

Saponin을 함유한 생약추출물의 거담작용에 관한 연구

김숙영 · 문자영 · 이동욱 · 박기현
한국 인삼 연초 연구소

Study on the Expectorant Activity of Ethanol Extracts from Some Crude Drugs Containing Saponins

Sook-Young Kim, Ja-Yeong Moon, Dong-Wook Lee and Ki-Hyun Park
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon 301-345, Korea

Abstract—The effect of ethanol extracts of *Gilkyung*(*Platicodi Radix*, *Platicodon grandiflorum* A, DC), *Onji*(*Polygalae Radix*, *Polygala tenuifolia* Willdenow) and *Deoduk*(*Codonopsis lanceolate Radix*, *Codonopsis lanceolata*) on expectorant activity of rat trachea was investigated. Following treatment of 50% ethanol extract of these medicinal plants (25 mg/rat), the content of neurotransmitters such as acetylcholine and histamine in tissue was significantly increased. The secretions of acid glycoproteins and the artificially injected phenol red were also increased. However, there was no significant difference except *Onji*. From the histological study through periodic acid Schiff and alcian blue stain, the thickness of inner membrane of acinar glands and the stained glycoproteins on surface of epithelium and on the glands were observed in all the rats trachea treated with extract of medicinal plants. *In vitro*, the viscosity of mucin solution was slightly decreased with an addition of the extracts. *Onji* showed the most effective expectorant activity among them at the identical conditions. The mechanism of expectorant activity of these medicinal plants seems to be due to stimulation of secretion and changes of rheological properties of mucus.

Keywords—*Platicodi Radix* · *Polygalae Radix* · *Codonopsis lanceolate Radix* · expectorant activity · glycoprotein · neurotransmitter · lysozyme · mucus · phenol red

기도의 분비물은 기도내에 흡입된 미세한 이물질을 배출하고 점막을 보호함으로써 기도의 항구적인 청정을 유지하는 매우 중요한 생체방어 기능을 한다.¹⁻²⁾

각종 호흡기 질환중 기도와 관련되어 나타나는 증상으로는 점액의 rheological 성상이 변화되어 기도에 축적됨으로써 나타나는 이상해소, 담의 배출곤란 및 호흡부전의 유발등을 들 수 있다.³⁻⁴⁾

생약중에는 이와같은 만성폐쇄성 질환을 치료

할 수 있는 진해 거담효과가 있다고 알려진 것들이 많고 이들을 단독 혹은 혼합투여 했을때 임상적인 효과가 있음도 보고되었다.⁵⁻⁷⁾

한방에서 강장, 진정제로 이용되고 있는 원지는 거담제로 알려진 *Senega*근에서와 동일한 saponin을 갖고 있어⁸⁻⁹⁾ 거담제로도 쓰이고 있다. 아울러 용혈 및 자궁수축작용¹⁰⁾, 이노작용¹¹⁾도 인정받고 있다. 또한 길경은 더덕과 더불어 근부에 platycodin을 함유해 거담작용외에 항염증작용 및 항계양작용이 있다.⁶⁻⁷⁾ 이들 생약들

에 대해 생리활성과 임상적인 유효성이 많이 보고된 것을 보면 이들 중 어떤 성분에 진해 내지 거담의 효과가 있음을 알 수 있다. 그러나 담의 유동성 변화로 이루어지는 그 기전이 매우 다양할 뿐만 아니라 생리활성 평가에 여러 가지 문제점이 있기 때문에 이들 생약들의 거담효과와 작용기전은 아직까지 실험적으로 명확하게 규명되어 있지 않다.

본 연구는 saponin성 거담제로 알려진 이들 생약추출물이 기도의 점액분비와 관련된 epithelium의 조직학적인 변화와 점액의 유동성에 미치는 여러 가지 영향을 관찰하여 이들의 거담효과와 그 작용기전을 평가하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료의 추출

시중 한약상에서 구입한 원지(Polygalae Radix), 길경(Platycodi Radix), 더덕(Codonopsis lanceolate Radix)을 정선하여 분말상태로 만든 다음 각각 200 g을 취하여 50% ethanol 1,200 ml를 50°로 유지하면서 3일간 연속 감압추출하였으며 다시 1,000 ml의 50% ethanol로 2일 및 1일간 3차에 걸쳐 추출하고 추출액을 모아 40.에서 70° Brix까지 감압농축한 후 냉동건조하고 일정량씩을 취하여 생리식염수에 녹여 실험에 사용하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 serotonin, acetylcholine, histamine, alcohol dehydrogenase, NAD⁺, mucin-line, phenol red, galactose, mannose, *M. lysodeiketicus* 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며 그의 시약들은 특급시약을 사용하였다.

