Lab. Anim. Res. 2010: 26(1), 21-29

Laboratory Animal Research
http://submission.kalas.or.kr

In vitro and *in vivo* Antibacterial Activities of *Cinnamomum cassia* Extracts Against *Helicobacter pylori*

Hyun-A Lee[1], Sunhwa Hong[1], Hong-Geun Oh[2], Sang-Ho Park[3], Youn-Chul Kim[4], Gil-Saeng Jeong[5] and Okjin Kim[1]*

[1]*Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, Iksan, Korea*
[2]*Huvet Co. Ltd, Iksan, Korea*
[3]*Korea DNA Valley Co. Ltd, Iksan, Korea*
[4]*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Korea*
[5]*Zoonosis Research Center, Wonkwang University, Iksan, Korea*

Infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is strongly associated with duodenal and gastric ulcers. Substantial epidemiological data has revealed that high rates of *H. pylori* infection might be related to high rates of gastric cancer and gastric adenocarcinoma. In this study, a medicinal herbal plant, *Cinnamomum cassia*, was examined and screened for anti-*H. pylori* activity. Seventy percent ethanol was used for herbal extraction. For anti-*H. pylori* activity screening, inhibitory zone tests as an *in vitro* assay and *in vivo* study using a Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) model were performed. Also, the safety of herbal compounds was evaluated by animal study. As a result of inhibitory zone test, *Cinnamomum cassia* extract demonstrated strong anti-*H. pylori* activities. Also, as results of *in vivo* animal studies, *Cinnamomum cassia* demonstrated strong therapeutic effects against *H. pylori* infection according to the criteria of histological examination and rapid urease test. As results of the safety study, after 28 days treatment of the *Cinnamomum cassia* extract, the animals were not detected any grossly and histological changes. These results demonstrate that it can be successfully cured against *H. pylori* infection and protected from *H. pylori*-induced pathology with *Cinnamomum cassia*. It could be a promising native herb treatment for patients with gastric complaints including gastric ulcer caused by *H. pylori*.

Key words: *Cinnamomum cassia*, *Helicobacter pylori*, antibacterial activity, Mongolian gerbil

(Received 7 February 2010; Revised version received 2 March 2010; Accepted 12 March 2010)

위 점막에 미생물이 존재 한다는 것은 1893년 *Bizzozero*가 개의 위점막에서 spirochetes의 세균을 관찰 보고한 이후로 여러 연구자에 의해서 사람과 동물의 위 점막에서 유사한 세균을 관찰 보고하였으나, 음식으로부터 소화되지 않은 세균으로 생각하고, 병리학적 의미는 없다고 생각하였다(Hahm *et al*., 2001). 그러나 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)가 Marshall과 Warren 에 의하여 최초로 1984년에 만성 위염 환자의 위점막 생검 조직에서 나선형의 만곡형 그람음성 간균(spiral, curved, Gram negative, rod shape bacteria)이 배양되었고, 이후로 급성 및 만성 위염, 소화불량, 흡수장애증, 저산증, 위궤양, 십이지장궤양, 위암, 위림프종에 이르는 각종 소화기 질환의 주요한 원인 인자로 밝혀지고 있다(Hansson *et al*., 1996; Honda *et al*., 1998; Marshall and Warren, 1984).

H. pylori 치료방법으로 3제요법(Triple therapy)이 있는데 이는 bismuth와 tetracyclin 및 metronidazole (MET)을 투여하는 방법이다(Shim *et al*., 2000). 또한 amoxicillin이나 clarithromycin (CLA) 중 한 가지 항생제와 proton pump inhibitor (PPI)를 동시에 투여하는 2제 병합요법, ranitidine bismuth citrate (RBC)와 CLA를 동시에 투여하는 2제요법 등이 소개되었으나 부작용 및 박멸효율성의 문제로 최근에는 추천되지 않는다(Park *et al*., 2000). 현재 *H. pylori* 박멸의 1차 처방에는 bismuth 제제를 포함하는 3제요법, PPI를 포함하는 2제 요법, RBC 제제를 포함하는 3제요법, bismuth를 근간으로 하는 3제요법에 PPI를 추가하는 4제요법 등이 권고 된다(Kim *et al*., 1999; Park *et al*., 2000). 오늘날 *H. pylori* 박멸을 위하여 PPI

*Corresponding author: Okjin Kim, Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, 344-2 Shinyoung-Dong, Iksan, 570-749, Korea.
TEL: +82-63-850-6668
FAX: +82-63-850-7308
E-mail: kimoj@wonkwang.ac.kr

를 기본으로 항생제를 포함한 3제요법이 치료의 주를 이루고 있는데 이와 같은 항생제의 사용은 필연적으로 이들 항생제에 대한 내성률의 증가를 초래하며 우리나라는 서구보다도 높은 내성률을 보이고 있다(Han, 2007; Kim, 2007). 특히 CLA에 대한 내성률은 꾸준하게 증가하고 있는 실정이다(Eun *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). *H. pylori* 감염률 뿐 만 아니라 항생제 내성률이 다른 나라에 비해 상대적으로 높은 우리나라에서 *H. pylori*의 제균 치료율을 높이기 위해서는 지속적으로 항생제 내성을 관찰할 필요가 있다(Kim, 2007).

*H. pylori*가 위궤양 및 위암을 유발하는 심각한 결과와 막대한 경제적 손실을 초래함에도 불구하고 현재 *H. pylori*를 효과적으로 예방할 수 있는 방법은 국내외적으로 전무한 상태이다(Hahm *et al.*, 2001; Kim, 2007). 현재 *H. pylori*에 관한 개발된 대책은 *H. pylori* 감염 진단 후 치료의 형태이며 이 때 사용되는 치료제는 항생제 MET를 주로 사용하고 있는데 이에 대한 내성과 항생제 부작용의 문제가 야기되고 있어 새로운 기전의 예방 및 치료제의 개발이 필요한 실정이다(Eun *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). 새로운 항생제의 개발 분야에서 크게 각광을 받고 있는 것으로 기존 화합물에 기초한 항생제와 연관관계가 먼 천연물 유래의 안전한 항생 물질이 있으며 천연물은 화합물 보다 다양성이 크고 안전하여 천연물 유래 항생 물질의 사용은 높은 안전성과 항생제 내성 문제의 해결 측면에서 큰 장점을 가지고 있다(Koehn and Carter, 2005).

