cells are isolated from the lesser epithelial ridge (LER, or outer spiral sulcus cell) area of pre-plated neonatal rat cochlear segments. However, Samul completely protected the morphological changes of organ of Corti and LER. Taken together, these data suggest that the protective effects of the water extracts of Samul against cisplatin may be mediated by the reduction of intracellular peroxide generation.

**Key words :** Cisplatin, ototoxicity, Samul, Protective effect, Organ of Corti

### 서 론

청각은 와우기관에 전달된 음의 파장이 청각각 유모세포를 자극하여 유발된 전위가 와우신경을 통해 와우신경핵으로 전달된 후 대뇌 측두엽의 청각중추에 도달하여 음으로 인식된다. 전정와우기관의 발달과 손상과정에서 세포고사의 역할은 내이 감각기관으로 발달하는 과정에서 세포의 증식, 분화 및 사멸의 과정을 거치므로 청각기능의 발달과 성숙과정에서 세포고사는 척추동물의 내이와 중추표적 신경조직의 정상적인 형성을 위해 요구되는 자연적인 현상으로 인식되고 있다<sup>1)</sup>. 특히 전정와우기관 유모세포 손상의 주된 요인은 활성산소종으로 유모세포의 고

사를 유도하여 청각장애를 일으킨다. 이러한 활성산소종의 원인은 세포성장인자의 결핍, 허혈, 재관류, 일산화질소, 글루타메이트에 의한 흥분독성, 임신중 알콜, 아미노글루코시드계열 항생제 및 시스플라틴 등의 항암제를 포함하는 이독성 약물이다<sup>2)</sup>. 대표적인 이독성 약물인 시스플라틴은 다양한 암의 치료에 광범위하게 사용되고 있으나 임상적으로 이명 및 고주파수 청력손실 및 청력 상실 등의 청각기능 손상과 신장독성의 부작용을 유발하여 사용에 제약이 되고 있다<sup>3)</sup>.

四物湯은宋代 陳 等<sup>4)</sup>의 《太平惠民和劑局方》에 “四物湯 調益榮衛 治衝任虛損 月水不調...”라 하여 최초로 수록된 이래로 歷代 醫家<sup>5-9)</sup>에 의해 血虛證에 대한 補血과 調經 및 活血의 기본 방제로 사용되어 왔으며, 최근에는 심혈관계질환, 뇌혈관계질환, 부인과질환 등에 광범위하게 응용되고 있다<sup>10,11)</sup>. 四物湯은 補血과 活血을 목적으로 血虛證이나 瘀血證에 쓸 수 있는 처방이다. 따라서 허혈성 심혈관질환의 病機가 韓醫學에서 말하는 血虛·

\* 교신저자 : 이상헌, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : pericom@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-1314

· 접수 : 2007/01/22 · 수정 : 2007/01/31 · 채택 : 2007/02/16

瘀血證과 유사하여 血虛·瘀血證의 代表方이라 할 수 있는 四物湯을 사용하여 실험·연구하였다. 四物湯에 관한 실험적 연구로는 造血效果<sup>12,13</sup>, 혈압강하효과<sup>14</sup>, 고지혈증의 개선효과와 항혈전효과<sup>15,16</sup>, 면역기능에 미치는 영향<sup>4</sup>, 노화로 인한 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향<sup>17</sup>, 혈관내피손상 회복<sup>18</sup> 등이 보고되어 있다. 특히 허혈 상태에서 야기되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 심근세포의 산화적 손상에 대한 보호효과가 보고되어 있다<sup>19</sup>.

따라서 이 연구에서는 시스플라틴에 의한 청감각 세포의 산화적 손상을 방어하는 四物湯의 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 약재는 陳師文<sup>4)</sup>의 《太平惠民和劑局方》에 기재된 구성내용을 바탕으로 하여 원광대학교 의학한방병원에서 정선한 것으로서 한 첩 분량은 다음과 같다.

Table 1.

