

시호의 메탄올 추출물이 일차배양한 뇌, DRG 및 간세포에 미치는 영향

김영중 · 박미정 · 변순정 · 송진호
서울대학교 약학대학

Effects of the Methanol Extract of Bupleuri Radix on Primary Cultured Brain Cells, DRG and Hepatocytes

Young Choong Kim, Mi Jung Park, Soon Jung Byun and Jin Ho Song
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract—Effects of the methanol extract of Bupleuri Radix on primary cultured chicken embryonic brain cells, dorsal root ganglia (DRG) and rat hepatocytes were studied. The methanol extract of Bupleuri Radix at the concentration ranging from 10 $\mu\text{g/ml}$ to 100 $\mu\text{g/ml}$ significantly recovered the cytotoxicity of rat hepatocytes induced by the treatment of galactosamine; at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, values of GOT and GPT in the culture medium were reduced by the 60% and 75%, respectively of those in the absence of the methanol extract of Bupleuri Radix. The addition of the methanol extract of Bupleuri Radix, into chicken embryonic brain cells which were cultured with a deficient medium significantly increased the number of cells promoting the neurite outgrowth. However, the methanol extract of Bupleuri Radix showed no effect on the activities of PDHC and acetylcholinesterase in primary cultured brain cells.

Keywords—Primary culture · chicken embryonic brain cells · DRG · rat hepatocytes · galactosamine · Bupleuri Radix

최근에 천연물로부터 신약을 개발하려는 움직임과 더불어 수천년 동안 축적된 임상적인 경험을 토대로 사용되어 온 한약이 새롭게 조명되고 있다. 천연물에서부터 신약을 개발하려면 우선 생리활성 물질을 검색할 수 있는 특이적이고 선택성과 감도가 높은 검색 방법의 개발이 일차적인 관문이라고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 보다 정확하고 특이한 생리활성물질 검색방법을 개발하기 위한 연구의 일환으로 일차세포배양법을 도입하여 한방에서 해열, 진통, 진해, 진정, 보간 등의 목적으로 광범위하게 빈번하게 사용

되고 있는 시호(Bupleuri Radix)의 약효를 점검하여 보았다. 즉, 시호의 간보호작용을 규명하기 위하여 흰쥐나 토끼를 인위적으로 사염화탄소나 galactosamine으로 간에 손상을 입힌 다음 조 saikosides를 투여하여 그 회복정도를 본 실험에서는 서로 상반된 결과를 보고하고 있어,¹⁻³⁾ 이에 본 논문에서는 일차배양한 간세포를 이용하여 시호의 약리작용을 알아보았다. 또한 시호의 메탄올 추출물을 제배의 뇌 및 감각신경기관인 dorsal root ganglia를 채외에서 인위적으로 질병상태로 유도배양하면서 첨가하여 이들 세

포 및 장기에 미치는 영향을 현미경 관찰과 동시에 일련의 생화학적 연구를 수행하여 알아보았다.

실험 방법 및 재료

재료 및 시약

본 실험에 사용한 시호는 한약재료상에서 약용으로 시판하는 것을 구입하여 감정하여 사용하였다. 계배(chicken embryo)는 일령 10일된 것을 초원농장(서울, 내곡동)에서 구입하였으며, 흰쥐는 서울대학교 실험동물사육실에서 공급받았다. 조직배양에 필요한 시약 및 기타 시약들은 Sigma Chemical Company(USA) 제품을 사용하였다. 방사선 동위원소 및 aquasol은 NEN Research Products(USA)에서 구입하여 사용하였다.

시호의 총메탄올 추출물 제조

시호 600 g을 메탄올 2 l로 추출하고 그 추출물을 감압 농축 후, 동결건조하여 분말을 얻었다.

계배추출물(chicken embryo extract)의 제조⁴⁾

일령이 10일된 계배를 적출하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 후, 주사기를 이용하여 원심분리관 속에 압출하고, 동량의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 후, 4°에서 18,000 rpm으로 25분간 원심분리하여서 그 상등액을 취하여 사용하였다.

