

# 사향과 항암제 Mitomycin C의 병용효과

은재순\* · 김대근 · 송정모<sup>1</sup>

우석대학교 약학대학, 1: 한의과대학

## The Combined Effect of Moschus and Anti-tumor drug Mitomycin C

Jae Soon Eun\*, Dae Keun Kim, Jung Mo Song<sup>1</sup>

Department of Pharmacy, 1: College of Oriental Medicine, Woosuk University

The combined effects of water-soluble fraction of Moschus (ME) and anti-tumor drug mitomycin C on the proliferation of human tumor cell-lines were estimated by MTT colorimetric assay. ME inhibited the proliferation of Hep G2, A540, HeLa, KHOS-NP and Balb/c 3T3 cells. Also, ME increased the cytotoxicity of mitomycin C on Hep G2, A549 and HeLa cells. In addition, ME enhanced the cell viability of murine splenocytes and human lymphocytes at the concentration of 100  $\mu$ g/ml. These results indicate that ME inhibits the proliferation of human tumor cells and increases the cytotoxicity of mitomycin C without cytotoxicity on immune cells.

Key words : Moschus, mitomycin C, human tumor cell-lines, splenocytes

### 서 론

사향은 사향사슴 (*Moschus moschiferus* Linne) 숫컷의 배꼽과 음경 사이에 있는 사향선 분비물을, 건조한 것으로 분비액은 황갈색의 반유동체이나 채취하여 건조하면 반고형체가 된다<sup>1)</sup>. 사향은 옛날부터 향료 및 약용으로 주로 사용되어 왔으며, 주성분으로는 muscone<sup>2)</sup>, muscopyridine<sup>3)</sup>, 5 $\beta$ -androstane류, cholesterol류<sup>4,5)</sup>, peptide<sup>6)</sup>, musclide-A1, musclide-A2 및 musclide-B 등<sup>7)</sup>이 보고되었다. 또한, 약리작용으로는 감심작용<sup>8-12)</sup>, 진통작용<sup>13)</sup>, 항염증작용<sup>14-17)</sup>, 혈소판응집억제작용<sup>18)</sup>, 중추흥분작용<sup>19)</sup>, 항히스타민작용<sup>20)</sup> 및 항암작용<sup>21)</sup> 등이 알려져 있다.

본 연구는 동물생약 중 항암작용을 가진 약물을 탐색하던 중 우황에 항암작용이 있음을 이미 보고한 바 있으며<sup>22)</sup>, 예비실험에서 사향 수용성물질에도 암세포 증식억제작용이 있음을 발견하고, 기존 항암제인 mitomycin C와 병용처리 하였을 때의 영향을 관찰하였으며, 부작용을 검색하기 위해 섬유아세포인 Balb/c 3T3 세포, 생쥐 비장세포 및 사람 임파구에 대한 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험 동물

본 실험에 사용한 생쥐는 C57BL/6계 수컷 18 $\pm$ 2 g을 대한 실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20 $\pm$ 3  $^{\circ}$ C, 습도 50 $\pm$ 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

#### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), DME/F12 medium, mitomycin C, penicillin-streptomycin, concanavalin A, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), Ficoll-Hypaque, MTT는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco Co., muscone은 BRL Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision Scientific Co.), Gas chromatography (Shimadzu GC-14B) 등을 사용하였다.

#### 3. 검액의 조제

사향 3g을 증류수 500 ml로 50  $^{\circ}$ C에서 교반하면서 48 시간

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학  
 · E-mail : jseun@woosuk.ac.kr · Tel : 063-290-1569  
 · 접수 : 2003/08/19 · 수정 : 2003/09/30 · 채택 : 2003/11/06

추출한 후 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 뒤 동결 건조하여 건조분말 1.2 g을 얻었다 (이하 ME라 칭함.) 세포 실험 시에는 ME를 PBS에 용해시켜 membrane filter (0.22 μm)로 여과멸균하여 사용하였다.

