

# 홍화가 위장관 카할간질세포에 미치는 효과

송호준 · 김정아 · 한송이 · 김형우<sup>1</sup> · 채 한 · 김병주 · 권영규\*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학부, 1: 약물의학부

## Effects of Carthami Flos on Interstitial Cells of Cajal in the Gastrointestinal Tract

Ho Joon Song, Jung A Kim, Song Ee Han, Hyung Woo Kim<sup>1</sup>, Han Chae, Byung Joo Kim, Young Kyu Kwon\*

*Division of Longevity and Biofunctional Medicine,*

*1: Division of Pharmacology School of Korean Medicine, Pusan National University*

The purpose of this study is to investigate the effects of Carthami Flos on interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. Many regions of the tunica muscularis of the gastrointestinal (GI) tract display spontaneous contraction. These spontaneous contractions are mediated by periodic generation of electrical slow waves. Recent studies have shown that the interstitial cells of Cajal (ICCs) act as pacemakers and conductors of electrical slow waves in gastrointestinal smooth muscles. We investigated the cytotoxicity activity, antioxidant activity, and pacemaking activity. The cytotoxicity activity was measured by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Antioxidant activities were determined by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging capacity assay and DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate) method. The effects of Carthami Flos on the pacemaker potentials in cultured ICCs from murine small intestine were investigated by using whole-cell patch-clamp techniques at 30°C. The addition of Carthami Flos (5, 10, 30 µg/ml) depolarized the resting membrane potentials in a concentration dependent manner. These results suggest that the GI tract can be targets for Carthami Flos, and their interaction can affect intestinal motility.

Key words : Carthami Flos, Interstitial cells of Cajal, gastrointestinal tract

### 서 론

홍화(紅花, safflower, *Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 1년생 초본으로서 원산지는 인도, 중국 및 이집트 등이다<sup>1)</sup>. 홍화씨유는 필수지방산인 리놀레산(linoleic acid)이 60% 이상 함유되어 있어 양질 기름이며, 올레산(oleic acid)이 30% 이상 함유되어 있는데 재배지역이나 기후 조건에 따라 다르다. 셀러드, 요리, 마아가린, 술제조(리쿠르)에 이용되며 양초, 페인트용 건유, 리놀륨(마루바닥의 깔개), 니스, 천광택 등의 원료로도 쓰인다. 의학적으로는 피의 순환을 원활하게 하고 해독하는 작용을 하며 천연두를 치료하는 효과가 있다고 한다. 그리고 혈당 콜레스테롤함량을 낮추는 기능이 있어 심장병 치료에 이용되며, 류마치스, 관

\* 교신저자 : 권영규, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교한의학전문대학원

· E-mail : kwon@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8471

· 접수 : 2011/04/19 · 수정 : 2011/06/23 · 채택 : 2011/07/15

절염, 말복 뻘데 바르는 연고로 이용한다. 특히 간의 염증성 종기 치료제, 이노축진, 강장제 등의 치료제로 이용된다. 또한 뼈를 튼튼하게 하고 골다공증치료에 효과가 있다고 한다<sup>2)</sup>. 또한 홍화꽃은 예로부터 어혈 및 통경 치료약으로서 뿐만 아니라 식품의 착색제로서 널리 이용되어져 왔다<sup>3)</sup>. 홍화씨유 생산과정에서 부산물로 얻어지는 홍화씨 유박은 고품 깻묵을 말한다. 유지원료인 대두, 면실, 유채, 낙화생, 아마인 등의 유지가 풍부한 종실로부터 유지를 채취한 나머지로, 기름을 뺀 술지게미라는 의미로 유박이라고 한다. 이들에겐 원료를 수입하여 국내에서 탈지, 생산되는 것과 탈지박으로 수입되는 것이 있다. 유박은 일반적으로 수분, 조단백질, 수용성질소, 조섬유, 조회분 및 소량의 기름성분으로 이루어지지만 단백질이 풍부하여 식용, 사료, 비료 등을 위한 귀중한 단백질 또는 질소원이 된다. 대표적인 유박으로서 대두박, 유채박 등이 있다. 대두박은 탈지대두라고 불리 일부 된장, 간장 등의 양조용, 그 밖의 식품용으로 소비되고 있지만 주로 배합 사