3) 실험동물

실험에 사용된 흰쥐(Sprague Dawley)는 본 연구소의 사육실에서 표준조건으로 사육한 것으로 체중이 150~160 g된 웅성을 사용하였고 실험중 식이에 특별한 처리는 하지 않았다.

2. 실험방법

1) 기도조직의 Neurotransmitter함량변화

기도의 섬모운동과 점액분비를 자극하며 평활근의 수축작용과 관련된 neurotransmitter중 acetylcholine은 Cooper¹²⁾의 방법에 따라 KBH₄와 LiCl 존재하에 생성된 ethanol이 NAD 의존성 alcohol dehydrogenase에 의해 aldehyde로 산화될때 생성되는 NADH를 fluorometer로 측정정량하였으며 serotonin과 histamine은 Udenfriend¹³⁾와 Shore¹⁴⁾의 방법을 이용하여 fluorometer로 각각 정량하였다. 이때 실험동물의 처리는 7마리를 한 군으로 8군을 준비하였다. 먼저 길경 추출물 25 mg을 0.5 ml의 식염수에 녹여 복강내주사하고 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분 후에 thiopental로 마취후 기도를 절개하고 50배 용량의 0.4 N perchloric acid로 균질화 하였다.

한편, 길경 추출물 15 mg에서 200 mg까지 용량을 달리하면서 같은 방법으로 투여하고 3시간 후에 기도를 적출 하였다.

원지와 더덕추출물은 25 mg씩을 각각 같은 방법으로 투여하고 3시간후에 기도를 적출, neurotransmitter들의 함량을 측정 비교 하였다.

2) Glycoprotein의 함량측정

각 생약추출물 25 mg을 흰쥐에 각각 복강 투여하고 2시간 후 thiopental로 마취하여 기도를 절개하였으며 20배 용량의 식염수로 균질화 하였다.

기도에 존재하는 glycoprotein (protein-bound hexose)은 Winzler¹⁵⁾의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 즉, 기도조직 균질액을 95% ethanol로 세척한 다음 0.1 N NaOH에 용해하고 Orcinol-H₂SO₄로 80°에서 15분동안 발색시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준당으로는 galactose와 mannose를 사용하였다.

3) Phenol Red분비작용 측정

점액분비 촉진작용을 확인하기 위해 Engler와 Szelenyi¹⁶⁾의 방법에 따라 25 mg의 생약추출물을 위와 같은 방법으로 각각 투여하고 90분 후에 0.5 ml의 phenol red(10 mg/kg)를 복강주사하였다. 30분 후 기도를 절개하여 1 ml의 생리식염수로 30분간 침적하여 phenol red를 추출하였으며 여기에 0.1 ml의 1 M NaOH를 가하고 546 nm에서 흡광도를 측정하여 phenol red의 분비량

을 정량하였다.

4) Lysozyme의 활성도 측정

생약추출물을 복강내 투여하고(25 mg/rat) 2시간 후 기도 epithelium에 존재하는 lysozyme의 활성도를 Tanimoto등¹⁷⁾의 방법으로 측정하였다. 즉 *M. lysodeikiticus* 세포를 기질로 하여 이것이 lysis되어 turbidity가 감소되는 정도를 640 nm에서 측정했다. 실험조건에서 분 당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 양을 1 unit로 정의하였다.

