

## 인삼 단백질분획물이 일차배양한 계배의 근육세포에 미치는 영향

박미정 · 송진호 · 이훈파 · 김영중  
서울대학교 약학대학

### Effects of the Protein Fraction of *Panax ginseng* on Primary Cultured Chicken Skeletal Muscle Cells

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

**Abstract**—Effects of the protein fraction of *Panax ginseng* on chicken embryonic skeletal muscle cells cultured with a deficient medium were studied. The protein fraction was further fractionated into four groups according to the molecular weight; larger than 10,000 dalton(fraction A), between 5,000 and 10,000 dalton(fraction B), between 1,000 and 5,000 dalton(fraction C), between 500 and 1,000 dalton(fraction D). According to the microscopic observation, all four protein fractions at the concentration of 10~100  $\mu\text{g/ml}$  showed the tendency to stimulate the growth and differentiation of the muscle cells. The activity of acetylcholinesterase in muscle cells was significantly elevated by the protein fraction A at the concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$ . Protein fractions B,C and D significantly enhanced the synthesis of RNA in the muscle cells. The synthesis of DNA in muscle cells was significantly enhanced by protein fractions A,B and C.

**Keywords**—*Panax ginseng* · protein fraction · chicken embryonic skeletal muscle cells · acetylcholinesterase · protein synthesis · RNA synthesis · DNA synthesis

인삼은 우리나라의 특산 생약으로 이의 신비한 효능을 밝히기 위한 연구가 다각적으로 진행되어 왔다. 그 결과 인삼은 기초대사를 항진시키고<sup>1)</sup>, 생체내에서 단백질의 합성을 촉진하며<sup>2)</sup>, 빈혈, 당뇨병, 고혈압에 대한 저항력을 나타내고<sup>3)</sup>, 피로를 회복시키고<sup>4,5)</sup>, stress에 대한 방어작용이 있으며<sup>6)</sup>, 중추신경계를 강화시킨다<sup>7,8)</sup>는 등 생체내에서 여러 생리작용에 관여하여 다양한 약리효과를 나타낸다고 알려졌다. 그러나 이러한 많은 연구에도 불구하고 인삼의 작용을 체계화하지 못하고 있는데 이는 인삼의 효과가 비

특이적이며 급성 효과를 가지고 있지 않아 장기간에 걸쳐 투여하지 않으면 그 효과를 기대하기 어렵고 많은 양을 투여하지 않으면 독성을 나타내지 않으므로 적합한 연구방법을 찾기가 어려운데 있다고 할 수 있겠다. 이에 본 연구실에서는 일차배양한 계배의 뇌세포 및 근육세포를 이용하여 dammarane계 glycosides 분획물의 세포수준에서의 약리작용에 대한 연구를 진행하여 왔다. 그 결과로 dammarane계 glycosides는 비정상상태의 뇌세포에서 신경축색돌기의 생성 발달 및 단백질, RNA, DNA 합성을 촉진시키며 pyruvate

dehydrogenase complex의 활성을 증가시켰고, 비정상상태인 근육세포의 성장 발달 및 단백질, RNA, DNA 합성을 촉진시키며 acetylcholinesterase의 활성을 증가시키는 작용이 있다는 것을 밝혔다.<sup>9,10</sup> 인삼의 유효성분으로는 dammarane계 glycosides로 20여 종류의 ginsenosides가 분리되었으며, 이들 ginsenosides에 의하여 상기의 다양한 효과가 나타나는 것으로 간주해왔었다. 그러나 인삼의 다양한 약리작용이 단지 dammarane계 glycosides에 의해서만 일어난다고 생각하는데 무리가 있어 다른 성분에 대한 관심이 점차 고조되고 있다. 인삼의 peptide 성분이 anti-lipolytic activity를 가지며<sup>11</sup>, phenol계 성분이 항산화작용을 나타낸다는 등<sup>12,13</sup>의 보고가 있으며 본 연구실에서도 인삼 단백질분획물의 생리활성에 대한 일련의 연구를 수행하여 왔다. 인삼의 단백질분획물이 일차배양된 계배의 뇌, 척수, DRG 및 근육세포의 성장을 촉진시키는 것을 현미경하에서 관찰하여 일차적으로 발표하였으며<sup>14</sup>, 연이어 단백질분획물이 계배의 뇌세포에 미치는 영향에 대하여 몇가지 생화학적 방법을 이용하여 성장촉진효과 및 그 작용 양상을 보고하였다.<sup>15</sup>

본 연구에서는 현미경관찰에 의한 단백질분획물의 근육세포 성장촉진효과를 생화학적인 방법으로 알아보았다.

