

오수유 열수추출액이 Cyclophosphamide 유도 면역억제에 미치는 효과

이영선¹ · 이금홍 · 박종현 · 권영규² · 신상우^{3*}

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 성덕대학 전통건강자원개발과, 2: 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실, 3: 부산대학교 한의학전문대학원

Water Extracted Evodiae Fructus Possesses Immunomodulatory Activities on Cyclophosphamide Induced Immunesuppression

Young Sun Lee¹, Geum Hong Lee, Jong Hyun Park, Young Kyu Kwon², Sang Woo Shin^{3*}

*Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University,
1: Department of Traditional Health Resource Development, College of Sung Duk,
2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University,
3: School of Oriental Medicine, Pusan National University*

Evodiae Fructus(EF) has been used as Traditional medicine for the treatment of headache, abdominal pain, hemorrhage, and menorrhae in many Asian countries. The present study was conducted to investigate the immunomodulatory effect on cyclophosphamide(CY)-induced immunesuppression of water extracted EF(EFE). In the mouse spleen cell proliferation assay, EFE enhanced mitogenic activity and restored the CY-induced cell suppression. In the nitric oxide(NO) assay, EFE inhibited NO production and iNOS protein levels in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In the GC-MS analysis, many ingredients of EFE were detected by solvents. These results indicated that EFE can modulate immune response through immune cell proliferation, the regulation of NO production and the inhibition of CY-induced immunotoxicity.

Key words : Evodiae Fructus, immunomodulatory effect, cyclophosphamide, NO

서 론

오수유(吳茱萸)는 운향과(芸香科)의 낙엽 소교목으로 9월 경의 녹색색 미숙과실을 채취해서 말린 것으로, 辛苦溫한 性味로 肝,胃經에 入하여 溫中祛寒하고 降逆止嘔하는 한약으로 쓰여져 왔다¹⁾. 오수유의 효능으로는 진통, 항구토, 혈압강하, 기관지 확장, 중추신경흥분, 체온상승, 자궁수축, 항균작용 등이 보고되었고²⁻⁵⁾, 그 주요성분으로는 alkaloid로 evodiamine, rutaecarpine, evocarpine, dehydroevodiamine 등이 알려져 있으며, 그 이외에 정유성분으로 evoden, ocimene, evodin, evodol 등이 보고된 바 있다⁶⁻¹⁵⁾.

항암제나 면역억제제로 가장 일반적으로 사용되는 알킬화제

* 교신저자 : 신상우, 부산시 금정구 장전동 산30, 부산대학교 한의학전문대학원

· E-mail : swshin@swshin.com, · Tel : 051-510-7376

· 접수 : 2007/11/03 · 채택 : 2007/11/27

약물 중 하나인 Cyclophosphamide(CY)는 백혈병, 류마티스 관절염, 림프종, 다발성 골수종과 골수 이식을 위한 면역억제시 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 CY의 비선택적 독성으로 정상 세포에도 독성을 나타내며 골수부전을 일으켜 혈소판 감소증과 더불어 빈혈증상을 악화 시켜 신체 발육부진 면역기능 저하 등의 생리적 현상이 알려져 있다. 이러한 비선택적 독성을 가진 면역억제제나 항암제의 부작용이나 독성을 경감 시킬 수 있는 물질 개발의 중요성이 대두되면서 최근 항암치료에 사용되는 여러 의약품에 의해 유발되는 생체면역 기능의 변화를 경감 시킬 수 있는 생리활성물질 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾.

오수유에 관한 최근의 국내연구를 살펴보면, 김 등⁴⁾은 오수유 Me-OH 추출물이 Cyanide에 의한 신경세포의 보호효과를, 정 등²⁾은 오수유가 선천성고혈압흰쥐의 혈압에 미치는 영향을 보고 하였다. 국외의 연구결과로는, 오수유의 주요성분 중 하나인 evodiamine의 항암효과 및 종양세포의 침윤과 전이 억제에

관한 여러 실험결과가 보고 되었다^{8,13,14}. 그러나, 오수유의 연구 결과 중 오수유의 면역조절능 특히 면역억제제로 항암제로 광범위하게 사용되고 있는 CY에 의해 초래되는 면역억제의 조절능에 관한 연구 보고는 아직 접하지 못하였다.

