

膈下逐瘀湯이 子宮筋腫細胞의 增殖과 MAP
Kinase 活性 및 Cell Apoptosis에 미치는
영향

慶山大學校 韓醫科大學 婦人科敎室
金昭延, 白承嬭

ABSTRACT

The work of *Gyukhachukeotang* on growth of uterine myomal cells, MAP kinase activity, and Cell Apoptosis

So-Youn Kim, Seung-Hee Baek

Dept. of gYnecology, College of Oriental Medicine, Kyung-san University

This work examines the effect of treatment with *Gyukhachukeotang* on the growth of uterine myomal cells. Comparisons of cell growth, MAP kinase activity and expression of *bcl-2* (apoptosis-related gene) were made between the control and experimental samples. The results as follows;

1. Any concentration of *Gyukhachukeotang* above 0.01% yielded growth inhibition. Concentrations of 5% and 10% stopped all cell growth, demonstrating the effectiveness of *Gyukhachukeotang* as a growth inhibitor on uterine myomal cells.

2. The MAP kinase activity in uterine myomal cells treated with *Gyukhachukeotang* was decreased to a high degree at the concentration of 10 %, and some inhibition of activity was detected at a concentration of 5 %.

3. The expression of *bcl-2*, a Cell Apoptosis-related gene, in uterine myoma cells treated with *Gyukhachukeotang* was gradually increased with increasing concentration of *Gyukhachukeotang*.

These results indicate the ability of *Gyukhachukeotang* to control uterine myomal cell growth, with concurrent reduction of MAP kinase activity. Treatment with *Gyukhachukeotang* appears to trigger a normal apoptosis response, as indicated by increased *bcl-2* expression. This observed increase in

apoptosis indicates that *Gyukhachukeotang* is an appropriate prescription to treat uterine myomal cells.

Key words : *Gyukhachukeotang*, uterine myomal cells, MAP kinase, *bcl-2*

I. 緒論

子宮筋腫은 可妊期 女性의 약 25%에서 發生하는 女性의 가장 흔한 骨盤內 腫瘍으로 어느 年齡에서도 發生할 수 있으나 특히, 30~45 歲에 好發된다^{1,2)}.

韓醫學에서는 腹腔內에서 發生하는 腫瘍疾患을 積聚, 癥瘕, 痞癥, 痞塊, 腸覃, 石瘕, 血蠱 등으로 分類하고 있으며^{3,4,5,6,7,8,9,10)} 이 중에서 癥瘕, 石瘕, 血蠱 등의 病證을 子宮筋腫과 類似하다고 認識하고 있다^{2,4,5)}.

膈下逐瘀湯은 五靈脂, 當歸, 川芎, 桃仁, 牡丹皮, 赤芍藥, 烏藥, 玄胡索, 甘草, 香附子, 紅花, 枳殼의 열 두가지 藥物로 構成된 活血化瘀^{11,12)}의 대표적인 方劑로 王¹³⁾의 <醫林改錯>에 最初로 收錄되어 있으며 “治瘀在膈下 形成積塊 或是小兒積塊 痛不移處 臥則陰墜”라 하여 下焦 氣滯瘀血로 인한 疾患과 瘀血內結로 인한 積聚 등의 病症을 治療한다 하였다^{13,14,15)}.

西醫學에서는 子宮筋腫의 原因 및 發生過程에 대하여 명확하게 규명되지 못한 未知의 狀態이다^{2,3,16)}. 治療方法 또한 보편화된 藥物療法은 없는 실정이어서 患者의 症狀과 年齡 및 腫瘍의 크기에 따라 차이가 있으나 子宮摘出術의 手術療法이나 호르몬요법에 依存하는 경우가 대부분이다^{2,3,17,18,19,20)}.

膈下逐瘀湯을 이용한 研究로는 權¹⁴⁾등^{21,22)}이 抗癌效果, 崔^{23,24)}등이 鎮痛 消炎 및 脾臟과 肝 損傷에 效果가 있었음을 보고하였고, 子宮筋腫

에 대한 實驗的 研究로는 白²⁵⁾등은 七製香附丸을 이용하여, 金²⁶⁾ 등은 桂枝茯苓丸을 이용하여 子宮筋腫細胞株의 成長을 抑制하는 效果를 얻었다고 보고하였으나, 膈下逐瘀湯이 子宮筋腫細胞抑制와 遺傳子活性에 미치는 影響에 대한 研究는 지금까지 없었다.

이에 著者는 膈下逐瘀湯의 效能을 糾明하기 위하여 기존의 凍結保存된 子宮筋腫細胞株를 培養하는 實驗과는 달리 人間의 子宮筋腫을 摘출한 후 직접 細胞를 培養시켜 人間의 疾病狀態에 더욱 近接한 實驗을 시도하였으며, 膈下逐瘀湯이 子宮筋腫의 細胞增殖에 미치는 影響과 膈下逐瘀湯처리에 따른 體外培養된 人間의 子宮筋腫 細胞에서의 MAP kinase活性과 Cell Apoptosis 관련 *bcl-2* 遺傳子발현을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

實驗에 使用된 藥材들은 慶山大學校 附屬 韓方病院에서 良質의 것을 精選하여 使用하였으며 處方의 構成은 <醫林改錯>¹³⁾에 準하였고, 아래의 用量은 한 貼 分量이다.

2. 方法^{27~34)}

1) 檢液의 調製

2첩 분량의 膈下逐瘀湯 195g을 증류수 1200 ml를 첨가하여 2시간 동안 중탕하여 검액 250 ml를 추출하였다. 추출한 검액은 멸균 거여즈를 이용하여 1次 여과한 다음 3,000 rpm하에서 15分間 遠心分離를 실시하여 상층액을 채

Components of *Gyukhachukeo-tang*

韓藥名	生藥名(學名)	사용량(g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix(Angelica gigas NAKAI)	11.25
桃仁	Persicae Semen(Prunus perica (L.) BATSCH)	11.25
甘草	Glycyrrhizae Radix(Glycyrrhiza uralensis FISCH.)	11.25
紅花	Carthami Flos(Carthamus tinctorius L.)	11.25
五靈脂	Trogopterorum Faeces(Trogopterorum Faeces)	7.5
川芎	Atrachilis Rhizoma(Atrachilis koerana Nakai)	7.5
牡丹皮	Moutan Cortex(Paeonia suffruticosa ANDR.)	7.5
赤芍藥	Paeonia Radix Rubra(Paeonia lactiflora PALL.)	7.5
烏藥	Linderae Radix(Lindera strychnifolia VILL.)	7.5
香附子	Cyperi Rhizoma(Cyperus rotundus L.)	5.625
枳殼	Aurantii Fructus(Citrus aurantium L.)	5.625
玄胡索	Bupleuri Radix(Buplerum falcatum L.)	3.75
計		97.5

취한 다음 이를 1.2 μ m와 0.45 μ m의 membrane filter(Milipore Co., USA)를 除菌하여 使用하였다.