### 실험 방법

**재료 및 시약**—본 실험에 사용한 인삼은 강화산 6년 근이며, 계배(chicken embryo)는 일령 10~12일 된 것을 초원농장(서울, 내곡동)에서 구입하였다. 조직배양에 필요한 시약 및 기타 시약들은 Sigma Chem. Co.(USA) 제품을 사용하였다. 방사성 동위원소 및 aquasol은 NEN Research Products(USA)에서 구입하여 사용하였다.

**인삼단백성분의 추출 및 분획**—인삼을 증류수로 세척한 후 잘게 부수어 Okuda 등의 방법을 약간 수정하여 4° 이하에서 인산완충액(pH8.0, ionic strength 0.05)을 사용하여 계속 교반하면서 24시간동안 추출한 다음 여과하였다. 여과시

킨 후의 잔사는 다시 상기와 같은 방법으로 2회 더 추출하여 여과한 다음 여액을 모두 합하였다. 여액은 한의여과장치(ultrafiltration apparatus: Amicon stirred cells, model 202)를 이용하여 분자량 500(UM05), 1,000(UM 2), 5,000(YM 5), 10,000(YM 10)을 각각 분획할 수 있는 한의여과막(ultrafiltration membrane)을 사용하여 질소 가스 상에서 scheme I 과 같이 분획하였다.<sup>11</sup>

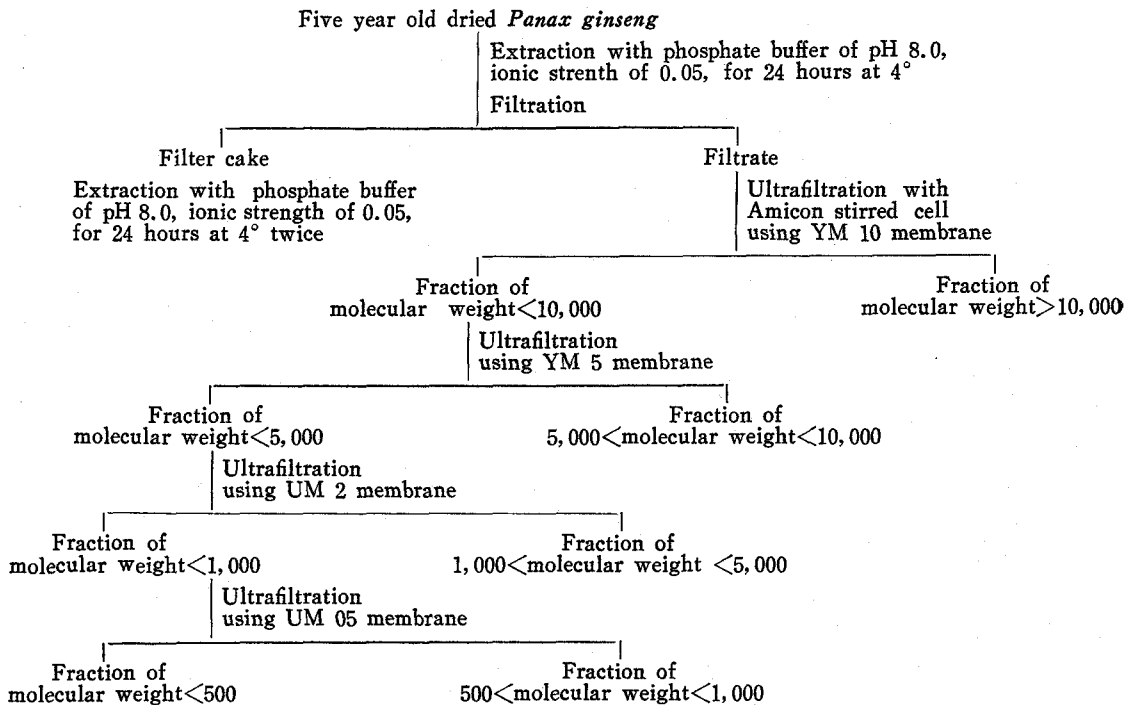
**계배추출물(Chicken embryo extract : EE<sub>50</sub>)의 제조**—일령이 10일된 계배를 적출하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 후, 주사기를 이용하여 원심분리관 속에 압출하고, 동량의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 후, 4°에서 18,000 rpm으로 25분간 원심분리하여서 그 상등액을 취하여 사용하였다.<sup>15</sup>