이에 본 연구에서는 오수유 열수추출액을 이용하여 면역작용 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 비장세포증식능, 오수유추출액 단독 또는 CY 병용 처리에 의한 비장세포 세포증식능의 변화 및 RAW264.7 대식세포에서의 NO 생성 조절에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 검액 준비

오수유의 열수추출액(EFE)은 오수유 2.9 kg을 정제수 13.5 L를 가하여 약탕기에서 2시간 30분 가열하여 추출한 후 다시 9 L의 정제수를 가하여 2시간 30분 가열하여 추출하였다. 이를 여과 후 진공감압 농축하였다. 농축된 오수유 추출액을 동결건조 하여 실험에 사용할 때까지 냉동보관 하였다.

2. 실험동물

무균 환경에서 사육된 5-6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 마우스에 사료와 물은 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 50±5%를 유지하였다.

3. 비장세포 분리 및 비장세포 증식능 실험

에테르 마취 후 심장에서 혈액을 채취 후 70% 알코올로 분무한 후 무균적으로 비장을 적출 하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장세포로 만든 후 4℃ HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A) 용액으로 2회 세척하였다. ACK lysis 용액을 가하여 적혈구를 완전히 용혈시킨 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) 배지로 2회 세척한 후 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유 시켰다. 일정액을 취하여 0.4% trypan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 생세포 수를 측정하여 사용하였다. 마우스 비장세포를 5×10⁵/100 μl 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 100 μl가 되게 조정하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에 넣어 24시간 배양하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다.

4. Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 Nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 μl

와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% a-naphthylamide in H₂O) 100 μl를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

5. Western blotting

RAW 264.7세포를 PBS로 3회 세척 후 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 μg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin 10 μg/ml Na₃VO₄, 10 μg/ml Na₂P₂O₇)로 균질화하고 세포 추출물을 얻어, SDS가 함유된 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동 후 nitrocellulose filter에 90 V에서 1 시간 동안 transfer하고, 3% non-fat milk를 함유한 TBS로 blocking한 후 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG-HRP로 반응 후 0.05% tween 20이 함유된 TBS로 세척한 후 ECL detection kit를 이용하여 X-ray film에 감광시켰다.

6. GC-MS를 이용한 오수유추출액의 성분 분석

GC-MS 분석은 Hewlett Packed(HP) 6890 gas chromatography-HP 5903N mass spectrometer를 사용하였다. Column은 HP-5MS, helium carries gas rate는 0.7 ml/min, ionization mode는 electron impact 70 eV으로 scan range는 m/z 50-800 mass unit로 분석 하였다. 성분은 database(computer library, NIST/EPA/MSDC libraries)를 이용하여 분석하였다.

7. 통계 처리법

모든 실험결과는 means±S.D.로 나타내었고, 각 실험군간의 측정치에 대한 자료분석은 각 군간 ANOVA와 Duncan's test에 의해 검정하였다. p<0.05일때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. EFE가 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

EFE가 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰 하였다. 분리된 마우스 비장세포에 EFE를 다양한 농도(100, 200, 400, 800, 1600 μg/ml)로 처리한 후 비장세포 증식능을 살펴본 결과, 비장세포증식능이 각각 0.86±0.01, 0.89±0.02, 0.96±0.04, 1.11±0.04, 1.12±0.03로, 대조군 0.71±0.02 에 비해 EFE의 처리 시 비장세포 증식능이 처리군 모두에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰 되었다(Fig. 1).

