

## 이성초 추출물의 세포독성과 항균효과 (IV)

이정호, 박남규, 양은영,<sup>1</sup> 이현옥,<sup>2</sup> 한동민,<sup>3</sup> 백승화

원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실, <sup>3</sup>자연과학대학 화학기술·생명과학부,  
<sup>1</sup>건일제약(주) 중앙연구소, <sup>2</sup>원광보건대학 치위생과

### Studies on the cytotoxicity and Antimicrobial Effects of the Extract of *Houttuynia cordata* (IV)

Jeong Ho Lee, Nang Kyu Park, Eun Yeong Yang,<sup>1</sup> Hyun Ok Lee<sup>2</sup> Dong Min Han<sup>3</sup> and Seung Hwa Baek

Department of Natural Products, Professional Graduate School of Oriental Medicine, and <sup>3</sup>Division of Chemistry Technology and Biological Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea. <sup>1</sup>Kunhil Pharmaceutical Co., LTD., Chunan Chungnam 330-810, Korea.

<sup>2</sup>Department of Hygiene, Wonkwang Health College, Iksan 570-750, Korea.

#### Abstract

This study was carried out to evaluate cytotoxic effects of *Houttuynia cordata* Thunberg extracts on murine leukemia tumor cell lines. Disruptions in cell organelles were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) assay. The comparison of IC<sub>50</sub> values of *Houttuynia cordata* Thunberg extracts on LI210, P388D<sub>1</sub> and Vero cell lines showed that the methanol extract of *Houttuynia cordata* Thunberg indicated the most antitumor activity in the MTT assay. In order to develop a antimicrobial agent, dried *Houttuynia cordata* Thunberg was extracted with several solvents, and then antimicrobial activity was investigated. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracted substance against microorganisms were also examined. Antimicrobial activity of amocla and ketoconazole as references was compared to those of other solvent extracts such as H<sub>2</sub>O, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate ethanol and methanol. The antimicrobial activity of all extracts from the sample had growth inhibition activity against gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi (MIC, > 200 µg/ml). These results suggest that the methanol soluble extract of *Houttuynia cordata* Thunberg may be a valuable choice for the studies on the treatment of murine leukemia tumor cell lines and antimicrobial agents.

**Keywords** □ *Houttuynia cordata* Thunberg, MTT assay, Antimicrobial agents, Minimum inhibitory concentration.

어성초 (*Houttuynia cordata* Thunberg)는 삼백초과 (Saurauace)에 속하는 다년생초본으로, 송 등<sup>1)</sup>은 시험관내에서 quercitrin은 항균활성을 나타내고, Oxymethylene methyl nonyl ketone에서는 2만배 희석으로 *Aspergillus niger*에 대해 항균활성균이 있다고 하였다. 이 등<sup>2)</sup>은 어성초의 75%에탄올 추출물은 팜유나 돈지에 대하여 에틸 아세테이트 분획중에서 항산화효과가 비교적 높았으며, 또한 decanoyl acetaldehyde는 sulfamine에 비해 4만배나 높은 항균력을 지니므로,<sup>3,4)</sup> 김 등<sup>5)</sup>은 어성초 추출물을 용매분획하여 각 분획에 대한 acidic, neutral, phenolic fraction에서 항미생물 활성이 인정되었으며, neutral fraction > acidic fraction > phenolic fraction순으로 높은 활성이 나타났다고 보고하였다. 이에 본 연구는 어성초의 잎으로부터 약효를 구명하고자 물, methanol, ethyl acetate, chloroform 및 *n*-hexane의 추출물을 얻고, 이 추출물을 이용하여 gram 양성균, gram 음성균 및 진균에 대한 항균 및 항진균 활성을 관찰하였으며, 이 추출물을 이용하여 암 연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT정량 분석법으로 마우스의 백혈병 세포인 LI210 세포, P388D<sub>1</sub> 세포와 양성대조군을 위한 정상세포는 Vero (kidney, african green monkey) 세포에 대하여 세포 독성효과를 관찰한 결과를 이에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

**실험재료-** 본 실험에서 사용한 어성초 (N-980510)은 전북 익산시 팔봉동에서 채집하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어 있다.

**실험기기-** CO<sub>2</sub> incubator (NUAIRE), Deep freezer (Ilshin), Nitrogen freezer (MVE, XC34/14), Elisa reader (Molecular devices,

spectra MAX 340), Microscope (Olimpus, CK2), Micropipette (Gilson), 96 well (Falcon), Conical tube (Falcon).