2) 子宮筋腫 組織의 준비

子宮筋腫 組織(uterine myoma tissue)은 포천중문의과대학 차병원에 子宮筋腫으로 來院하는 患者로부터 採取하였다. 本 研究에 사용된 子宮筋腫은 39歲의 子宮선근종(uterine adenomyosis) 환자로부터 本 실험에 대한 충분한 설명과 이해를 구한 후 채취하였으며 채취된 子宮筋腫 組織은 採取 즉시 37℃ 滅菌 生理食鹽水에 담아 研究室로 30分 이내에 運搬하였다. 이들 子宮筋腫 組織은 조직배양용 petridish (100mm, Nunc, Denmark)로 옮겨 DPBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline; Gibco/BRL, USA) 溶液으로 옮겨 멸균 핀셋과 가위를 利用하여 조직 주변의 血液과 子宮組織을 제거하였다. 이어 DPBS 溶液으로 3회 洗滌한 다음 子宮筋腫 組織을 직경 5mm정도로 細切하였다. 細切된 子宮筋腫 組織은 Trypsin-EDTA (Gibco/BRL, USA) 溶液에 10分간 침지하여 組織의 一部를 酵素處理 하였다. 酵素處理된 子宮筋腫 組織은 10% FBS (Fetal bovine serum;

Hyclone, USA)가 함유된 DMEM (Gibco/BRL, USA) 培養液이 함유된 25-T flask(Nunc, Denmark)에 seeding하여 7일간 37℃ CO2 배양기 (Heraeus, Germany)내에서 배양하였다. 7일간 培養된 子宮筋腫 組織은 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 觀察하여 組織의 周邊部에 細胞의 成長을 觀察하고 신선 DMEM 培養液으로 교체하여 追加로 7일간 培養하였다. 추가 培養後 seeding된 子宮筋腫 組織은 제거하였으며 재차 신선 DMEM 培養液으로 7日 간격으로 2~3회 培養하여 子宮筋腫 細胞의 成長을 誘導하였다.

3) 子宮筋腫組織으로 부터 細胞培養 및 凍結保存

Primary culture를 통해 培養된 子宮筋腫 細胞는 實驗의 수행을 위해 增殖을 誘導하였다. 25-T flask 表面에 80~90%의 monolayer가 形成되었을 때 flask내의 DMEM 培養液을 suction 장비(Milipore, USA)를 利用하여 완전히 제거한 다음 Ca²⁺, Mg²⁺-free PBS(Gibco/BRL, USA)용액으로 2회 세척한 다음 부착된 細胞의 分離를 위해 2 ml Trypsin-EDTA 溶液을 분주하여 2分間 酵素處理를 실시하였다. Tryps

in-EDTA 處理 後 동량의 FBS를 분주하여 酵素作用을 抑制시킨 다음 5ml serological pipette (Costar, USA)을 사용하여 반복적인 pipetting을 실시하여 부착된 細胞를 分離하였다. Pipetting으로 회수되지 않은 子宮筋腫 細胞는 cell scraper(Costar, USA)를 사용하여 分離하였다. 分離한 細胞는 16ml centrifuge tube (Costar, USA)에 분주한 다음 800 rpm下에서 5分間 遠心分離를 실시하였고 以後 上層液을 除去한 다음 신선 PBS溶液 5ml를 添加하여 재부유시킨 다음 재차 遠心分離를 實施하였다. 遠心分離後 上層液을 除去한 다음 子宮筋腫細胞에 10% FBS가 첨가된 DPBS 10ml를 첨가한 다음 부유시킨 다음 細胞의 濃도를 Markler cell counting chamber (Sofi, Israel)를 사용하여 細胞의 濃도를 測定하였다. 이어 10% FBS가 含有된 125-T flask (Nunc, USA)에 ml당 50,000個의 子宮筋腫 細胞가 되도록 분주한 다음 2日間 細胞培養器內에서 培養하였다. 2日間 培養 後 附着되지 않은 細胞를 除去하고 신선 DMEM 培養液으로 교체한 다음 追加로 3日間 培養하였다. 실제현미경하에서 細胞의 增殖를 觀察하면서 f flask 표면의 90%정도 增殖되었을 때 전술한 방법에 準해 追加로 계대배양 (serial culture)을 실시하였다. 4차례 계대배양된 子宮筋腫 細胞를 本 研究에 이용하였다. 계대배양 과정에서 증식된 일부의 세포는 196℃ 액체질소에 동결보존 하였는데 이는 分離한 子宮筋腫細胞를 10% DMSO(Dimethylsulfoxide; Sigma, USA)와 10% FBS가 含有된 DPBS 溶液을 서서히 혼합시킨 다음 이를 4℃ 냉장고에서 30分間 에 냉한 다음 액체질소에 침지하므로서 凍結保存 하였다.

4) 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞의 成長抑制 效果

膈下逐瘀湯 처리가 제외배양된 子宮筋腫細

胞의 성장에 미치는 영향을 검토하기 위해 먼저 준비된 膈下逐瘀湯을 DMEM 培養液에 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 및 0.01%의 濃도가 되도록 培養液을 제조하였다. 이들 각각 相異한 濃도가 함유된 培養液은 25-T flask에 분주한 다음 준비된 子宮筋腫細胞 3×10⁴/plate를 첨가하여 3日間 培養하였다. 이 때 대조구로는 10% FBS와 0% FBS가 함유된 DME M이 含有된 培養液으로 하였다. 3日間 培養 後 各各의 flask內에 증식된 모든 子宮筋腫細胞를 분리한 다음 이들의 濃도를 측정하여 비교하므로서 膈下逐瘀湯 처리가 子宮筋腫細胞의 成長에 미치는 영향을 비교하였다. 한편, 膈下逐瘀湯 처리에 의한 子宮筋腫細胞의 成長抑制 效能을 확인하기 위한 다른 방법으로 monolayer가 형성된 子宮筋腫細胞를 작성한 다음 여기에 상기 서술된 농도의 膈下逐瘀湯이 含有된 培養液으로 교체한 다음 3日間 培養한 後 細胞를 채취하여 細胞數를 調査하였다.

5) 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞에서의 MAP Kinase 活性의 變化

① 子宮筋腫細胞로 부터 Total T RNA의 분리 및 정제

Total RNA 추출은 약 5-10×10⁶개의 세포에 TRIZOL reagent(GIBCO BRL) 1ml을 첨가하여 단백질과 ds DNA를 침전시킨 후, 여기에 200 μ l의 chloroform을 넣고 상온에서 15分間 rocking後 14,000rpm으로 4℃에서 遠心分離하여 上層液을 옮긴 후에 isopropyl alcohol을 넣고, 상온에 10分間 방치후에 14,000rpm으로 15분간 遠心分離 後에 70% alcohol로 세척하고 실온에서 10分間 말린 후, DEPC (Diethyl-pyrocabonate)-멸균수 30 μ l로 Total RNA를 회수하였다. 회수된 Total RNA는 spectrophotometer로 260nm와 280nm 파장에서 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 결정하고 이용하였다.

