

纖維芽細胞(Balb/c 3T3)의 增殖에 미치는 神效托裡散의 影響

殷載淳 · 全容根 · 廉楨烈 · 徐恩實 · *蘇俊魯 · *吳贊鎬
全州又石大學校 藥學科 · *生物工學科

Effect of Sinhyo-Taklee-San on the Proliferation of Fibroblast Cell(Balb/c 3T3)

Jae Soon Eun · Young Keun Jeon · Jeong Yul Yum · Eun Sil Suh · June No So* and Chan Ho Oh*
Dept. of Pharmacy and *Dept. of Biotechnology, Chunju Woo Suk University, Chunju 565-800, Korea

Abstract—The studies were conducted to investigate the effect of Sinhyo-Taklee-San(STS), which is composed of Astragali Radix(AR), Lonicerae Flos(LF), Angelicae gigantis Radix(AGR) and Glycyrrhizae Radix(GR), on the proliferation of fibroblast cell(Balb/c 3T3). STS, GR and glycyrrhizin increased the proliferation of 3T3 cells. The 10% serum obtained from STS, AR, LF, AGR and GR treated mice also increased the proliferation of 3T3 cells markedly. GR, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid inhibited protein synthesis, but did not affect on DNA synthesis.

Keywords—Balb/c 3T3 cell · Sinhyo-Taklee-San · Glycyrrhizae Radix · glycyrrhizin · glycyrrhetic acid · DNA synthesis · protein synthesis

손상된 조직의 회복 즉 상처치유(wound healing)에는 섬유아세포, 각질세포, 내피세포, 탈식세포, 혈소판 등 많은 세포의 상호작용이 요구되며 이들 세포의 증식이 각종 성장인자들에 의해 조절됨으로서 효과적인 상처치유가 이루어지는 것으로 알려져 있어 조직손상의 회복이라는 생체반응은 고도로 복잡한 과정으로 인식되고 있다.¹⁾ 상처치유 과정은 일반적으로 염증반응(inflammation), 육아조직(granulation tissue) 및 간질세포(matrix)의 형성, 재구성과정(remodeling) 등의 3단계로 나누어지며 상처치유 과정에 참여하는 다양한 세포들중의 하나인 섬유아세포는 육아조직 형성기에 증식하여 상처부위로 이동하는 것으로 알려져 있다.²⁾

Balb/c 3T3세포는 mouse의 태아로부터 유래된 섬유아세포로서 Torado 등³⁾이 개발한 세포주(cell line)인 3T3세포 계통의 하나이다. 3T3세포주를 대상으로 한 최근까지의 연구결과에 의하면, 이 세포의 증식에 영향을 주는 상처치유

관련 물질로는 epidermal growth factor(EGF),⁴⁾ platelet driven growth factor(PDGF),⁵⁾ basic fibroblast growth factor(bFGF),⁶⁾ substance P와 K⁷⁾ 및 vitamin A⁸⁾ 등이 있으며 이들 각각의 작용기전은 DNA 합성촉진, 세포내 골격 합성 조절, collagen 합성촉진 등 다양한 것으로 알려져 있다.

한방에서 외과적인 상처를 치료하고자 내복하는 약제들 중에는 기혈을 보하는 동시에 세살을 빨리 회복시키는 작용을 가진 약제들이 많으며⁹⁾, 신효탁리산도 이러한 약물중의 하나로서 송대진¹⁰⁾의 태평혜민화제국방에 수록되어 있고 구성생약은 황기, 인동초, 당귀 및 감초이다.