4. 검액의 확인 및 정량

검액의 확인 및 정량은 gas chromatography를 이용하여 Takamori 등의 방법<sup>23)</sup>으로 실험하였다. 즉, 사향에 ethyl alcohol을 가하여 실온에서 교반하면서 48 시간 동안 추출한 후 여과하여 증발 농축시킨 후 잔사를 ethyl alcohol에 용해시켜 검액으로 하였다. Muscone 표준품 10 ml를 ethyl alcohol에 용해시켜 검량선을 작성하였다. Gas chromatography는 FID 검출기를, column은 2% OV-1 glass (100 × 0.26 cm)를, 이동상은 N<sub>2</sub>를 사용하였다. Column 온도는 160 °C를 유지하였고, 검출기와 주입부의 온도는 260 °C로 하였다.

5. 세포배양 조건

인체 암세포주로는 간암세포주인 Hep G2, 폐암세포주인 A549, 자궁암세포주인 HeLa 및 골육종세포주인 KHOS-NP를 사용하였으며<sup>24)</sup>, Hep G2, HeLa, KHOS-NP 및 Balb/c 3T3 세포주는 DME 배지를, A549 배지는 DME/F12 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 μg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 실험은 계대배양 3일째의 세포를 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 조정하여 사용하였다.

6. 비장세포 분리

생쥐의 비장세포 분리는 Mizel<sup>25)</sup> 등의 방법을 이용하였다. 생쥐를 경추탈골하여 도살한 후 적출한 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리) 96-well plate에 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml로 조제한 비장세포 부유액 100 μl를 분주하고 concanavalin A 1 μg/ml와 ME 0.1, 1, 10, 100 μg/ml를 각각 첨가한 후 48 시간 배양한 다음 MTT법으로 세포생존율을 측정하였다.

7. 사람 임파구의 분리

사람 임파구는 건강한 성인 남자의 혈액을 채취하여 Ficoll-Hypaque 용액으로 분리하였다<sup>26)</sup>. 즉, heparin 처리된 주사기로 혈액 10 ml를 채취하여 12 ml DPBS-A에 혼합한 다음 10 ml의 Ficoll-Hypaque 용액 위에 희석 혈액을 층이 이루어지도록 조심스럽게 가하였다. 3,000 rpm에서 30 분간 원심분리 후 pasteur pipet을 이용하여 Ficoll-Hypaque 용액 위에 밀집된 단핵구층을 취하여 5배 부피의 DPBS-A로 2회 세척하였다. 세척 후 hemocytometer를 이용하여 세포의 생존율 및 총세포수를 측정하였다. 분리한 세포를 RPMI1640 배지에 부유시켜 96-well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 분주한 후 ME 0.1, 1, 10, 100 μg/ml를 각각 첨가한 후 48 시간 배양한 다음 MTT법으로 세포생존율을 측정하였다.

8. MTT법에 의한 세포독성 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann<sup>27)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>28)</sup>이 변형시킨 방법을 이용하였다. 즉 96-well plate의 각 well에 세포부유액 (2 × 10<sup>5</sup> cells/ml) 100 μl를 넣고 각 농도별로 희석된 ME 50 μl와 mitomycin C 50 μl를 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT 용액 20 μl를 각 well에 첨가하고 배양 종료시까지 차광하였다. 부착세포는 배양 후 배양액을 제거하고 생성된 formazan을 0.04N-HCl isopropyl alcohol 100 μl로 용출시켜 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였으며, 부유세포는 배양 후 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl를 각 well에 첨가하여 차광상태에서 18 시간 더 배양한 다음 동일한 방법으로 측정하였다.

9. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± SE로 나타내었고 통계처리는 Student t-test를 실시하여 p < 0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. Muscone의 정량

Muscone의 retention time은 8.875분이었고, 본 실험에 사용한 사향 중의 muscone 함량은 0.176%로 나타났다 (Fig. 1).