② RT-PCR(Reverse Transcriptase PCR)

분리된 Total RNA는 SUPERSCRIPTM II RNase H-Reverse Transcriptase (GIBCO BRL)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 먼저 total RNA 1 μ g을 준비한후 1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈(500 μ g/ml), 1 μ l 10mM dNTP Mix를 넣은 후 final volume이 12 μ l가 되도록 멸균수를 첨가하였다. 그리고 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 섞어준 다음, 4 μ l 5 \times first-strand buffer, 2 \times 0.1M DTT, 1 μ lRNase O UT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(40units/ μ l)를 각각 添加後 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 섞어 주었다. 여기에 최종적으로 SUPERSCRIPTM II 1 μ l (200units)를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 50분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

③ cDNA 정량 분석

cDNA 정량은 G3PDH 5'primer(5'-accacag-tccatgccatcac-3')와 G3PDH 3'primer(5'-tcc-accaccctgttgctgta-3')를 이용한 PCR로 정량하였다. G3PDH 5'primer와 G3PDH 3'primer 20 pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25 μ l를 맞춘 후 first denature 94 $^{\circ}$ C 5분, 30cycle로 denature 94 $^{\circ}$ C 30초, anealing 65 $^{\circ}$ C 30초, extension 68 $^{\circ}$ C 2분 30초, final extension 68 $^{\circ}$ C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio-rad quantity-one을 이용하여 각 sample별로 농도를 결정하였다.

④ MAP Kinase PCR

Proliferation과 관련된 MAPkinase의 정량적 분석은 MAP kinase 5'primer (5'-cgctcagc-atggtgtgc-3')와 G3PDH 3'primer(5'-ccctgga-aagatggcctg-3')를 이용한 PCR로 MAP kinase gene의 일부분 중 586bp를 증폭하였다. MAPkinase 5'primer와 MAPkinase 3'primer 20pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25 μ l를 맞춘후 first denature 94

$^{\circ}$ C 5분, 30cycle로 denature 94 $^{\circ}$ C 1분, anealing 58 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분 20초, final extension 72 $^{\circ}$ C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio-rad quantity-one을 이용하여 각 sample별로 농도를 결정하였다.

6) 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞에서의 Apoptosis관련 *bcl-2* 유전자의 발현

Apoptosis와 관련된 apoptosis-related cysteine protease의 정량적 분석은 *bcl-2* 5'primer (5'-gtgtagcaccagtgggtgtg-3')와 *bcl-2* 3'primer 5'-tgaccctgagcagagacctt -3')를 이용한 PCR로 apoptosis-related cysteine protease gene의 일부분 중 450bp를 증폭하였다. *bcl-2* 5' primer와 *bcl-2* 3'primer 20pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25 μ l를 맞춘 후 first denature 94 $^{\circ}$ C 5분, 30cycle로 denature 94 $^{\circ}$ C 1분, anealing 53 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분 20초, final extension 72 $^{\circ}$ C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한후 Bio-rad, quantity-one을 이용하여 각 sample별로 농도를 결정하였다.

III. 成績

1) 膈下逐瘀湯이 첨가된 배양액 하에서의 子宮筋腫細胞의 成長에 미치는 影響

子宮筋腫細胞에 膈下逐瘀湯을 濃度別로 處理하여, 3日間 培養한 후 細胞成長을 調査한 結果, 對照群(가장 좋은 培養條件으로 膈下逐瘀湯을 添加하지 않은 條件)의 경우 10% FBS 添加群의 경우 23.7배인 71.0 \times 10⁴/ml 세포증식이 이루어졌고 0% FBS 添加群의 경우 7.1배인 21.3 \times 10⁴/ml의 細胞增殖이 이루어졌다.

膈下逐瘀湯 添加群의 경우 0.01% 以上에서 對照群에 比하여 成長이 遲延되는 效果가 나타났으며 특히, 5% 以上の 濃度에서는 子宮筋腫細胞 中 대부분이 成長을 하지 못하고 死滅하여 오히려 細胞成長率은 0.1과 0.2培로 감소되는 結果가 나타났다. 또, 1%, 0.5%, 0.05% 및 0.01% 添加群에서도 細胞의 成長率은 각각 1, 1.6, 2.6, 4.4 및 6.1培로서 對照群에 比하여

細胞의 成長이 이루어지지 않은 것을 알 수 있었다. 細胞의 成長이 停止된 1% 膈下逐瘀湯과 10% FBS 添加群에서도 7.8 培인 23.5×10^4 /ml 細胞만이 成長하여 膈下逐瘀湯이 人間子宮筋腫細胞의 成長抑制 效果가 있는 것으로 나타났다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. In vitro growth of uterine myomal cells treated with Gyukhachukeotang at various concentration

Concentration of <i>Gyukhachukeotang</i>	Initial concentration of the cells ($\times 10^4$ /well)	Final concentration of the cells after 3-days culture* ($\times 10^4$ /plate)	Growth rate**
Control(10%FBS)	3	71	23.7
Control(0% FBS)	3	21.3	7.1
10%	3	0.4	0.1
5%	3	0.5	0.2
1%	3	3.2	1.1
0.5%	3	4.7	1.6
0.1%	3	7.7	2.6
0.05%	3	13.1	4.4
0.01%	3	18.4	6.1
1%+10% FBS	3	23.5	7.8

* 92 hours culture at 37 °C, 5% CO2 in air condition.

** Total no. of cells harvested/Initial no. of cells cultured.

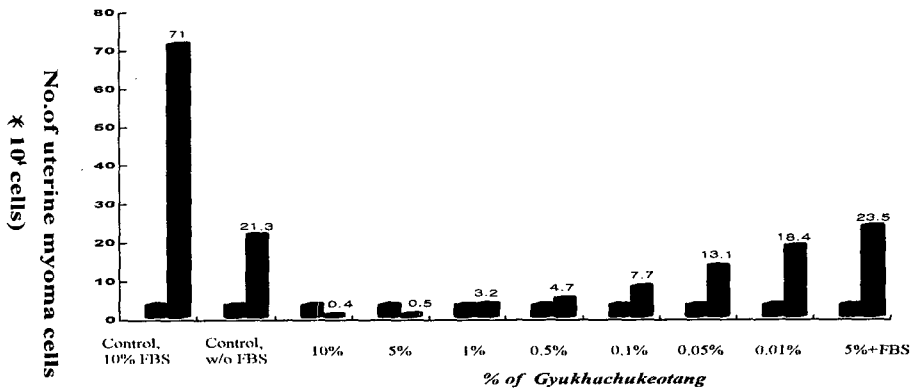


Fig. 1. In vitro growth of human uterine myoma cells treated with different concentrated *Gyukhachukeotang* in DMEM medium at initial seeding period for 3-day culture

2) 膈下逐瘀湯 처리가 單層培養된 子宮筋腫細胞의 成長에 미치는 影響

子宮筋腫細胞를 10% FBS가 含有된 DMEM 培養液下에서 3日間 培養하여 monolayer가 形成된 子宮筋腫細胞에 10% FBS가 含有된 DMEM 培養液을 除去한 다음 各々 相異한 濃度의 膈下逐瘀湯이 含有된 培養液으로 交替하여 3日間 追加 培養한 다음 細胞의 成長을 調査하였다.