2. EFE가 CY처리에 의한 비장세포 증식능에 미치는 영향

EFE의 CY 처리에 의한 면역억제 보호효과를 관찰하기 위하여 CY처리에 의한 비장세포 증식능의 변화를 관찰하였다. CY 처리에 의한 비장세포 증식능을 살펴본 결과, 비장세포에 CY를 처리시 1600 μg/ml의 농도에 비장세포 증식능이 약 50% 감소하였다. CY(1600 μg/ml)의 농도와 EFE(100, 200, 400, 800, 1600 μg/

ml)을 동시에 처리하였을 때 CY 단독 처리군(0.46±0.01)에 비해 EFE 농도 의존적(0.63±0.02, 0.66±0, 0.73±0.01, 0.83±0.01, 0.84±0.02)으로 비장세포 증식능의 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 2).

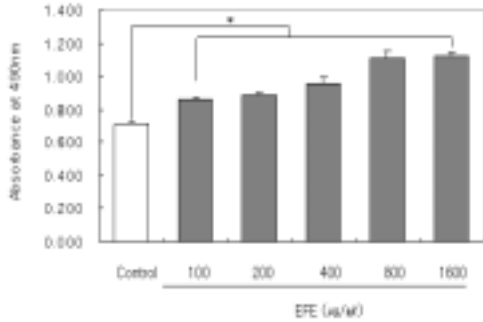


Fig. 1. Dose response of EFE on the proliferation of mouse splenocytes. Mouse spleen cells(5×10^6 cells/ml) were cultured with several concentration(0, 100, 200, 400, 800, 1600 µg/well) of EFE for 48hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as mean±S.D in triplicate cultures. * Significantly enhanced, $P < 0.05$ compared with control.

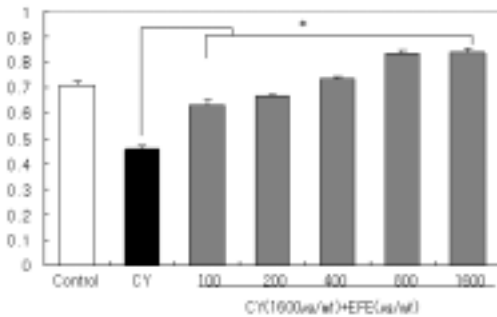


Fig. 2. Effect of EFE on the proliferation of mouse splenocytes with or without cyclophosphamide in vitro. Mouse spleen cells(5×10^6 cells/ml) were cultured with several concentration(0, 100, 200, 400, 800, 1600 µg/well) of EFE with or without CY for 48hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as mean±S.D in triplicate cultures. * Significantly enhanced, $P < 0.05$ compared with CY.

3. EFE가 RAW264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성에 미치는 영향
EFE의 대식세포 면역활성 유도능을 살펴보기 위하여 NO 생성조절에 미치는 영향을 살펴본 결과, RAW 264.7 대식세포주에 LPS 처리에 의하여 과다하게 유도된 NO(61.14 ± 0.94)는 EFE(100, 200, 400, 800, 1600 µg/ml)을 동시에 처리하였을 때 EFE 농도 의존적(62.93 ± 0.41 , 37.07 ± 0.34 , 20.6 ± 0.4 , 19.49 ± 0.31 , 21.63 ± 0.21)으로 NO생성이 억제됨이 관찰되었다(Fig. 3). NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS 단백질 발현의 관련성을 조사한 결과, LPS 자극에 의해 iNOS 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, LPS와 EFE를 동시에 처리 시 EFE 농도 의존적으로 iNOS 단백질 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4).

4. GC-MS를 이용한 EFE의 성분 분석

한의학에서 상용하는 제형인 탕전시의 오수유의 성분을 분석하고자, 오수유를 열수 추출하여 분말상태로 만든 후 여러 종

류(Hexan, Ethyl acetate, Methanol)의 용매를 이용하여 오수유 추출액을 녹인 후 각 용매에 녹아 있는 성분을 GC-MS를 이용하여 조사 하였다. 오수유 추출액은 용매에 따라 다양한 성분이 관찰되었다(Table 1).