본 연구는 사람에 위암 및 위궤양을 유발하여 심각한 임상결과를 초래하는 *H. pylori*에 효과적인 천연물 유래 항균물질을 개발하고자 수행되었다. 천연물 유래 *H. pylori* 항균제의 개발을 통하여 현재 임상 치료에서 사용되는 항생제의 내성과 부작용문제를 해결할 수 있으며, 안전한 천연물 유래 *H. pylori* 항균물질의 개발로 효과적인 치료 및 예방을 위한 신약 개발의 기초자료를 제공하고자 본 연구가 계획되었다.

재료 및 방법

천연물 계피 추출물 조제

익산시 대학한약국으로부터 구입한 건조된 계피(*Cinnamomum cassia*)를 분쇄기(대성아트론, DA700)로 입자 크기가 30메시 이하가 되도록 분쇄하여 천연물 분말을 수득한 후, 상기에서 수득한 건조된 천연물 분말(1 kg) 질량의 3배(v/w)에 해당하는 증류수를 포함하는 70% 에틸알콜 수용액을 가하여 100°C에서 3시간 동안 환류 냉각 추출하고 여과 및 감압 농축한 후, 동결건조하여 분말상태의 계피 추출물 600 g을 수득하여 실험의 시료로 사용하였다.

H. pylori 배양

H. pylori (ATCC 43504, American Tissue Culture Collection, Rockville, MD) 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종 후, 10% CO_2 및 100% 습도가 유지되는 37°C incubator에서 3일간 배양 하였다. 배양된 *H. pylori*를 멸균된 PBS (pH 7.2)가 들어 있는 튜브에 모은 후, 1 mL당 2.0×10^9 colony-forming unit (CFU)의 균수를 포함하게 준비하여 실험에 사용하였다.

실험동물

식품의약품안전청 실험동물자원과에서 Specific-pathogen free (SPF) 상태로 계통이 유지되고 있는 Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)을 공급받아 원광대학교 동물자원개발연구센터 실험동물사육실(II)에서 1주일 동안 순화사육한 후 실험에 사용하였다. Mongolian gerbil에서 *H. pylori*는 사람의 병태생리와 유사하게 만성으로 진행되어 위염, 위궤양과 위암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Honda *et al.*, 1998). 본 연구자들은 사람의 *H. pylori* 감염 동물모델인 Mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 감염 후 후보물질의 적용에 의한 치료효과를 확인하고자 하였다. 사육기간 중 온도는 23±1°C, 습도 50±5%, 소음 60 phone 이하, 조명시간 08:00~20:00(1일 12시간), 조도 150~300 Lux, 환기는 시간당 10~12회의 환경에서 사육되었으며, 사료는 실험동물 전용사료(샘타코, 한국)를 2.0 Mrad의 방사선으로 멸균시켜 자유급식 시켰으며, 음수는 filter 여과 후 자외선 멸균수를 자유 급수 하였다. 본 연구에 사용된 동물실험에 관련된 모든 실험과정과 절차는 원광대학교 동물실험윤리위원회의 사전심의와 윤리규정을 준수하여 수행 되었다(Approval No. WKU 09-025).

In vitro 헬리코박터 항균 효능 실험

H. pylori 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천 배지 플레이트에 도말(streak)하고 대조를 위한 항생제 디스크 겐타마이신(바이엘동물약품, 한국), 가나마이신(바이엘동물약품, 한국) 및 엔로플록사신(바이엘동물약품, 한국)을 적용용량으로는 각각 0.25, 0.5, 0.25 mg씩 적용하였다. 천연물 추출물 30 mg을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA) 100 μL에 녹여 300 mg/mL 농도로 디스크 여과지에 5 μL씩 10^0 (적용용량 1.5 mg), 10^{-1} (0.15 mg)과 용매대조를 위한 DMSO를 각각 적용하였다. 본 실험에서는 균이 접종된 배지에 멸균된 디스크(지름 0.7 mm)를 배치하고, 이후 10% CO_2, 100% 습도가 유지되는 항온기에서 배양하고 4일 후 평가하였다. 균을 접종한 후 6, 12, 24, 48 및 60시간 후 각각 표준자를 이용하여 clear zone의 지름으로 표현되는 억제범위를 측정하여 균이 자라지 않은 clear zone을 관찰하였다. 디스크

는 각 균주 당 6개씩 검사하여 억제 범위의 평균값을 분석하였다. 결과의 평가는 항생제 디스크 각각의 주변 clear zone 형성 관찰하고 형성된 clear zone의 지름을 측정하여 지름이 클수록 항균 효과가 높은 것으로 판정하였다.

In vivo 헬리코박터 항균 효능 실험

1주일간 순화 사육한 7주령의 건강한 수컷 Mongolian gerbil 40두를 실험에 사용하였다. 각 군당 10두의 동물들을 사용하여 *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 적용군(I군), *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 무처치 적용군(II군) 및 *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 무처치 적용군(IV군)의 4개 군으로 나누어 실험을 수행하였다.