계배의 DRG의 조직배양⁵⁾

일령 12일 된 계배에서 DRG를 적출하여 collagen을 입힌 배양용기(Linbro dish, 35×10 mm) 중심에 배양액 1적을 떨어뜨려 넓게 편 후 적출한 DRG 3개 썩을 이식하여 24시간 배양한 후 다시 배양액 1 ml을 첨가하여 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 87.5%, 말 혈청 10%, 계배 추출물 2.5%, penicillin 10,000 IU/100ml, streptomycin 10,000 µg/100 ml 및 amphotericin B 500 µg/100 ml로 구성된 표준 배양액과 이 배양액에서 세포 성장에 필수 성분인 계배 추출물을 제거한 결핍 배양액을 사용하였다.

계배의 뇌세포 배양⁶⁾

일령이 10일 된 계배에서 뇌를 적출한 후 결합조직을 제거하고 0.15% trypsin으로 조직을 연화시킨 후 세포상태로 분리하였다. 이것을 collagen을 입힌 배양용기(Falcon, 15×24 mm)에 뇌세포가 1×10^5 cells/ml이 되도록 이식하였다. 배양액은 DRG의 배양에 사용한 배양액을 사용하였다.

흰쥐의 간세포 배양⁷⁾

흰쥐를 urethane(1g/kg body weight)으로 마취시킨 다음 70% ethanol로 복부를 소독한 후 개복하였다. 간문맥을 21 gauge catheter로 삽관(canulation)하고 30 ml/min의 속도로 perfusion 하였으며 이때 하대정맥을 잘라 혈액을 제거하였다. 150 ml의 HBSS로 perfusion한 후 흉강(thoracic cavity)를 열어 상대정맥을 18 gauge catheter로 삽관한 다음 하대 정맥을 묶어 주어서, 소화용액(digestion solution)이 상대정맥을 통하여 공급 flask로 되돌아오는 recirculation이 이루어지도록 하였다. Recirculation은 37°에서 CO₂(5%)와 O₂(95%)의 혼합기체를 공급해주면서 HBSS 95 ml과 collagenase 5 ml(50 mg/5 ml HBSS, final conc. 0.05%)으로 구성된 소화용액으로 10분간 수행되었다. 간세포가 분리된 후 간을 떼어 내어 HBSS 60 ml을 가한 후 간막을 가위로 찢어서 간세포가 유리되게 한 다음 lens paper로 여과하였다. 여과액은 50 g에서, 4분간 원심분리한 다음 상등액을 버리고 다시 배양액으로 같은 조건에서 원심분리한 후 cell suspension을 얻었다. Cell suspension은 5×10^5 cells/ml의 농도로 collagen 도포된 배양용기에 이식하였다. 배양액은 Waymouth's MB 751/1 medium, 10% fetal calf serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin(fraction V), 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-7} M insulin, 5.32×10^{-2} M L-serine, 4.09×10^{-2} M L-alanine, 2.67×10^{-2} M NaHCO₃, 10,000 IU/100 ml penicillin, 10,000 IU/100 ml streptomycin 과 500 µg/100ml amphotericin B로 구성된 배양액을 사용하였다.

세포의 배양

일정한 습도를 유지하는 37° 배양기에서 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 공급하

면서 세포를 배양하였다.

단백질 정량⁸⁾

배양한 세포의 단백질 함량은 Lowry방법에 의하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Acetylcholinesterase 정량⁹⁾

배양한 세포중에 존재하는 acetylcholinesterase의 함량은 Ellman의 방법에 의하여 측정하였다. 인산 완충액(0.1 M, pH 8.0) 2.6 ml가 들어 있는 photocell에 단백질 정량이 된 세포균질물 0.4 ml를 가하고 비특이성 cholinesterase의 반응 억제제인 tetraisopropylpyrophoramide를 반응계의 최종농도가 1×10^{-4} M 농도가 되도록 가하였다. 여기에 dithiobisnitrobenzoate 100 μ l를 가하고 412 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 안정화되었을 때의 흡광도를 기준점으로 하고, 기질로서 acetylthiocholine iodide 20 μ l를 가한 후 1분간의 흡광도 변화를 측정하였다. Acetylcholinesterase의 특이적 효소활성은 세포균질물의 단백질 1 mg이 1분당 변화시킨 흡광도 변화량(ΔA /분/mg protein of tissue homogenate)으로 나타내었다.