료의 원료로 되고 있고 축산 사료로서 methionine을 강화하는 것에 의해 어분에 가까운 사육성적이 얻어진다고 되고 있다. 유채박은 탈지대두에 이은 주요한 식물단백원이고 예부터 뛰어난 유기비료로 증용되어, 담배, 꾀, 가정용 원예비료로 빠뜨릴 수 없는 것이다. 동물유지의 유박에는 생선을 증자, 압착, 건조한 어박이 있고 분말상의 어분은 비료, 사료에 쓰이고 있다<sup>4,5</sup>. 특히 홍화씨의 세로토닌유도체는 항산화 및 항염증작용 뿐만 아니라 세포증식 효과<sup>6,7</sup> 및 tyrosinase 저해제로서 미백효과<sup>8</sup>가 있음이 보고된 바 있다. 또한 뼈 형성을 촉진함으로써 갱년기 여성의 골다공증을 예방할수 있음을 세포 및 동물 실험을 통하여 밝힌 바가 있다<sup>9,10</sup>.

오래전부터 위장관의 평활근에서 자율적으로 발생하는 규칙적 수축운동(rhythmic contraction)은 연동운동이나 분절운동과 같은 위장관의 운동의 기본이 되는 것으로 알려져 왔다. 이러한 규칙적 수축운동은 서파(slow wave)라는 현상으로 나타난다<sup>11,12</sup>. 그러나 이러한 규칙적 수축운동은 단순한 위장관 평활근과 운동신경 지배만의 관계로는 설명되지 않으며, 이러한 서파의 기원을 평활근에서 찾으려는 노력은 예외 없이 모두 실패하였다<sup>13</sup>. 오랫동안 위장관 근육층의 조직학적 조건에서 카할세포(Interstitial Cells of Cajal, ICCs)라는 특수한 세포가 존재하는 것이 알려져 왔다. 카할세포는 1893년 Cajal에 의해 처음 기술된 세포로서 첫 기술 당시에는 자율신경 말단부와 평활근 사이에 위치하는 primitive interstitial neurons로 간주되었으며, 흔히 신경과 밀접하게 위치하여 신경조직 말단과 평활근 근육 사이에 intercalated 되어 있는 것으로 기술되어 왔다<sup>14</sup>. 또한 카할세포는 카할세포 상호간과 인접한 평활근과 gap junction을 통해 연결되어 있는 것이 확인되었다. 따라서 위장관에서의 전기적 결합체(syncytium)는 최소한 2가지 이상의 세포로 이루어진 것이 확인되었다. 지난 10여년 간 동물 모델을 중심(mouse, guinea pig, dog 등)으로 한 집중적인 연구를 통해 위, 소장, 그리고 대장에서 전형적인 phasic 활동을 나타내는 평활근에서의 항도잡이(pacemaker) 역할은 카할세포에서 기원한다는 사실이 밝혀졌다<sup>15</sup>. 따라서 카할세포에 대한 연구는 위장관 운동 조절 기전에 관한 연구를 의미하고 많은 위장관 질환 관련 연구에 카할세포를 이용하고 있다. 하지만 홍화의 위장관 카할간질세포에 대한 효과에 관한 체계적인 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 이미 구축된 카할세포 모델을 이용하여 홍화의 위장관 운동 조절 능력을 알아보고 카할세포에 대한 홍화의 기능을 살펴보는 것은 홍화의 소화기 관련 질환 중 위장관 운동 조절 기능성 식품 소재 혹은 치료제로서 가능성을 알아볼 수 있는 좋은 기회가 될 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 위장관 카할세포의 pacemaking activity 에서 홍화에 의한 조절효과에 관한 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고 하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제

실험에 사용한 홍화꽃 추출물은 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행(Plant Extract Bank)에서 구입한 알콜추출물 홍화시료를 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) MTT assay