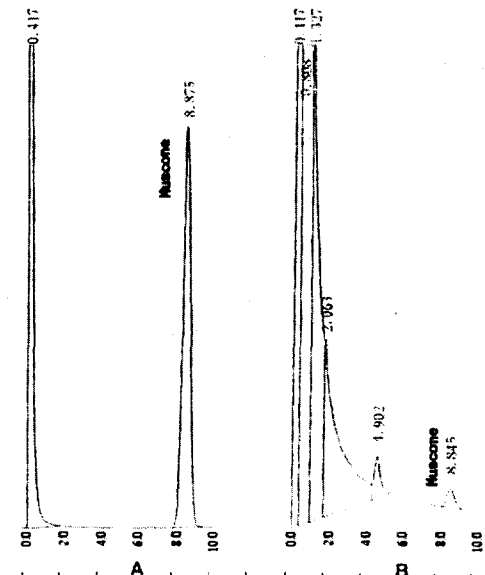


Fig. 1. GC chromatogram of muscone (A) and Moschus extract (B). Column: 2% OV-1 glass column (100 × 0.26 cm), Temp.: column 160 °C, injector 260 °C, detector 260 °C.

2. 암세포주 및 Balb/c 3T3 세포주에 대한 ME의 세포독성 효과  
암세포에 미치는 ME의 세포독성은 측정하기 위해 0.1, 1,

10, 100 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 가하여 배양하고 흡광도를 측정 한 결과 대조군의 흡광도를 100%로 하였을 때 Hep G2 세포는  $85.9 \pm 1.6$ ,  $72.4 \pm 2.1$ ,  $69.1 \pm 2.0$ ,  $65.6 \pm 1.3$  및  $61.4 \pm 1.1\%$ 로 0.1  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서, A549 세포는  $100.6 \pm 2.2$ ,  $99.8 \pm 2.1$ ,  $95.8 \pm 1.2$ ,  $89.9 \pm 1.1$  및  $73.8 \pm 1.8\%$ 로 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서, HeLa 세포는  $98.6 \pm 1.3$ ,  $97.6 \pm 1.7$ ,  $95.3 \pm 1.8$ ,  $88.2 \pm 1.0$  및  $71.2 \pm 1.9\%$ 로 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서, KHOS-NP 세포는  $99.9 \pm 2.1$ ,  $97.3 \pm 1.5$ ,  $86.4 \pm 1.1$ ,  $80.8 \pm 1.5$  및  $68.9 \pm 1.7\%$ 로 10  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 세포독성을 나타내었으며, 섬유아세포주인 Balb/c 3T3 세포에 대해서도  $99.7 \pm 1.9$ ,  $97.2 \pm 1.1$ ,  $96.5 \pm 1.8$ ,  $91.3 \pm 1.6$  및  $83.5 \pm 1.5\%$ 로 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 세포독성을 나타내었다 (Fig. 2).

3. 암세포주 및 Balb/c 3T3 세포주에 대한 mitomycin C의 IC<sub>50</sub> 농도  
 각 암세포주를 50% 억제하는 mitomycin C의 농도를 측정 한 결과, Hep G2 세포는 8.1  $\mu\text{g/ml}$ , A549 세포는 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , HeLa 세포는 1.9  $\mu\text{g/ml}$ , KHOS-NP는 2.9  $\mu\text{g/ml}$ , Balb/c 3T3 세포는 7.3  $\mu\text{g/ml}$ 이었다 (Table 1).

Table 1. The IC<sub>50</sub> of mitomycin C on human tumor cell-lines and Balb/c 3T3 cells.

Cells	IC50 of Mitomycin C ( $\mu\text{g/ml}$ )
Hep G2	8.1
A549	1.0
HeLa	1.9
KHOS-NP	2.9
Balb/c 3T3	7.3

4. 암세포주 및 Balb/c 3T3 세포주에 대한 mitomycin C와 ME의 병용 효과

Mitomycin C와 ME의 병용효과를 관찰하기 위해 mitomycin C IC<sub>50</sub> 농도와 ME 0.1, 1, 10 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 각 세포주에 동시에 처리하고 48 시간 배양하였다.

