

대황의 모상근 배양조직 추출물의 세포독성

황성진[†]·김재헌^{*}·나명석^{**}·황백^{***}

동신대학교 식품생물공학과, *임업연구소,
광주여자대학교 생명과학부, *전남대학교 생물학과

Cytotoxic Effects of Extracts from Hairy Roots of *Rheum undulatum* L.

Sung Jin Hwang[†], Jae Hun Kim^{*}, Myung Suk Ra^{**}, and Baik Hwang^{***}

Dept. of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju

*Korean Forestry Research Institute

**Dept. of Life Sciences, Kwangju Women's University, Kwangju

***Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju, Korea

ABSTRACT : The purpose of this research was to investigate the effects of extracts from cultured hairy roots of *R. undulatum* on human kidney epithelial cells. The cytotoxicity was measured by colorimetric assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), neutral red (NR) and sulforhodamine protein B (SRB) with human kidney epithelial cell lines A498. MTT, NR and SRB quantities decreased proportionally in cultured A498 cells treated with the water or chloroform extracts of cultured hairy roots at increasing concentrations. These results suggest that extracts of cultured hairy roots are cytotoxic on human epithelial cells. The cytotoxicity of chloroform fraction was stronger than that of water fraction. The values of MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀ of the extracts of chloroform fraction and those of water fraction were measured to be 289.3 μ g/ml, 302.7 μ g/ml, 433.8 μ g/ml and 475.8 μ g/ml, 428.3 μ g/ml, 549.5 μ g/ml in A498 cell line.

Key words : *Rheum undulatum*, hairy root cultures, cytotoxicity, MTT, NR, SRB

서 언

식물체로부터 생합성되는 천연물질 중 대부분은 식물 자신의 방어나 생식과 같은 생명현상을 유지하는 수단으로 사용되어 진다. 대부분이 이차대사 경로를 통하여 합성되어지는 이와같은 물질은 인간 생활에 있어서 의약품 제재나 살충제, 식품첨가제

등으로 이용되고 있다(Balandrin, 1985). 그러나 고등식물 유래 약리물질의 획득을 위해 사용하는 자연채취는 재배의 어려움, 인건비의 상승, 기후변화나 토질에 따른 생산성의 변화와 같은 제한 요인들이 문제가 되고 있다.

대황(*Rheum undulatum* L.)은 18세기 이후 유럽 및 아시아지역에서 민간요법에 의한 치료제로 널리

[†] Corresponding author (Phone) E-mail : 061-330-3225, Sungjhwang@hanmail.net

Received Jan. 13, 2001

사용하여 왔으며 고대 중국에서는 산해경에 명약으로 기재되어 단방 또는 복방용 재료로 이용되고 있다. 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료 등에 이용되고 있으며, 진정, 지혈, 구충, 항균, 항종양, 혈압강하 등의 효과가 알려져 있다(Zhu, 1998). 이상과 같이 주요한 전통 약용식물로서 간주 되어온 대황은 실제로 신장질환을 포함한 다양한 약효를 지녀 여러 가지 증상에 사용될 수 있으나 그 자체의 독성과 부작용을 최소화하기 위해서는 적정 처리 농도가 설정 되어야 한다. 아울러 대황으로부터 이와같은 약리물질을 생산하기 위해서는 자연 채취 보다는 기내(*in vitro*)에서 탈분화된 세포를 유도하고 이로부터 물질합성능이 높은 세포주를 선발하여 다양한 배양조건 하에서 특정 물질을 생산 하는 방법이 바람직 할 수 있다(Buitelaar and Tramper, 1992). 그러나 이와같은 탈분화된 세포는 뿌리와 같은 기관 배양체에 비해 특정 물질의 합성능이 불완전하고 전혀 이루어지지 않은 경우가 많다(Flores et al., 1987; Charwood and Rhodes, 1990).