**계배의 근육세포 배양**—일령이 12일된 계배의 가슴근육을 적출하여, 결합조직을 제거하고 0.2% trypsin으로 조직을 연화시킨 후 세포상태로 분리하였다. Fibroblast를 제거하기 위하여  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도의 세포를 이식시켜 37°에서 45분간 공기(95%)와 CO<sub>2</sub>(5%)의 혼합기체를 공급하면서 배양하였다. 그 후 상등액을 조심스럽게 취하여 약  $5 \times 10^5$  cells/ml 농도의 근육세포를 collagen 도포 배양용기(Falcon: 15×24 mm, 녹십자: 100×20 mm)에 이식하여 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 87.5%, 말혈청 10%, 계배추출물 2.5%, penicillin 10,000 IU/100 ml, streptomycin 10,000 μg/100 ml 및 amphotericin B 500 μg/100 ml로 구성된 표준 배양액과 이 배양액에서 세포성장에 필수 성분인 계배추출물을 제거한 결핍배양액을 사용하였다.<sup>16</sup>

**세포의 배양**—일정한 습도를 유지하는 37° 배양기에서 공기(95%)와 CO<sub>2</sub>(5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 세포를 배양하였다.

**단백질 정량**—배양한 세포의 단백질 함량은 Lowry방법에 의하여<sup>17</sup> bovine serum albumin을 표준품으로 하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Acetylcholinesterase 정량**—배양한 세포 중에 존재하는 acetylcholinesterase의 함량은 Ellman의 방법에 의하여 측정하였다.<sup>18</sup> 인산 완충



**Scheme I** Extraction and fractionation of protein constituents of dried *Panax ginseng* root.

액(0.1 M, pH 8.0) 2.6 ml에 단백질 정량이 된 세포균질물 0.4 ml, tetraisopropylpyrophosphoramidate  $1 \times 10^{-4}$  M 및 dithiobisnitrobenzoate 10  $\mu$ g를 가하고 412 nm에서 흡광도를 측정하고 다시 acetylcholine iodide 20  $\mu$ l를 가한 후 1분간의 흡광도 변화를 측정하였다. Acetylcholinesterase의 특이적효소활성은 세포균질물의 단백질 1 mg이 1분당 변화시킨 흡광도 변화량(4A/분/mg protein of tissue homogenate)으로 나타내었다.

**단백질 생합성 측정**—단백질 생합성은 [ $^3$ H]-leucine을 배양액에 첨가하여 방사성 동위원소로 표지된 leucine이 배양세포의 단백질에 incorporation되는 정도를 측정하였다.<sup>19)</sup> 뇌세포를 4일간 배양한 후 배양액에 [ $^3$ H]-leucine(1  $\mu$ Ci/ml)을 투여하여 2시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 HBSS로 3회 세척하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 1 ml 가하여 단백질을 침전시켰다. Ethanol과 ether의 혼합용액(3:1) 1 ml로 잔존하는 TCA를 제거한 후 1 N NaOH 200  $\mu$ l로 단백질을 녹여내었다. 그 중 100  $\mu$ l를 취하여 scintillation cocktail aquasol 5 ml에 가한 후 방사능을 측정하였다.

**DNA생합성 측정**—DNA생합성의 측정은 [ $^3$ H]-leucine 대신 [ $^3$ H]-thymidine을 사용하여 단백질 생합성 정도 측정 방법과 비슷한 방법으로 수행하였다.<sup>19)</sup>

**RNA 생합성 측정**—RNA생합성의 측정은 [ $^3$ H]-leucine 대신 [ $^3$ H]-uridine을 사용하여 단백질 생합성 정도 측정 방법과 비슷한 방법으로 수행하였다.<sup>19)</sup>

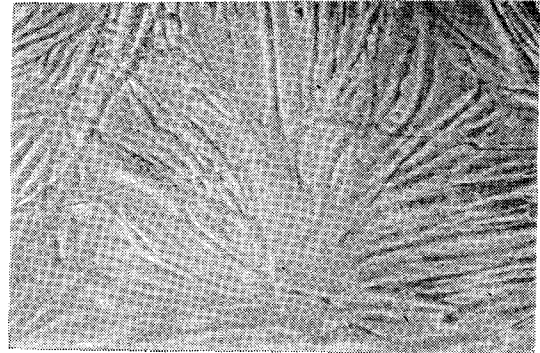
**통계처리**—통계적 유의성 검토는 대조치로 부더의 변동을 "ANOVA" test로 하였다.