한약명	생약명	중량	%
숙지황(熟地黃)	<i>Radix Rehmanniae</i>	12 g	31.6 %
당귀(當歸)	<i>Radix Angelicae Gigantis</i>	12 g	31.6 %
백작약(白芍藥)	<i>Radix Paeoniae</i>	8 g	21.0 %
천궁(川芎)	<i>Rhizoma Cnidii</i>	6 g	15.8 %
총량		38 g	100 %

#### 2) 검액조제

실험에 사용된 약재는 물을 용매로 추출하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물 (H<sub>2</sub>O extract)은 음건된 사물탕 100 g을 물 1 ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 濾過하고 3200 rpm으로 20 분 원심분리 후 濃縮器 (Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃ (Deep Freezer)에서 12 시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥 시킨 것을 試料로 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

실험에 필요한 DMEM, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사 (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양용기 (24-well plate, 10cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide (MTT), cisplatin 및 TRITC-labeled phalloidin은 Sigma사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) HEI-OC1 세포주 배양

마우스 와우기관 of Corti에서 유래한 청감각 유모 세포인 HEI-OC1은 미국 House Ear Institute (Los Angeles, CA, USA)의 Kalinec 박사로부터 분양받았다. 세포는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 (33℃, 5% CO<sub>2</sub>) 항생제 첨가 없이 10% 우태아 혈청이 포

함된 DMEM으로 배양하였고, 48시간 주기로 0.05% Trypsin-EDTA를 사용하여 계대 배양하였다.

#### 2) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판 (24-well plate)에 세포 (1×10<sup>5</sup> cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종 부피의 1/10 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액 100 μl/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 3) 세포내 ROS 생성의 측정

Cisplatin과 사물탕에 의한 세포내 활성산소의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; sigma)와 hydroethidium (HE ; Molecular probe)을 이용하였다. 비형광물질인 DCFH-DA는 세포내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광 (FL-1H)을 발한다. 또한 파랑색의 hydroethidium은 superoxide 존재 시 산화되어 붉은 색의 형광 (FL-2H)을 발하게 된다. 두 형광의 정도는 생성되는 세포내 활성산소 양에 비례하여 증가한다. 각 시약의 처리 후 세포를 수확하기 전에 5 μM DCF-DA 혹은 5 μM hydroethidium을 처리하여 33℃에서 30분간 반응 후 PBS (pH 7.4)로 세척하고 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확, 다시 PBS로 세척하여 Flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하고 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

#### 4) Sprague-Dawley rat에서 cochlear 분리

생후 2일이 지난 랫드를 알코올로 소독한 후 clean bench에서 모든 분리작업을 수행하였다. 실험도구는 알코올에 소독한 후 사용하였으며, 랫드 두경부를 통하여 두개골을 절단하고 bullar를 노출 시킨 후 cold PBS로 세척 후에 cochlear를 분리하였다.

#### 5) Organ of Corti 배양

생후 2일이 지난 랫드 cochlear explant에서 분리한 organ of Corti의 배양은 collagen을 코팅한 coverslip을 이용하였다. 먼저, coverslip을 알코올로 소독한 후에 4 well plate에 넣고, Type I rat-tail collagen (3.76 mg/ml in 0.02 N acetic acid), 10× basal medium Eagle (BME) 그리고 2% sodium carbonate를 9:1:1의 비율로 혼합한 후, coverslip에 15 μl씩 분주하여 실온에서 15분 반응하였다. Collagen matrix가 완성되면 media를 첨가한다. Cochlear에서 분리한 organ of Corti는 base, middle, apex의 세 부분으로 나누며 본 실험에서는 middle turn만을 실험에 적용하였다. 12 well plate 내의 coverslip에 middle turn을 부착한 후 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양하였다.

#### 6) Phalloidin 염색

분리, 배양한 cochlear explant의 organ of Corti는 시약 처리 후, 4% paraformaldehyde로 30분 고정하고 생리식염수 (PBS, pH7.4)로 세척한 후 0.25% Triton X-100으로 5분 실온에서 반응

하였다. TRITC-labeled phalloidin (Sigma P1951, 1:2000)과 30분 실온에서 반응한 후 PBS로 3회 세척하고 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다.