**시약-** FBS (Fetal bovin serum), RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, hepes, L-glutamine, nutrient broth (Difco), nutrient agar (Difco), brain heart infusion broth (Difco), brain heart infusion agar (Difco), sabouraud dextrose broth (Difco), sabouraud dextrose agar (Difco), D-PBS (Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS (Hanks' balanced salt solution)등은 Gibco 제품을 사용하였으며, 0.4% Tripan blue solution, dimethylsulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

**검액재료-** 본 연구에 이용한 어성초는 전북 익산시 팔봉동에서 채집하여 실험에 사용하였다. 어성초 30 g을 1000 ml등근 플라스크에 1차 증류수 300 ml넣고, 상온에서 24시간 동안 교반한 후 추출하였다. 이와같이 세 번 반복 추출하여 얻은 추출물을 0.4 μm필터로 여과한 후, 여과액을 증류기로 35℃에 감압농축시킨 후 냉동건조하였다. 건조된 양은 물 추출물 1,870 mg을 얻었다. hexan, 에틸 아세테이트, 클로르포름, 메탄올, 에탄올을 상온에서 위의 방법과 동일한 방법으로 추출하였으며, 용매를 감압농축하여 hexan 추출물 380 mg, 에틸 아세테이트 530 mg, 클로르포름 1,110 mg, 메탄올 추출물 2,360 mg, 에탄올 추출물 1,860 mg을 얻었다.

**시료의 처리-** 조제한 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하였다. 각각 1 : 1 (ml / g)로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution을 하여 10<sup>-2</sup> mg/ml ~ 10<sup>-6</sup> mg/ml 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

**사용균주-** 항균 및 항진균 시험용으로 사용된 균주는 국립보건원으로부터 분양 받아 사용하였으며, Table II에 나타낸 바와 같이 gram 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus*

ATCC 29213, *Staphylococcus epidermids* ATCC 12228, *Staphylococcus mutans* JC-2, gram 음성 세균으로는 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2421, *Pseudomonas putida* KCTC 8729 진균으로는 *Candida albicans* KCTC 1940 항균 대조군 amocla와 항진균 대조군 ketoconazole을 사용하였다.

**균주의 배양**- 세균배양에 사용된 배지는 세균의 경우, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermids*, *Staphylococcus mutans*와 *Escherichia coli*는 brain heart는 infusion broth를 사용하였고, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Pseudomonas putida*는 nutrient broth (Difco)를 사용하였고, 배지에 균을 이식하여 37 °C 배양기에서 16~20시간동안 배양하였다. 진균은 sabouraud dextrose broth를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 22 °C 배양기에서 5~7일 배양하여 사용하였다.

**항균 및 항진균력 측정**- 각 용매 추출물에 대한 항균 및 항진균력은 액체배지 희석법<sup>6,7)</sup>을 이용하여 측정하였다. 각 추출물을 10% DMSO 생리식염수에 용해시킨 후 추출물의 농도를 최고농도 2,00 µg/ml에서 최저농도 3.13 µg/ml까지 2배 계단희석 하였다. 희석된 각각의 시료 2.0 ml를 petri dish에 취하고 여기에 배지 18.0 ml를 섞어 배지가 굳은 다음 배양시킨 균을 백금으로 5 mm정도 도말하여 세균은 37 °C 배양기에서 24시간, 진균은 22 °C 배양기에서 5~7일간 배양하였다. 항균력의 대조군으로는 amocla (건일, amoxicillic sod., clavulanic acid pot.)를 사용하였고, 항진균력의 대조군으로는 ketoconazole을 사용하였다, 각 배양이 끝나면 집락형성 여부를 관찰하여 성장이 인정되지 않는 가장 낮은 농도를 최소억제농도 (Minimum Inhibitory concentration, MIC)<sup>8)</sup>로 판정하였다.

**세포독성능 측정을 위한 세포주**- 암세포 성장억제능 측정을 위해 사용한 L1210 과 P388D<sub>1</sub>은 mouse 유래 암세포주로서 L1210은 lymphocytic leukemia이며 P388D<sub>1</sub>은 lymphoid neoplasma이다. 양성대조군을 위한

정상세포는 Vero (kidney, african green monkey) 세포를 사용하였다. 세포독성능 측정을 위한 세포주는 서울대학 세포주은행에서 분양 받아 실험실에서 계대배양하면서 실험였다.

**세포배양배지**- 세포배양에 사용된 배지는 L-glutamine 포함된 RPMI-1640에 NaHCO<sub>3</sub> (2 g, 23.81 mmol)을 혼합한 후, 3차 증류수에 녹인 다음 membrane filter (0.2 µm)로 여과한 후, 여액에 56 °C에서 30분간 inactivation 시킨 우태아 혈청 FBS를 전체액의 1%가 되도록 혼합한 다음, 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 pH 7.2가 되도록 하였다.