PDHC 정량¹⁰⁾

PDHC의 활성은 PDHC가 환원시킨 NADH의 양을 측정하여 정량하였다. 균질화된 세포에 2.5 mM NAD, 0.2 mM thiamine pyrophosphate, 0.1 mM coenzyme A, 0.3 mM dithiothreitol, 5 mM pyruvate, 1 mM magnesium chloride, 1 mg/ml의 bovine serum albumine, 0.6 mM *p*-iodonitrotetrazolium, 0.1 mg/ml lipoamide dehydrogenase이 함유된 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8) 용액의 반응시약을 1분간 반응시킨후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 생합성 측정¹¹⁾

단백질의 생합성은 [³H]-leucine을 배양액에 첨가하여 방사성 동위원소로 표시된 leucine이 배양세포의 단백질에 incorporation되는 정도를 측정하였다. 뇌세포는 4일간 배양하고 간세포는 2일간 배양한 다음 배양액에 [³H]-leucine(1 μ Ci/ml)을 투여하여 2시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 HBSS로 3회 세척하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 1 ml 가하여 단백

질을 침전시켰다. Ethanol과 ether의 혼합용액(3:1) 1 ml로 간존하는 TCA용액을 제거한 후 1 N NaOH 200 μ l로 단백질을 녹여내었다. 그 중 100 μ l를 취하여 scintillation cocktail aquasol 5 ml에 가한 후 방사활성을 측정하였다.

DNA 생합성 측정

DNA 생합성의 측정은 [³H]-leucine 대신 [³H]-thymidine을 사용하여 단백질 생합성 정도 측정 방법과 비슷한 방법으로 수행하였다.

RNA 생합성 측정

RNA 생합성의 측정은 [³H]-leucine 대신 [³H]-uridine을 사용하여 단백질 생합성 정도 측정 방법과 비슷한 방법으로 수행하였다.

Galactosamine(GalN)에 의해 유도된 간독성의 측정

간세포를 1.5시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 1.5 mM GalN과 생약추출물을 함유한 배양액으로 갈아준 다음 간세포를 배양한 지 48시간 후에 그 배양액을 채취하여 glutamic-pyruvic transaminase(GPT)와 glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT)의 활성을 Reitman-Frankel의 방법¹²⁾을 이용하여 측정하였다.

실험결과 및 고찰

계배의 뇌세포 및 DRG에 미치는 영향

시호가 뇌 및 감각신경기관인 DRG에 어떠한 영향을 미치는가를 일차배양한 계배의 뇌세포 및 DRG에 시호의 메탄올 추출물을 투여하여 알아 보았다. 즉, 생체에 미치는 생리활성 물질의 영향이 정상상태보다는 비정상상태에서 효과가 더욱 뚜렷이 나타날 것이므로 계배의 뇌로부터 뇌세포를 직접 분리하여 결핍 배양액으로 비정상상태로 유도배양하면서 시호의 메탄올 추출물을 10, 50, 100 μ g/ml씩 투여하여 24시간 배양 후 신경축색돌기를 생성하는 신성세포의 수를 다섯 부위에서 측정하여 시호의 효과를 알아보았다. 시호의 메탄올 추출물은 결핍배양액으로 배양하였을 때 뇌의 신경축색돌기를 생성하는 세포의 수를 증가시켜주었으며 농도를 증가시킴에 따라 생존세포의 수가 감소하는 경향을 보였다 (Table I).