본 연구에서는 탈분화된 세포가 아닌 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 빠른 성장과 화학적 전형성을 나타내는 모상근을 유도하고 이와같은 형질전환된 뿌리를 유용물질의 생산에 활용하고자 하였다. 아울러 이와같은 모상근 배양체로부터 분리한 추출물에 대한 세포독성검사를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 모상근 배양

대황(*Rheum undulatum* L.)의 모상근은 기내에서 배양된 유식물체의 조직 절편과 *Agrobacterium rhizogenes* 15834를 공조배양하는 방법(황 등, 2000)으로 유도 하였으며, 고행배지에서 배양된 생체시료 약 0.05 g을 50 ml WPM 배지(Lloyd and McCown, 1987)가 들어있는 100 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 rotary shaker에서 100 rpm으로 배

양(25±1℃, 암상태) 하였다. 배양체는 3주 간격으로 계대배양하였으며 배양 12주 후 회수하여 시료로 사용하였다.

2. 표준엑스 제조

배양된 대황 모상근을 증류수로 3회 세척한 다음 36시간 냉동 건조시켰다. 건조시료는 막자사발에서 분쇄한 다음 분말 5 g을 80% 메탄올에서 3회 환류 추출하였다. 추출물은 여과 후 감압 농축하고 증류수를 가하여 현탁시킨 후 분액여두에 넣고 동량의 클로로포름을 가하여 분획시켰다. 클로로포름층은 회수하고 수층에 다시 동량의 클로로포름을 가하여 분획하는 방법으로 2회 반복하여 시행하였다. 클로로포름층은 50℃에서 농축 건조시켰으며 수층은 감압 농축한 후 동결 건조하여 수층분획으로 하였다.

3. 세포배양

실험에 사용된 세포주는 human kidney epithelial cell A498로 한국세포균주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다. A498 세포주의 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.), antibiotics, fungizone (Gibco, U.S.A.)을 혼합하여 사용하였다. 세포배양은 5% CO₂로 조정된 배양기(Forma Scientific, U.S.A.)내에서 37℃로 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하였다. 배양된 세포는 1 X trypsin-EDTA(Gibco, U.S.A.)로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 hemacytometer로 세포수를 산정하였다.

4. MTT assay

Mosmann (1983)의 방법에 따라 A498 세포를 5×10⁴ cells/well이 되도록 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후 대황의 모상근의 분획별 추출물(1, 10, 50, 100 µg/ml)이 첨가된 배양액으로

옮겼다. 24시간 배양한 다음 배양액을 버리고 MTT 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 배양액에서 다시 배양하였다. MTT 첨가 배지에서 3시간 배양 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO ; Sigma, U. S. A)를 100 μl 씩 넣어 5분간 실온 방치한 다음 ELISA reader (Bio-Tek. Inc., U. S. A)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Neutral red(NR) assay

Borenfreund 와 Purener (1984)의 방법에 따라 A498 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 well plate에 분주하여 24시간 배양 한 후 분액별 대항 모상근 추출물(1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 교체하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 neutral red를 3시간 동안 처리하였다. PBS으로 배양세포를 세척한 다음 1% formaldehyde-1% CaCl_2 (200 $\mu\text{l}/\text{well}$)를 넣어 세포를 고정하고, 1% glacial acetic acid-50% ethanol (200 $\mu\text{l}/\text{well}$)을 첨가하고 15분 후 ELISA reader (Bio-Tek. Inc., U. S. A)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Sulforhodamine B(SRB) assay

Skehan 등(1990)의 방법에 따라 A498 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조정하여 well plate에 분주한 다음 24시간 동안 항온기내에서 배양하였다. 분획별 대항 모상근 추출물(1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 교체하여 24시간 후 각 well에 차가운 50% TCA를 50 μl 씩 넣어준 다음 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 방치하여 세포를 고정시키고 증류수로 수회 세척하여 공기 중에서 건조시켰다. 각 well에 0.4% SRB용액을 100 μl 씩 넣어 20~30분 동안 반응시킨 후 1% acetic acid로 세척하여 공기 중에서 건조시켰다. 고정세포에 염색되어 있는 SRB를 10 mM trizma base (pH 10.5)로 용출시켜 ELISA reader (Bio-Tek. Inc., U. S. A)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05이하인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