5) 기도의 조직변화

생약추출물을 4)에서와 같은 방법으로 처리하고 절개한 기도조직을 중성 formalin으로 고정시켰다. 이어 Yanaura¹⁸⁾의 방법에 따라 glycoprotein 분비정도를 비교하기 위하여 alcian blue (pH 2.0)로, 일반적인 morphology와 분비선 등의 조직변화를 관찰하기 위하여 PAS 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

6) Mucin의 유동성에 미치는 영향

생약추출물의 어떤 성분이 점액과 직접 작용하여 점성도에 영향을 미치는가를 검토하기 위하여 점액의 주 성분인 mucin을 이용하여 관찰하였다. 즉, 0.1% mucin용액 10 ml에 추출물을 5 mg에서 20 mg까지 변화시키면서 첨가하고 37°에서 30분간 보온한 다음 Ostwald viscometer로 점성의 변화를 측정하여 비교하였다.

실험결과

1. 기도내의 Neurotransmitter 함량에 미치는 영향

선정한 생약들의 유효농도를 결정하기 위하여 길경추출물을 생리 식염수에 녹인 후 일정량씩 현취에 투여하고 평활근의 이완 및 수축, 그리고 섬모운동과 점액분비의 촉진과 관계가 있는 것으로 알려진^{19,20)} acetylcholine, serotonin 및 histamine 등의 기도내 함량변화를 관찰하였다.

한편, 실험동물을 희생시키는 방법에 따라 이들의 함량이 달라지기 때문에²¹⁾ 본 실험에서는 thiopental로 마취 후 기도를 적출하였다. Fig. 1은 25 mg의 길경추출물을 투여한 후 시간의 경과에 따라 변화되는 이들의 함량변화를 관찰한

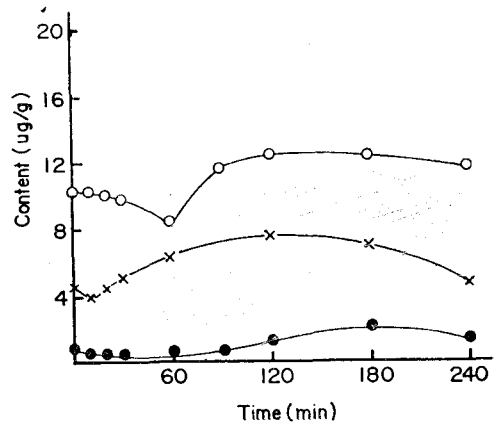


Fig. 1. Sequential changes in the content of neurotransmitters in the trachea of rat treated with extract of Platicodi Radix (o—o: histamine, x—x: acetylcholine, ●—●: serotonin).

것이다. 대개 2~3시간 사이에 기도내 함량이 다소 증가되었으나 4시간 이후에는 정상으로 회복되었으며 모두 비슷한 경향을 보였다.

또한 이들 생약추출물을 15 mg에서 100 mg까지 용량을 달리하면서 투여하고 3시간 후에 조직을 적출하여 이들의 함량을 측정 비교한 결과 Fig. 2에서와 같이 25 mg을 투여했을 때 다소 높았다. 선정한 saponin성 거담제들의 생리 활성효과를 상대적으로 비교하기 위하여 이들 결과를 기초로 각각 25 mg씩을 복강내 투여하고 2시간 후 이들의 함량을 측정한 결과는 Table I과 같다.

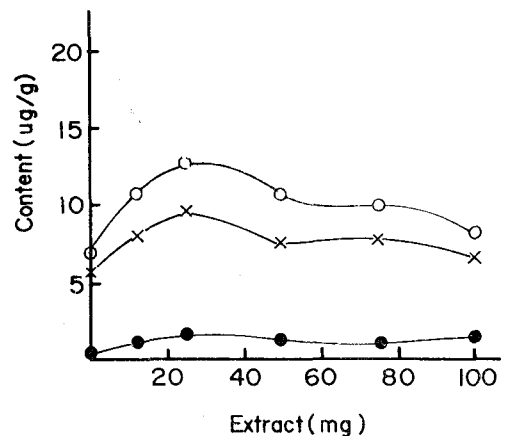


Fig. 2. The content of neurotransmitters in the trachea of rat treated with extract of Platicodi Radix (o—o: histamine, x—x: acetylcholine, ●—●: serotonin).