본 실험에서는 섬유아세포인 Balb/c 3T3세포를 이용하여 신효탁리산의 섬유아세포 증식작용을 살펴 본 결과 증식작용이 현저함을 관찰하고 세포증식작용에 주 작용을 하는 구성생약을 찾기 위해, 황기, 인동초, 당귀 및 감초엑스의 세포증식작용을 측정하였으며, 각 생약을 마우스에

경구투여하고 혈청을 분리하여, 분리한 혈청이 세포증식에 미치는 영향을 살펴 보았다. 실험결과 감초에 세포증식작용이 있었기에, 그 성분인 glycyrrhizin 및 그 가수분해 물질인 glycyrrhetic acid의 세포증식작용을 관찰하였으며, 그 작용기전을 추구하고자 DNA 및 protein의 합성능을 살펴 본 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험 재료

실험 동물—본 실험에 사용한 mouse는 ICR계 (20±2 g) 웅성을 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

검액조제—신호타르산(황기 11.25 g, 인동초 11.25 g, 당귀 7.5 g, 감초 3.75 g), 황기, 인동초, 당귀 및 감초를 각각 증류수로 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 농축하여 엑스를 각각 12.7%, 20.7%, 8.9%, 40% 및 24%를 얻어 동물실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포실험시에는 PBS 용액에 용해시켜 멸균여과하여 사용하였다.

시약 및 기구—실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma), fetal bovine serum(FBS, Gibco), ³H-thymidine(³H-TdR, Sp. act. 50Ci/m mol, ICN), ³H-leucine (Sp. act. 60Ci/mol, ICN), Insta-gel(Packard), trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), glycyrrhizin(Sigma), glycyrrhetic acid (Sigma), 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma) 등이며, 사용기구는 multi-well plate(96-well, Costa), disposable pipette(Bellco), disposable pasteur pipette(9 inch, Sigma), culture flask(Nunc), cell-harvester(Nunc), ELIZA-Reader(Dynatech), liquid scintillation counter(Packard), ¹⁴C₂ incubator(Vision Scientific Co.), clean bench(Vision Scientific Co.), inverted microscope(Nicon Co.) 등을 사용하였다.

세포배양액 조제—실험에 사용된 Balb/c 3T3 세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME)이었으며, 실험조건에 따라 다양한 농도의 fetal bovine serum(FBS), penicillin (100 units/ml), streptomycin(100 µg/ml) 등을 첨가하였다. Balb/c 3T3는 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 Dulbecco's phosphate buffered saline A 용액(DPBS-A)으로 씻어준 후 50 ml flask당 1 ml의 0.25% trypsin 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착시켜 계대 배양 하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DME 배양액(10% FBS-DME) 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 ml culture flask)에 1:15~1:20의 split ratio로 옮겨 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

실험 방법

세포배양조건—계대배양 중인 배양 3일째의 Balb/c 3T3 세포를 trypsin 처리에 의해 상기한 바와 같은 방법으로 탈착시켜 실험조건에 따라 FBS가 다양한 농도로 첨가된 DME 배양액에 1×10⁵ cells/ml로 부유시켰다. 세포부유액 100 µl 씩을 96 well plate의 각 well에 분주하여 well당 1×10⁴ 세포가 접종되게 한 다음 각 well에 배양액을 50 µl씩 더 첨가하고 CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C)에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 그 후 다시 각 well에 희석된 검액 또는 배양액을 50 µl씩 첨가하여 최종용적이 200 µl가 되게 하였다. 이상과 같이 처리한 다음, CO₂ incubator에서 48시간 더 배양하여 Balb/c 3T3 세포의 증식능, DNA 합성능, protein 합성능 등에 미치는 시료의 효과를 조사하였다.

MTT 법에 의한 세포 증식능 측정—Balb/c 3T3 세포의 증식능은 Moseman의 방법¹¹⁾을 개량한 Skaper의 방법¹²⁾을 응용하여 측정하였다. 즉, 세포 증식능 측정에 사용한 MTT는 DPBS-A에 5 mg/ml 농도로 용해시켜 여과필균 하였으며, 세포는 96-well plate에 1×10⁴ cells/well 농도로 접종하고 배양액의 최종 용적은 200 µl로 하였다. 세포배양 종료 4시간 전에 MTT 용액을 첨가하였으며(20 µl/well), 배양종료 후 세포배양액을 제거하고 100 µl의 0.01N HCl-isopropanol

을 첨가하여 세포에 의해 생성된 청색 결정의 formazan을 용해시켰다. Formazan이 용해된 배양 plate의 각 well의 흡광도는 ELISA Reader로 570 nm에서 측정하였으며 이때 reference filter의 파장은 650 nm로 하였다. 이상의 과정에서 MTT 용액을 첨가한 다음 부터는 배양 plate를 은박지로 포장하고 빛을 차단시킨 상태로 배양하여 빛에 의한 MTT의 환원을 최소화 하였다.