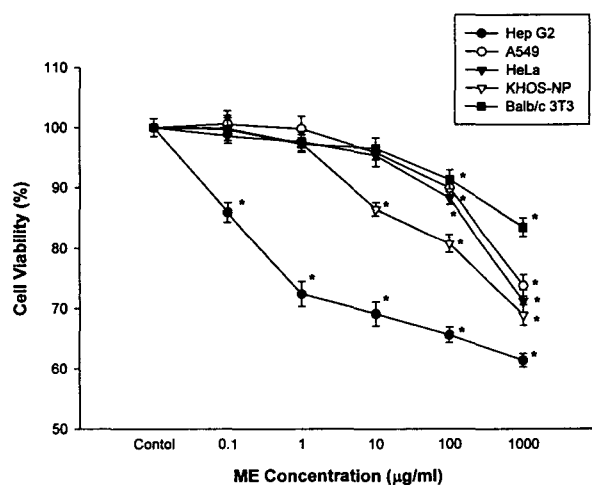


Fig. 2. Effect of Moschus water extract (ME) on human tumor cell-lines and Balb/c 3T3 cell. The tumor cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were cultured for 48 hrs. in CO<sub>2</sub>-incubator at 37 °C. The OD of each well was measured 570 nm with ELISA-Reader. Each bar represents the mean  $\pm$  SE from 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

Mitomycin C IC<sub>50</sub> 만을 처리한 군의 흡광도를 100%로 하였을 때 Hep G2 세포는  $99.4 \pm 1.5$ ,  $96.4 \pm 2.1$ ,  $85.9 \pm 1.9$  및  $74.3 \pm 1.5\%$ 로 10  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서, A549 세포는  $84.9 \pm 2.2$ ,  $78.0 \pm 1.5$ ,  $75.2 \pm 1.7$  및  $71.2 \pm 1.6\%$ 로 0.1  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서, HeLa 세포는  $96.5 \pm 1.9$ ,  $88.3 \pm 1.5$ ,  $80.0 \pm 1.7$  및  $76.4 \pm 1.8\%$ 로 1  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 암세포 증식억제작용이 mitomycin C만 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었으나, KHOS-NP 세포는  $100.3 \pm 1.7$ ,  $98.7 \pm 1.5$ ,  $97.5 \pm 1.9$  및  $95.9 \pm 2.1\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. Balb/c 3T3 세포는  $100.4 \pm 2.2$ ,  $98.6 \pm 1.5$ ,  $99.7 \pm 1.5$  및  $100.2 \pm 1.9\%$ 로 mitomycin C만 처리한 대조군에 비해 별 차이가 없었다 (Fig. 3).

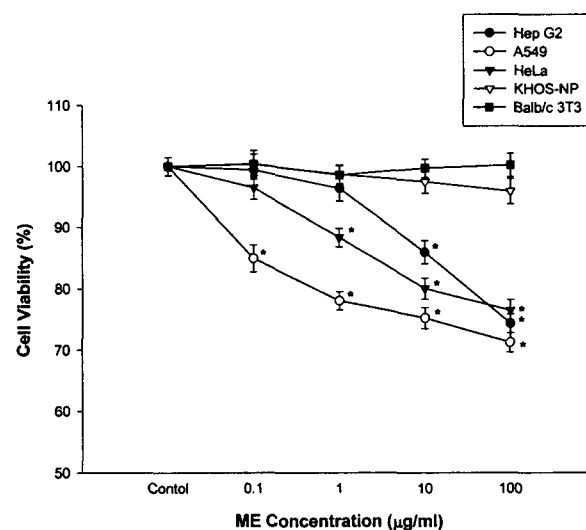


Fig. 3. The combined effect of mitomycin C and ME on human tumor cell-lines and Balb/c 3T3 cell. Each bar represents the mean  $\pm$  SE from 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ). Control: Mitomycin C IC<sub>50</sub> on human tumor cell-lines