Table I. The content of neurotransmitters in trachea of the rats treated with 50% ethanol extract of crude drugs

Treatments	Neurotransmitter($\mu\text{g/g}$ tissue)		
	Acetylcholine	Serotonin	Histamine
Control	5.8 \pm 2.7	1.3 \pm 1.0	10.3 \pm 1.5
Platicodi Radix	9.9 \pm 3.7	1.6 \pm 0.3	16.5 \pm 1.3*
Polygalae Radix	21.6 \pm 7.5*	1.6 \pm 1.2	21.4 \pm 1.2*
Codonopsis lanceolate Radix	16.6 \pm 7.2*	1.5 \pm 0.6	17.0 \pm 4.0*

Results are given as the mean \pm S.E. * p <0.01

Table II. The effect of 50% ethanol extract of crude drugs on tracheal protein-bound hexose content and phenol red excretion

Treatments	Content of hexose (mg/g tissue)	Ratio (%)	Content of PR ^{a)} ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	Ratio (%)
Control	4.4 \pm 0.8	100	5.2 \pm 1.0	100
Platicodi Radix	4.6 \pm 0.7	104	4.8 \pm 0.7	92
Polygalae Radix	5.7 \pm 0.5*	130	13.6 \pm 1.3**	261
Codonopsis lanceolate Radix	4.7 \pm 0.4	107	5.7 \pm 0.9	110

a): phenol red

Results are given as the mean \pm S.E. * p <0.05, ** p <0.01

즉, 대조군에서 acetylcholine의 함량은 약 5.8 mg/g이었으나 원지를 투여한 실험군은 21.6 mg/g으로 3.7배 증가되었고 더덕과 길경추출물의 투여군에서 각각 2.9 및 1.7배로 유의하게 증가되었다. Histamine의 함량도 이와 비슷한 경향을 보였으며 원지 투여군이 길경이나 더덕 추출물의 투여군에서 보다 높았다. 그러나 Serotonin은 다소 증가되었으나 유의성은 없었다.

2. 기도 점액분비에 미치는 영향

점액분비가 촉진되는 정도는 분비되는 양을 측정하는 것이 가장 정확하다. 그러나 이를 측정하는데 여러 문제점이 있기 때문에 본 실험에서는 marker가 될 수 있는 glycoprotein^{18,22,23)}과 phenol red의 분비량¹⁶⁾을 동일 조건에서 측정하였으며 glycoprotein은 protein-bound hexose의 양으로부터 평가하였다. Phenol red의 분비는 이와 더불어 수분의 분비량을 위한 marker가 될 수 있다.

Table II는 이들의 관찰로부터 얻은 결과이다. protein-bound hexose의 함량은 원지 투여군이 약 5.7 mg/g으로 대조군(4.4 \pm 0.8 mg/g)에 비

해 1.3배 높았고 더덕과 길경 추출물의 투여군에서는 107% 및 104%로 약간 증가되었다. 한편 phenol red 분비량은 더덕 추출물 투여군에서 대조군 보다 약 10%가 증가된 반면 원지 투여군은 161%나 유의하게 증가되었다.

이들 결과로부터 원지는 3가지 생약 중 점액분비 효과가 가장 높았으며 길경과 더덕은 대조군에 비해 다소 높은 결과를 보였으나 유의성은 없었다.

한편 bromhexine과 같은 mucolytic agent를 투여했을때 mucopolysaccharide fibril을 가수분해하는 lysozyme의 활성도가 증가되는 것을 관찰한 바 있다.²⁴⁾ 이 효소는 glycoprotein의 disulfide결합의 절단에 의한 효과와 더불어 점액의 점성을 감소시키는 중요한 기전의 하나이다.