對照群인 10% FBS가 含有된 培養液에서의 細胞成長은 $120.3 \times 10^4/\text{ml}$ 로 나타났다. 이를 100%로 換算하여 各々 處理群에 대한 細胞成長率을 調査한 結果, FBS가 含有되지 않은 培養液에서의 細胞成長率은 49.3%($59.3 \times 10^4/\text{ml}$)로 FBS에 의한 細胞成長의 低下는 약 50.7%임을 알 수 있었다. 膈下逐瘀湯 添加濃度を 10%, 5%, 1%, 및 0.5%로 하였을 경우 細胞 成長率은 各々 21.9%($26.3 \times 10^4/\text{ml}$), 25.4% ($26.0 \times 10^4/\text{ml}$), 28.5% ($34.3 \times 10^4/\text{ml}$), 47.6% ($57.3 \times 10^4/\text{ml}$)로서 50%미만의 成長率을 나타냈을 뿐만 아니라 FBS 無添加群에서의 細胞成長率 보다

도 월등히 낮은 成長率을 나타내어 膈下逐瘀湯의 細胞成長抑制가 나타남을 알 수 있었다. 또한 0.1%, 0.05% 및 0.01% 첨가군에서의 성장률은 各々 55.4%($66.7 \times 10^4/\text{ml}$), 67.6% ($81.3 \times 10^4/\text{ml}$) 및 70.9% ($85.3 \times 10^4/\text{ml}$)로서 10% FBS가 添加된 對照群의 結果에 비해 낮은 細胞成長率을 나타내었으나 FBS를 添加하지 않은 對照群의 結果와는 유사한 結果를 나타내었다.

따라서 膈下逐瘀湯의 作用을 나타내는 濃度は 1%以上の 添加群인 것으로 판단되었다. 한편 1% 膈下逐瘀湯과 10% FBS를 添加한 培養液은 64.8% ($78.0 \times 10^4/\text{ml}$)로서 FBS 無添加群보다는 다소 높은 成長率을 나타내었는데 이는 培養液內에 添加된 FBS의 影響에 기인된 것으로 思料된다. 이러한 結果를 미루어 볼 때 膈下逐瘀湯은 人間 子宮筋腫 細胞의 成長抑制作用이 있음을 확인할 수 있었고 細胞成長抑制效果가 명확하게 나타나는 濃度は 添加濃도가 1.0%以上일 경우임을 알 수 있었다(Table 2, Fig 2).

Table 2. Growth of uterine myomal monolayered cells treated with different concentrated Gyukhachukeotang in the media

Concentration of Gyukhachukeotang	Final concentration of the cells after 3-day culture* ($\times 10^4/\text{plate}$)	Growth rate (%)**
Control (w/10% FBS)	120.3	100
Control (w/0% FBS)	59.3	49.3
10%	26.3	21.9
5%	26.0	25.4
1%	34.3	28.5
0.5%	57.3	47.6
0.1%	66.7	55.4
0.05%	81.3	67.6
0.01%	85.3	70.9
1%+10% FBS	78.0	64.8

* 92 hours culture at 37°C, 5% CO2 in air condition.

** Growth rate is calculated to compare control(10% FBS in DMEM media) group.

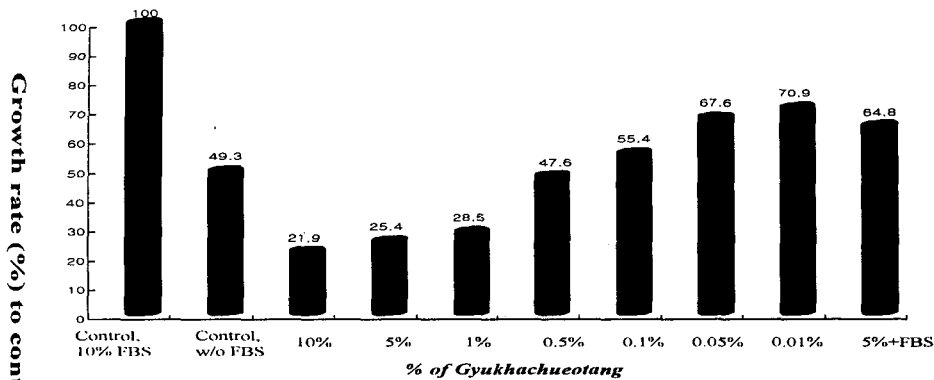


Fig. 2. In vitro growth rate of human uterine myoma cells treated with different concentrated *Gyukhachueotang* in DMEM medium compared to control with 10% FBS group

* Human uterine myoma cell cultured for 3-day in DMEM containing 10% FBS and then further 3-day culturing in DMEM containing different concentrated *Gyukhachueotang*

3) 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫 細胞에서의 MAP Kinase 활성

膈下逐瘀湯이 含有된 培養液을 利用하여 子宮筋腫細胞의 成長抑制 效果를 확인한 다음 이러한 成長抑制 效果를 좀더 구체적으로 알아보기 위해 MAP kinase activity를 확인하였다.

膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞로부터 採取한 RNA를 利用하여 RT-PCR과 quantitative PCR을 위해 同一한 量의 DNA를 精량하기 위해 house-keeping gene인 GAPDH gene을 精량한 結果로 Fig. 3에서 보는 바와 같이 同一한 量의 DNA가 精량되었음을 알 수 있다(Fig. 3).

이러한 結果를 기초로 하여 각각 상이한 농도의 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞에서의 MAP kinase activity를 調査한 結果, 膈下逐瘀湯 1%와 10% FBS가 含有된 培養液에서의 MAP kinase activity는 317659 CNT/mm²으로 나타났다. 한편 細胞의 成長抑制 效果가 나타났던 膈下逐瘀湯 10%, 5%, 1% 및 0.1% 添加群의 경우 MAP kinase activity는 各各 2269, 2521, 2834 및 2851 CNT/mm²로 膈下逐瘀湯

添加濃度가 減少됨에 따라 MAP kinase activity는 增加됨이 觀察되었다(Fig. 4).

1% 膈下逐瘀湯과 10% FBS 添加된 培養液에서 培養된 子宮筋腫細胞에서의 MAP kinase activity (2478 CNT/mm²)를 100으로 換算하였을 때 各各의 濃度에 대한 MAP kinase activity를 換算한 結果는 Fig. 5에서 보는 바와 같았다.

膈下逐瘀湯의 添加濃度를 10%로 하였을 경우 MAP kinase activity는 91.6%정도로서 細胞의 活性 정도가 높은 수준으로 減少됨을 알 수 있었으며 添加濃度가 5%, 1% 및 0.1%일 경우 各各 102.1%, 114.4% 및 115.1%로서 1% 膈下逐瘀湯 및 10%FBS 添加群에서의 活性보다는 비슷하거나 다소 높은 細胞活性를 나타내었다. 이러한 結果로 보아 본 研究에 使用된 膈下逐瘀湯은 細胞培養 實驗에서와 마찬가지로 子宮筋腫細胞의 成長抑制 作用이 있는 것으로 判斷되며 그 효능을 나타내는 添加濃度는 5% 이상으로 判斷된다.