Balb/c 3T3 세포증식에 미치는 검액의 영향—엑스화된 검액을 다양한 농도로 배양액에 희석하고 여과멸균 시켜 앞서 언급한 바와 같은 방법으로 부착된 세포에 처리하였다. 세포의 증식능에 미치는 검액의 효과는 MTT 법으로 측정한다. 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 산정하였다.

검액 투여 마우스의 혈청이 Balb/c 3T3 세포 증식에 미치는 영향—각 엑스를 500 mg/kg씩 1일 1회 5일간 경구투여 하였고, 대조군에는 생리 식염수 만을 투여하였다. 투여 후 단두하여 혈액을 얻어 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청의 농도를 10%로 하여 배양액에 가하고, 알과 동일하게 실험하였다.

DNA 합성능 측정—세포내로 유입된 thymidine 양으로 측정된 DNA 합성능은 각 실험조건에서 세포를 배양하면서 배양종료 3~5시간 전에 ³H-thymidine(³H-TdR, 1 μCi/well)을 첨가하여 배양종료시까지 pulse시켜 조사하였다.¹³⁾ 배양종료 후, DPBS-A로 세포표면을 씻어내고 10% trichloroacetic acid(TCA)로 10분-5분-5분 동안 연속처리한 다음 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 함유된 0.3N NaOH 용액으로 30분간 처리하여 세포를 용해시켰다. 이를 counting vial로 옮기고 cock-tail 용액(Insta gel)을 첨가하여 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

Protein 합성능 측정—protein 합성능 역시 각 실험조건에서 세포를 배양하면서 배양종료 12시간 전에 ³H-leucine(5 μCi/well) 첨가하여 pulse시켜 조사하였다. 배양종료 후, DNA 합성능 측정에서와 같은 방법으로 처리하고 방사능을 측정하였다.

실험 결과

신호탁리산이 Balb/c 3T3 세포의 증식에 미치는 효과—3T3 세포는 1×10^4 cells/well에서 3일 이상 배양시 대수증식기에 도달하였기에, 본 실험에서는 세포수를 1×10^4 개로 하였으며 배양일은 3일로 정하였다. 3T3 세포의 증식에 미치는 검액의 영향을 조사하기 위하여 96-well plate의 각 well에 세포 1×10^4 cells/well을 넣고 여러 농도의 검액을 3일 동안 처리하여 배양한 결과, 검액의 농도가 10^{-6} , 10^{-5} 및 10^{-4} g/ml일 때 대조군에 비해서 유의성 있게 세포의 증식을 증가시켰다. 10^{-3} g/ml일 때는 세포증식을 억제시켰는데 이는 약물자체의 독성이 아닌가 추정된다 (Fig. 1).

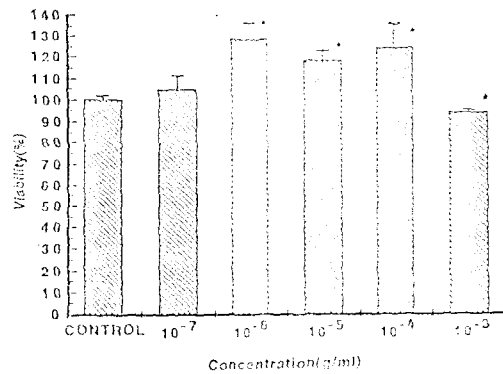


Fig. 1. Effect of Sinhyo-Taklee-San(STS) on 3T3 cells

The 3T3 cells(1×10^4 cells/well) were incubated with various concentrations of STS extract for 3 days at 37°C-CO₂ incubator, followed by the addition of 20μl of MTT(5 mg/ml) and further incubation at 37°C for 4 hrs.

Each bar represents the mean±SE of 4 assays.

Significantly different from the control group,

*p<0.05.