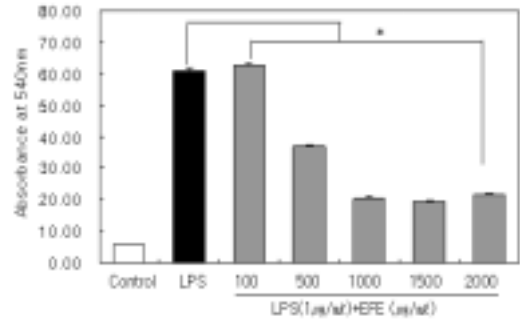


Fig. 3. Effect of EFE on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with or without lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/ml) for 24hr in the presence or absence of EFE at indicated doses. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are the means±SD of three independent experiments. *significantly different from samples treated with LPS alone (ANOVA, $P < 0.05$).

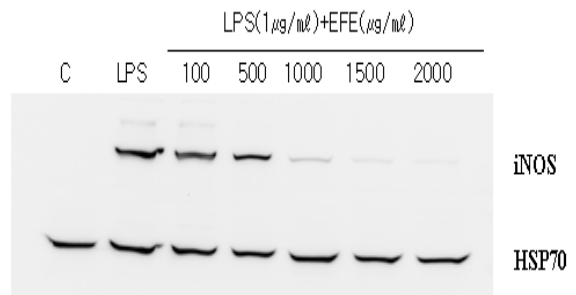


Fig. 4. Effects of EFE on the expression of iNOS protein in LPS stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1µg/ml LPS in the presence or absence of various concentration of EFE for 24h. The protein extracts were prepared, and then the samples analyzed for iNOS expression by Western blotting as described in the method. HSP70 was used as control protein.

Table 1. Chemical composition of EFE by a various solvents

| Solvent | Compounds |
|---------------|---|
| Hexane | Ammonia, Hydrazine, Methylcyclopentane, Sec butylformate, 2,2-Dimethylpentane, n-Docosane |
| Ethyl acetate | 2(1H)-Quinolinone, 4-bromo-3-chloroaniline, p-Anisilidenacetone, 1-nitro-4-(2-thienyl)benzene, Benzoic acid, 3-Amino-2,5-dichlorobenzoic acid, Ethanol, 2-Propanone, Butyl ethyl ether, Diethyl carbinol, Acetaldehyde, Acetaldehyde, N-Allyl-N-ethylamine, 3-Methylheptane, 2-Methylhexadecane, n-Docosane, 3,5-Di-tert-butylphenol, Dioctyl disulphide, 3-Buten-2-one, 3-Amino-2,5-dichlorobenzoic acid, 3-Amino-2,5-dichlorobenzoic acid |
| Methanol | Methyl octadecanoate, Methyl decanoate, Ficosanoic acid, Methyl heptadecanoate, Heneicosanoic acid, Methyl nonanoate, Methyl 17,18-dideutrioctadecanoate, Dodecanoic acid, Hexanoic acid, Hexadecanoic acid |

고찰

오수유에 관한 국내외 연구보고에 따르면 정 등²⁾은 오수유가 선천성고혈압환자의 혈압 조절에 효능이 있음을 보고하였고,

Zhang 등¹⁵⁾은 오수유 성분중 Evodiamine이 HeLa 세포에서 apoptosis를 유도함을 보고하였으며, Huang 등²¹⁾은 Human prostate cancer PC-3 세포에 apoptosis를 유도할 수 있음을 보고하였다. 그 외 오수유는 자궁수축, 이뇨, 항균, 살충, 진통, 위액분비억제 등 다양한 약리작용이 있는 것으로 보고 되고 있다²²⁻²⁵⁾. 오수유의 이러한 다양한 약리 작용으로 볼 때 오수유 추출액이 면역기능의 조절에 유효한 작용을 할 것으로 기대되어, 본 연구에서는 한의학에서 주로 사용되는 제형인 탕전에 해당하도록 오수유를 열수 추출하여 면역기능 조절에 미치는 영향을 관찰 하였다.