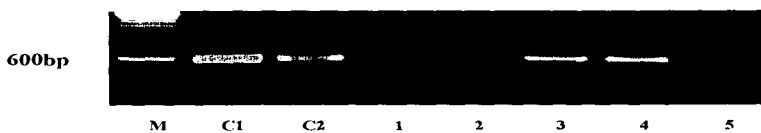
GAPDH PCR



Fig.3. GAPDH analysis for quantitative PCR

- C1 : 10% FBS
- C2 : w/o FBS
- 1 : 10%
- 2 : 5%
- 3 : 1%
- 4 : 0.1%
- 5 : 1%+10%FBS

MAP kinase PCR



Density CNT/mm²

C1 : 3567, C2: 2902, 1 : 2269, 2 : 2521, 3 : 2834, 4 : 2851, 5: 2478

Fig. 4. MAP kinase activity of cultured human uterine myoma cells treated with different concentrated *Gyukhachukeotang* in DMEM media for 3 days

M : 100bp ladder marker

- C1 : 10% FBS
- C2: w/o FBS
- 1 : 10%
- 2 : 5%
- 3 : 1%
- 4: 0.1%
- 5: 1%+10%FBS

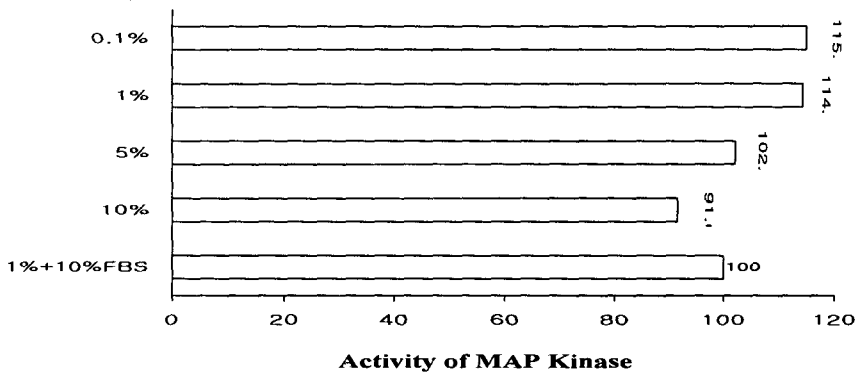


Fig. 5. Comparison of MAP Kinase activity of human uterine myoma cells cultured different concentrated *Gyukhachukeotang* for 3 days

4) 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞에서의 Apoptosis 관련 *bcl-2* 유전자 발현

膈下逐瘀湯이 처리된 細胞에 대한 세포의 활성도를 알아보기 위한 다른 실험으로서 細胞의 自然死(cell apoptosis)와 관련된 *bcl-2* 유전자의 발현을 調査하였다.

膈下逐瘀湯을 각각 相異한 濃度로 처리한 子宮筋腫細胞에 대해 *bcl-2* 유전자의 발현을 調査한 結果, 1% 膈下逐瘀湯과 10% FBS가 含有된 培養液에서 배양된 子宮筋腫細胞의 경우 2711 CNT/mm²로 나타났다. 이러한 수치를 100으로 하였을 때 0.1%, 1%, 5% 및 10% 添加群구서의 *bcl-2* 유전자의 발현양은 각각 237, 2683, 3134 및 3945 CNT/mm²로 나타나 MAP Kinase 활성과는 반대로 膈下逐瘀湯의 添加濃度가 增加됨에 따라 *bcl-2* 유전자의 발현은 점차적으로 높게 나타났다. 이를 1% 膈下逐瘀湯과 10% FBS 添加群의 *bcl-2* 유전자의 발현을 100으로 환산하였을 경우 膈下逐瘀湯 10%, 5%, 1% 및 0.1% 添加群에서의 *bcl-2* 유전자의 발현은 각각 145.5%, 115.6%, 99.0% 및 85.7%였다.

이상의 結果를 종합하여 볼 때 膈下逐瘀湯

의 처리가 子宮筋腫細胞에 직접적으로 작용하여 세포내의 MAP kinase activity를 감소시키고 그 結果 細胞의 自然死가 促進되어 *bcl-2* 유전자의 발현을 增加시킨다는 사실을 확인하였다(Fig. 6, Fig. 7).

IV. 考 察

子宮筋腫은 可妊期 女性의 25%를 차지하고 있으며 30~45세 女性에서 好發하는 陽性腫瘍으로 有色人種 특히 黑人에게 많이 나타난다¹⁾. 子宮筋腫의 西醫學的인 原因으로는 遺傳的인 要因으로 보거나, estrogen과 관련지어 생각하고 있으나 아직 明確한 原因은 未知인 狀態이다^{1,2,3,16)}.

韓醫學에서는 腹腔內에서 發生하는 腫瘍疾患을 積聚, 癥瘕, 痞癥, 痞塊, 腸覃, 石瘕, 血蠱 등으로 분류하고 있으며^{3,4,5,6,7,8,9,10)} 이 중에서 癥瘕는 女性 腫瘍疾患을 總稱하는 것이며 石瘕, 血蠱 등의 病證은 子宮筋腫과 類似하다고 인식하고 있다^{2,4,5)}.

癥瘕에 대하여 <中藏經>³⁵⁾에서는 積聚癥瘕

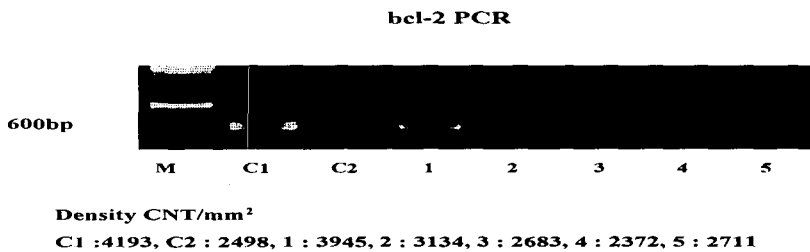


Fig. 6. *bcl-2*, apoptosis related gene, expression of cultured human uterine myoma cells treated with different concentrated Gyukhachueotang for 3 days

M : 100bp ladder marker
C1 : 10% FBS
C2 : w/o FBS
1 : 10%
2 : 5%
3 : 1%
4 : 0.1%
5 : 1%+10%FBS

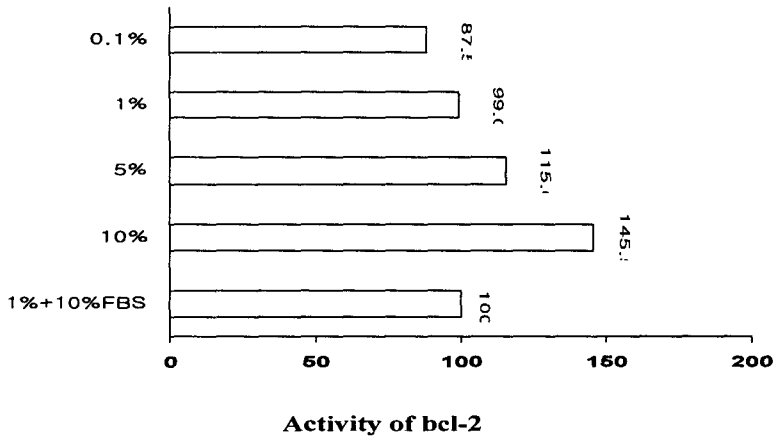


Fig. 7. Comparison of bcl-2 activity of human uterine myoma cells cultured different concentrated *Gyukhachukeotang* for 3 days