7) 결과 산출 방법

표시된 결과는 4회 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며 p-value가 최대치 0.05 (p < 0.05) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험결과

1. 시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포주의 생존율 변화

시스플라틴 및 사물탕에 의한 HEI-OC1 세포주의 세포독성을 조사하기 위하여 다양한 농도의 시스플라틴과 사물탕을 각각 24시간 처리한 후 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포의 생존율은 1.25 µM 시스플라틴 처리군에서는 대조군의 85%, 2.5 µM 농도에서는 74%로 감소하였으며, 5 µM의 농도에서는 63%, 10 µM의 농도에서는 58%, 20 µM의 농도에서는 47%의 세포 생존율을 보였으며 40 µM의 농도에서는 38% 미만으로 감소하였다(Fig. 1A). 또한 사물탕은 최고 1000 µg/ml 농도에서 89%의 세포생존율을 보였다(Fig. 1B). 따라서 시스플라틴에 의한 HEI-OC1의 세포독성은 농도의존적으로 축적됨을 알 수 있었다.

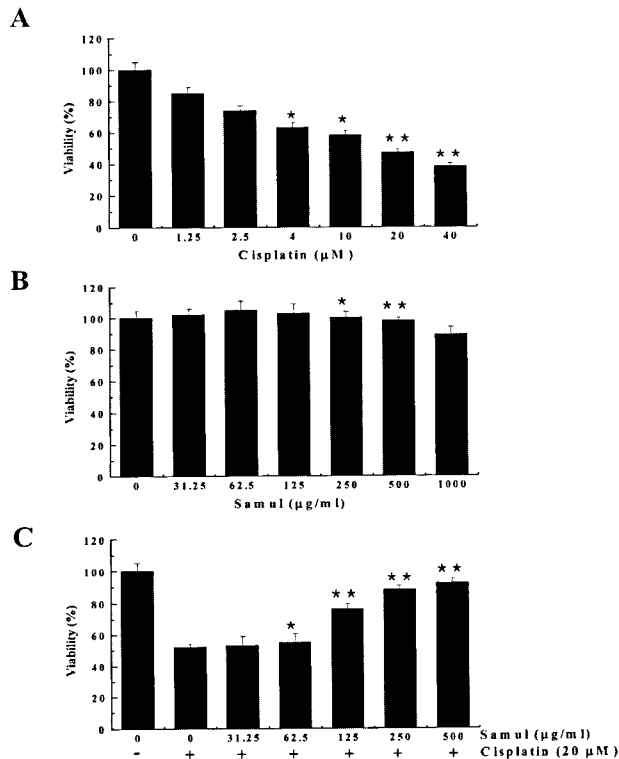


Fig. 1. Effects of cisplatin and samul on viability of HEI-OC1 cells. Cells were treated with various concentrations of cisplatin for 24 hr (A), or added with Samul for 24 hr (B). Cells were pretreated with various concentrations of Samul for 30 min and followed by the addition of 20 µM cisplatin for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. \* p<0.01, \*\* p<0.001 by student's t-test, compared with control group.

2. 시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포사멸에 대한 사물탕의 효과  
시스플라틴의 처리에 의한 세포사멸을 확인하였으므로, 이

때 HEI-OC1 세포 손상에 대한 한약 처방의 보호효과를 알아보기 위하여 사물탕을 다양한 농도로 30분 전 처리한 후 20 µM의 시스플라틴을 24시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포생존율은 시스플라틴 단독처리시 대조군의 52%를 보였으나 사물탕 전처리 실험군은 125 µg/ml의 농도에서는 76%, 250 µg/ml의 농도에서는 88%, 그리고 500 µg/ml의 농도에서는 92%의 세포생존율을 보여(Fig. 1C), 사물탕 농도의존적인 보호효과를 확인할 수 있었다.