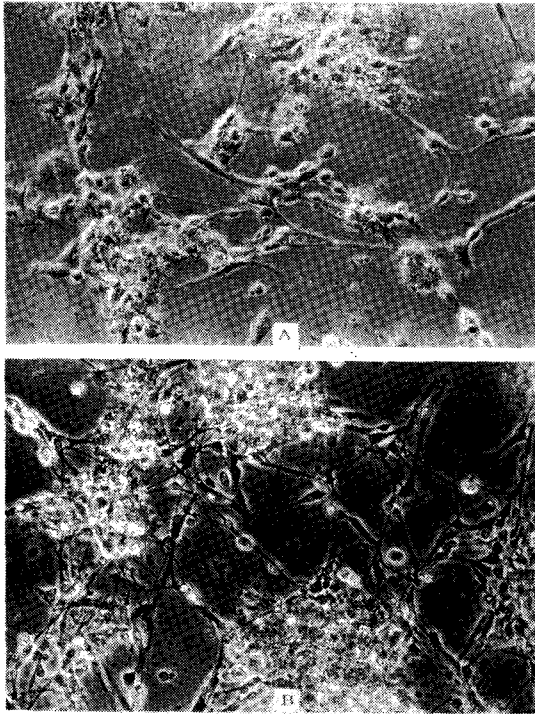


Fig. 1. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the growth of chicken embryonic brain cells ($\times 200$). Brain cells were cultured with a deficient medium for 48 hours.
 A : Primary cultured brain cells in the absence of methanol extract of Bupleuri Radix.
 B : Primary cultured brain cells in the presence of $100 \mu\text{g/ml}$ methanol extract of Bupleuri Radix.

Table I. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the number of chicken embryonic brain cells which outgrowth neurites.

The methanol extract of Bupleuri Radix ($\mu\text{g/ml}$)	Number of brain cells with neurite outgrowth
0	20.33 ± 4.51
10	$40.08 \pm 5.33^*$
50	$39.94 \pm 6.16^{**}$
100	$34.75 \pm 5.88^*$

Brain cells were cultured with a deficient medium for 24 hours,

Significantly different from the control :

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

현미경 관찰에 의한 소견으로는 뇌세포를 결핍배양액으로 배양하였을 때 시호의 메탄올 추출물을 투여하면 뇌세포의 성장제한이 어느 정

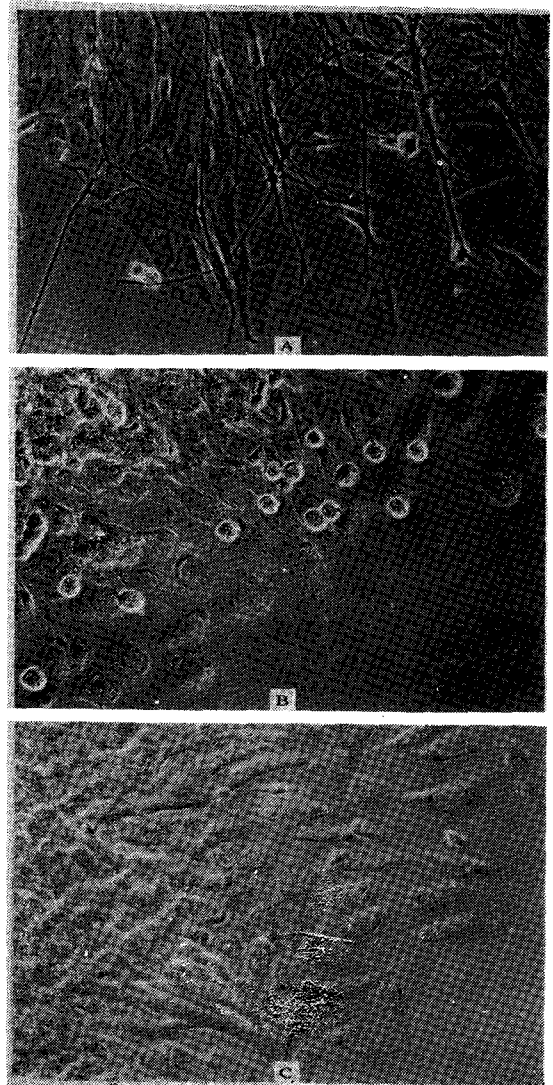


Fig. 2. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the neurite outgrowth of primary cultured DRG. ($\times 200$).