실험에 사용된 7주령 Mongolian gerbil을 12시간 절식시킨 후, I군 및 II군의 동물들은 1 mL 당 2.0×10^9 colony-forming unit (CFU)의 *H. pylori* 균 수가 포함되게 준비된 배양액을 두당 0.5 mL씩 마우스용 존대를 이용하여 경구(p.o.)로 투여하여 *H. pylori* 감염을 유발하였다. III군 및 IV군의 동물들은 12시간 절식 후 멸균 PBS (pH 7.2)를 0.5 mL씩 경구로 투여하였다. 투여 후 각 군의 동물들은 12시간의 절식 후 사료를 급여하였다. 절식 동안에 음수는 자유 급이할 수 있도록 하였다. *H. pylori* 또는 PBS를 투여한 I군과 III군의 동물들은 2주일 후인 9주령부터 계피 추출물을 체중 기준으로 400 mg/kg 용량으로 경구 투여를 4주간, 즉 13주령까지 연일 투여하였다. 이 기간 동안 II군 및 IV군의 동물들은 다른 처치 없이 사료와 음수를 자유 급여하였다.

9주령에서 13주령까지, 즉 *H. pylori* 감염이 유지되는 시점으로부터 4주간의 시험물질 투여 기간, 각 시험군의 동물들은 1주에 1회 체중을 측정하고 실험 종료일인 13주령에 각 개체를 12시간 절식한 후 에테르 마취 하에 안락사 시킨 후 위를 적출하여 육안병변 점수를 구하였다. 또한 신속요소분해효소검사를 통하여 감염 여부를 확인하였으며, 추가적인 병리조직학적 검사를 통하여 조직병변의 점수를 구하여 계피 추출물 투여가 헬리코박터 세균 감염에 미치는 영향을 평가하였다.

위 점막의 육안병변점수(gross lesion score) 산정은 Yam 등(2009)의 방법을 수정하여 수행하였다. 시험방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 각 시험 군별로 시험 종료일에 적출된 위(stomach)는 큰굽이(great curvature)를 따라 절개하여 펼친 후에 실체현미경(×10)을 사용하여 병변을 관찰하고, 육안 병변의 점수를 산정하였다. 육안병변의 점수는 각 병변의 가로길이×세로길이(mm^2)의 총합으로 계산하였다. 각 개체의 점수를 구한 후 각 군별로 평균 점수를 구하였다.

위 점막의 조직병변점수(histological lesion score) 산정은 Yam 등(2009)의 방법을 수정하여 수행하였다. 시험방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 조직병리조직학적 검사를 위하여 적출된 위의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하고, 선위(glandular stomach) 부위를 가로 방향으로 5 mm 간격으로 잘라, 개체 당 3개 부위를 선정하였고, 이 때 선별된 부위들은 다른 개체들 간에 서로 동일한 부위가 되도록 주의하여 선정하였다. 선정된 부위들의 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4 μm 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H & E) 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다. 각 조직 소견의 병변에 대한 평가를 수행하여 0: no lesion, 1: mild, 2: moderate, 3: severe로 등급을 점수로 환산하여 기록하고, 개체당 3개 부위의 점수의 합을 구하여 개체의 병리조직점수를 구한 후, 각 군의 평균 점수를 구하였다.

신속요소분해효소검사(rapid urease test)는 CLO 검사 시약인 ASAN Helicobacter Test (Asan Pharmaceutical Co., Korea)를 이용하여 수행되었다. 무균적으로 적출한 위 날문부위(pyloric region) 점막의 조직을 채취하여 ASAN Helicobacter Test에 각각을 넣고 제조회사의 설명서에 따라 배양하여 노란색 배지가 적색으로 변하는 경우를 양성으로 판정하였다. 검사과정을 간략히 설명하면 미리 실온에 방치한 시약을 노란색 한천 겔이 보이도록 스티커를 벗긴 후 무균 바늘을 사용하여 위점막 조직을 겔 속에 밀어 넣고 스티커를 다시 덮은 후 동물번호와 시간을 기입하고 incubator를 이용하여 37°C로 12시간 배양 후에 판독하였다. 판독의 결과 노란색에서 적색으로 배지의 색깔이 바뀐 경우를 양성으로 판정하였다. 실험 종료 후 양성 판정된 개체의 수를 백분율로 구하여 양성율(positive percent)을 구하였고 음성 개체수를 군 전체수로 나누어 백분율을 구하여 치료율(therapeutic percent)을 구하였다.

계피추출물의 독성 평가 실험

계피 추출물을 오랜 기간 섭취함으로 인해 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위한 독성 평가 실험을 수행하였다. 실험은 9주령 수컷 Mongolian gerbil을 사용하여 수행되었으며, 28일 동안 매일 400 mg/kg 용량으로 시험물질을 경구 투여하였다. 실험 종료일 에테르 마취하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 후, 대뇌(cerebrum), 소뇌(cerebellum), 연수(pons), 고환(Testis), 심장(heart), 간(liver), 폐장(lung), 신장(kidney), 근육(muscle), 비장((Spleen), 전립선(prostate), 췌장(pancreas), 흉선(thymus), 부신(adrenal gland), 소장(small intestine), 대장(large intestine), 골수(bone marrow), 갑상선(thyroid gland) 및 정낭(seminal vesicle)을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하였다. 고정이 완료된 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파

라핀 포매한 후, 4 μm 두께로 절편하여 H & E 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다.

통계학적 분석

각 시험군의 양성률에 대한 통계는 Repeated *Measured* ANOVA SPSS v.12 USA (Duncan's 사후검정)을 실시하였으며 $P<0.05$ 이하 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다. Rapid urease 검사인 CLO test의 각 시험 군의 양성율과 치료율에 대한 95% confidential interval (CI)이 MINITAB software (Minitab Inc., USA)를 사용하여 구해졌다. 각 군의 양성률에 대한 CI가 차이가 있으면 통계적으로 유의한 것으로 판단되었다.