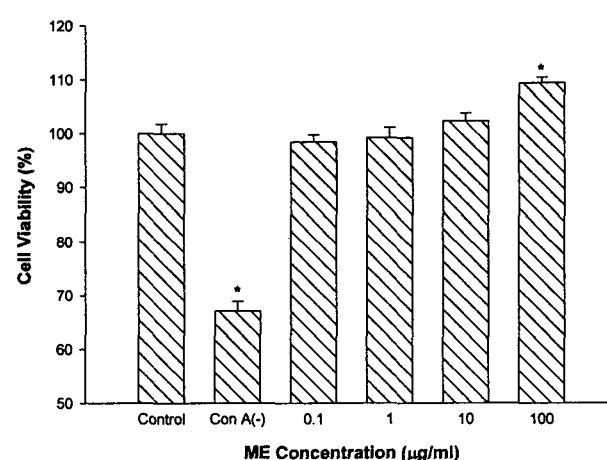


Fig. 4. Effect of ME on the cell viability of murine splenocytes *in vitro*. The splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 hours in RPMI 1640 media mixed with concanavalin A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and ME (0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) *in vitro*. The cell viability was measured by MTT method. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 4 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ). Con A(-): Concanavalin A non-treated group.

5. 마우스 비장세포에 미치는 효과

비장세포에 미치는 영향을 관찰하고자 concanavalin A를 처리한 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때 concanavalin A를 처리하지 않았을 때는 67.5±1.8%로 감소하였으며 ME 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml를 처리하였을 때는 98.4±1.3, 99.2±1.9, 102.3±1.5 및 109.4±1.1%로 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다 (Fig. 4).

6. 사람 임파구에 미치는 효과

사람 임파구에 미치는 영향을 관찰하고자 ME 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml를 처리하였을 때 99.8±1.7, 100.2±2.1, 103.7±1.4 및 108.4±1.0%로 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다 (Fig. 5).

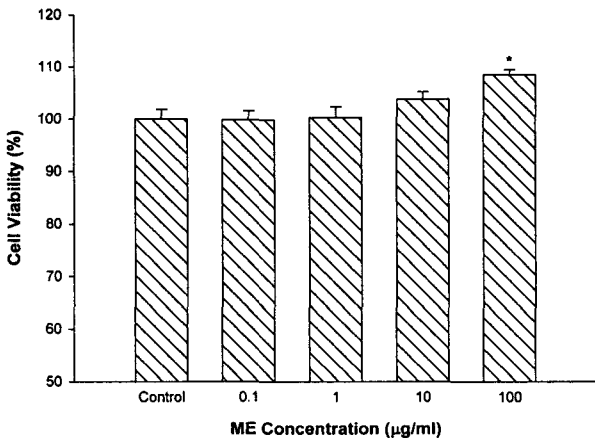


Fig. 5. Effect of ME on the cell viability of human lymphocytes in vitro. The lymphocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 48 hours in RPMI 1640 media mixed with ME (0.1, 1, 10 and 100 µg/ml) *in vitro*. The cell viability was measured by MTT method. Each bar represents the mean±SE of 4 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ).

고찰

사향은 우황청심환 및 소합향환 등에 들어 있는 약재로써 감심, 진정, 고열 및 허혈에 의한 혼미시 사용되어 왔다<sup>29,30</sup>. 최근 Kimura의 보고<sup>16</sup>에 의하면 감심작용은 musclide에 의해, 소열작용은 peptide 화합물에 의해 나타난다고 하였으며, 사향에 항암작용이 있음은 이미 보고되었으나<sup>21</sup>, 자세한 기전에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 실험에서는 사향의 항암작용에 대한 기초적인 기전을 연구하고자 실험하였다. 동물생약들을 실험할 때 가장 문제가 되는 것이 진짜인지 가짜인지를 구분하는 것이다. 본 실험에서는 이러한 어려운 문제점 때문에 사향의 주성분인 muscone의 함량을 측정하게 되었으며, 본 실험에 사용한 사향에 함유된 muscone은 0.176%이었다. 사향추출물 (ME)은 사람 간암세포주인 Hep G2, 폐암세포주인 A549, 자궁암세포주인 HeLa 및 골육종세포주인 KHOS-NP에 대해 모두 세포독성을 나타내었다. 또한, 정상세포의 모델로 사용한 생쥐 섬유아세포주인 Balb/c 3T3 세포에 대해서도 세포독성을 나타내었지만, 암세포