**세포배양**- 세포독성능 측정에 사용된 부유세포 (suspension cell)인 L1210, P388D<sub>1</sub>와 양성대조군을 위한 정상세포인 Vero는 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여, 세포의 지수적 성장 (exponential growth)을 유지하도록 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2~3일간 배양한 후, conical tube (falcon)에 옮겨 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심분리한 다음, 상등액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후, 일부를 취하여 0.4% trypan blue을 가하여 염색되지 않은 살아있는 세포를 haemocytometer로 세어 5×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배지에 부유시켜 배양하여 실험에 들어갔다. 부착세포인 Vero cell은 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 monolayer가 형성될 때까지 배양시킨 후, 배양배지를 버리고, 부착된 세포에 잔류한 세포배양배지를 제거하기 위하여 D-PBS로 2회 세척한 다음, Trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA . Na)으로 처리하고, D-PBS적량을 가하여, 단일세포로 부착시킨 다음 conical tube에 옮겨 1500 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심분리하

고, 상등액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후, 일부를 취하여 0.4% trypan blue를 가하여, 염색되지 않은 살아있는 세포를 haemocytometer로 세어  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배지에 부유시켜 배양시켰다.

**MTT assay-** 암세포에 대한 세포독성능 측정은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide] colorimetric 검정법으로 실험하였다.<sup>9-11)</sup> 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해, 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 암세포 L1210, P388D<sub>1</sub>와 Vero정상세포를  $2 \times 10^5$  cells/ml 농도로 100  $\mu$ l/well씩 접종하고, 각각의 검체를 단계 희석하여 10  $\mu$ l/well 각 well에 첨가하고, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에서 4시간 동안 배양한 후, 형성된 불용성 formazan crystal products를 용해시키기 위하여, 10% SDS를 함유한 0.01N HCl 용액을 각 well당 150  $\mu$ l씩 가해 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에서 1일간 배양하여, Elisa reader (Molecular Devices spectra MAX 340)로 흡광도 (540 nm)를 측정하여 IC<sub>50</sub>값을 구하였다. 비교약물로는 adriamycin (일동제약)을 사용하였고, 약물없이 동일한 조건하에서 배양된 세포를 control로 하였다. IC<sub>50</sub>값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 약물의 농도 ( $\mu$ g/ml)로 주어지며, 미국 암 연구소 (NCI; National Cancer Institute, USA)의 manual 방법에 의해 결정하였다.<sup>12)</sup>

**세포의 광학현미경적 관찰-** 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, L1210, P388D<sub>1</sub>, Vero세포는 MTT정량을 하기전에 도립현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

암연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는

MIT정량분석법을 이용하여, 어성초 (*Houttuynia cordata* Thunberg)의 잎을 물과 몇가지 유기용매를 사용하여 추출된 추출물에 대한 세포독성의 결과 (Table 1)에 의하면, 마우스의 백혈병 세포인 L1210 세포에 대하여, 약한 세포독성 발현이 나타났다. MTT 정량분석법에 의하면, 추출물 중에서 핵산 추출액은 IC<sub>50</sub>, 64.36  $\mu$ g/ml 값으로 가장 강한 세포독성 발현을 관찰 할 수 있었다. 이들 추출물은 마이크로그램농도의 농도범위에서는 투여량에 따라 세포독성을 보였다.<sup>13)</sup> L1210 세포에 대한 어성초 추출물의 세포독성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 세포독성이 감소하였다. MTT 정량분석법에 의하면, 핵산 추출물 > 메탄올 추출물 > 클로르포름 추출물 > 에틸 아세테이트 추출물 > 에탄올 추출물 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 어성초 추출액을 MTT 정량분석법으로, P388D<sub>1</sub> (murine leukemia tumor cells) 세포에 대하여 성장억제효과를 평가하였다. MTT정량분석법에 의하면, P388D<sub>1</sub> 세포에 대한 어성초 추출물의 비교약물인 adriamycin에 대한 항암활성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 항암활성이 감소하였다. MTT정량분석법에 의하면, 메탄올 추출물 > 클로르포름 추출물 > 핵산 추출물 > 에틸 아세테이트 추출물 > 에탄올 추출물순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 이들 추출물 중에 메탄올 추출물은 IC<sub>50</sub> 41.33  $\mu$ g/ml 값으로 가장 강한 항암활성을 갖는 생리활성물질이 함유되어 있을 것으로 판단된다. 그렇지만, 핵산 추출물은 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대하여 강한 세포독성 발현 (IC<sub>50</sub> 72.05  $\mu$ g/ml)을 나타냈다. 본 실험결과에 의하면, 핵산 추출물은 L1210세포에 대하여 강한 세포독성을 나타냈으며, P388D<sub>1</sub>세포에 대하여 메탄올 추출물은 강한 성장억제 활성을 관찰 할 수 있었으며, 어성초 추출물을 MTT정량분석법으로 양성대조군을 위한 정상세포인 Vero에 대한 세포독성의