The % viability was calculated by the following eq.:

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{OD of treated group}}{\text{OD of control}} \times 100$$

활기, 인동초, 당귀 및 감초 엑스가 Balb/c 3T3 세포의 증식에 미치는 효과—신호탁리산의

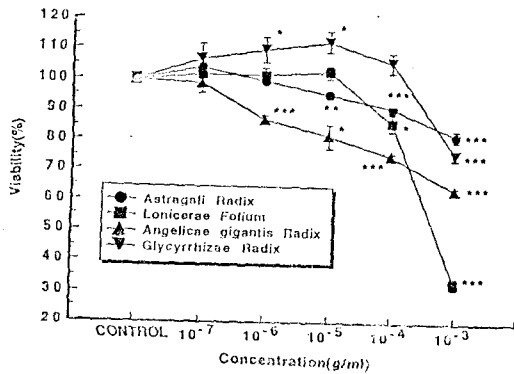


Fig. 2. Effect of Astragali Radix, Lonicerae Folium, Angelicae gigantis Radix and Glycyrrhizae Radix extracts on 3T3 cells

Each bar represents the mean±SE of 4 assays. Significantly different from the control group, *;p<0.05, **;p<0.01 and ***;p<0.001.

세포증식작용에 관여하는 생약을 규명하기 위해, 각각의 검액농도를 10⁻⁷~10⁻³ g/ml로 하여 실험하였을 때, 황기엑스는 10⁵ g/ml 이상의 농도에서 세포증식을 억제시켰다. 인동초엑스는 10⁻⁴ g/ml 이상의 농도에서 세포증식을 억제시켰으며, 당귀엑스는 10⁻⁶ g/ml 이상의 농도에서 세포증식을 억제시켰다. 한편 감초엑스는 10⁻⁶ 및 10⁻⁵ g/ml에서, 유의성있게 세포증식을 증가시켰으며, 10⁻³ g/ml에서는 억제시켰다(Fig. 2).

Glycyrrhetic acid 및 glycyrrhizin Balb/c 3T3 세포의 증식에 미치는 효과—감초엑스가 세포증식을 증가시켰기에 감초의 주성분인 glycyrrhizin 및 그 가수분해물질인 glycyrrhetic acid의 영향을 알아보고자, 각각의 농도를 10⁻¹⁰~10⁻⁴ g/ml를 가한 결과, glycyrrhetic acid는 대조군과 유의성 있는 차이가 없었으나, glycyrrhizin은 10⁻¹⁰ g/ml 및 10⁻⁴ g/ml에서 대조군에 비해 세포증식을 유의성있게 증가시켰다(Fig. 3).

신호탁리산, 황기, 인동초, 당귀 및 감초엑스를 투여한 마우스의 10% 혈청이 Balb/c 3T3 세포의 증식에 미치는 효과—검액 투여 마우스의 혈청이 3T3 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 검액을 투여한 마우스의 10% 혈청을 가한 결과, 생리식염수만을 투여한 마우스의 혈청을 100%로 하였을 때, 신호탁리산엑스를 투여한 마우스의 혈청은 128.3±10.0%, 황

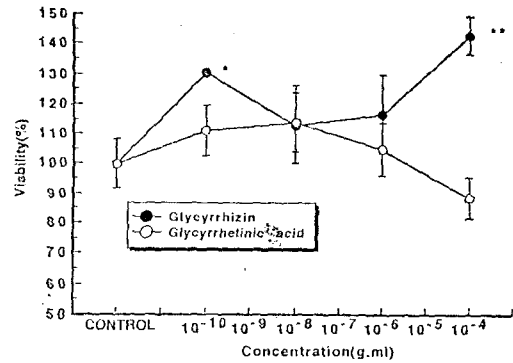


Fig. 3. Effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on 3T3 cells

Each bar represents the mean±SE of 4 assays. Significantly different from the control group, *;p<0.05 and **;p<0.01.