비장은 면역반응의 주요 임파 장기로 면역과 관련된 많은 세포들이 존재한다. 임파구 증식능은 여러 종류의 자극에 의하여 초래된 새로운 DNA합성 및 세포분열의 결과로 새로운 면역 조절제를 탐색하는 방법으로 광범위하게 사용되어지고 있다^{18,26,27)}. 본 연구에서는 오수유(EFE)가 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포를 분리하여 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰하였다. EFE를 마우스 비장세포에 처리 시 비장세포 증식능이 처리군 모두에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 1). 이는 EFE가 면역세포를 자극 면역세포의 분열을 자극 할 수 있는 mitogen으로 작용될 수 있는 있음을 간접적으로 나타내 주는 결과 중의 하나라 할 수 있다.

CY는 알킬화제로 장기이식 후 나타나는 거부반응의 억제 및 악성 종양의 치료목적으로 사용되고 있는 대표적인 화학요법제로 알려져 있다. 그러나 CY의 비선택적인 독성으로 인해 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내어 빈혈, 백혈구 수 감소, 혈소판 감소 등과 같은 부작용을 나타내고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 따라서 최근에는 이와 같은 부작용이나 면역독성을 최소화 할 수 있는 물질을 발굴하고자 하는 연구가 이루어지고 있다. Senthikumar 등¹⁶⁾은 squalene이 CY에 의해 유도된 독성으로부터 조직을 보호 할 수 있음을 보고하였으며, Artym 등²⁸⁾은 lactoferrin이 CY에 의해 억제된 체액성 면역반응을 회복시킬 수 있음을 보고 하였다. 또한 국내 연구를 살펴보면 표 등¹⁸⁾은 상항 버섯 추출물이 CY처리에 의해 억제된 체액성 면역기능 조절연구에서 면역독성을 경감시킬 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서 EFE의 CY 처리에 의한 면역억제 보호효과를 관찰하기 위하여 CY처리에 의한 비장세포 증식능의 변화를 관찰한 결과, CY 단독 처리군에 비해 EFE 농도 의존적으로 비장 세포 증식능의 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 2). 이는 EFE가 화학요법제의 처리에 의해 야기 될 수 있는 부작용 중의 하나인 면역세포에 대한 면역독성을 감소시킬 수 있는 결과로 생각된다.

NO는 L-arginine에서 만들어지는 Free radical로서 반응성이 강하며 다양한 생리적 기능을 매개하는 물질로 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로 저 농도에서 신경전달 물질 등과 같은 작용을 하나 NO가 과도하게 생성 시 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다^{29,30)}. 본 연구팀은 여러 한약재 추출액을 이용하여 NO 생성 조절능이 있는 물질을 탐색하는 연구를 통하여 건강 열수추출액이 NO 생성 조절능이 있음을 보고하였으며, 이러한 조절은 iNOS유전자 발현 조절과 관련 있

음을 보고하였다²⁷⁾. 정 등²⁾은 오수유의 혈압강하 작용에 관한 연구에서 NO는 오수유의 혈압강하의 매개체일 가능성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 EFE의 대식세포 면역활성 유도능을 살펴보기 위해 NO 생성조절에 미치는 영향을 살펴본 결과, EFE는 RAW 264.7 대식세포주에 LPS 처리에 의하여 과다하게 유도된 NO 생성을 억제할 수 있음이 관찰되었으며(Fig. 3), 이러한 NO 생성 억제 기작은 iNOS 단백질 발현의 감소와 관련됨이 관찰 되었다(Fig. 4).