주에 대한 세포독성보다는 약하였다. 암치료시 사용되는 항암제들은 암세포뿐 아니라 정상세포에도 독성을 나타내기 때문에, 항암제의 용량을 줄일 수 있는 방법을 연구하는 것은 매우 의미 있는 일이라 할 수 있다. 항암제인 mitomycin C와 ME 병용효과를 관찰하기 위해 각 세포주에 대한 mitomycin C의 IC<sub>50</sub> 농도를 측정하였다. Mitomycin C IC<sub>50</sub> 농도와 ME를 병용처리 하였을 때 Hep G2, A549 및 HeLa 세포는 mitomycin C 단독처리시 보다 암세포에 대한 독성이 증강되었으나, KHOS-NP 및 Balb/c 3T3 세포는 mitomycin C 단독처리시에 비해 별 차이가 없었다. 이는 ME를 mitomycin C와 병용하면 mitomycin C의 농도를 줄일 수 있음을 시사하는 것이며, Balb/c 3T3 세포에 대해서 독성이 증강되지 않았다는 결과는 정상세포에 대한 독성을 경감시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 일반적으로 항암제들은 정상세포에 대한 독성 뿐 아니라 면역세포에 대해서도 독성을 나타낸다. ME는 생쥐 비장세포 및 사람 임파구의 생존율을 고농도에서 대조군에 비해 증가시켰다. 이 결과는 ME가 면역세포에 대해서 독성을 나타내지 않음을 시사하는 것이다. ME의 항암작용에 대한 자세한 기전을 연구하기 위해서는 추후 이들 성분 및 *in vivo* 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

사향추출물 (ME)은 Hep G2, A549, HeLa, KHOS-NP 및 Balb/c 3T3 세포의 증식을 억제하였고, 항암제 mitomycin C와 병용시 Hep G2, A549 및 HeLa 세포의 증식을 mitomycin C 단독 처리시 보다 더욱 억제하였으며, 생쥐 비장세포 및 사람 임파구의 증식을 고농도에서 촉진하였다.

이상의 실험 결과 사향추출물은 암세포 증식억제작용이 있었으며, 항암제 mitomycin C와 병용 처리하였을 때 mitomycin C의 작용을 증강시켰으나, 면역세포에 대해서는 별 독성을 나타내지 않았다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 生藥學研究會: 現代生藥學, 學窓社, p.454, 1994.
2. Toyoguchi, Y., Satoh, H., Otorii, T. and Sugawara, K.: Pharmacological actions of muscone on cardiovascular system. *Oyo Yakuri*. 33(4), 701, 1987.
3. Yu D. Das B. C.: Structure of hydroxymuscovopyridine A and hydroxymuscovopyridine B, two new constituents of musk. *Planta Med.*, 49, 183, 1983.
4. 久保喜一等: 動物性生藥の品質評價に関する研究(第2報). 麝香の品質評價に関する研究. *藥誌*, 98, 483, 1978.