저자들은 선정된 생약들을 같은 조건으로 투여하고 기도조직 균질액에 함유된 lysozyme의 활성도를 측정하여 Table III에 나타냈다. Table III에서와 같이 생약의 투여로 인해 이 효소의 활성도가 크게 변화되지 않았다. 그러나 원지투여군은 대조군에 비해 약 30% 증가되었으나 통

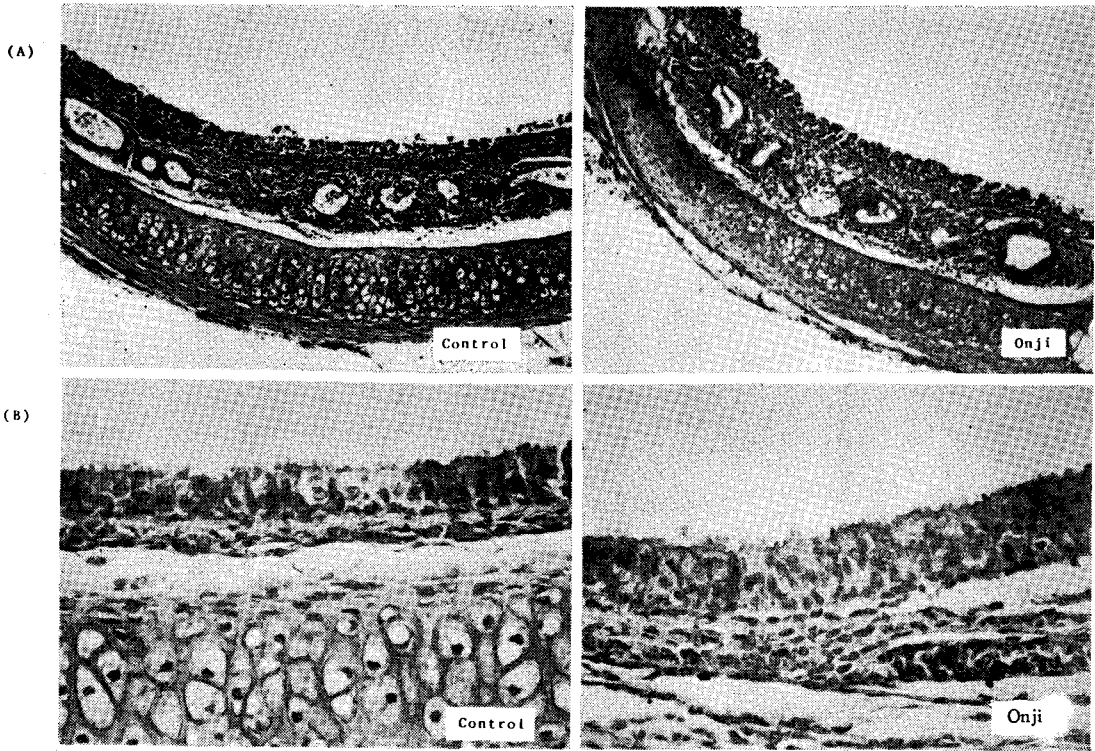


Fig. 3. Photomicrographs of rat tracheal submucosal glands(A: PAS stain, B: Alcian blue stain).

Table III. The activity of lysozyme in trachea of the rats treated with 50% ethanol extract of crude drugs

Treatments	Enzyme activity (unit/mg tissue)	Ratio (%)
Control	807±233	100
Platicodi Radix	827±133	102
Polygalae Radix	1,040±100	129
Codonopsis lanceolate Radix	827±100	102

Results are given as the Mean±S.E.

계적인 유의성은 없었다.

3. 기도의 조직변화

생약추출물 25 mg을 흰쥐에 각각 투여하고 3 시간 후 기도를 적출하여 점액분비와 관련된 분비선 및 epithelium에 내재하는 glycoprotein을 관찰하기 위하여 PAS 및 alcian blue 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

생약추출물을 투여한 모든 흰쥐의 기도에서 acinar gland 내막의 thickness를 보였으며 생약

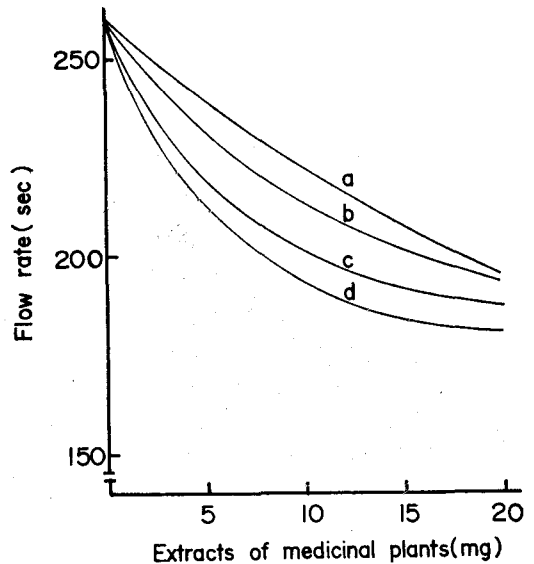


Fig. 4. The comparison of viscosity of 0.1% mucin solution after incubation for 30 mins at 37°. The extracts of medicinal plants were added into the solution of 10 ml(a: Saline, b: Platicodi Radix, c: Polygalae Radix, d: Codonopsis lanceolate Radix).