비교는 다음과 같은 순서로 감소하였다 MTT 정량분석법에 의하면, 핵산 추출물 > 에틸 아세테이트 추출물 > 클로르포름 추출물 > 에탄올 추출물 > 메탄올 추출물순으로 정량분석값을 얻을 수 있었으며, 정상세포인 Vero는 다른 용매 추출물보다 세포독성이 가장 낮게

나타났다. 따라서 메탄올 추출물의 L1210세포와 P388D<sub>1</sub>세포에 대한 항암물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어, 이들 추출물에 대한 최적분리조건을 확립하여 순수한 화합물을 분리한 후, 이들 화합물에 대한 P388D<sub>1</sub>세포의 항암활성을 측정해야 할 것으로 판단된다.

**Table I.** The antitumor activities of aqueous and organic solvents of extracts of *Houttuynia cordata* Thunberg. Comparison of IC<sub>50</sub> for aqueous and organic solvents of extracts of *Houttuynia cordata* Thunberg by the MTT assay.

Sample <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		
	Mouse lymphocytic leukemia cells (L1210)	Murine leukemia tumor cells (P388D <sub>1</sub> )	Vero cells
WHC	ND	ND	ND
MTHC	72.05	41.33	216.07
CFHC	84.38	44.94	100.21
EAHC	89.89	65.66	99.75
HXHC	64.36	53.60	99.36
ETHC	131.75	257.16	180.85

Plants extracts; WHC; water extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; MTHC; methanol of *Houttuynia cordata* Thunberg; CFHC; chloroform extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; EAHC; ethyl acetate extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; HXHC; hexane extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; ETHC; ethanol of *Houttuynia cordata* Thunberg.

<sup>a</sup>Each extract was examined in triplicate experiments.

<sup>b</sup>IC<sub>50</sub> represents the concentration of an extract required for 50% inhibition of cell growth.

여성초를 물과 메탄올, 에틸아세테이트, 클로르포름, 핵산, 에탄올을 용매로 사용하여,

모든 추출물에 대한 최소억제농도는 gram 양성균인 *S. aureus* ATCC 6538P, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341과 gram 음성균인 *E. coli* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 1636, *K. pneumoniae* ATCC 10031에 대하여는 200 μg/ml 이상의 농도로 나타나, 항균대조균인 *Amocla*의 최소억제농도 (< 6.25 μg/ml)에 비해 항균력이 낮은 것으로 나타났다. 진균인 *A. niger* ATCC 9029, *C. albicans* ATCC 10231에 대해서도 200 μg/ml 이상의 농도로 MIC가 나타났으며, 대조균 *Ketoconazole*의 최소억제농도 (< 6.25 μg/ml)에 비해 항진균력이 낮은 것으로 나타났다 (Table II).

**Table II.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Houttuynia cordata* Thunberg extracted with different solvents<sup>a)</sup> against various microorganisms.

Strains	MIC ( $\mu$ g/ml)							
	Amocla	Ketocon	WHC	MTHC	CFHC	EAHC	HXHC	ETHC
<i>S. aureus</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>S. mutans</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>S. epidermidis</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>E. coli</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>P. aeruginosa</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>P. putida</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>S. typhi</i>	> 200	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>C. albicans</i>	> 200	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200

Plants extracts; WHC; water extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; MTHC; methanol of *Houttuynia cordata* Thunberg; CFHC; chloroform extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; EAHC; ethyl acetate extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; HXHC; hexane extract of *Houttuynia cordata* Thunberg; ETHC; ethanol of *Houttuynia cordata* Thunberg.

<sup>a)</sup>Each extract was examined in triplicate experiments.

어성초의 물과 여러가지 유기용매 추출물에 대한 항균효과는 조개나물 추출물에 대한 항균력과 항진균력이 같게 나타났으며,<sup>14)</sup> 고삼 추출물보다 낮은 것으로 보아,<sup>15)</sup> 어성초에 함유되어 있는 항균성물질과 항진균성물질이 적게 함유되어 있으리라 판단된다.