A : DRG were cultured with a standard medium for 48 hours.

B : DRG were cultured with a deficient medium for 48 hours.

C : DRG were cultured with a deficient medium in the presence of $100 \mu\text{g/ml}$ methanol extract of Bupleuri Radix for 48 hours.

도 회복되었으며 농도에 따른 변화는 인지할 수 없었다(Fig. 1).

이를 뒷받침하기 위하여 뇌세포에 존재하는 효소 중에서 에너지 대사 및 신경전달물질인 acety-

Icholine의 생합성 및 분해에 관여하는 효소들인 PDHC 및 acetylcholinesterase의 활성을 측정하였으나(Table II), 시호의 메탄올추출물은 이들 효소의 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 또한 시호의 메탄올 추출물은 비정상상태의 뇌세포에서 단백질의 합성을 감소시키는 경향을 나타냈으며 RNA 합성은 억제하였으나 DNA 합성은 증가시켰다(Table III). 이와 같은 시호의 뇌에 대한 효과는 시호가 신경축색돌기를 생성하는 신경세포의 생존률은 증가시켜주지만 이러한 효과는 직접 단백질이나 RNA 합성과는 관련이 없는 듯하다. 또한 시호가 비정상상태에서의 뇌의 PDHC나 acetylcholinesterase의 활성에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 중추억제 작용이 있다는 보고¹³⁾와 연관지을 수 있을지의 여부를 밝히기 위한 연구는 수행중이다.

또한 시호의 메탄올 추출물은 비정상상태로 유도배양한 계배의 DRG에는 별다른 영향을 미치지 못하는 것을 현미경하에서 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

흰쥐의 간세포에 미치는 영향

시호의 간보호작용을 밝히기 위하여 일차배양한 간세포를 GalN으로 처리하여 인위적으로 손상을 입힌 다음 시호의 메탄올 추출물을 투여하여 손상된 간세포의 치유정도를 알아보았다. GalN은 간세포의 단백질과 RNA 합성을 억제하여 간에 손상을 입히며, GalN에 의하여 손상된 간세포는 virus감염에 의한 간염과 유사하다는 보고가 있다. 이에 시호의 메탄올 추출물을 GalN으로 손상된 간세포에 투여한 후 배양액 중으로 유리되는 GPT와 GOT의 양을 측정하여 그 회복정도를 측정하고, 간세포에서의 단백질, RNA 및 DNA의 합성 능력을 측정하여 GalN에

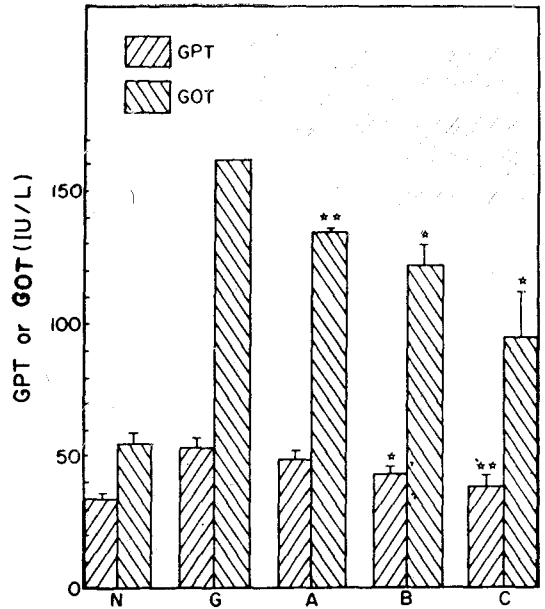


Fig. 3. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the GalN-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes (n=3 dishes).

N : The activity of GPT or GOT in the cultured medium of hepatocytes without GalN treatment.

G : The activity of GPT or GOT in the cultured medium of hepatocytes treated with 1.5 mM GalN.

A, B and C : The activity of GPT or GOT in the cultured medium of hepatocytes treated with 1.5 mM GalN in the presence of 10, 50 and 100 µg/ml methanol extract of Bupleuri Radix, respectively.