3. 시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포사멸에서 활성산소종의 생성변화에 대한 사물탕의 효과

시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포의 사멸에서 활성산소의 생성여부를 확인하기 위하여 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 및 hydroethidium (HE) 염색으로 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성을 flow cytometry (FACS) 분석을 통하여 조사하였다. 먼저 시스플라틴 처리에 의한 DCF-DA 및 HE의 형광 변화를 알아보기 위하여 20 µM 농도의 시스플라틴을 16시간, 18시간 각각 처리한 후 FACS로 분석하였다. 그 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 처리 18시간에 대조군에 비하여 현저한 형광의 증가가 관찰되었으며(Fig. 2A), 시스플라틴 16시간 처리후 HE의 형광 변화가 관찰되었다(Fig. 2B). 이때 사물탕의 전처리에 의해서 시스플라틴에 의해 생성된 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성이 감소하였으며(Fig. 2), 사물탕 자체에 의한 형광 변화는 없었다. 이상의 결과로 시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포사멸은 세포내 활성산소종의 생성에 의한 것으로 판단된다.

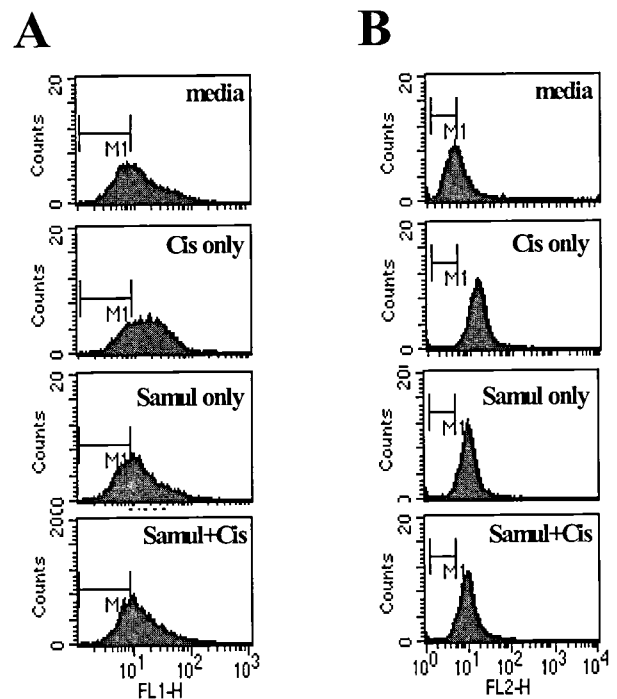


Fig. 2. Reduction of intracellular peroxide by Samul in cisplatin-treated HEI-OC1 cells. (A) HEI-OC1 cells were treated with cisplatin for 18 hr in the absence or presence of Samul. Then, cells were incubated with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, 5 µM) and fluorescence intensity of cells was analyzed by flow cytometry. (B) HEI-OC1 cells were treated with cisplatin for 16 hr in the absence or presence of Samul. Then, cells were incubated with hydroethidium (HE, 5 µM) and fluorescence intensity of cells was analyzed by flow cytometry. The assay was repeated three times independently. The representative data are shown.

4. 시스플라틴에 의한 organ of Corti의 형태적 변화에 대한 사물탕의 효과

시스플라틴에 의한 직접적인 청각각 세포의 손상을 관찰하기 위하여 렫트의 와우기관을 분리하여 organ of Corti의 유모세포를 염색하였다. 먼저 분리된 유모세포는 안정화 시킨 후 500 µg/ml의 사물탕을 30분 전처리하고, 30 µM의 시스플라틴을 30시간 처리하여 배양한 후 유모세포와 주위세포의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 붉은색의 TRITC-labeled phalloidin 염색 및 핵산의 DAPI 염색을 수행하였다. Phalloidin-TRITC는 organ of Corti 기관의 유모세포에 선택적으로 결합한다. 그 결과 시스플라틴은 유모세포수의 현저한 감소와 함께 일정한 형태의 정렬을 파괴하였으나(Fig. 3B), 사물탕을 30분간 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 세포수와 형태가 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 3D).