결 과

In vitro 헬리코박터 항균 효능 실험 결과

H. pylori 세균 배양 플레이트에 적용한 대조 항생제 디스크들과 계피 추출물을 적용한 후 37°C incubator에서 추가 배양 하면서 적용 디스크 주변 clear zone의 지름 크기를 측정한 결과 각각의 디스크 주변에 *H. pylori* 세균 이 증식하지 못하는 clear zone을 관찰할 수 있었다 (Figure 1). 실험결과 Table 1과 같이 적용 후 12시간째 가장 큰 clear zone의 지름을 관찰할 수 있었는데, DMSO의 경우 clear zone크기를 관찰할 수 없었고 대조군으로 사용된 gentamycin의 경우 10 mm, ganamycin 9 mm, enrofloxacin 15 mm이었으며, 계피 추출물 1.5 mg 적용에 의하여 14 mm, 계피 추출물 0.15 mg 적용에 의하여 10 mm이었다(Figure 1). *H. pylori* 균주를 가지고 계피의 항균 감수성을 관찰한 결과, 계피 추출물은 대표적 항생제로 널리 알려진 겐타마이신, 가나마이신 보다도 우수한 수준의 억제 범위를 보였으며 3세대 항생제인 엔로플록사신과 유사한 정도의 억제범위를 보였다.

In vivo 헬리코박터 항균 효능 실험 결과

계피 추출물을 *H. pylori* 세균 감염 및 비감염 동물에 투여한 후, 체중변화를 확인한 결과 Table 2와 같은 결과를 얻었다. *H. pylori* 세균 감염 후 계피 추출물 투여군은 비투여군인 II군에 비교하여 유의한 체중 증가를 보였다($P<0.05$).

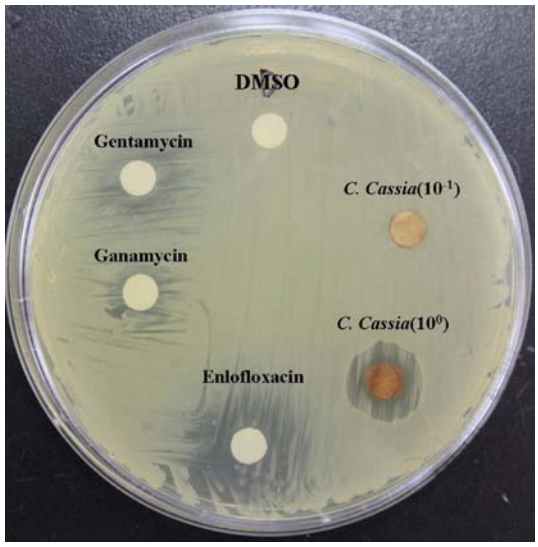

Figure 1. The anti-*H. pylori* activities of *Cinnamomum cassia* extract using the paper disk diffusion bioassay. The diameter of clear zone reveals anti-*H. pylori* activities of the inoculated materiel. *C. cassia* (10^0): *Cinnamomum cassia* extract 1.5 mg, *C. cassia* (10^{-1}): *Cinnamomum cassia* extract 0.15 mg.

육안병변점수 산정을 위하여 계피 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물에 투여한 후, 위점막의 육안병변을 검사한 결과 *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 무처치 적용군(II군)은 위점막에 다수의 궤양 소견이 관찰되었으나 계피추출물 적용군(I군)은 위궤양 소견이 거의 관찰되지 않았다(Figure 2). 위 육안병변점수를 계산한 결과 *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 무처치 적용군(IV군)의 경우에 위궤양 병변이 관찰되지 않아 육안점수 0의 값을 얻었다. 반면, *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 무처치 적용군(II군)은 85±15.5의 육안점수를 보여 *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 적용군(I군)의 12±2.0 보다 유의한 변화를 보였다 ($P<0.05$).

병리조직점수 산정을 위하여 계피 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물에 투여하고 위점막의 조직병리 병변을 검사한 결과 *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 무처치 적용군(II군)은 위점막 상피세포의 변성과 위축 소견이

Table 1. Anti-*H. pylori* activities of *Cinnamomum cassia* extract using the paper disk diffusion bioassay

Treatment		Clear zone (mm)				
		6 hrs	12 hrs	24 hrs	48 hrs	60 hrs
DMSO		0	0	0	0	0
Gentamycin		5	10	8	8	7
Ganamycin		5	9	8	7	7
Enrofloxacin		10	15	13	12	9
Cinnamomum cassia	10^0 (1.5 mg)	10	14	12	12	10
	10^{-1} (0.15 mg)	5	7	6	6	5

Table 2. Results of body weight changes of anti-*H. pylori* activities of *Cinnamomum cassia* extract using *in vivo* study

Group	Treatment	Body weights (gram)				
		O w.p.i.[a]	1 w.p.i.	2 w.p.i	3 w.p.i	4 w.p.i
I	*H. pylori*+Cinnamomum[b]	135.5± 2.05	137.0± 2.55	141.0± 2.00*	144.5± 3.55*	146.0± 1.55*
II	*H. pylori*+PBS	135.5±4.00	135.0± 3.00	136.0± 2.55	136.5± 2.55	137.0± 1.55
III	PBS+Cinnamomum	135.0± 5.10	141.0± 4.25	145.0± 4.00*	149.5± 2.55*	153.0± 2.40*
IV	PBS+PBS	135.5± 4.15	139.0± 3.55	144.0± 3.15*	148.0± 2.30*	152.0± 2.00*

[a]Weeks post inoculation. Treatment weeks with test materials after *Helicobacter pylori* infection.
[b]*Cinnamomum cassia* treatment was continuously inoculated with 400 mg/kg dose during 4 weeks after *Helicobacter pylori* infection.
*Significantly different from the positive control Group II (P<0.05).

Figure 2. Gross findings of the stomach in the study on therapeutic effects of *H. pylori* infection with *Cinnamomum cassia* extract. A: *H. pylori*+*Cinnamomum cassia*, B: *H. pylori*+PBS (black arrow: ulcer lesions), C: PBS+*Cinnamomum cassia*, D: PBS+PBS.