Evodia 속 식물 중 일부는 오래전부터 민간에서 약용으로 사용되어 왔다. 한의학에서 주로 사용되는 제형인 탕전시의 오수유의 성분을 분석하고자, 오수유를 열수 추출하여 분말상태로 만든 후 여러 종류(Hexan, Ethyl acetate, Methanol)의 용매를 이용하여 오수유 추출액을 녹인 후 각 용매에 녹아 있는 성분을 GC-MS를 이용하여 조사한 결과, 오수유 주성분으로 알려진 evodiamine, rutaecarpine, evoden, evodin, evodol 등은 이번 실험에 사용된 용매에서는 관찰되지 않았으나 용매에 따라 다양한 성분들이 분리 되었다(Table 1). 추후 여러 용매를 이용하여 한국산 오수유의 성분에 관한 체계적 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과로 볼 때, 오수유는 임파구세포와 대식세포의 활성화를 통해 면역반응을 유도 할 수 있으며, CY에 의해 초래된 독성효과를 억제 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

오수유가 면역작용의 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 오수유 열수추출액(EFE)의 비장세포증식능, 오수유 추출액 단독 또는 CY 병용에 의한 비장세포 증식능변화, RAW 264.7 세포에서 NO생성, GC-MS를 이용한 성분 분석 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

EFE이 비장세포 증식능에 미치는 영향 결과, 비장세포 증식능이 EFE 처리 농도 의존적으로 유의한 증가가 관찰 되었으며, CY 처리에 의해 감소된 비장세포 증식능이 EFE를 동시에 처리 시 EFE 농도 의존적으로 비장 세포 증식능의 증가가 관찰되었다. EFE는 LPS 자극에 의해 RAW264.7 대식세포에서 과다하게 생성된 NO의 양을 감소시킴이 관찰되었으며, 이러한 NO 생성 억제 기작에 iNOS 단백질 발현이 관련되어 있음이 관찰되었다. EFE를 Hexan, Ethyl acetate 또는 Methanol 용매를 이용하여 오수유 추출액을 녹인 후 각 용매에 녹아 있는 성분을 GC-MS를 이용하여 조사한 결과, Ethyl acetate 용매에서 가장 많은 종류의 성분이 분리 되었으며, 오수유의 주성분으로 알려진 evodiamine, rutaecarpine, evoden, evodol 등은 사용 용매에서 분리되지 않았다.

본 연구 결과, 오수유 열수추출액은 비장세포 증식능을 농도 의존적으로 증가 시켰으며, CY에 의해 초래된 비장세포 증식의 감소를 억제 시킬 수 있음이 관찰되었다. 또한 대식세포에서 NO 생성을 조절 할 수 있음이 관찰되었다. 이상의 결과로 볼 때 오수유는 비장세포와 대식세포의 면역조절능을 통하여 CY에 의해