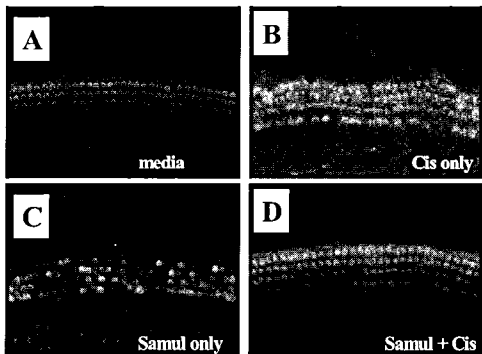


Fig. 3. Pretreatment with Samul prevented the morphological change by oxidative stress in rat organ of Corti explants. Organ of Corti explants were treated with cisplatin (30 µM) for 30 hr. The organ of Corti explants were stained with TRITC-conjugated phalloidin, and then observed under fluorescent microscopy.

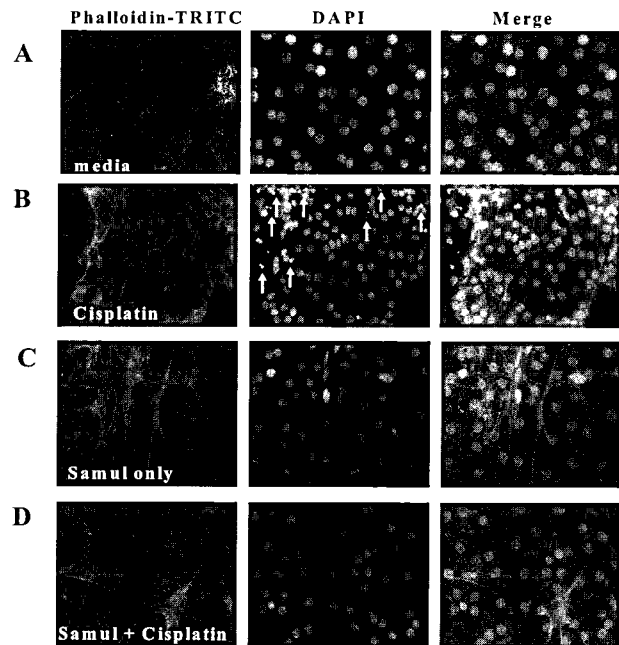


Fig. 4. Pretreatment with Samul prevented the morphological change by oxidative stress in the lesser epithelial ridge (LER, or outer spiral sulcus cell) area of pre-plated neonatal rat cochlear segments. Organ of Corti explants were treated with cisplatin (30 µM) for 30 hr. The LER area were stained with TRITC-conjugated phalloidin and DAPI, and then observed under fluorescent microscopy.

또한 시스플라틴 단독처리시 유모세포를 지지하고 있는 외부 세포들(LER)의 핵분열을 유도하였으나 사물탕 전처리시 대조군 수준으로 보호하였다(Fig. 4). 이상의 결과는 시스플라틴은 감각세포에서 유래한 HEI-OC1 세포뿐만 아니라 청각각 기관인 organ of Corti의 유모세포와 주위 세포의 세포고사를 유도하였으며, 사물탕은 이러한 산화적 손상으로부터 청각각 세포 손상을 보호함을 알 수 있었다.

고찰

현대사회에 접어들면서 나름대로의 삶을 누리는 사람들의 최대 관심사는 건강으로 쏠리고 있으며, 남녀노소를 막론하고 정신적, 육체적, 사회적으로 질병이나 고통에 시달리지 않는 삶을 꿈꾸는 건 당연한 일이다. 특히 인구증가와 평균수명 연장으로 노령인구가 점점 증가하게 됨에 따라 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환을 비롯한 여러 가지 의학적 문제점들이 사회문제까지 대두되고 있다<sup>20</sup>. 또한 암의 발생증가에 따른 치료법 및 그에 따른 부작용 극복에 대한 연구가 절실한 실정이다.