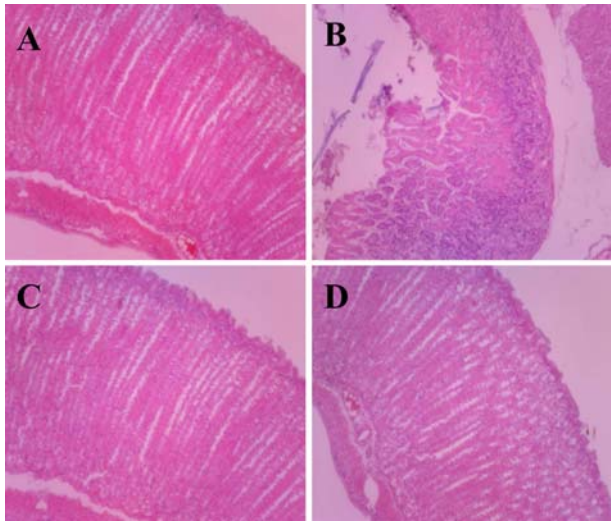

Figure 3. Histopathological findings of the stomach in the study on therapeutic effects of *H. pylori* infection with *Cinnamomum cassia* extract. A: *H. pylori*+*Cinnamomum cassia*, B: *H. pylori*+PBS (Cellular degeneration and atrophy in the mucous layer), C: PBS+*Cinnamomum cassia*, D: PBS+PBS.

관찰되었으나 계피 추출물 적용군(I군)과 *H. pylori* 세균 비감염 동물들인 III군과 IV군의 동물들에서는 특이 변화를 관찰할 수 없었다(Figure 3). 위 조직병변점수를 계산한 결과 *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 적용군(III군), *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 무처치 적용군(IV군)의 경우에 병리조직학적 병변이 관찰되지 않아 육안점수 0의 값을 얻었다. 반면, *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 무처치 적용군(II군)은 7.5±0.55의 육안점수를 보여 *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 적용군(I군)의 1.5±0.25 보다 유의한 변화를 보였다(P<0.05).

신속요소분해효소검사는 계피 추출물을 *H. pylori* 세균 감염과 비감염 동물에 투여하고 *H. pylori* 세균의 치료에 의한 제거 효과를 확인하기 위하여 수행되었으며, 실험결과는 Table 3과 같았다. 신속요소효소분해검사인 CLO test의 결과는 검체에 감염된 헬리코박터 세균 성장 시 요소분해와 제공된 배지의 요소와의 반응 결과로 유도되는 색깔 변화로 감염 여부를 손쉽게 알 수 있는 방법이다. 신속요소분해효소검사를 이용하여 위 점막에 *H. pylori*가 존재하는 경우에 검사시약의 배지에서 균이 증식하면서 요소분해효소를 분비하게 되어 검사시약에 존재하는 요소를 가수분해 시키며 암모니아를 생성하여 시약의 전체 pH가 상승하게 되고 검사시약에 포함되어있는 pH 지시약이 발색하여 적색으로 색깔의 변화가 일어나 손쉽게 결과를 판정할 수 있었다. 신속요소분해효소검사가 검사에 제출된 위점막 *H. pylori*의 존재유무를 판정하는 정성적 자료만 제공하고 정확한 정량적인 정보를 제공하는 목적으로 고안되지는 않았지만, *H. pylori*의 세균 수가 많으면 배양 시 보다 많은 요소분해효소가 배출되기 때문에 검사 시약의 기질을 보다 짧은 시간에 분해하여 강한 적색의 발색 반응을 보이기 때문에 발색 시간의 차이, 발색 정도의 차이로 간접적인 세균의 수 차이를 비교할 수 있었다(Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). 실험결과, *H. pylori* 감염 없이 계피 추출물 적용군(III군), *H. pylori*

Table 3. Results of rapid urease test with gastric mucosal tissues after the study on therapeutic effects of *H. pylori* infection with *Cinnamomum cassia* extract

Group	Inoculation[a]		N	Positive reaction (Positive percent)[b]	Therapeutic No. (Therapeutic percent)
	H. pylori	Treatment			
I	Yes	Cinnamomum	10	0* (0 %, CI[c] 0-25.9)	10* (100 %, CI 74.1-100)
II	Yes	PBS	10	10 (100 %, CI 74.1-100)	0 (0 %, CI 0-25.9)
III	No	Cinnamomum	10	0* (0 %, CI 0-25.9)	-
IV	No	PBS	10	0* (0 %, CI 0-25.9)	-

[a]Treatment was conducted daily during 4 weeks after *H. pylori* infection.
[b]The positive percent revealed *H. pylori* colonization, which was observed as red color change from yellow color medium.
[c]Incidence percentage (95% confidential interval) was calculated with MiniTab statistic software program.
*Significantly different from the positive control Group II (P<0.05).

감염 없이 계피 추출물 무처치 적용군(IV군)의 경우에 신속요소분해효소검사에 의하여 *H. pylori* 세균에 음성 결과를 보였다. 반면, *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 무처치 적용군(II군)은 10마리 개체 모두에서 강한 적색의 *H. pylori* 세균 양성반응이 검출되었다. *H. pylori* 감염 후 계피 추출물 적용군(I군)은 10두 모두에서 음성의 결과를 보여 *H. pylori* 감염 양성대조군 II군과 유의한 변화를 보였다(P<0.05).

계피 추출물에 의한 독성 평가 결과

계피 추출물을 오랜 기간 섭취함으로 인해 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위해 9주령 수컷 Mongolian gerbil을 사용하여 28일 동안 매일 400 mg/kg 용량으로 시험물질을 경구 투여하고 계피의 독성 발현 유무를 평가한 결과 대조군 및 계피 추출물 투여군의 모든 개체에서 폐사 또는 특이 임상증상은 관찰되지 않았다. 실험 종료일 에테르 마취하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 결과 유의한 병변은 관찰할 수 없었다. 또한. 대뇌(cerebrum), 소뇌(cerebellum), 연수(pons), 고환(Testis), 심장(heart), 간(liver), 폐장(lung), 신장(kidney), 근육(muscle), 비장((Spleen), 전립선(prostate), 췌장(pancreas), 흉선(thymus), 부신(adrenal gland), 소장(small intestine), 대장(large intestine), 골수(bone marrow), 갑상선(thyroid gland) 및 정낭(seminal vesicle)의 병리조직학적 검사에서도 별다른 세포손상은 관찰되지 않았다.