雜蟲者 皆五臟六腑 眞氣失弱 邪氣滲而生焉。癥者系於氣 瘕者系於血。癥有勞氣冷熱虛實燥濕藥鬼憂之十二名。瘕有青黃燥血脂孤蛇龜之八名> 이라 하였고, <巢氏諸病源候論>³⁶⁾에서는 “癥瘕者皆由寒溫不調 飲食不化與藏氣相搏結所生也。其病不動者 直名爲癥 若病雖有結瘕而可推移者 名爲瘕瘕 瘕者假也 謂虛假可動也”라 하였고, <醫宗金鑑>³⁷⁾에서는 “五積六聚分臟腑 七癥八瘕氣血凝, 癥積不動有定處 瘕聚推移無定形”이라 하였고, <東醫寶鑑>³⁸⁾에서는 “六鬱爲積聚癥瘕 痲癖之本 癥者徵也 腹中堅硬按之應手曰癥 瘕者假也 腹中手硬而忽聚忽散無有常處”라고 하였다.

石瘕에 대하여서는 <黃帝內經>³⁹⁾ 水脹編에서 胞中에서 發生하며 寒氣가 子門에 留客하여 子門이 閉塞되면 鬱血이 胞中에 留積하여 妊娠한 狀態와 類似하다고 설명한 이래 <東醫寶鑑>³⁸⁾에서는 “石瘕者胞中損傷瘀血結成久則堅硬如石 乃先感寒氣而後血壅所致”라고 하였고, 孫⁴⁰⁾은 女子에서만 發生된다 하였으며 血蠱에 대하여는 “血蠱卽癥瘕之甚者 腹肚堅硬如石”이라고 하여 女性腫瘍 疾患 中 子宮筋腫을 石瘕

와 血蠱로 認識하고 있다.

膈下逐瘀湯은 王¹³⁾의 <醫林改錯>에 瘀血이 膈下에 있게됨으로써 積塊를 형성하고 이 積塊의 痛증이 이동하지 않을 때 사용한다고 最初로 收錄된 이래 康¹¹⁾은 活血消瘀, 理氣止痛하는 效能이 있기 때문에 痞塊를 없애주면서 氣滯血瘀를 다스린다고 하였고, 尹⁴¹⁾은 胸腹에 있는 痞塊와 腹痛이 일정하게 發生될 때 사용할 수 있다라고 하였으며, 戴⁴²⁾는 瘀血內結로 인한 積聚 즉, 腹部積塊가 뚜렷하고 硬痛이 移動하지 않을 때 應用된다고 하였다. 또한 余¹²⁾는 下焦氣滯瘀停疾患에 有效 하다고 하였고, 辛⁴³⁾은 本方이 血府逐瘀湯^{44,45)}에 비해 活血化瘀之劑와 止痛之劑인 紅花 牡丹皮 五靈脂 玄胡索 등이 加味되어 있어 瘀血로 인한 腹部의 腫塊 등에 사용될 수 있음을 說明하였다.

膈下逐瘀湯을 구성하는 藥物들의 效能을 살펴보면 五靈脂는 散瘀止痛, 通利血脈 하는 效能이 있어 血滯經閉腹部疼痛 등에 활용되고, 當歸는 補血和血, 活血止痛하는 效能이 있어 血虛經閉, 寒疝腹中痛 등에 利用되고, 川芎은 活血行氣, 開鬱하는 效能이 있어 氣鬱로 인한

瘡瘍腫痛에 사용되고, 桃仁은 破血祛瘀하면서 潤燥滑腸하는 作用이 있어 瘀血阻滯腹痛, 癥瘕積聚血滯作痛 등에 이용되고, 牡丹皮는 活血祛瘀, 清血涼血 하는 作用이 있어 血瘀積聚作痛에 사용된다. 赤芍藥은 涼血活血, 消壅散腫 하는 效能이 있어 壅腫疼痛, 產後瘀血積聚에 사용되고, 烏藥은 順氣止痛하는 效能이 있어 寒疝腹痛, 七情鬱結 등에 사용되고, 玄胡索은 活血祛瘀, 理氣止痛하는 效能이 있어 疝痛, 血滯腹痛, 胸腹諸痛 등에 응용되고, 甘草는 下氣通經, 消腫紅의 效能이 있어 壅疽腫毒을 다스리고, 香附子는 理氣解鬱, 調經止痛하는 效能이 있어 經痛, 小腹脹痛, 消飲食積聚 등에 활용되고, 紅花는 活血通經, 祛瘀止痛하는 效能이 있어 腹中血氣刺痛, 瘡癰腫毒, 瘀血疼痛에 이용되고, 枳殼은 堅積을 攻下하는 效能이 있어 脹痛, 胸膈痞結 등에 사용된다^{43,46,47,48}.

MAP kinase는 Mitogen activated protein의 약자로 또는 Extracellular signal regulating kinase로 일컬어지며 말그대로 세포의 成長(growth), 增殖(proliferation), 分化(differentiation) 및 細胞自然死(apoptosis)등을 調節하는 機能을 수행한다⁴⁹. MAP kinase를 調査한 理由는 子宮細胞株에 膈下逐瘀湯을 첨가할 경우 細胞의 成長, 遲延, 抑制 등이 觀察되어지는데 이러한 細胞內의 現象을 보다 精確하게 규명하기 위해 細胞로부터 추출한 DNA를 이용하여 MAP kinase 또는 이것이 인산화되어 생리활성을 나타내는 형태인 phosphorylated MAP kinase의 활성도를 調査하게 된다^{50,51,52,53}. MAP kinase의 활성도가 높다는 것은 細胞內에서 대사활성을 비롯한 다양한 細胞活動 특히, 細胞培養時에는 細胞成長에 좋은 영향을 갖는다는 의미이고 반대로 활성도가 낮다는 것은 細胞成長의 遲延 또는 自然死되는 細胞가 많다는 것을 의미하는 것으로 세포의 apoptosis가 높아지게 되는 것이다.

MAP kinase의 작용기전은 세포막(cellular membrane)상의 수용체(receptor)에 결합되어지는 신호(signal)로 외부 자극이 세포내에 작용하려면 세포막수용체(membrane receptor)에 signal이 결합(binding)되며 이러한 signal receptor complex는 세포내에 존재하는 cAMP(intracellular cyclic nophosphate)를 활성화시키게 된다.

활성화된 cAMP는 불활성화되어 있는 Protein kinase(PK)system을 활성화시켜 세포내의 Ras 유전자를 활성화 시킨다. 이렇게 활성화된 PK와 Ras결합체는 MAP kinase(ERK)의 활성화를 유도하고 이것이 세포질내 혹은 세포의 핵내에서 細胞성장(survival), 분화(differentiation), 특정 유전자발현(specific gene expression)등의 작용을 나타내게 한다.