5. Do, J. C., Kitatsuji, E. and Yoshii, E.: Study on the Components of Musk(I) Chem. Pharm. Bull., 23(3), 629, 1975.
6. Yu D, et al: Studies on the anti-inflammatory principle of musk. Acta Pharmaceutica Sinica. 15, 306, 1980.
7. Kadota S., Orito T., Kituchi T., Uwano T., Kimura I. and Kimura M.: Musclide-A1, -A2, and -B, Cardiotonic potentiating Principles from Musk. Tetrahedron Letters, 32(14), 1733, 1991.
8. Kimura, M., Osada, E. and Waki, I.: Fundamental Research for the pharmacological Activity of Oriental Drugs.VII. Yakugaku Zasshi. 88(2), 125, 1968.
9. kimura, M., Waki, I. and Inagaki, J.: Fundamental Research for the Pharmacological Activity of Oriental Drugs.XII. Yakugaku Zasshi. 98(4), 446, 1978.
10. Kimura, M., Kimura, I., Chui, L. and Uwano, T.: Forskolin- and Diacylglycerol-like Potentiation of Isoproterenol-induced Positive Inotropic effect in Guinea pig Papillary Muscles by the Musk Component, Musclide. Phytotherapy Research. 3(3), 91, 1989.
11. Kimura, M., Kimura, I., Uwano, T., Isoi, Y., Kadota, S. and Kikuchi, T.: Musclide-A1: A novel  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase activator derived from musk and its cardiotonic potentiating action in guinea-pig cardia muscles. Phytotherapy Research. 5, 159, 1991.
12. Kimura, I. and Kimura, M.: Musclide-  $A_1$ ; A Novel Cardiotonic Compound Derived from Musk and its Pharmacological Mechanisms. Taisha. 29(5), 178, 1992.
13. Ding, M. and Lin, W.: Analgesic anti-inflammatory effects of moschus bone setting liquor in local traumatic ecchymosis. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 15(1), 49-51, 1990.
14. Zhu, X.Y., Wang, W.J., Xu, G.F., Yang, Y.L., Sun, S.M. and Xue, L.M.: The pharmacological activities of Musk(II). Acta Pharmaceutica Sinica. 23(6), 406, 1988.
15. Mishra, R.K., Arora, R.B. and Seth, S.D.S.: Anti-inflammatory Activity of Musk. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 14, 830, 1962.
16. kimura, M., Waki, I. and Ishida, M.: Fundamental Research for the Pharmacological Activity of Oriental Drugs.XI. Yakugaku Zasshi. 98(4), 442, 1978.
17. Dequan, Y., Xuemei, L. and Shuyan, G.: Studies on the antiinflammatory Principle of Musk. Yao Hsueh Hsueh Pao. 15(5), 306, 1980.
18. Morishita, S., Mishima, Y and Shoji, M.: Pharmacological properties of Musk. Gen. Pharmac. 18(3), 253, 1987.
19. Mukhopadhyay, A., Seth, S.D.S. and Bagchi, N.: Cardiac and CNS Actions of Musk. The Indian Journal of Pharmacy. 35(6), 169, 1973.
20. Seth, S.D.S., Mukhopadhyay, A., Bagchi, N., Prabhakar, M.C. and Arora, R.B.: Antihistamic and Spasmolytic effects of Musk. Japanese Journal of Pharmacology. 23, 673, 1973.
21. 常敏毅: 抗癌本草, 一中社, 345, 1987.
22. Eun, J.S., Kang, S.Y. and Han, J.H.: The combined effects of 50% MeOH extract of Bezoar Bovis and anti-cancer drugs on human cancer-cell lines. Chonju Woosuk Univ., 16, 31-52 1994.
23. 高桑徳太郎外: 生薬分析の 投法, 厚生科学研究報告(2), 大阪生薬協会. p168, 1975.
24. Robert Hay et al : Catalogue of cell lines and hybridomas. American type culture collection. 7<sup>th</sup>, pp.4,93,100,146,197, 1991.
25. Misel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, K.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line, P 388  $D_1$ . J. Immunol. 120, 497, 1979.
26. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M.: Selected methods in cellular immunology, W.H. Freeman and Company p.186, 1979.
27. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, J. Immunol. methods. 65, 55-63, 1983.
28. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity, J. Immunol. methods. 129, 23, 1990.
29. 申載鏞: 方薬合編解説. 成輔社 p100, 146, 1988.
30. 奥田拓道, 木村正康, 官本昭正, 和田博: 漢方薬, 中山書店, p178, 1992.