## 실험 결과 및 고찰

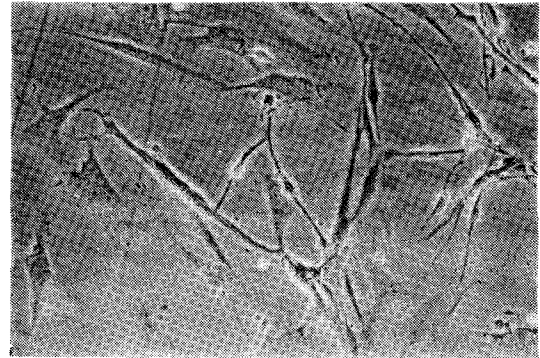
인삼의 단백분획물이 근육세포의 성장 및 발달에 어떻게 영향을 미치는가를 밝히기 위하여 계배의 가슴근육으로부터 근육세포를 준비하여 정상상태와 비정상상태로 체외에서 배양하면서 인삼의 단백분획물을 첨가하여 그 효과를 현미경으로 관찰하고 근육세포의 성장 및 분화에 밀접한 관계가 있는 효소로 알려진 acetylcholinesterase의 활성 및 단백질, RNA, DNA의 합성을 측정하여 단백분획물의 효과를 알아보았다.

인삼의 단백분획물은 인삼을 인산완충액(pH 8.0, ionic strength 0.05)으로 추출한 후 한의여과장치를 이용하여 scheme I에서와 같이 분획하였다. 즉 분자량에 따라 분자량이 500이상, 1,000이하, 1,000이상, 5,000이하, 5,000이상, 10,000이하, 1,000이상인 분획 등의 4군으로 크게 분획하였다.

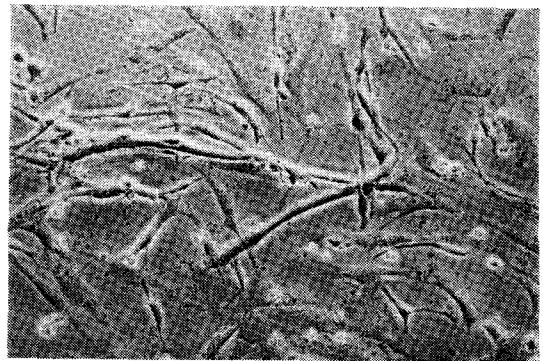
인삼의 단백분획물이 근육세포에 미치는 효과를 알아보기 위하여서는 정상상태의 근육세포에서 보다는 성장 및 발달을 제한시킨 비정상상태에서 연구하는 것이 바람직하다고 생각되어 세포분화와 성장에 필수물질이라고 알려진 계배추출물을 함유하지 않은 결핍배양액으로 근육세포를 배양하면서 단백분획물들의 효과를 알아보았다. 비정상상태로 유도된 근육세포에 인삼의 단백분획물을 각각 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 투여하여 60시간동안 배양한 후, 단백분획물이 근육세포의 성장에 미치는 효과를 알아보았다. 정상상태로 배양된 근육세포는 길고 굵게 잘 발달된 myotube를 형성하였으며(Fig. 1. A), 비정상상태로 유도배양된 근육세포들은 myoblast의 상태에서 성장이 멈추고 myotube 상태로는 거의 발달하지 못할뿐만 아니라 단위면적에서 관찰되어지는 생존세포의 수도 현저히 감소하였다(Fig. 1. B). 그러나, 비정상상태의 근육세포에 단백분획물을 투여하였을 때, 그 정도가 정상상태의 근육세포에는 미치지 못하지만 단위면적당 관찰되어지는 근육세포의 수가 증가하였고 가늘고 짧긴하나 myotube 상태로 발달되어있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1. C). 각각의 배양용기의 다섯부위에서 myotube상태로 발달된 근육세포의 수를 측정된 결과, 단백분획물들이 각기 다른 농도에서 근육세포의 발달을 유의성있게 촉진시킴을 확인할 수 있었다(Table I). 본연구실에서는 분자량이 5,000 dalton이하인 단백분획물들 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 비정상상태로 유도배양한 계배의 근육세포에 투여하고 5일간 배양한 후, 현미경으로 관찰하였을 때에 근육세포에서의 성장촉진 효과가 뚜렷하게 관찰된다고 이미 보고하였었다.<sup>14)</sup> 그러나 이 경우 근육세포를 5일간 배양하였을 때는 세포융합이 활발하게 일어나 근육세포의 수를 정확하게 측정하는 데 문제점이 있어



A.