Significantly different from the control :

* p<0.05, ** p<0.01.

의한 간상해를 어떤 기전으로 회복시키는 지를 살펴보았다.

흰쥐의 간세포를 1.5시간동안 배양한 다음 1.5 mM GalN으로 상해를 주면서 시호의 메탄올 추

Table II. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the activity of PDHC and acetylcholinesterase in chichen embryonic brain cells cultured for 4 days

	The methanol extract of Bupleuri Radix (µg/ml)	Activity of PDHC (nmol/min/mg protein)	Activity of acetylcholinesterase (ΔA/min/mg protein × 10 ⁻⁴)
Brain cells cultured with a standard medium	0	8.751±1.634	0.873±0.003
Brain cells cultured with a deficient medium	0	2.708±0.282	0.320±0.069
Brain cells cultured with a deficient medium	50	3.141±0.904	0.283±0.108

Table III. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the synthesis of protein, RNA and DNA in chicken embryonic brain cells cultured for 4 days

	The methanol extract of Bupleuri Radix ($\mu\text{g/ml}$)	Protein [^3H]-Leucine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)	RNA [^3H]-Uridine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)	DNA [^3H]-Thymidine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)
Brain cells cultured with a standard medium	0	4,387 \pm 407	60,890 \pm 1,613	60,889 \pm 5,210
Brain cells cultured with a deficient medium	0	2,187 \pm 121	12,863 \pm 302	18,409 \pm 2,701
Brain cells cultured with a deficient medium	50	1,956 \pm 124	9,236 \pm 379***	25,203 \pm 1,624*

Significantly different from the control : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

출물 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하고 48시간 배양후에 GPT 및 GOT값을 측정하였다(Fig. 3). 시호의 메탄올 추출물은 간손상 시 배양액 중으로 유리되는 GPT 및 GOT의 증가를 유의적으로 감소시켰으며 농도를 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키에 따라 농도 의존적으로 GPT 및 GOT값을 감소시켰다. 특히 시호의 메탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는

전혀 투여하지 않았을 경우의 GPT값의 75%, GOT값의 60%까지 감소되었다.

이러한 시호의 간보호 효과는 현미경으로도 관찰할 수 있었다. 배양후 48시간이 지난 정상 간 세포는 monolayer를 형성하면서 건강하게 잘 자라고 있었으나(Fig. 4a), GalN으로 처리한 간세포의 경우는 정상적인 형태를 유지하지 못하고 괴사하고 있었다(Fig. 4b). 그러나 시호의 메탄