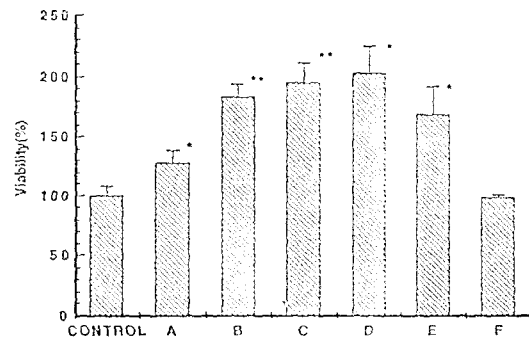


Fig. 4. Effect of 10% serum of each samples treated mice on 3T3 cells

Drugs (500mg/kg/day) were administered p.o. for 5 days.

Each bar represents the mean±SE of 4 assays.

Significantly different from the control group, *;p<0.05 and **;p<0.001.

- A; STS Ext.
- B; Astragali Radix Ext.
- C; Lonicerae Folium Ext.
- D; Angelicae gigantis Radix Ext.
- E; Glycyrrhizae Radix Ext.
- F; 10% FBS

기를 투여한 마우스의 혈청은 182.6±1.1%, 인동초를 투여한 마우스의 혈청은 195.2±16%, 당귀를 투여한 마우스의 혈청은 203.4±22%, 감초를 투여한 마우스의 혈청은 169.3±23%로 대조군에 비해 모두 유의성있게 세포증식을 증가시켰다(Fig. 4).

감초엑스가 DNA 및 protein 합성능에 미치는 영향—감초엑스의 세포증식 작용기전을 알아 보고자 각각 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} g/ml를 가한 뒤, DNA 및 protein 합성능을 측정한 결과, 10^{-4} g/ml 농도에서 DNA 합성능은 억제되었으며, protein 합성능은 대조군에 비하여 전농도에서 유의성 있게 억제되었다(Fig. 5).

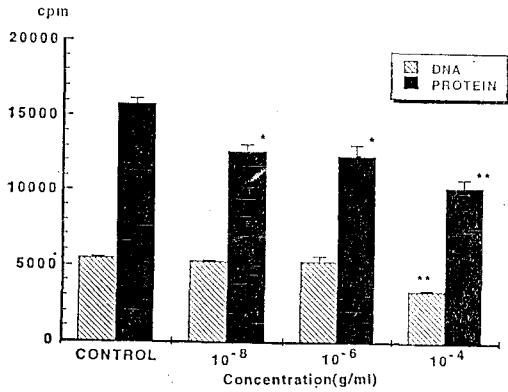


Fig. 5. Effect of Glycyrrhizae Radix extract on DNA and protein synthesis in 3T3 cells
Each bar represents the mean±SE of 4 assays.
Significantly different from the control group, *;p<0.01 and **;p<0.001.

Glycyrrhizin이 DNA 및 protein 합성능에 미치는 영향—Glycyrrhizin의 세포증식 작용기전을 알아 보고자 각각 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} g/ml

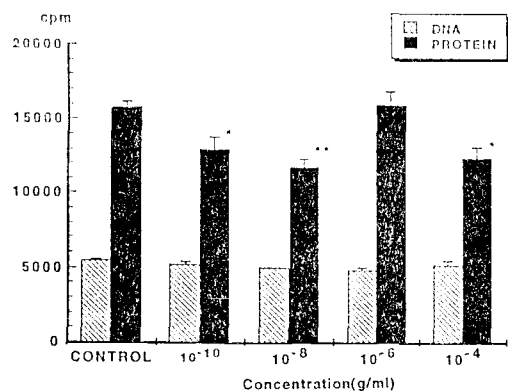


Fig. 6. Effect of glycyrrhizin on DNA and protein synthesis in 3T3 cells
Each bar represents the mean±SE of 4 assays.
Significantly different from the control group, *;p<0.05 and **;p<0.01.

를 가한 뒤, DNA 및 protein 합성능을 측정한 결과, 대조군에 비해 DNA 합성능은 별 차이가 없었으나, protein 합성능은 유의성 있게 억제되었다(Fig. 6).

Glycyrrhetic acid가 DNA 및 protein 합성능에 미치는 영향—Glycyrrhetic acid의 세포증식 작용기전을 알아보고자, 각각 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} 및 10^{-4} g/ml를 가한 뒤, DNA 및 protein 합성능을 측정한 결과, 대조군에 비해 DNA 합성능에는 별 영향을 주지 못하였으나, protein 합성능은 유의성 있게 억제되었다(Fig. 7).