세포 생존율 측정은 세포 배양판 (24-well)에 카할세포를 1 ml씩 분주하여 24시간 이상 배양 후 홍화추출물을 200, 400, 600, 800, 1000  $\mu\text{g/ml}$  로 처리한 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  하에서 72시간 배양한 후, MTT용액 (5 mg/ml)을 배양액 최종 부피의 1/10되게 첨가 하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 형성된 formazan 침전물을 dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 ml로 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) DPPH 자유산소기 소거법에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성은 DPPH을 이용하여 시료의 자유산소기 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 방법을 활용하였다. 메탄올에 녹인 시료를 준비한 후, DPPH 약 2 mg을 메탄올 15 ml에 녹여 0.3 mM의 DPPH 용액을 제조하였다. 준비된 DPPH 450  $\mu\text{l}$ 에 시료용액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 섞은 후 상온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다

#### 3) DCFH-DA 법

카할세포를 96well plate 에 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  하에서 4시간 동안 배양한 다음, 50  $\mu\text{M}$ 의 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Eastman kodak co., Rochester, NY)를 첨가하고 45분간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 씻어내고, PBS용액을 첨가하였다. 활성산소종의 양은 형광분석기 (Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 측정하였다(excitation at 485 nm, emission at 530 nm).

#### 4) 카할세포 배양

카할세포의 배양을 위해 주로 이용되는 마우스는 3-13일령 Balb/C를 사용하고 ether로 마취 시킨후 회생시킨 다음 개복하여 pyloric ring에서부터 회장에 해당하는 소장부위를 적출한다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로 채워진 준비 용기 속에서 창자간막 가장자리를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 운상근을 노출시킨후 분리된 소장 근육조직을 collagenase, bovine serum albumin, trypsin inhibitor, ATP 등이 들어 있고,  $\text{Ca}^{2+}$ 이 들어 있지 않은 Hank's 용액에 옮긴 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 항온 소화시킨후 진탕시켜 세포를 분리한다. 분리된 세포들을 유리 coverglass위에 분주하고, 10분후에 stem cell factor와 antibiotic/antimycotic이 들어 있는 SmGm (smooth muscle growth medium) 용액을 분주한 후, 37 $^{\circ}\text{C}$  (95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ ) 배양기에서 배양 시킨다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 antibiotic/antimycotic만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주고 실험은 배양 2일째 후부터 시행한다.

#### 5) 전기생리학적 실험

카할세포에서 막전압 또는 전류를 기록하기 위해 patch clamp 실험기법 중 whole cell patch 방법이 많이 이용되고 있다. 전압 또는 전류는 standard patch clamp amplifiers를 통해 증폭

시킴, 나오는 신호는 디지털 오실로스코프 및 생리적 기록기를 통해서 관찰된다. 세포막 전류는 -70 mV 의 유지전압에 고정하여 기록하며 얻어진 결과는 pClamp등의 프로그램을 통해 분석 처리하게 된다. 막전압 또는 전류를 기록하는 동안 세포의 관류 용액의 조성은 다음과 같다.

용액	KCl	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	glucose	HEPES	Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정
농도	5	135	1.2	10	10	

(단위: mM)

전극내 용액의 조성은 다음과 같음 (각 수치는 mM 단위임)

용액	KCl	MgCl <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> ATP	Na <sub>2</sub> GTP	creatinine phosphate disodium	HEPES	EGTA	Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정
농도	140	5	2.7	0.1	2.5	5	0.1	

(단위: mM)

배양된 ICCs에서 세포막 전압 또는 전류 고정법을 시행하면 자발적으로 발생하는 내향성 향도잡이 전류 및 전압이 기록된다.

6) 통계 분석

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago)의 Independent t-test를 사용하였으며 유의 수준 p<0.05를 사용하였다. 실험결과는 mean±SD 또는 빈도(%)로 기재하였다.

결 과

1. 세포 생존율에 미치는 영향

홍화가 위장관 카할세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 농도별로 홍화를 투여하고 72시간 후, 세포 생존율을 측정한 결과 800 µg/ml 이상에서 세포 독성이 나타났다. 800 µg/ml, 1000 µg/ml에서 세포 생존율은 각각 75.3±6.1%, 65.1±5.1%였다(Fig. 1). 따라서 홍화 800 µg/ml 이상의 농도에서 유의한 세포 생존율을 보였다.