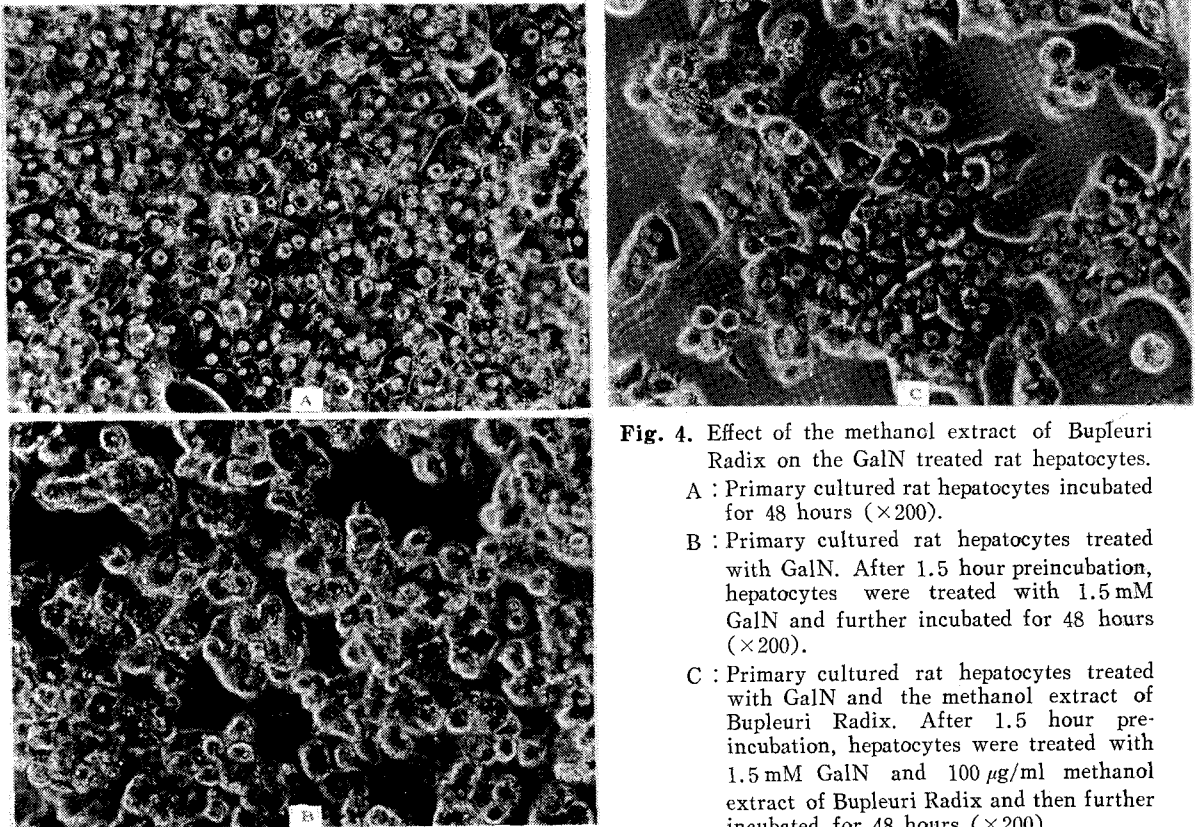


Fig. 4. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the GalN treated rat hepatocytes.

- A : Primary cultured rat hepatocytes incubated for 48 hours ($\times 200$).
- B : Primary cultured rat hepatocytes treated with GalN. After 1.5 hour preincubation, hepatocytes were treated with 1.5 mM GalN and further incubated for 48 hours ($\times 200$).
- C : Primary cultured rat hepatocytes treated with GalN and the methanol extract of Bupleuri Radix. After 1.5 hour preincubation, hepatocytes were treated with 1.5 mM GalN and 100 $\mu\text{g/ml}$ methanol extract of Bupleuri Radix and then further incubated for 48 hours ($\times 200$).

Table IV. Effect of the methanol extract of Bupleuri Radix on the synthesis of protein, RNA and DNA in primary cultured rat hepatocytes (1.0 mM GalN, n=3 dishes).

	The methanol extract of Bupleuri Radix ($\mu\text{g/ml}$)	Protein [^3H]-Leucine incorporation (dpm/ 5×10^6 cells)	RNA [^3H]-Uridine incorporation (dpm/ 5×10^6 cell)	DNA [^3H]-Thymidine incorporation (dpm/ 5×10^6 cells)
Normal hepatocytes	0	5,756 \pm 1,262	4,452 \pm 108	3,672 \pm 200
GalN-treated hepatocytes	0	254 \pm 28	1,740 \pm 82	708 \pm 80
GalN-treated hepatocytes	100	1,772 \pm 360***	3,558 \pm 110***	1,248 \pm 146***

Significantly different from the control : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

을 추출물을 투여한 경우에는 정상세포에는 미치지 못하나 정상적인 형태를 유지하는 세포들이 생존해 있었다(Fig. 4c).