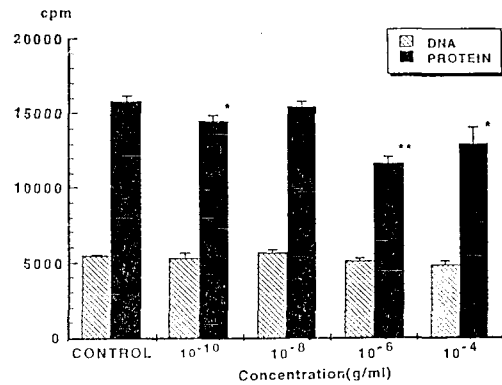


Fig. 7. Effect of glycyrrhetic acid on DNA and protein synthesis in 3T3 cells
Each bar represents the mean±SE of 4 assays.
Significantly different from the control group, *;p<0.05 and **;p<0.001.

고 찰

섬유아세포인 Balb/c 3T3 세포를 1×10^4 cells/well로 3일간 배양시 대수증식기에 도달하였기에 본 실험에서는 이 조건하에서 실험하였다. 신호타리산엑스의 농도가 10^{-6} , 10^{-5} 및 10^{-4} g/ml일 때 대조군에 비해 유의성 있게 세포증식을 증가시켰으며, 신호타리산이 생체에 투여되었을 때, 섬유아세포에 영향을 주는 물질이 생체내에서 유도되는지의 여부를 확인하기 위하여, 검액의 일정 기간 동안 투여된 마우스로부터 얻은 혈청을 Balb/c 3T3 세포에 처리한 결과, 마우스의 혈청을 10% 농도로 처리하였을 때, 대조군(정상 마우스 혈청처리)에 비해 검액처리 마우스의 혈청

은 섬유아세포의 증식이 현저하였다. 이 결과는 신호타리산이 섬유아세포의 증식을 촉진시키는 직접작용과 섬유아세포에 영향을 주는 물질을 생체내에서 유도하는 효과가 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

섬유아세포 증식을 촉진하는 신호타리산의 작용을 좀더 파악하기 위하여, 구성생약인 황기, 인동초, 당귀 및 감초엑스의 섬유아세포에 대한 작용을 살펴본 결과, 감초엑스는 10^{-6} 및 10^{-5} g/ml에서 세포증식을 촉진하였으며, 인동초 및 당귀엑스는 오히려 세포증식을 억제하였다. 각 생약을 마우스에 경구투여하고 혈청을 분리하여 세포증식에 미치는 영향을 관찰하였을 때는 4종의 생약 모두에서 세포증식 촉진작용이 나타났다. 이러한 결과는 신호타리산의 직접세포증식 촉진작용은 주로 감초에 의한 것임을 시사하는 것이다. 경구투여 하였을 때는 혈액중의 세포성장 인자와 같은 물질의 생성을 촉진하여 작용이 나타나는 것이 아닌가 추정되며, *Triticum vulgare* (common wheat plant)로 부터 얻은 추출물이 3T3 세포의 증식을 EGF 등과 같은 세포성장 인자들의 효과와 비슷한 정도로 증가시킨다는 Farinella 등¹⁴⁾의 보고와 비교될 수 있는 것이라 사료된다.

감초의 직접세포증식 촉진작용이 어떠한 성분에 의한 것인가를 규명하기 위하여, 감초의 주성분인 glycyrrhizin 및 그 가수분해물질인 glycyrrhetic acid에 대한 세포 증식작용을 관찰한 결과 glycyrrhizin은 10^{-10} 및 10^{-4} g/ml에서 세포증식을 촉진하였으나, glycyrrhetic acid는 별 영향을 주지 못하였다. 이러한 결과는 감초의 세포증식 촉진작용은 주로 glycyrrhizin에 의한 것이라 추정되나 자세한 결과는 추후 연구 검토되어야 할 것이다.