시스플라틴은 암의 치료에 널리 사용되는 화학요법제이지만 신장독성과 이독성 때문에 사용량에 제한적이다<sup>21</sup>. 특히 시스플라틴은 영구적이고 비가역적인 감각신경성 난청을 초래하므로 치료초기부터 청력감소 초래에 대한 주의 깊은 모니터링이 필요하며 특히 고음역의 난청이 초기 증상으로 생기므로 초기 고음역에 대한 청각검사를 통해 이독성이 생기는지 검사하여야 영구적 난청을 예방할 수 있다. 요즘은 시스플라틴과 비슷하나 이독성이 적은 카보플라틴 등을 이용하기도 하지만 여전히 이독성이 문제되고 있다. 따라서 시스플라틴과 동등하거나 그 이상의 효과를 내면서 이독성이 없거나 적은 약물을 개발하는 것이 관건이다.

四物湯은 심혈관계질환, 뇌혈관계질환, 부인과질환 등에 광범위하게 응용되고 있으며<sup>10,11</sup>, 항암제 등의 산화적 손상에 의한 심근세포고사를 보호함이 알려져 있다<sup>19</sup>.

본 연구에서는 시스플라틴에 의한 와우기관내 청각각유모세포의 직접적인 손상기전을 밝히기 위해 청각각세포에서 유래한 HEI-OC1 세포주와 렫트에서 분리한 organ of Corti를 이용하여 세포사멸 현상을 조사하고, 세포사멸 기전과 세포독성을 예방할 수 있는 사물탕의 가능성을 조사 하였다. 먼저 시스플라틴은 세포에 농도 의존적인 세포독성을 보였으며, 이때 시스플라틴에 의한 세포독성은 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성에 의한 것임을 확인하였다. 이렇게 유발된 HEI-OC1 세포사멸은 사물탕 처리 농도에 의존적으로 억제되었으며, 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성을 억제하였다. 이는 임상에서 이명 현상 및 어지럼증 치료에 사용되고 있는 flunarizine에 의한 보호효과와 일치하였다<sup>23</sup>. 또한 시스플라틴은 렫트에서 분리한 organ of Corti의 유모세포뿐만 아니라 주위의 세포<sup>24</sup>에 핵산의 분열을 보이는 세포고사를 유도하였으며, 이때 사물탕은 시스플라틴에 의한 세포독성을 대조군 수준으로 보호하였다. 특히 항산화제 활성을 갖는 천연물의 시스플라틴에 의한 청각세포 보호효과<sup>25</sup>가 보고되고 있어 이에 대한 정확한 기전 연

구가 요구되어진다.

이상의 연구 결과를 종합하면 시스플라틴에 의해 유도된 HEI-OC1 세포의 사멸은 세포내에서 생성된 활성산소종에 의한 세포고사 현상이었다. 그러나 사물탕은 이러한 산화적 손상으로 부터 감각유모세포 및 주변 세포들을 보호하였다. 따라서, 이에 대한 사물탕의 보호 기전 및 기능 연구 등을 통해 산화적 손상에 의한 역할에 대해 연구 되어야 할 것으로 사료 되며, 이독성 보호 약재로서의 가능성을 제시하였다.

## 결 론

시스플라틴에 의한 이독성에서 사물탕의 보호 효과를 확인하기 위하여, HEI-OC1 세포주의 세포생존율 변화 및 활성산소종의 생성변화를 분석하였다. 사물탕은 시스플라틴에 의해 세포내 생성된 활성산소종에 의한 산화적 손상으로부터 청각각 유모세포와 주변 세포를 보호하는 효과를 나타냈으며, 이는 이독성 보호 약물 및 기전 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 시스플라틴 등에 의한 이독성 약물의 병인과 사물탕과 같은 산화적 손상 예방 물질을 개발하는데 응용될 수 있으리라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 원광대학교 2006년 교내연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