B.



C.

**Fig. 1.** The effect of the protein fraction of *Panax ginseng* on the growth of primary cultured chicken embryonic skeletal muscle cells for 60 hours. ( $\times 200$ )

- A : Muscle cells cultured with a standard medium.  
 B : Muscle cells cultured with a deficient medium.  
 C : Muscle cells cultured with a deficient medium in the presence of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  protein fraction of *Panax ginseng* ranging from 1,000 dalton to 5,000 dalton,

**Table I.** The effect of protein fractions of *Panax ginseng* on the number of chicken embryonic skeletal muscle cells cultured with a deficient medium for 60 hours

Substance	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of muscle cells
Control+EE <sub>50</sub>	0	32 $\pm$ 2
Control	0	5 $\pm$ 1
Protein fraction larger than 10,000 dalton	10 50 100	11 $\pm$ 0*** 10 $\pm$ 0*** 7 $\pm$ 1*
5,000 dalton < protein fraction < 10,000 dalton	10 50 100	11 $\pm$ 1** 11 $\pm$ 2* 9 $\pm$ 1**
1,000 dalton < protein fraction < 5,000 dalton	10 50 100	8 $\pm$ 1* 9 $\pm$ 1** 9 $\pm$ 1**
500 dalton < protein fraction < 1,000 dalton	10 50 100	11 $\pm$ 2* 12 $\pm$ 2** 6 $\pm$ 0

A count was performed on five fields in each well. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of 3 separate determinations.

Significantly different with respect to control:  
p<0.05\*, p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\*

본 연구에서는 60시간 배양 후에 근육세포의 수를 측정하였다. 또한 단백질분획물의 효과도 초기 단계의 근육세포에서 뚜렷하여 초기의 성장 및 발달에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 하였다. 모든 단백질분획물은 초기상태의 근육세포의 성장 및 발달을 뚜렷하게 촉진시켰으며, 특히 분자량이 5,000 dalton 이하인 분획물들은 5일이 지난 완전히 성숙된 근육세포에서도 그 효과가 뚜렷한 것으로 보아 각 분획물들이 근육세포의 성장 단계에서 각기 다르게 작용할 가능성이 있음을 추측할 수 있겠다. 즉, 인삼 단백질분획물들은 일반적으로 근육세포의 성장 발달을 촉진하며 특히 분자량 5,000 dalton 이하의 저분자량 물질은 근육세포의 분화를 촉진시키는 것이 아닌가 추측되어 근육세포에 존재하는 효소로서 근육세포의 성장, 분화의 척도가 될 수 있는 acetylcholinesterase의 활성을 측정하여 보았다(Table II). 분자량 10,000 dalton 이하인 분획물들을 100  $\mu\text{g/ml}$  씩을 비정상상태로 유도배양된 근육세포에 투여하고 4일동안 배양한 후 acetylcholinesterase 활성을 측정하였더니 단백질분획물을 투여하지 않은 대조군에 비해 특이할만한 변화를 볼 수 없었다.

**Table II.** The effect of protein fractions of *Panax ginseng* on the activity of acetylcholinesterase in chicken skeletal embryonic muscle cells cultured with a deficient medium for 4 days

Substance	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Activity of acetylcholinesterase ( $\Delta\text{A}/\text{min}/\text{mg protein} \times 10^{-4}$ )
Control	0	1.01 $\pm$ 0.13
Protein fraction larger than 10,000 dalton	100	1.41 $\pm$ 0.08*
5,000 dalton < protein fraction < 10,000 dalton	100	1.17 $\pm$ 0.06
1,000 dalton < protein fraction < 5,000 dalton	100	1.09 $\pm$ 0.04
500 dalton < protein fraction < 1,000 dalton	100	1.00 $\pm$ 0.09

Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of 3 separate determinations.