이에 著者는 癥瘕, 石瘕, 血蠱로 분류되는 子宮筋腫을 活血祛瘀시키는 처방으로 구성된 膈下逐瘀湯을 선택하여 子宮筋腫의 成長을 抑制시키는 效果를 확인하고자 子宮筋腫 細胞의 增殖에 미치는 영향과 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞의 成長抑制效果 및 MAP kinase 活性의 변화와 Apoptosis관련 bcl-2를 측정하였던 바 有意한 結果를 얻었다.

실험은 膈下逐瘀湯을 添加한 培養液에서의 子宮筋腫細胞의 成長觀察, 單層培養에서의 子宮筋腫細胞의 成長觀察과 子宮筋腫細胞의 MAP kinase 및 Apoptosis의 활성도를 觀察하는 세가지 方法으로 시행하였다.

첫째, 膈下逐瘀湯이 처리된 체외배양된 子宮筋腫細胞의 成長에 미치는 영향을 검토하기 위해 먼저 준비된 膈下逐瘀湯을 DMEM배양액에 10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.05% 및 0.01%의 濃度가 되도록 培養液을 제조하였다. 이 때 對照群으로는 10%FBS와 0%FBS가 含有된 DMEM이 含有된 培養液으로 하였다.

대조군인 10%FBS 첨가군의 경우 23.7배인

71.0×104/ml의 세포증식이 이루어졌고 0%FBS 추가군의 경우 7.1배인 21.3×104/ml의 세포 증식이 이루어졌으며 膈下逐瘀湯 추가군의 경우 10%, 5%농도에서는 子宮筋腫細胞 중 대부분이 成長하지 못하고 死滅한 것을 확인했으며, 또한 0.01% 농도 이상에서도 細胞成長率は 對照群에 比하여 成長이 遲延되는 效果가 있는 것을 觀察하였다(Table 1, Fig. 1).

둘째, 膈下逐瘀湯에 대한 細胞成長 抑制效果를 보다 상세하게 觀察하기 위하여 子宮筋腫細胞를 10%FBS가 含有된 DMEM 培養液下에서 3日間 培養하여 monolayer가 형성된 子宮筋腫細胞에 10%FBS가 함유된 DMEM배양액을 제거한 다음 각각 相異한 濃度の 膈下逐瘀湯이 含有된 培養液으로 교체하여 3日間 追加 培養한 다음 細胞의 成長을 調査하였다.

對照群인 10%FBS가 含有된 培養液에서 細胞成長을 100%로 換算한다면 膈下逐瘀湯 添加群의 경우 10%, 5%, 1%의 경우에서 各各 21.9%, 25.4%, 28.5%로 人間子宮筋腫細胞의 成長抑制效果가 명확하게 나타났다(Table 2, Fig. 2).

셋째, 膈下逐瘀湯이 含有된 培養液을 利用하여 좀 더 구체적으로 成長抑制效果를 알아보기 위하여 MAP kinase activity를 확인하였다.

膈下逐瘀湯 10%, 5%, 1% 및 0.1%添加群의 경우 MAP kinase activity는 각각 2269, 2521, 2834 및 2851CNT/mm²로 膈下逐瘀湯添加 濃도가 減少됨에 따라 MAP kinase activity는 增加됨이 觀察되었다(Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5).

이러한 結果로 보아 본 研究에 사용된 膈下逐瘀湯은 細胞培養 實驗에서와 마찬가지로 子宮筋腫細胞의 成長抑制作用이 있는 것으로 判斷되며 그 效能을 나타내는 添加濃도는 5%以上으로 判斷된다.

膈下逐瘀湯이 처리된 細胞에 대한 細胞의 活性도를 알아보기 위한 다른실험으로서 細胞

의 自然死와 관련된 *bcl-2* 유전자의 발현을 調査한 結果, 0.1%, 1%, 5%, 10%添加群에서의 *bcl-2* 유전자의 발현양상은 각각 2372, 2683, 3134, 3945CNT/mm²로 나타나 MAP kinase activity와는 반대로 膈下逐瘀湯의 添加濃도가 增加됨에 따라 *bcl-2* 유전자의 발현은 점차적으로 높게 나타났다(Fig. 6, Fig. 7).

以上の 結果를 綜合하여 볼 때, 膈下逐瘀湯이 子宮筋腫細胞의 成長을 抑制하는 效能이 있으며 膈下逐瘀湯의 처리가 子宮筋腫細胞에 직접적으로 作用하여 MAP kinase activity를 減少시키고, 그 結果 自然의 細胞死가 促進되어 *bcl-2* 유전자의 발현을 增加시킨다는 事實을 확인하였다.

또한 이 實驗은 凍結保存된 子宮筋腫細胞株에 培養하는 既存의 實驗과는 달리 人間の 子宮筋腫細胞를 직접 培養시키고 藥物을 投與하여 觀察함으로써 人間の 疾病상태에 더욱 近接한 實驗이라 할 수 있다.

向後에는 子宮筋腫患者의 臨床에 있어서 직접 藥物을 投藥하여 일어나는 變化를 觀察함으로써 人間の 疾病을 治療하는데 進一步하는 研究가 必要하리라 思料된다.

V. 結 論

膈下逐瘀湯이 子宮筋腫細胞의 增殖에 미치는 영향을 알아보기 위하여 가장 좋은 條件으로 배양된 子宮筋腫細胞(10%FBS, 0%FBS)의 對照群과 膈下逐瘀湯을 濃度別로 처리한 添加群을 培養시켜 子宮筋腫細胞의 成長抑制效果, MAP kinase activity 및 Cell Apoptosis 관련 *bcl-2* 발현의 양상을 살펴본 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 膈下逐瘀湯의 子宮筋腫細胞 成長抑制를 나타내는 濃도는 0.01%以上 濃度에서 모두 나

타났으며 5%, 10%의 濃度에서는 대부분이 成長하지 못하고 死滅하여 膈下逐瘀湯이 子宮筋腫細胞의 成長抑制에 效能이 있는 것으로 나타났다.

2. 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞에서의 MAP kinase activity는 10%의 濃度에서 細胞의 活性度가 높은 수준으로 減少 됨을 알 수 있으며, 5%이상의 濃度에서 子宮筋腫細胞成長을 抑制하는 것으로 나타났다.

3. 膈下逐瘀湯이 처리된 子宮筋腫細胞에서의 Cell Apoptosis 관련 *bcl-2* 유전자 발현양상은 膈下逐瘀湯添加群의 濃度가 增加됨에 따라 *bcl-2* 유전자의 발현은 점차적으로 높게 나타났다.

以上の 研究結果로 보아 膈下逐瘀湯은 子宮筋腫細胞에 直接的으로 作用하여 成長을 抑制시키고, MAP kinase activity를 減少시키며 그 結果 細胞의 自然死가 促進되어 *bcl-2* 유전자의 발현을 增加시키므로써 子宮筋腫을 治療하는 效果적인 處方으로 思料된다.