별로 큰 차이는 보이지 않았다. 그러나 alcian blue로 염색된 glycoprotein은 gland 내벽과 epithelium 표면에서 확인되었고 원지 투여군에서는 현저하게 그 함량이 증가되었다.

4. Mucin 용액의 점성에 미치는 영향

생약추출물을 흰 쥐에 투여한 후 생리적인 기전에 의해 나타나는 효과 외에 추출물속에 존재하는 어떤 성분에 의해 직접 점액의 점성이 감소되는지를 확인하기 위해 mucin 용액의 점성에 미치는 영향을 관찰하였다.

Fig. 4는 0.1% mucin용액에 생약들로 처리한 후 점성도의 변화를 측정된 결과이다. 3종의 추출물 모두 mucin 용액의 점성을 감소시켰고 농도의 증가에 따라 더욱 감소되는 경향을 보였으며 그 중 더덕 추출물이 같은 조건에서 가장 큰 감소를 나타내었다.

고 찰

기도점액의 수분과 glycoprotein 균형에 따라서 점액의 물리적인 성상이 변화될 수 있다는 것은 잘 알려져 있다.

만성기관지염을 비롯한 여러 가지 호흡기 질환에 사용되는 많은 약물들은 *in vivo* 혹은 *in vitro*에서 점액의 점성을 효과적으로 감소시킨다. 거담을 목적으로 사용되는 N-acetylcysteine²⁵⁾이나 bromhexine²⁶⁾ 등은 기도의 점액분비와는 상관없이 glycoprotein의 peptide chain을 연결하는 S-S결합을 개열함으로써 유동성을 변화시킨다.

그러나 생체의 거담작용은 매우 다양한 기전에 의해 이루어진다. 즉, i) 수분을 비롯한 점액의 분비를 촉진시킴으로써 그 양을 증가시키는 것. ii) 직접적인 작용으로 점액 혹은 담의 점성을 낮추는 것. iii) 섬모운동의 촉진으로 인해 배설을 용이하게 하는 것 등이다. 그러나 여러 가지 약물들의 거담작용은 확인되었지만 이들이 폐나 기관의 기능을 강화하거나 항진시킨다는 증거는 없다.

생약은 일반적인 거담제와는 달리 여러 가지 복합계제로 경구 투여되고 호흡기능의 강화를 목적으로 하기 때문에 단순히 분비량이나 점

성에 미치는 영향의 관찰만으로는 거담의 효과를 평가하기 어렵다. 저자들은 한방에서 단일 혹은 혼합처방에 의해 거담을 목적으로 많이 이용되는 길경, 원지, 더덕추출물의 거담효과와 이의 기전을 규명할 목적으로 위의 추출물들을 흰쥐에 각각 투여한 후 점액분비, 섬모운동, 점액의 유동성 및 기도의 조직변화 등을 관찰하였다.

섬모운동, 점액분비의 촉진, 이물질 배설을 위한 기침의 유발 등은 기도점막 미주신경의 지배를 받는다. 또한 subepithelial receptor에 의해 유발되기도 하며 특히 cholinergic 혹은 α -, β -adrenergic 화합물에 의해서 자극 혹은 촉진된다.^{27,28)}

저자들은 생약추출물의 투여로 인해 amine계 호르몬의 일종인 acetylcholine, histamine 등의 neurotransmitter들의 조직내 함량이 다소 증가되는 것을 관찰하였다(Table I). 그러나 이들은 기도의 평활근에만 특이적으로 작용하는 것이 아니고 mast cell에 존재하면서 조직에 분포된 혈관에 대해서도 작용할 뿐아니라 외부에서 투여할 경우 그 투여용량에 따라서 상반된 영향을 나타내기도 한다. 그러나 원지의 경우 glycoprotein의 함량이나 phenol red의 분비속도 등으로 보아 이들의 작용을 배제할 수는 없다.