모상근은 배양과정에서 식물성장조절물질의 처리 없이도 성장속도가 매우 빠르고 모식물체와 동일한 성분의 대사물질을 함유하는 화학적 전형성능 (chemical totipotency)을 나타내는 일종의 고정화 세포와 같은 특성을 갖는다. 따라서, 고등식물 유래 유용물질의 생산을 위한 시료로 널리 활용될 수 있다 (Flores and Filner, 1985 ; Flores, 1987). 본 실험에서는 최적 배양조건에서 4주간 배양된 대항의 모상근으로부터 표준엑스를 추출하여 사람의 신장 상피세포에 대한 세포독성을 조사하였다. 각종 물질의 세포독성을 검정하는 방법으로 MTT정량, NR정량, SRB정량법이 많이 사용하고 있다. 이와 같은 방법은 세포내 소기관의 활성을 비색방법을 이용하여 정량적으로 세포독성을 비교 측정하는 방법들로 MTT정량법은 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase의 활성도를 통해 세포독성을 측정하며 (Borenfreund and Babich, 1987 ; Borenfreund et al., 1990), SRB정량법은 Lowry나 Bradford 방법처럼 총단백질을 단시간에 간단히 정량 할 수 있는 방법 (Skehan, 1990) 이고, NR정량법은 lysosome에 대한 세포 소기관의 독성을 규명할 수 있는 방법이다 (Babich et al., 1996 ; Borenfreund and Puerner, 1984). 이들 모두 미국 국립 암연구소에서 항암제 등의 독성물질 검정을 위한 방법으로 사용되고 있다 (Carmichael et al., 1987).

Table 1 과 2는 MTT방법에 의한 세포독성조사 결과로 수층분획은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 대조군에 비교할 때 99.1%로 세포에 미치는 영향이 거의 없었으나, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 대조군의 96.5%로 세포에 영향을 나타내었다. 수층분획을 처리

하지 않은 대조구와 비교할 때 50%에 영향을 주는 MTT₅₀농도는 475.8 μ g/ml이었다. 클로로포름층의 분획물은 1 μ g/ml에서 대조군의 93.9%이었고, 첨가한 추출물의 농도 증가에 따라 세포에 미치는 독성효과가 크게 나타났다. 클로로포름층의 MTT₅₀ 농도는 289.3 μ g/ml로 수층분획에 비해 낮게 나타났다(Table 2).

Table 1. Cytotoxicity and activity of the water fraction of hairy root cultures by MTT assay on A498 cell line

Concentration (μ g/ml)	MTT quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	0.344 \pm 0.05**	100.0
1	0.345 \pm 0.03	100.3
10	0.341 \pm 0.02**	99.1
50	0.332 \pm 0.05*	96.5
100	0.298 \pm 0.03*	86.6
MTT ₅₀	475.8	

^a The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, *P < 0.05, **P < 0.01 vs control.

Table 2. Cytotoxicity and activity of the chloroform fraction of hairy root cultures by MTT assay on A498 cell line

Concentration (μ g/ml)	MTT quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	0.344 \pm 0.05**	100.0
1	0.323 \pm 0.06*	93.9
10	0.305 \pm 0.02**	88.7
50	0.294 \pm 0.03*	85.5
100	0.275 \pm 0.01*	79.9
MTT ₅₀	289.3	

^a The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, *P < 0.05, **P < 0.01 vs control.

NR방법에 의한 세포독성 결과를 보면 수층분획의 경우 10 μ g/ml 농도까지는 세포에 거의 영향을 미치지 못하였으나, 50 μ g/ml농도에서 대조군의 95.5%로 세포에 독성을 나타내었다(Table 3). NR₅₀의 농도는 428.3 μ g/ml로 나타났다. 한편, 클로로포름층으로부터 얻은 대황 추출물에서는 10 μ g/ml에서 대조군의 96.9%로 세포에 영향이 나타나기 시작하였으며, 100 μ g/ml에서 대조군의 87.8%를 나타내었다. NR₅₀의 농도는 307.7 μ g/ml로 나타났다(Table 4).

Table 3. Cytotoxicity and activity of the water fraction of hairy root cultures by NR assay on A498 cell line

Concentration (μ g/ml)	NR quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	0.286 \pm 0.04*	100.0
1	0.285 \pm 0.03*	99.7
10	0.280 \pm 0.02**	97.9
50	0.273 \pm 0.04*	95.5
100	0.268 \pm 0.03**	93.7
NR ₅₀	428.3	

^a The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, *P < 0.05, **P < 0.01, vs control.