參考文獻

- 대한산부인과학회. 부인과학(3). 서울:도서출판칼빈서적. 1991:175-83, 473-81, 599, 667-78, 1131-63.
- 裴恩敬, 李京燮, 宋炳基. 子宮筋腫의 韓醫學的 接近. 大韓韓方婦人科學會誌. 1994;7(1): 79~86.
- 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 子宮筋腫의 治驗1例. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(1):33-8.
- 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 癥瘕의 東西醫學的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1986;7(1):84-8.
- 梁秀烈, 李京燮, 宋炳基. 癥瘕患者에 對한 臨床的 考察. 大韓韓方婦人科學會誌. 1991;4(1):23-7.
- 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울:杏林出版社. 1980:249-56.
- 李京燮, 宋炳基. 癥瘕 狀態에 關한 文獻的 考察. 서울:東洋醫學研究室. 1980;5:46-52.
- 문구, 조성각. 積聚處方에 對한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1996;11(2):315-29.
- 王肯堂. 六科準繩. 서울:大星文化社. 1992:252-68.
- 宋炳基. 邪客子門의 證治體系에 關한 考察. 서울:醫林. 1982:150.
- 康舜洙. 바른 方劑學. 서울:大星文化社. 1996:259.
- 余桂清. 歷代中醫腫瘤案論選粹. 北京:北京出版社. 1988:1-49.
- 王清任. 醫林改錯. 서울:一中社. 1992:66-8.
- 權晟五, 鄭鉉雨. 膈下逐瘀湯이 癌細胞의 增殖에 미치는 實驗的 效果. 大韓東醫病理學會誌. 2000;14(1):148-59.
- 田賢哲 등. 膈下逐瘀湯의 治療效能에 關한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1978;15(1):31-3.
- 이중학. 자궁근종에 대한 임상적 및 병리학적 연구. 대한산부인과학회지. 1987;30:213-22.
- 王曉萍. 婦產科病症治精要. 北京:科學技術文獻出版社. 1999:208-36.
- 백원민 외. 자궁근종의 임상적 고찰. 대한산부인과학회지. 1983;26:1047-54.
- 송계승 외. 자궁근종의 임상통계학적 관찰. 대한산부인과학회지. 1987;30:981-8.
- Buttram Jr VC Reiter RC. Uterine leiomyomata. Etiology. Symptomatic and management. Fertil Steril. 1981;36:433.
- 魯勳政 외 3人. 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 대한 實驗的 研究. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1996;2(1):43-56.
- 高光錫. 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合 四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 實驗的 研究. 東醫病理學會誌. 1994;9(1):21-45.
- 崔海輝. 膈下逐瘀湯 煎湯液이 鎮痛. 消炎 및 脾臟에 미치는 影響. 圓光韓醫學. 1991;1(1):185-94.
- 田賢哲. 膈下逐瘀湯 煎湯液이 ccl4로

- 誘發된 白鼠 肝損傷에 미치는 影響에 關한 研究. 慶熙大學校 大學院(碩士). 1978.
25. 白承嬉. 七製香附丸이 子宮細胞株의 成長과 排卵 및 着床前胚發生에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2000;13(1):186-218.
 26. 金眞喜. 桂枝茯苓丸이 子宮筋腫細胞의 成長抑制와 MAP Kinase活性에 미치는 影響. 慶山大學校大學院(博士). 2001.
 27. 김중일. 선천성기형에 대한 연구. 대한산부인과학회지. 1992;35:1720-9.
 28. 민부기. 생쥐난소의 체외 배양에서 인간난포액과 표피성장인자가 난성숙에 미치는 영향. 大韓不妊學會雜誌. 1993;20(2):157-60.
 29. 양승희. 생쥐에서 과배란유도시 인간음모성선자극 홀몬 투여 방법이 체외수정 및 배자의 체외성장에 미치는 영향에 관한 연구. 大韓不妊學會雜誌. 1994;21(2):165-76.
 30. 양영호, 손인숙, 송찬호. 선천성기형에 대한 임상적 고찰. 대한산부인과학회지. 1993;36 :2294-8.
 31. Pang. H.-A., Lee. Y.W. Suh. N.J. and Chang. I.-M. Toxicological study of Korean tea materials: Screening of potential mutagenic activities by using SOS-Chromotest. Korean J. Pharmacogn. 1990;21: 83.
 32. Grewal S. York R. Stork P. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. Currunt Opinion in Neurobiology. 1999;9:544-53.
 33. Naor Z. Benard O. Seger R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: The case of gonadotropin-releasing hormone receptor. 1999;11:91-9.
 34. Nebreda A. Porras A. MAP kinases: beyond the stress response. TIBS. 2000; 25:257-60.
 35. 華 陀. 中藏經. 서울:成輔社. 1978:13.
 36. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 台中:昭人出版社. 1975:7, 6-12, 19.
 37. 吳 謙 等編. 醫宗金鑑下冊. 北京:人民衛生出版社. 1982:38.
 38. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1975:48, 490-1.
 39. 王 冰 註. 皇帝內經. 서울:高文社. 1971:75, 80, 112, 123, 147, 172, 281, 296, 353.
 40. 孫思邈. 備急千金要方. 北京:人民衛生出版社. 1982:59-62, 66, 211-5.
 41. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂. 1998:200, 513-4.
 42. 戴綿成. 中醫雜病論治. 福州:福建科學技術出版社. 1995:173-4.
 43. 辛民教. 臨床本草學. 서울:營林出版社. 1986:175, 221, 249, 253, 300, 384, 385, 388, 464, 466-7, 470.
 44. 金哲源. 婦人科에 活用되고 있는 小腹逐瘀湯에 對한 研究. 大韓婦人科學會誌. 1998;11(2):315-29.
 45. 洪喜鐸 등. 血府逐瘀湯이 免疫機能에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1996;9(1):177-89.
 46. 辛民教. 申氏本草學. 서울:壽門社. 1973:16-20, 80-4, 486-90, 521-2, 540-2, 554-6, 562-4, 600-3, 605-7.
 47. 吳儀洛. 本草從新. 서울:杏林出版社. 1982:6, 29-30, 31-2, 35, 57, 113, 130, 146, 243.
 48. 李時珍. 本草綱目. 서울:高文社. 1985:400-3, 484-9, 494-7, 995, 1115, 1465.
 49. 최의주. Regulation of the stress activated MAP kinase. 제3회 한국응용약물학회 추계심포지움. 1995;1:23-7.
 50. Haccard O. Jessus C. Cayla X. Goris J. Merlevede W. Ozon R. In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the Xenopus oocyte. Eur J Biochem. 1990;192(3):633-42.
 51. Choi T. Rulong S. Resau J. Fukasawa K. Matten W. Kuriyama R. Mansour S. Ahn N. Vande Woude GF. Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. Proc Natl Acad Sci. 1996;93(10):4730-5.
 52. Ian MB. Jeremy AS. Tao DI. Jacqueline MC. Lubo Z. Jing Z. Ronald RM.

Pregnancy-Dependent Changes in Cell Signaling Underlie Changes in Differential Control of Vasodilator Production in Uterine Artery Endothelial Cells. *Endocrinology*. 2000;141(3):1107-17.

53. 김선행. 체외수정시술 주기에서 자궁내막발달과 착상에 관한 연구. *大韓不妊學會雜誌*. 1993;20(2):117-23.