초래된 독성효과를 감소시킬 수 있으리라 생각되며 이는 오수유가 화학요법에 의해 초래되는 면역독성을 억제시킬 수 있는 조절제로서 개발 가능성을 제시해 줄 수 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울, 영림사, pp 337-338, 1991.
2. 이성우, 황방연, 김세은, 김환목, 김영호, 이경순, 이정준, 노재섭. 약용식물 오수유로부터 다제약제 내성 조절물질의 분리. 생약학회지 26(4):344-348, 1995.
3. 정수연, 박윤주, 정면우, 임화경, 강주희, 최기환, 김주일. 오수유가 선천성고혈압흰쥐의 혈압에 미치는 영향. 응용약물학회지 8(4):305-310, 2000.
4. 김성은, 김대근, 신태용, 임종필, 엄동욱. 흡광도 측정법에 의한 오수유탕 중 오수유 알칼로이드의 정량. 생약학회지 35(1):88-91, 2004.
5. 김상태, 안승희, 김정도, 김영균. 오수유 MeOH 추출물이 Cyanide에 의한 신경세포의 보호효과에 미치는 영향. 생약학회지 34(4):282-287, 2003.
6. Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D., Rossi, M.C. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography--mass spectrometry analysis of the volatile compounds of Evodia species fruits. J Chromatogr A 1087(1-2):265-273, 2005.
7. Tsai, T.H., Chang, C.H., Lin, L.C. Effects of Evodia rutaecarpa and rutaecarpine on the pharmacokinetics of caffeine in rats. Planta Med 71(7):640-645, 2005.
8. Liao, C.H., Pan, S.L., Guh, J.H., Chang, Y.L., Pai, H.C., Lin, C.H., Teng, C.M. Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb Evodiae fructus, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells in vitro and in vivo. Carcinogenesis 26(5):968-975, 2005.
9. Ueng, Y.F., Tsai, T.H., Don, M.J., Chen, R.M., Chen, T.L. Alteration of the pharmacokinetics of theophylline by rutaecarpine, an alkaloid of the medicinal herb Evodia rutaecarpa, in rats. J Pharm Pharmacol 57(2):227-232, 2005.
10. Wang, C., Wang, M.W., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. Roles of SIRT1 and phosphoinositide 3-OH kinase/protein kinase C pathways in evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death. J Pharmacol Sci 97(4):494-500, 2005.
11. Ueng, Y.F., Yu, H.J., Lee, C.H., Peng, C., Jan, W.C., Ho, L.K., Chen, C.F., Don, M.J. Identification of the microsomal oxidation metabolites of rutaecarpine, a main active alkaloid of the medicinal herb Evodia rutaecarpa. J Chromatogr A 1076(1-2):103-109, 2005.
12. Lee, S.K., Kim, N.H., Lee, J., Kim, D.H., Lee, E.S., Choi, H.G., Chang, H.W., Jahng, Y., Jeong, T.C. Induction of cytochrome P450s by rutaecarpine and metabolism of rutaecarpine by cytochrome P450s. Planta Med 70(8):753-757, 2004.
13. Fei, X.F., Wang, B.X., Li, T.J., Tashiro, S., Minami, M., Xingde, J., Ikejima, T. Evodiamine, a constituent of Evodiae Fructus, induces anti-proliferating effects in tumor cells. Cancer Sci 94(1):92-98, 2003.
14. Kobayashi, Y. The nociceptive and anti-nociceptive effects of evodiamine from fruits of Evodia rutaecarpa in mice. Planta Med 69(5):425-428, 2003.
15. Zhang, Y., Wu, L.J., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. Intracellular regulation of evodiamine-induced A375-S2 cell death. Biol Pharm Bull 26(11):1543-1547, 2003.
16. Senthikumar, S., Devaki, T., Manohar, B.M., Babu, M.S. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. Clin Chim Acta 364: 335-342, 2005.
17. Artym, J., Zimecki, M., Kruzal, M. Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice. Med Sci Monit 10(3):BR84-89, 2004.
18. 표명윤, 현수미, 양기숙. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. 응용약물학회지 9: 194-200, 2001.
19. 마진열, 하창수, 성현제, 지옥표. Cyclophosphamide로 Rat에 유도된 악성빈혈에 대한 숙지황의 증수에 따른 치료효능에 관한 연구. 생약학회지 32(3):325-334, 2005.
20. Zhang, Y., Wu, L.J., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. Acta Pharmacol Sin 25(1):83-89, 2004.
21. Huang, D.M., Guh, J.H., Huang, Y.T., Chueh, S.C., Chiang, P.C., Teng, C.M. Induction of mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer pc-3 cells by evodiamine. J Urol 173(1):256-261, 2005.
22. 정보섭, 신민교. 향약대사전. 서울, 영림사, p 786, 1990.
23. 중앙대사전. 서울, 성보사, p 1118, 1992.
24. 중초약학. 홍콩, 상무인서관, p 299, 1983.
25. 왕본상. 현대중약약리학. 천진, 천진과학기술출판사, p 608, 1997.
26. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Suh, S.I., Shin, S.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Lee, E.S., Kim, K.J., Kim, S.H., Yoo, W.K., Kim, H.J. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted

- Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. J. Ethno 84: 193-198, 2003.
27. 이영선, 권영규, 이금홍, 신상우. 건강 열수출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(2):485-490, 2006.
28. Artym, J., Zimecki, M., Paprocka, M., Kruzel, M.L. Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice. Immunology Letters 89: 9-15, 2003.
29. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev immunol 15: 323-350, 1997.
30. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 357(pt 3):593-615, 2001.