고 찰

현재까지 *H. pylori*에 의한 위암의 발병 과정은 정확히 밝혀져 있지는 않았지만 최근의 보고에 의하면, *H. pylori*에 감염된 경우 위점막 상피세포의 증식 능력이 현저히 증가되고 발암과 관련 있는 단백질이 과잉 생산되는 것과 관련되는 것으로 추정되고 있다(Hibi *et al.*, 1997). 또한, *H. pylori* 감염은 위 점막 세포 손상 유발과 손상 후 세포 재생 과정에 유전자의 mismatch repair를 야기하고, 그 과정 중에 *H. pylori*의 활성산소 라디칼, 질소 화합물 등이 복합적으로 작용하여 위암을 유발하는 것으로 추정되고 있다(Hibi *et al.*, 1997). *H. pylori* 감염에 의해 일어나는 염증반응과 대식세포 작용에 의해 생성 되는 반응성이 높은 유리산소에 의해 표피세포의 DNA를 손상시켜 위암 발생이 야기될 수도 있고, 위상피세포는 *H. pylori*와 반응하여 interlukin (IL)-8과 같은 chemokin과 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 일련의 염증성 매개체를 활성화시키고, 최종적으로 apoptosis 과정을 밟게 된다(Jung *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000). 그리고 사람 호중구와 림프구에서도 *H. pylori* 감염에 의해 친염증성 cytokine이 발현될 수 있음이 증명되고 있다(Bamford *et al.*, 1998; Ihan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). 한국인의 연간 위암 발생율은 10만 명당 남성 57.9와 여성 25.1로 보고되고 있으며, 이는 다른 나라의 위암 발생율에 비교하여 매우 높은 수치임을 알 수 있다. 위암은 그 임상적 결과가 심각하여 한국 성인 사망률의 주요 원인 중의 하나로 보고되고 있다(Ahn *et al.*, 1991). *H. pyori*의 유병율은 한국인에서 8살에 80%, 20살 이상에서는 90%를 보이는 것으로 보고되고 있다(Jung *et al.*, 2000). 이러한 자료들에 의하면 대부분의 한국인들은 *Helicobacter*에 감염되어 있으며, 평균 40-45년 이상의 생애 동안, *H. pylori*에 감염된 상태로 지낸다는 것을 알 수 있다. 또한 국내의 높은 위암 발생율은 *H. pylori*의 높은 유병율과 연관된 결과임을 알 수 있다(Jung *et al.*, 2000). 이러한 연구 결과들에 의하면 *H. pylori*는 위암의 유발 인자로서 *H. pylori* 치료 및 감염대책 마련이 시급한 것을 알 수 있다.

지금까지 많은 항생제들이 *H. pylori*에 대해 우수한 항균효과가 있음에도 불구하고 단일 항생제 및 복합치료 성공하지 못하고 있고, 항생제 투여에 의한 내성 균주 출

현 및 위내에서의 약물의 침투성과 치료 후에 성장이 억제되었던 균의 재증식 등의 문제가 존재한다(Harris, 1997). 항균제내성은 *H. pylori* 제균 실패의 주요 원인이다. 일반적으로 일차 제균치료제로는 PPI, amoxicillin (AMX), CLA 또는 MET 삼제요법이 권장되지만, 국내의 MET 내성률이 25.8-66.2% 정도로 보고되고 있다(Eun *et al*., 2003; Kim *et al*., 2004; Lee *et al*., 2005). 국내의 CLA 내성률은 2.5-13.8%로 보고되어 있다. 해당 지역에서 또는 특정 환자군에서 CLA에 대한 원발성 내성률이 15%가 넘으면 경험적인 일차치료제로 CLA 사용이 어렵다(Lee, 2002; Eun *et al*., 2003). 이러한 제균율의 감소에 가장 많은 영향을 미치는 요인은 항생제 내성으로서 이 중 CLA을 제외한 나머지 항생제들에 대한 MIC 기준이 국제적으로 합의되지 않았기 때문에 실험실마다 비교가 어려운 실정이나 국내 한 연구기관에서의 지속적인 연구에 의하면 AMX와 CLA은 1987년에는 0%의 내성율에서 2003년에는 각각 18.5%와 13.8%으로 내성율이 증가하였으며 MET도 52.9%에서 66.2%로 내성율이 증가했음을 알 수 있다(Wouden *et al*., 1999). 이러한 항생제 내성의 대안으로서 천연물 유래 항균 효능 물질의 개발이 새로운 대안으로 제시되고 있다. 약용식물은 인류의 역사가 시작된 이래, 오래 전부터 민간요법적인 치료제로 사용되어 왔으며, 최근에는 분자약물학의 급속한 진보에 따라 수많은 천연 항균제가 현대 의약품으로 적용되는 수준에 도달하였다(Lim *et al*., 2002). 현재 항생제 내성 및 다제내성 세균의 증가로 치료가 어려운 경우가 많아졌으며, 앞으로 세균감염 치료가 더욱 어려워 질 것으로 세계적인 전문가들이 예측하고 있다(Kunin, 1993). 이에 따라 다제내성균에 대하여 항균효과를 가지는 새로운 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 학계와 산업계에서는 새로운 항생물질인 천연항생제 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(Lim *et al*., 2002).