Table 4. Cytotoxicity and activity of the chloroform fraction of hairy root cultures by NR assay on A498 cell line

Concentration (μ g/ml)	NR quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	0.286 \pm 0.04*	100.0
1	0.281 \pm 0.02	98.3
10	0.277 \pm 0.02**	96.9
50	0.264 \pm 0.01*	92.3
100	0.251 \pm 0.05*	87.8
NR ₅₀	302.7	

^a The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, *P < 0.05, **P < 0.01, vs control.

SRB방법을 이용한 세포독성조사 결과 수층으로부터 얻은 대왕추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군의 97.8%가 영향을 받았으며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군의 92.9%로 비교적 세포에 미치는 영향이 적었다. SRB₅₀의 농도는 549.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다 (Table 5). 클로로포름층으로부터 얻은 대황 추출물에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군의 96.8%, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 94.6%을 나타내었고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 87.9%을 나타내었으며 SRB₅₀의 농도는 433.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다 (Table 6).

Table 5. Cytotoxicity and activity of the water fraction of hairy root cultures by SRB assay on A498 cell line

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SRB quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	0.313 \pm 0.04**	100.0
1	0.316 \pm 0.07*	100.9
10	0.311 \pm 0.03*	99.4
50	0.306 \pm 0.02*	97.8
100	0.288 \pm 0.04**	92.0
SRB ₅₀	549.5	

^a The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, *P < 0.05, **P < 0.01, vs control.

Table 6. Cytotoxicity and activity of the chloroform fraction of hairy root cultures by SRB assay on A498 cell line

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SRB quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of control
Control	0.313 \pm 0.04**	100.0
1	0.312 \pm 0.01	99.7
10	0.303 \pm 0.05*	96.8
50	0.296 \pm 0.02*	94.6
100	0.275 \pm 0.02**	87.9
SRB ₅₀	433.8	

^a The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, *P < 0.05, **P < 0.01 vs control.

수층과 클로로포름층으로부터 얻은 대황 모상근의 추출물을 사람의 신장세포인 A498세포주에 처리하고 MTT, NR, 그리고 SRB정량법에 의해 세포독성을 측정한 결과 분획별 추출물의 처리농도의 증가에 따라 세포에 미치는 독성은 증가하였다. 특히, 클로로포름층으로부터 얻은 추출물이 세포에 미치는 영향은 수층으로부터 얻은 추출물 보다 세포에 미치는 영향이 크게 나타났다. 50%의 세포독성을 나타내는 MTT₅₀, NR₅₀, 그리고 SRB₅₀에서도 서로 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 Lee 등 (1997)이 인체 피부암세포에 적용하여 세포수 생존율, MTT정량 및 SRB정량을 실시한 결과와 비교할 때 메탄올, 에탄올, 클로로포름층으로부터 얻은 추출액이 세포에 미치는 영향과 항암작용에 있어서 차이를 보인다는 결과와 유사하였다. 따라서 추출시 사용하는 용매에 따라 세포에 미치는 영향이 다를 수 있음을 확인할 수 있었다. 조사방법에 따른 차이는 수층으로 얻은 대황 추출물의 경우 NR방법에서 클로로포름층으로부터 얻은 대황 추출물의 경우 MTT정량방법에서 다른 방법보다 동일 농도에서 민감하게 나타났는데 이러한 결과는 실험에 사용하는 물질에 따라 조사 방법의 차이를 갖는 기 보고된 결과들과 일치하였다 (Han 등, 1998). 또한, Han 등 (1998)은 클로로포름층의 분획별 처리구에서 항암활성의 차이를 보았다. 본 실험에서 두가지 종류의 분획층에 따른 세포독성의 차이는 각 층에 포함된 약리물질의 생리 생화학적인 작용 특성에 따른 차이가 있을 것으로 추정되므로 각 분획층의 성분 분석에 관한 연구를 계속 실시할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

적 요

기내 배양 과정에서 식물성장조절물질의 처리 없이도 성장속도가 매우 빠르고, 모식물체와 동일한 성분의 대사물질을 생합성하는 화학적 전형성능을 나타내는 형질전환된 뿌리 즉, 모상근을 이용하여

약리물질을 생산하고자 대황 모상근을 유도하고 이로부터 추출한 물질의 세포독성을 조사하였다.