Significantly different with respect to control:  
p<0.05\*, p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\*

따라서 분자량 5,000 dalton 이하의 단백질분획물들의 근육세포의 분화를 촉진시키는 작용은 acetylcholinesterase의 활성 증가와는 직접적인 연관이 없으며 이에 대한 연구는 더 깊이 수행되어야 할 것으로 사료된다. 분자량 10,000 dalton 이상인 단백질분획물 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 투여하였을 때, 비정상상태로의 유도로 인하여 억제되었던 acetylcholinesterase의 활성이 단백질분획물을 투여하지 않았을 때의 1.4배로 유의성있게 증가되었기에 이 분획물의 근육세포의 성장 촉진작용을 acetylcholinesterase의 활성 증가와 관련지어 설명할 수 있겠다. 이러한 단백질분획물의 효과는 panaxadiol glycosides와 panaxatriol glycosides 50  $\mu\text{g/ml}$  씩을 비정상상태의 근육세포에 투여하고 4일간 배양한 후 acetylcholinesterase의 활성을 측정하였을 때, 활성이 1.5배정도 증가된 사실<sup>10)</sup>과 관련지어 보면, 단백질분획물의 경우는 분자량이 10,000 dalton 이상인 분획물은 이들 dammarane계 glycosides에 못지않게 근육세포의 성장 및 발달에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 특이한 형태의 근무력증의 경우 신경근 중판에서 acetylcholinesterase가 결핍되어 있다는

**Table III.** Effects of protein fractions of *Panax ginseng* on the syntheses of protein, RNA and DNA in primary cultured chicken embryonic skeletal muscle cells for 4 days

Substance (100 µg/ml)	Protein [ <sup>3</sup> H]-leucine incorporation (dpm/5 × 10 <sup>5</sup> cells)	RNA [ <sup>3</sup> H]-uridine incorporation (dpm/5 × 10 <sup>5</sup> cell)	DNA [ <sup>3</sup> H]-thymidine incorporation (dpm/5 × 10 <sup>5</sup> cells)
Control + EE <sub>50</sub>	2,262 ± 123	9,082 ± 490	3,422 ± 306
Control	1,023 ± 97	3,508 ± 392	703 ± 57
Protein fraction larger than 10,000 dalton	958 ± 118	3,919 ± 902	2,097 ± 253***
5,000 dalton < protein fraction < 10,000 dalton	1,497 ± 635	4,440 ± 69***	1,552 ± 467**
1,000 dalton < protein fraction < 5,000 dalton	1,382 ± 239	4,590 ± 597*	1,320 ± 227**
500 dalton < protein fraction < 1,000 dalton	1,120 ± 32	5,027 ± 295***	1,017 ± 580

Results are expressed as mean ± S.D. of 3 separate determinations.

Significantly different with respect to control:

p < 0.05\*, p < 0.01\*\*, p < 0.001\*\*\*

보고<sup>20)</sup>가 있으며 이러한 사실로 미루어볼 때 단백질분획물 및 dammarane계 glycosides가 비정상상태의 근육세포에서 이 효소의 활성을 증가시킨다는 사실은 임상적인 응용면에서 볼 때 그 의미가 크다고 사료된다.

단백분획물이 비정상상태로 유도배양된 계배의 근육세포의 성장 및 발달을 촉진시키는 작용을 이해하기 위하여 근육세포에서의 단백질, RNA 및 DNA 합성에 미치는 단백질분획물의 효과를 알아보았다. 비정상상태의 근육세포에 단백질분획물을 100 µg/ml 투여하였을 때, 단백질의 합성에는 별다른 영향을 미치지 못하였으나, 분자량 10,000 dalton 이하의 단백질분획물은 RNA의 합성을 증가시켰고 분자량 1,000 dalton 이상의 단백질분획물은 DNA의 합성을 유의성있게 증가시켰다(Table III). 특히 분자량 10,000 dalton 이상의 단백질분획물의 경우, 본 연구실에서 인삼의 단백질분획물이 손상받은 여러 장기에서의 단백질, RNA 및 DNA 합성에 미치는 영향에 대한 일련의 실험결과에 의하면 간세포, 뇌세포 및 근육세포 모두에서 DNA의 합성은 유의성있게 증가되었다.<sup>15,21)</sup> 이것으로 보아 이 분획물이 장기에 관계없이 DNA 합성 단계에 직접적으로 관여하고 있는 것으로 추측되며 이에 관한 자세한 연구는 수행 중에 있다.