시호의 간세포 보호작용의 기전을 밝히기 위하여 GalN에 의하여 억제된 간세포에서의 단백질, RNA 및 DNA 합성에 시호가 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 시호의 메탄올 추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여하였을 때 GalN으로 손상된 간세포에서의 단백질, RNA 및 DNA 합성이 유의성있게 증가되었으며(Table IV) 정상 간세포에서의 합성능력의 28%, 67%, 19% 수준까지 회복시켜주었다. 이와 같은 결과는 시호가 DNA 합성단계에 직접 관여하여 DNA의 합성을 증가시켰다고도 볼 수 있으나 현미경으로 관찰하였을 때 시호가 살아있는 세포의 수를 증가시키는 것으로 미루어 보아 생존 세포의 수가 증가되고 이로 인하여 결과적으로 DNA의 합성이 증가되었다고도 볼 수 있다. 또한 시호의 메탄올 추출물이 손상된 간세포의 단백질합성은 DNA 합성과 비교하여 별다른 차이를 보이지 않으나 RNA의 합성은 크게 증가시켰는데 이는 RNA의 합성정도를 측정하기 위하여 사용한 방사성동위원소가 [^3H]-uridine이기 때문인 것으로 간주된다. 간에서 GalN은 UDP와 반응하여 간의 UTP 및 UDP hexose를 고갈시키게 되고 그로 인하여 RNA의 uracil nucleotide-dependent 생합성이 억제된다. 따라서 uridine이 고갈되어 합성이 일어나지 못하고 있는 상태에서 uridine을 투여하였으므로 RNA의 합성이 잠정적으로 크게 증가된 것으로 추측되며 시호에 의한 직접적인 RNA 및 DNA의 합성증가 여부를 증명하기 위한 실험은 수행중에 있다. 본연구에서 시호가 GalN으로

인한 간상해를 어느 정도 회복시키는 것을 일차적 방법으로 배양한 간세포를 이용하여 증명할 수 있었으며 이 방법을 이용하여 간보호작용을 갖는 물질을 검색할 수 있는 것으로 나타났다.

결 론

1. 시호의 메탄올 추출물은 비정상상태로 유도배양한 계배의 뇌에서 신경축색돌기를 생성하는 세포의 수를 증가시켰으나 PDHC나 acetylcholinesterase의 활성에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 또한 감각신경기관인 DRG에서 신경축색돌기 생성에 아무런 영향을 미치지 않는 것이 현미경으로 관찰되었다.

2. 시호의 메탄올 추출물은 GalN 처리로 손상된 흰쥐의 간세포를 회복시켜 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유리되는 GOT 및 GPT값을 각각 시호의 메탄올 추출물을 투여하지 않았을 때의 60%, 75%까지 현저히 감소시켰다.

3. 천연물의 생리활성물질 검색 및 연구에 일차세포 배양법에 의하여 일차배양한 계배의 뇌, DRG 및 흰쥐의 간세포를 이용할 수 있는 방법을 제시하였다.

감사의 말씀 : 본 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 대하여 깊이 감사하는 바이다.

(1990년 3월 2일 접수 : 3월 15일 수리)

문 헌

1. Shibata M., Isomura A., Inoue T. and Nagai M.: *Shoyakugaku Zasshi* 30, 62 (1976).

2. Haviniwa, J. and Harada, M.: *Yakugaku Zasshi* **80**, 617 (1960).
3. Arichi, S., Konishi, H. and Abe, H.: *Kanzo* **19**, 430 (1978).
4. White, P.R., The cultivation of animal and plant cells, The Ronald Press Company, New York, pp.66 (1963).
5. Kim, Y.C. and Kim, E.K.: *Yakhak Hoeji* **24**, 143 (1980).
6. Kim, Y.C., Han, D.S., Huhy, H., Ahn, S.M. and Koo H.J.: *Yakhak Hoeji* **27**, 2 (1983).
7. Berry, M.N. and Friend, D.S.: *The Journal of Cell Biology* **43**, 506 (1969).
8. Lowry, O.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
9. Ellman, G.L., Courtney K.D., Andre, J.V. and Featherstone, R.M.: *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
10. Lois, M.H., John, P.B.: *J. Biol. Chem.* **256**, 65 (1981).
11. Markelonis, G., Oh, T.H. and Derr, D.: *Experimental Neurology* **70** 598 (1980).
12. Reitman, S. and Frankel, S.: *Am. J. Clin. Path.* **28**, 56 (1957).
13. Takatgi, K. and Shibata, M.: *Yakugaku Zasshi* **89**, 712 (1969).