1. 수층과 클로로포름 층으로부터 얻은 대황 모상근 추출물 모두 농도의 증가에 따라 세포에 미치는 독성이 증가하였다.

2. 클로로포름층으로부터 얻은 대황 모상근 추출물이 수층으로부터 얻은 대황 추출물보다 세포에 미치는 독성이 크게 나타났다. 클로로포름층 분획의 MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀은 각각 289.3 µg/ml, 302.7 µg/ml, 433.8 µg/ml이었고, 수층 분획물의 MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀은 각각 475.8 µg/ml, 428.3 µg/ml, 549.5 µg/ml 이었다.

3. 세포독성 측정방법에 따라 차이를 보였으며 수층 분획의 경우 NR정량법에서 클로로포름층 분획의 경우 MTT정량법에서 독성 정도가 더 높게 나타났다.

사 사

본 연구는 2000년도 한국학술진흥재단 지원 연구비 (KRF-2000-015-DP0306)에 의해 수행되었음

인 용 문 헌

- Babich H., H. L. Zuckerbraun, L. B. Barber, S. B. Babich and E. Borenfreund. 1996. Cytotoxicity of Sanguinarine chloride to cultured Human cells from oral tissue. *Pharmacol. and Toxicol.* 78 : 397-403.
- Baladrin, M. 1985. Natural plant chemicals : Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228 : 1154-1160
- Borenfreund E. and H. Babich. 1987. In vitro cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neural cells and fibroblasts. *Cell. Biol. Toxic.* 3 : 63-79.
- Borenfreund E., H. Babich and N. Martin-Alguacil. 1990. Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 26 : 1030-1034.
- Borenfreund E. and J. A. Puerner. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Tissue Culture Meth.* 9 : 7-9.
- Buitelaar, R. M., and J. Tramoer. 1992. Strategies to improve production of secondary metabolites with plant cell cultures : A literature review. *J. Biotechnology* 23 : 111-141
- Carmichael J., W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Michell. 1987. Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Reserch.* 47 : 936-942.
- Charlwood, B. V. and M. J. Rhodes. 1990. In *Secondary Products from Plant Tissue Culture.* Clarendon Press, Oxford
- Flores, E. H., Hoy M. W. and J. J. Pickard. 1987. Secondary metabolites from root cultures. *Trends in Biotechnology* 5 : 64-69
- Flores, H. E. 1987. Use of plant cell and organ culture in the production of biological chemicals. In *Applications of Biotechnology to Agriculture Chemistry.* American Chemical Society Symposium Series, vol. 334. H. Lebaron, R. O. Mumma, R. C. Honeycutt, and J. H. Duesing, eds. American Chemical Society, Washington DC. pp. 66-68
- Flores, H. E., and P. FINDER. 1985. Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. In *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures.* K. H. Neumann, W. Barz, and E. Reinhard, eds. Springer-Verlag, NY. pp. 174-185
- Han, D. S., Y. I. Kim, K. E. Choi, J. S. Kwag and S. H. Baek. 1998. Development of anticancer agents from Korean medicinal plants. Part 7. cytotoxic activity of the chloroform soluble fraction of *Perrilla frutescens* against human oral epitheloid carcinoma cells. *Environmental Mutagens & Carcinogens.* 18(1) : 37-42.
- Hwang, S. J., M. S. Na, B. S. Pyo, J. B. Lee and B. Hwang. 2000. Production of tannin from hairy root cultures of *Rheum undulatum* L. *Korea J. Medicinal*

- Crop Sci. 8 : 250-258.
- Lee, K. N., H. H. Shin, D. S. Han, Y. O. Kim, K. E. Choi, J. S. Kwag and S. H. Beak.** 1997. Development of anticancer agents from Korean medical plants. Part 5. cytotoxic activity of the butanol soluble fraction of *Perilla frutescens* against human skin melanoma cells. Kor. J. Pharmacogn. 28(4) : 264-270.
- Lloyd, G. and B. McCown.** 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by the use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Proc. Soc. 30 : 412-427
- Mosmann T.** 1983. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65 : 55-63.
- Skehan P., R. Storeng, D. A. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. T. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd.** 1990. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82 : 1107-1112.
- Zhu You-Ping.** 1998. In Chinese Materia Medica. Harwood academic press. pp. 231-238