점액의 점성은 glycoprotein의 수소결합 혹은 hydrophobic결합, disulfide 결합등에 의해 유지되며 복잡하게 얽힌 polymeric system과 같은 rheological 성상을 나타낸다.²⁹⁾

지금까지 어떤 약물에 의해 생긴 거담효과는 대부분 대형동물을 이용하여 respiratory tract fluid(RTF)의 부피, 점성, glycoprotein의 조성 등을 관찰하여 그 효과를 평가하였다.^{30,31)}

그러나 이와같은 방법은 장시간 실험동물을 마취시켜야 하며 실험의 전 과정동안 동일한 생리적인 상태가 유지되었다고 보기는 어렵다. 더구나 각 실험군의 동물이 동일한 조건을 갖춘 실험동물을 선정하기가 용이하지 않을 뿐만 아니라 각 실험군간의 차이 또한 적지않다. 본 실험에서는 흰쥐를 대상으로 동일한 조건에서 기도에 존재하는 glycoprotein을 측정함과 동시에 alcian blue로 조직을 염색, 직접 비교하였다.

또한 mucoprotein의 peptide chain에 결합돼 있는 대부분의 hexose가 mannose와 galactose이기 때문에^{22,23)} 이들을 정량하여 glycoprotein분비의 지표로 하였다. 점액분비 촉진의 가장 확실한 marker가 될 수 있는 glycoprotein을 생약추출물의 투여로 인한 양적인 증가와 epithelium의 표면 및 분비선에 존재하는 glycoprotein을 염색하여 비교함으로써 이들의 분비촉진작용을 확인할 수 있었다. 같은 조건에서 원지는 탁월한 효과를 나타내었다.

점액분비 촉진작용의 확인을 위한 다른 방법으로 phenol red의 배설작용도 glycoprotein의 함량변화의 결과와 일치하였으며, 원지 투여군에서 특이하게 분비작용이 높은 결과는 glycoprotein의 분비와 더불어 수분의 증가도 병행되는 것으로 해석할 수 있다. 한편 담의 점도 저하작용은 단백질 분해효소나^{32,33)} lysozyme²⁴⁾에 의해서도 가능하기 때문에 본 실험에서도 기도 조직 균질액에서 lysozyme의 활성도를 측정 비교하였다. 그러나 생약 추출물의 투여로 인해서 효소의 활성도는 크게 변화되지 않았다.

또한 기도를 PAS 염색한 후 그 조직변화를 관찰한 결과 cillia는 잘 보존되었고 점액분비선은 다소 커진 반면 acinar gland의 inner membrane에 thickness를 보였다. 정량적인 비교는 어려웠지만 생약추출물을 투여한 모든 실험군에서 비슷한 변화를 보였다.

한편 pH 2.0에서 alcian blue로 epithelium에 내재하는 acid glycoprotein을 염색한 결과 분비선 내벽과 epithelium 표면에 대조군에서 보다 훨씬 많은 푸른색으로 염색된 glycoprotein을 볼 수 있었으며 이와같은 결과는 glyceryl guaiacolate³⁴⁾나 길경, 인삼, 마황추출물의 배합 엑스³⁰⁾를 투여했을때의 결과와 일치하였다.

실험에 사용된 생약들은 50% ethanol 추출물로서 그의 조성은 매우 다양할 것으로 생각된다. 저자들은 추출물에 존재하는 어떤 성분들이 mucolytic effect를 나타내는지 확인하기 위하여 mucin용액의 점성에 미치는 영향을 비교하였다 (Fig. 4). 3종의 생약추출물 모두에서 그 효과가 낮기는 하지만 점도의 감소현상이 관찰되었다.