## 결 론

어성초 (*Houttuynia cordata* Thunberg) 추출물을 MTT정량분석법으로, 마우스의 백혈병

세포인 L1210세포, P388D<sub>1</sub>와 정상세포인 Vero세포에 대하여 세포독성효과를 평가하였다. 이들 추출물은 마이크로그램 농도의 범위에 대하여 세포독성을 나타냈으며, 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대한 이들 추출물중에 에틸 아세테이트 추출물은 IC<sub>50</sub> 64.36  $\mu$ g/ml 정량분석값으로 가장 강한 세포독성 발현을 관찰 할 수 있었다. P388D<sub>1</sub> 세포에 대한 어성초 추출물의 세포독성은 어성초의 메탄올 추출물은 IC<sub>50</sub> 41.33  $\mu$ g/ml 정량분석값으로 가장 강한 세포독성을 나타냈으나, 정상세포인 Vero는 다른 용매추출물보다 세포독성이 낮게 나타났다, 따라서 메탄올 추출물의 마우스의 혈액암세포에 대한 항암물질이 함유되어 있으리라 판단된다. 어성초를 물과 메탄올, 에틸아세테이트, 클로르포름, 헥산, 에탄올을 용매로 사용하여 어성초로부터 추출한 결과, gram 양성균, gram 음성균과 진균에 대해서도 200  $\mu$ g/ml 이상의 농도로 MIC가 나타나, 대조군 *Ketoconazole*의 최소억제농도 (< 6.25  $\mu$ g/ml)에 비해 항진균력이 낮은 것으로 나타났다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2000년도 원광대학교 교비연구비와 일부 두뇌한국 21사업지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### 문헌

1. Song, H. J., Shin, M. K.: Effects of *Houttuynia* Herba on immune responses and histological findings in mice bearing pneumonitis, *Kor. J. Pharmacogn.* **18**, 216, 1987, (references cited 54 and 55).
2. Lee, Y. J., Shin, D. H., Chang, Y. S., Shin, J. I.: Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**, 683, 1993.
3. 최영현, 김은영, 박건영, 이숙희, 이원효: 어성초즙 및 추출물의 항돌연변이 효과. *한국영양식량학회지*, **23**, 916, 1994.
4. Hayashi, K., Kamiya, M., Hayashi, T.: Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV, *Planta Med.* **61**, 237, 1995.
5. Kim, K. Y., Chung, D. O., Chung, H. J.: Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* Thunb. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 400, 1997.
6. Moody, M. R., Young, V. M., Morris, M. J., Schimpff, S. C.: In vitro activities of miconazole, miconazole nitrate and ketoconazole alone and combined with rifampin against *Candida* spp. and *torulopsis glabrata* recovered from cancer patients, *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 871, 1980.
7. Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Hirayama, Y., Hayashi, T.: Antimicrobial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prods.* **62**, 1595, 1999.
8. 이진섭 외: 진단병원미생물학, 589-601. 고려의학, 서울, 1996.
9. Mosmann, T. J.: Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival; application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55, 1983.
10. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B., Pinedo, H. M.: Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MIT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, **27**, 897, 1991.
11. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdr, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936, 1987.
12. a) Goldin, A., Venditti, J. M., Macdonald, J. S., Muggia, F. M., Henney, J. E., Devita, V. T.: Current Results of the Screening Program at the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. *Europ. J. Cancer*, **17**, 129, 1981.  
b) Kallmann, R. F.: The Use of Rodent Tumors in Experimental Cancer Therapy. *Cancer Res.* **45**, 6541, 1985.
13. Ryu, H. S., Shin, M. K., Cho, H., Yang, E. Y., Chae, K. Y., Kang, K. U., Baek, S. H.: Studies on the cytotoxicity of the ethyl acetate soluble *Sophora flavescens* Ait. extract against L1210 and P388D1 cells (III). *Kor. J. Pharmacogn.* **31**, 51, 2000.

14. Ryu, M. H., Aeam, Y. D., Byun, J. B., Cho, H., Yang, E. Y., Kang, K. U., Shi, M. K., Baek, S. H.: Studies on the cytotoxicity and antimicrobial effects of the extract of *Ajuga multiflora* Bunge. *Kor. J. Pharmacogn*, **31**, 72, 2000.
15. Cho, H., Weon, S. R., Yang, E. Y., Kim, J. S., You, I. S., Ryu, D. G., Lee, J. H., Kang, K. U., Baek, S. H.: Antimicrobial effect of the extract of *Sophora flavescens* Ait (I). *J. Pharm. Soc. Korea*, **43**, 419, 1999.