*H. pylori*가 위궤양 및 위암을 유발하는 심각한 결과와 막대한 경제적 손실을 초래함에도 불구하고 현재 *H. pylori*를 효과적으로 예방할 수 있는 방법은 국내외적으로 전무한 상태이다. 현재 *H. pylori*에 관한 개발된 대책은 *H. pylori* 감염 진단 후 치료의 형태이며 이 때 사용되는 치료제는 항생제 MET를 주로 사용하고 있는데 이에 대한 내성과 항생제 부작용의 문제가 야기되고 있어 새로운 기전의 예방 및 치료제의 개발이 필요한 실정이다. 본 연구에서 항균효능이 기대되는 계피 추출물의 anti-*H. pylori* 효능을 *in vitro* 실험에서 확인하였다. 또한 계피 추출물을 이용하여 실험동물을 이용한 *in vivo H. pylori* 감염치료 효능 연구를 수행한 결과 계피 추출물은 *H. pylori* 감염을 억제하고 감염에 의한 병변을 완화시켜주는 것을 알 수 있었다. 계피 추출물을 적용한 *H. pylori* 감염에 대한 *in vivo* 치료효과 실험결과 위 점막의 *H. pylori* 제거 효과는 rapid urease CLO test결과로 확인할 수 있었다.

녹나무과(Lauraceae)에 속하는 육계(*Cinnamomum cassia Blume*) 또는 기타 동속 근연식물의 어린 가지 수간피(stem bark)를 건조한 전통한약재인 계피는 예로부터 온중산한(溫中散寒), 보명문화(補明門火), 온후기혈(溫厚氣血), 지통(止痛)의 효능이 있고, 온리거한(溫裏祛寒) 하는 작용이 뛰어나 하초(下焦)에 작용하여 신양(腎陽)을 보(補)하는 작용을 가진다고 알려져 있어, 기능성 식품 및 한약제로 다양하게 사용되고 있다(Sung, 2009). 계피에는 cinnamaldehyde가 50%로 가장 많이 함유되어 있으며, 이외에도 cinnamic acid, benaenpropranal, benaenpropranal, borneol, benzaldehyde, camphene, coumarin, β-sitosterol, choline, vanillic acid, protocatechuic acid 등이 분리 보고되어 있다(Zhu, 1998). 현재까지 골다공증 치료효과(Lee and Choi, 2006), 면역활성 효과(Shan *et al*, 1999), amphotericin B 의 항진균효과의 증가효과(Giordani *et al*, 2006), 항균효과(Jung *et al*., 1998a; Jung *et al*., 1998b; Mau *et al*., 2001), 진경효과(Zhu *et al*., 1998), 항산화 효과(Lin *et al*., 2003; Prakash *et al*., 2007). 항알레르기 효과(Park and Go, 2001) 등 매우 다양한 계피 추출물의 약효가 동물 및 임상실험을 통해 알려져 있다. 특히, 근래에 들어 계피의 항산화 효과에 대한 연구가 증가되고 있다(Lin *et al*., 2003; Prakash *et al*., 2007). 또한 최근 항산화 활성을 나타내는 물질들이 역류성 식도염에도 양호한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Rao and Vijayakumar, 2008). 그러나 현재까지 계피의 anti-*H. pylori* 효능에 대한 보고는 없었다. 본 연구 결과 계피는 *in vitro*와 *in vivo* 실험 둘 다에서 우수한 anti-*H. pylori* 효능이 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구 결과는 계피의 anti-*H. pylori* 효능에 대한 최초 보고이다. 또한, 우수한 *anti-H. pylori* 효능을 확인한 계피 추출물에 대한 28일 투여 안전성 평가를 수행한 결과, 계피 추출물의 400 mg/kg 연일 투여에 의하여 유의한 독성 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 계피 추출물은 안전성이 높은 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합한다면, 항생제 내성문제가 없으며 섭취에 안전성이 높은 천연물 유래 *H. pylori* 항균물질로서 계피 추출물은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 모두 우수한 anti-*H. pylori* 효능이 확인되었기 때문에 향후 *H. pylori* 치료제 개발의 우수한 후보물질로서 이용 될 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 전라북도의 지방기술혁신사업 연구비 지원(MOCIE grant No. RTI05-03-02)에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다. 또한 본 연구의 수행 동

안 기술적인 지원을 아끼지 않은 원광대학교 동물자원개발연구센터(Center for Animal Resources Development)의 한상준 연구원의 수고에 감사 드립니다.

참고문헌

Ahn, Y.O., Park, B.J., Yoo, K.Y., Kim, N.K., Heo, D.S., Lee, J.K., Ahn, H.S., Kang, D.H., Kim, H., Lee, M.S. and Park, T.S. (1991) Incidence estimation of stomach cancer among Koreans. *J. Kor. Med. Sci.* 6, 7-14.

Bamford, K.B., Fan, X. and Crowe, S.E. (1998) Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114, 482-492.

Eun, C.S., Han, D.S., Park, J.Y., Jeon, Y.C., Hahm, J.S., Kim, K.S. and Kang, J.O. (2003) Changing pattern of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korean peptic ulcer diseases. *J. Gastroenterol.* 38, 436-441.

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J. and Portugal, H. (2006) Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phyother. Res.* 20, 58-61

Hahm, K.B., Lee, K.M., Kim, Y.B., Han, S.U. and Kim, M.W. (2001) Animal models of *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Gastroenterol.* 37, 399-405.

Han, D.S. (2007) Treatment of *H. pylori* infection and current status of vaccine development. *Hanyang Med. J.* 27, 81-95.

Hansson, L.E., Nyren, O., Hsing, A.W., Bergstrom, R., Josefsson, S., Chow, W.H., Fraumeni, J.F. and Adami, H.O. (1996) The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* 355, 242-249.

Harris, A. (1997) Treatment of *Helicobacter pylori*. *Drugs In Today.* 33, 59-66.

Hibi, K., Mitomi, H., Koizumi, W., Tanabe, S., Saigenj, K. and Okayasu, I. (1997) Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Patho.* 108, 26-34.

Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A. and Nasu, M. (1998) Development of *Helicobacter pylori* induced-gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res.* 58, 4255-4259.

Ihan, A., Tepez, B., Gubina, M., Malovrh, T. and Kopitar, A. (1999) Diminished interferon-â production in gastric mucosa T lymphocytes after *Helicobacter pylori* eradication in duodenal ulcer patients. *Hepatogastroemterology* 46, 1740-1745.