결론적으로 선정된 3종류의 saponin함유 생약 중 원지가 가장 거담효과가 높았으며 그 작용기전은 점액의 분비를 촉진시키는 물론 담의 점성을 감소시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

(1988년 4월 22일 접수 : 5월 31일 수리)

Literature Cited

1. Sade, J., Eliezer, N., Silberg, A. and Nevo, A.C.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 102, 48(1970).
2. Wanner, A.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 116, 73 (1977).
3. Alexander, H.L.: *J. Allergy*, 34, 305(1963).
4. Lamb, D. and Reid, L.: *Br. J. Dis. Chest.* 66, 239(1972).
5. Imamura, N., Misawa, M., Kitagawa, H., Yanaura, S. and Ishizono, H.: *Folia Pharmacol. japon* 87, 497(1986).
6. 高木敬次郎, 李殷芳; 藥誌 92, 969(1972).
7. 東海林徹, 木田憲佐; 應用藥理 10, 407(1975).
8. 藤田路一, 隸川李治; 日本藥理學誌 74, 94(1954).
9. Fujita, M. and Itokawa, H.: *Chem. Pharm. Bull.* 9, 1006 (1961).
10. 張昌紹; 藥理學 p.189(1965).
11. Park, D.K. and Lee, W.H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 14, 178(1983).
12. Cooper, J.R.: *Biochem. Pharmacol.* 13, 795 (1964).
13. Udenfriend, S., Weissbach, H. and Brodie, B.B.: *Methods Biochem. Anal.* VI, 95(1957).
14. Shore, P.A.: *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 127, 182(1959).
15. Winzler, R.J.: *Methods Biochem. Anal.* II, 279 (1955).
16. Engler, H. and Szelenyi, I.: *J. Pharmacol. Methods* 11, 151(1984).
17. Tanimoto, T., Fukuda, H. and Kawamura, J.: *Chem. Pharm. Bull.* 32, 3607(1984).
18. Yanaura, S., Takeda, H. and Minsawa, M.: *Folia Pharmacol. japon* 79, 65(1982).
19. Widdicombe, J.G.: *Physiol. Rev.* 43, 1(1963).
20. Jamieson, D.: *Br. J. Pharmacol.* 19, 286(1962).
21. Bosin, T.R. and Lahr, P.D.: *Biochem. Pharmacol.* 30, 3187(1981).

22. Davis, S.S., Cox, A., Marriott, C., Readman, A.S., Barrett-Bee, K.: *Eur. J. Respir. Dis.* 67, 94(1985).
23. Reid, L.: In *The lung, structure, function and disease* by 23 authors, ed. by William, M.T. and Murray, R.A., Williams and Willkins Company pp.138-150(1978).
24. Horstmann, G., Iravani, J., Melville, M.W. and Ulmer, W.T.: *Pneumonologie* 152, 105(1975).
25. Kogi, K., Saito, T., Kase, Y. and Hitosh, T.: *Folin Pharmacol. japon.* 77, 569(1981).
26. Takeda, H., Kasamatsu, S., Misawa, M. and Yanaura, S.: *Folia Pharmacol. japon* 81, 29 (1983).
27. Gallagher, J.T., Kent, P.W., Passatore, M., Phipps, R.J. and Richardson, P.S.: *Proc. Soc. Lond B* 192, 49(1975).
28. Ueki, J., German, V.F., Nadel, J.A.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 121, 351(1980).
29. Davis, S.S., Scobie, S., Inglis, A.: *Biorheol.* 13, 225(1975).
30. Imaura, N., Misawa, M., Kitagawa, H., Yanaura, S. and Ishizone, H.: *Folia Pharmacol. japon.* 87, 497(1986).
31. Carson, S.A., Chopra, S.K. and Tashkin, D.P.: *Eur. J. Resp. Dis.* 63, 316(1982).
32. Kase, Y., Seo, H., Miyata, T., Kito, G., Hirotsu, I. and Tomoda, K.: *Japan J. Pharmacol.* 27, supp, p.73(1977).
33. Kase, Y., Oyama, Y., Uehara, O., Hidaka, T., Takahama, K., Miyata, T. and Tomota, K.: *Japan J. Pharmacol.* 29, supp, p.97(1979).
34. Yanaura, S., Takeda, H. and Misawa, M.: *Folia Pharmacol. japon* 79, 57(1982).