- Rybak, L.P., Whitworth, C., Somani, S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope*. 109:1740-17444, 1999.
- McAlpine, D., Johnstone, B.M. The ototoxic mechanism of cisplatin. *Hear Res*. 47:191-203, 1990.
- Fram, R.J. Cisplatin and platinum analogues: Recent advances. *Curr Opin Oncol*. 4:1073-1079, 1992.
- 陳師文. 太平惠民和劑局方, 臺北, 旋風出版社, p 242, 1975.
- 金完熙, 崔達永 共編. 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, p 57, 58, 1993.
- 신민교. 최신한방임상진료, 영림사, pp 389-390, 1988.
- 신민교. 임상본초학, 영림사, pp 219-223, 249-250, 1998.
- 楊維傑 編. 黃帝內經靈樞譯解, 台聯, 國風出版社, p 199, 200, 271, 488, 1976.
- 柳道坤 編著. 東醫生理學講義, 익산, 圓光大學校 出版局, pp 255-263. 1999.
- 尹吉榮. 동의임상방제학, 명보출판사, pp 254-263, 1992.

- 康舜洙. 바른方劑學, 대성문화사, pp 122-123, 1996.
- 姜昌洙. 四物湯 전탕액이 가토의 혈압강하에 미치는 영향, 원광대학교 대학원. 1984.
- 洪茂昌 外. 四物湯 투여가 家犬의 赤血球像에 미치는 영향에 관한 연구, 경희한의대논문집, 1:117-120, 1978.
- 權在龍. 四物湯 및 계절별 활용방이 혈액에 미치는 영향, 대구한의과대학 대학원. 1991.
- 신영경. 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, 대구한의과대 대학원. 1988.
- 河智容. 四物湯 및 四君子湯이 endotoxin으로 유발된 혈전증에 미치는 영향, 경희대학교 대학원. 1998.
- 朴鍾雲 外. 四物湯이 老化白鼠 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 19(1):185-201, 1998.
- 南昌圭. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 영향. *원광대학교 한의과대학 대학원*. 1997.
- Park, C., So, H.S., Kim, S.J., Youn, M.J., Moon, B.S., Shin, S.H., Lee, I., Moon, S.K., Park, R. Samul extract protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of H9c2 cardiomyoblasts via activation of extracellular regulated kinases (Erk) 1/2. *Am J Chin Med*. 34:695-706, 2006.
- 이근후. 최신임상정신의학. 서울, 하나의학사, pp 138, 216-228, 1988.
- Humes, H.D. Insights into ototoxicity. Analogies to nephrotoxicity, *Ann. NY. Acad. Sci.* 884:15-18, 1999.
- Park, C., So, H.S., Shin, S.H., Choi, J.Y., Lee, I., Kim, J.K., Chung, S.Y., Park, R. The water extract of Omija protects H9c2 cardiomyoblast cells from hydrogen peroxide through prevention of mitochondrial dysfunction and activation of caspases pathway. *Phytother Res*. 21:81-88, 2007.
- So, H.S., Park, C., Kim, H.J., Lee, J.H., Park, S.Y., Lee, J.H., Lee, Z.W., Kim, H.M., Kalinec, F., Lim, D.J., Park, R. Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced death of auditory cells. *Hear Res*. 204:127-139, 2005.
- Zhai, S., Shi, L., Wang, B.E., Zheng, G., Song, W., Hu, Y., Gao, W.Q. Isolation and Culture of Hair Cell Progenitors from Postnatal Rat Cochleae, *J Neurobiol*. 65(3):282-293, 2005.
- Yu, H.H., Kim, Y.H., Jung, S.Y., Shin, M.K., Park, R.K., So, H.S., Kim, K.Y., Lee, D.H., You, Y.O. Rehmannia glutinosa Activates Intracellular Antioxidant Enzyme Systems in Mouse Auditory Cells. *Am J Chin Med*. 34:1083-1093, 2006.