감초의 세포증식 촉진작용의 기전을 알아 보코자 DNA 및 protein의 합성능을 측정된 결과, 감초엑스는 10^{-4} g/ml 농도에서 DNA 합성능을 억제 하였으며, protein 합성능은 전농도에서 유의성 있게 억제하였다. 감초의 주성분인 glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid를 처리하였을 때는 DNA 합성능에는 별 영향을 주지 못하였고, protein 합성능은 유의성 있게 억제하였는데, 본

실험에서 측정된 DNA 및 protein은 단시간의 합성능을 측정된 것이기에 자세한 기전은 추후 연구 검토되어야 할 것이다.

신호타리산이 섬유아세포의 증식 이외에 상처치유 과정에는 어떤 영향을 미치는지, 특히 섬유아세포의 이동 및 세포간질(matrix)의 형성에 미치는 영향 등에 대해서도 앞으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

섬유아세포(Balb/c 3T3)의 증식에 미치는 신호타리산 및 각 구성생약과 그 성분 에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 신호타리산은 10^{-6} , 10^{-5} 및 10^{-4} g/ml 농도에서 섬유아세포의 증식을 촉진시켰다.
2. 감초엑스는 10^{-6} 및 10^{-5} g/ml 농도에서 Balb/c 3T3 세포의 증식을 촉진시켰다.
3. Glycyrrhizin은 10^{-10} 및 10^{-4} g/ml 농도에서 Balb/c 3T3 세포의 증식을 촉진시켰으나, glycyrrhetic acid는 별 영향을 주지 못하였다.
4. 신호타리산, 황기, 인동초, 당귀 및 감초엑스를 각각 경구투여한 마우스(500mg/kg/day, 5일간)로 부터 얻은 혈청을 10% 농도로 세포배양액에 첨가되었을때, 섬유아세포의 증식이 유의성 있게 증식되었다.
5. 감초엑스는 10^{-4} g/ml 농도에서 단기간의 DNA 합성능을 억제하였으며, 전농도에서 단기간의 protein 합성능을 억제하였다.
6. Glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid는 단기간의 DNA 합성능에는 영향을 주지 못하였으나, protein 합성능은 억제하였다.

이상의 실험결과 신호타리산의 섬유아세포 증식에 대한 직접작용은 감초의 주성분인 glycyrrhizin에 의해 일부 기인된 것이라 사료된다.

〈1993년 4월 9일 접수 : 5월 3일 수리〉

참 고 문 헌

1. Matsuoka, J. and Grotendorst, G.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4416 (1989).
2. Levi-Schaffer, F. and Kupietzky, A.: *Exp. Cell*

- Res. 188, 42 (1990).
3. Torado, G.J. and Green, H.: *J. Cell Biol.* 17, 299 (1963).
 4. Kimball, E.S., Fisher, M.C. and Persico, F.J.: *Cell Immunol.* 113, 341 (1988).
 5. Huang, J.S., Huang, S.S. and Deuel, T.F.: *J. Cell Biol.* 97, 383 (1983).
 6. Sato, Y. and Rifkin, D.B.: *J. Cell Biol.* 107, 1199 (1988).
 7. Nilsson, J., von Euler, A.M. and Dalsgaard, C.J.: *Nature* 315, 61 (1985).
 8. Demetriou, A.A., Levenson, S.M., Rettura, G. and Seifter, E.: *Surgery* 98, 931 (1985).
 9. 申載鏞：方藥合編解說，成輔社，p. 81 (1988).
 10. 陳師文：太平惠民和劑局方，旋風出版社，臺北，p. 11 (1975).
 11. Mosmann, T.: *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983).
 12. Skaper, S.D., Facci, L., Milani, D., Leon, A., and Toffano, G.: In *Methods in Neurosciences*, Vol. 2, Cell culture, pp.17-33 (1990).
 13. Freshney, R.I.: *Culture of animal cells; A manual of basic technique*, 2nd ed., Alan R. Liss Inc., NY, pp.235-237 (1987).
 14. Farinella, Z., Morale, M.C., Agosta, M.A. and Rizza, V.: *Int. J. Tissue React.* 8, 337 (1991).