Jung, H.C., Kim, J.M., Song, I.S. and Kim, C.Y. (1997) *Helicobacter pylori* induces an array of proinflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8,-1α/β, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-α. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 473-480.

Jung, E.T., Park, M.Y., Lee, E.W., Park, U.Y. and Jang, D.S. (1998a) Antimicrobial characteristics against spoilage microorganisms and food preservative effect of Cinnamon (*Cinnamomum cassis* Blume) bark extract. *J. Life Sci.* 8, 648-653.

Jung, E.T., Park, M.Y., Lee, J.K. and Jang, D.S. (1998b) Anitimicrobial activity and antimutagenesis of Cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) bark extract. *J. Food Hygiene Safety* 13, 337-343.

Jung, T.S., Kang, S.C., Choi, Y.J., Jeon, B.S., Park, J.W., Jung, S.A., Song, J.Y., Choi, S.H., Park, S.G., Choe, M.Y., Lee, B.S., Byun, E.Y., Baik, S.C., Lee, W.K., Cho, M.J., Youn, H.S., Ko, G.H. and Rhee, K.H. (2000) Two-dimensional gel electrophoresis of *Helicobacter pylori* for proteomic analysis. *J. Bacteriol. Virol.* 35, 97-108.

Kim, B.W., Choi, M.G., Choi, H., Moon, S.B., Kim, B.K., Chae, H.S., Kim, J.K., Chung, I.S., Chung, K.W., Sun, H.S. and Park, D.H. (1999) Pooled analysis of antibiotic therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Korea. *Korean. J. Gastroenterol.* 34, 42-49.

Kim, J.M. (2007) Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Hanyang Medical Reviews* 27, 80-95.

Kim, J.M., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I.S. and Kim, C.Y. (2000) Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor-alpha and soluble Fas ligands. *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 40-48.

Kim, J.M., Kim, J.S., Jung, H.C., Kim, N., Kim, Y.J., Song, I.S. (2004) Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4843-4847.

Koehn, F.E. and Carter, G.T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206-220.

Kunin, C.M. (1993) Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. *Ann. Intern. Med.* 118, 557-561.

Lee, J., Kim, S.M., Im, E.H., Choi, Y.W., Kim, Y.M., Kim, P.S. and Lee, J.H. (2005) The prevalence of antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolated in Daejeon. *Korean J. Clin. Microbiol.* 8, 47-50.

Lee, J.U., Kim, S.H., Park, T.W. and Kim, O.J. 2006. Establishment of Ethanol-pretreation animal model to study *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Vet. Res.* 46, 327-355.

Lee, J.U., Kim, S.H., Park, T.W. and Kim, O.J. 2007. Elder ages decreases the susceptibility for *Helicobacter pylori* infection in an animal model. *Korean J. Vet. Res.* 47, 77-84.

Lee, J.Y., Kim, W., Gawk, G.Y., Park, S.C., Ye, B.D., Lee, S.H., Kim, S.G., Kim, J.S., Jun, H.C. and Song, I.S. (2002) Reinfection rate and clinical manifestation of *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer disease after triple therapy containing clarithromycin. *Korean J. Gastromterol.* 39, 93-100.

Lee, K.H. and Choi, E.M. (2006) Stimulatory effects of extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia* blume on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytother. Res.* 20, 952-960.

Lim, T.H., Lee, J.M. and Cha, B.J. (2002) Antifungal activity and identification of an *Actinomycetes straun* isolated from mummified peaches. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 161-166.

Lin, C.C., Wu, S.J., Chang, C.H. and Ng, L.T. (2003) Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia*. *Phytother. Res.* 17, 726-730.

Marshall, B.J. and Warren, J.R.. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.

Mau, J., Chen, C. and Hiseh, P. (2001) Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus. *J. Agric. Food Chem.* 49, 183-188.

Park, H.J., Kim, J.W., Lee, J.H., Shin, J.H. and Yu, K.A. (2000) Detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. *Korean J. Gastroenterol.* 47, 459-461.

Park, G.H. and Go, D.S. (2001) Anti-allergic compound isolated from *Cinnamomum cassia*. *J. Korean. Soc. Appli. Biol. Chem.* 44, 40-42.

Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G. and Singh, B.N. (2007) Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58, 18-28.

Rao, C.V. and Vijayakumar, M. 2008. Effect of quercrtin, flavonoids and alpha-tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 233-238.

Shan, B.E., Yoshida, Y., Sugiura, T. and Yamashita, U. (1999) Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes *in vitro*. *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 149-159.

Shim, S.G., Kim, J.J., Kim, Y.H., Sung, I.K., Son, H.J., Lee, K.T., Rhee, P.L., Koh, K.C., Paik, S.W., Rhee, J.C., Choi, K.W., Kim, C.S., Choi, M.S., Ryu, K.H., Lee, H.Y., Heo, J.S. and Noh, J.H. (2000) One-week triple therapy for *Helicobacter pylori* a prospective, randomized study. *Korean J. Gastroenterol.* 35, 16-22.

Sung, K.C. (2009) Effect of *Cinnamomi Cortex* aqueous extracts on reflux esophagitis induced by ligation of the pylorus and forestomach in rats. *Kyungpook National University.* 1-101

Wouden, E., Thijs, J., Zwet, A., Sluiter, W. and Kleibeuker, J. (1999) The influence of *in vitro* nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1751-1759.

Yam, M.F., Ang, L.F., Salman, I.M., Ameer, O.Z., Lim, V., Ong, L.M., Ahmad, M., Asmawil, M.Z. and Basir, R. (2009) Orthosiphon stamineus leaf extract protects against ethanol-induced gastropathy in rats. *J. Med. Food* 12(5), 1089-1097.

Zhu, Y.P. (1998) *Chinese materia medica chemistry, pharmacology and applications.* pp. 353-356, Harwood Academic Publshers, The Netherlands.