단백분획물들의 근육세포에 대한 효과는 직접적으로 근육세포에 작용하여 성장을 촉진시킨다고도 볼 수 있겠다. 이들 성분이 신경계에도 작

용한다는 연구결과<sup>15)</sup>로 미루어 볼 때, 생체내에서는 근육세포에 영향을 미치는 신경계의 기능을 항진시킴으로써 간접적으로 근육세포의 성장 및 발달을 촉진시킬 가능성도 있다. 그러나, 단백질, RNA 및 DNA 합성 양상이 근육세포와 뇌세포에서 다른 것만으로 미루어보아도 단백질분획물의 근육세포에 미치는 효과는 신경계에 대한 효과의 과급효과만의 것으로는 생각하기 어려우며 근육세포에도 직접적인 효과를 미치는 것으로 사료된다.

## 결 론

1. 인삼 단백질분획물들은 비정상상태로 유도배양된 계배의 근육세포의 생존을 증가시켰으며 myotube 상태로의 발달을 촉진시켰다.
2. 분자량 10,000 dalton 이상인 단백질분획물 100 µg/ml을 비정상상태로 유도배양한 근육세포에 투여하였을 때, 비정상상태로의 유도로 인하여 억제된 acetylcholinesterase의 활성이 단백질분획물을 투여하지 않았을 때의 1.4배로 유의성있게 증가되었다.
3. 비정상상태의 근육세포에 단백질분획물을 100 µg/ml을 투여하였을 때, 단백질의 합성에는 별다른 영향을 미치지 못하였으나, 분자량 10,000 dalton 이하의 단백질분획물은 RNA 합성을 증가시켰으며 분자량 1,000 dalton 이상의 단백질분획물은 DNA의 합성을 유의성 있게 증가시켰다.

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

〈1990년 9월 7일 접수 : 9월 15일 수리〉

## 문 헌

1. Yokozawa, T., Semo, H. and Oura, H.: *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 3095(1975).
2. Oura, H., Nakashima, S. and Tusukada, K.: *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 980(1972).
3. Korean Ginseng Research Institute, Korean Ginseng, Republic of Korea 173(1978).
4. Saito, H., Yoshida, Y. and Ta aki, K.: *Jap. J. Pharmacol.* **24**, 119(1974).
5. Korean ginseng Research Institute, Korean Ginseng, Republic of Korea, 116(1978).
6. Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H.: *Jap. J. Pharmacol.* **22**, 245(1972).
7. Nabata, H., Saito, H. and Takagi, K., *Jap. J. Pharmacol.* **23**, 29(1973).
8. Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V.: *Ann. Rev. Pharm.* **9**, 419(1969).
9. Park, M.J., Song, J.H. and Kim, Y.C.: *Yakhak Hoeji* **33**, 39(1989).
10. Jung, Y.K., Park, M.J., Song, J.H. and Kim, Y.C.: *Yakhak Hoeji* **33**, 161(1989).
11. Ando, T., Muraoka, T., Yamasaki, N. and Okuda, H.: *Planta Medica* **38**, 8(1980).
12. Han, B.H., Park M.H., Woo, L.K., Woo, W.S. and Han Y.N.: *Korean Biochem. J.* **12**, 33(1979).
13. Han, B.H., Park M.H. and Han Y.N.: *Korean Biochem. J.* **18**, 337(1985).
14. Kim, Y.C., Han, D.S., Huh, H., Ahn, S.M. and Koo, H. J: *Yakhak Hoeji* **27**, 109(1983).
15. Park, M.J., Song, J.H., Kim, S.Y. and Kim, Y.C.: *Yakhak Hoeji* **34**(in press).
16. White, P.R.: The cultivation of animal and plant cells, The Ronald Press Company, New York, pp.66(1963).
17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Rondall R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265(1951).
18. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre, J.V. and Featherstone, R.M.: *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
19. Markelonis, G. Oh T.H. and Derr, D.: *Experimental Neurol.* **70**, 598(1980).
20. Engel, A. G., Lambert, E.H. and Gomez, M.R.: *Ann. Neurol.* **1**, 4(1977).
21. Song, J.H., Park, M.J., Kim, E. and Kim, Y.C.: *Yakhak Heoji* **34**(in press).