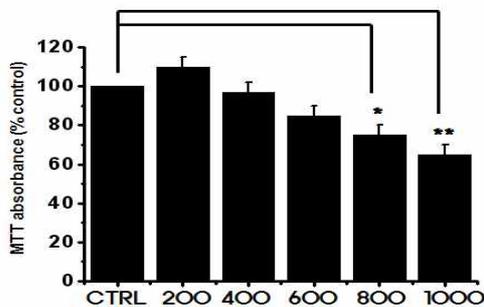


Fig. 1. Effects of Carthami Flos on cell viability of ICCs in the gastrointestinal tract. ICCs were attached 6-well plate and added carthami Flos as indicated concentrations respectively. After 72 hr incubation, cell viabilities were measured using MTT methods. Values are expressed as mean±S.D. \*P<0.05. \*\*P<0.01.

2. 항산화 활성에 미치는 영향

홍화의 DPPH 라디칼 소거활성법을 이용하여 항산화 활성을 측정하여 보았다. 홍화의 처리 농도에 따라 800 µg/ml, 1000 µg/ml의 농도에서 각각 20.7±4.9%, 30.5±7.5% 의 라디칼 소거활성(scavenging activity)을 나타내 농도 의존적으로 DPPH의 자유산 소거 소거 활성이 증가함을 보였다. 양성 대조군으로 사용한 Vit. C의 항산화 효과에는 미치지 못하였으나 홍화에 의한 항산화효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

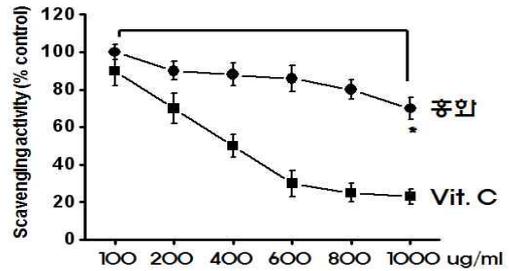


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of Carthami Flos at various concentration. Carthami Flos were incubated with DPPH solution at 37°C for 30 min. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. Vit. C : ascorbic acid. Values are expressed as mean±S.D. \*P<0.05. \*\*P<0.01.

3. 홍화의 항산화 효과

홍화가 정상세포 내에서 항산화능이 있는지 알아보기 위하여, ROS sensitive probe인 DCFH-DA를 사용하여 ROS level을 측정하였다. 홍화는 정상 세포 내의 ROS level을 시간에 따라 유의하게 감소시켰다. ROS level은 홍화 투여 20분 이후부터 유의한 수준으로 감소시켰는데 control과 비교하여 5 µg/ml 홍화에서는 20분에는 25.4%, 30분에는 26.3%, 40분에는 13.6%가 감소하였고, 10 µg/ml 홍화에서는 20분에는 37.1%, 30분에는 41.4%, 40분에는 26.6%가 감소하였다(Fig. 3). 따라서 홍화에 농도 의존적으로 항산화 효과가 있음을 알 수 있다.

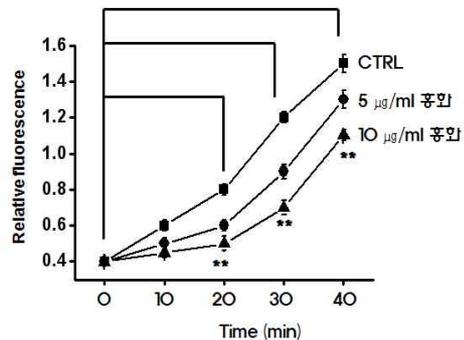


Fig. 3. Effect of Carthami Flos on intracellular ROS levels in ICCs. Carthami Flos were incubated with DCFH-DA solution at 37°C for 45 min. Activities were determined by measurement of absorbance at excitation at 485 nm and emission at 530 nm. CTRL: ICCs + 50 µM DCFH-DA. Values are expressed as mean±S.D. \*P<0.05. \*\*P<0.01.

4. 홍화의 pacemaking activity 조절 효과

위장관 카할세포의 pacemaking activity에서 홍화에 의한 조

절능을 알아 보았다. 홍화는 농도 의존적으로 pacemaking activity의 탈분극(depolarization)을 일으키고 진폭(amplitude)이 감소함을 알 수 있었다. 탈분극이 일어나는 정도는 5  $\mu\text{g/ml}$  홍화에서는 8.3 mV, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 13.2 mV, 30  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 22.4 mV정도를 나타내었다(Fig. 4).

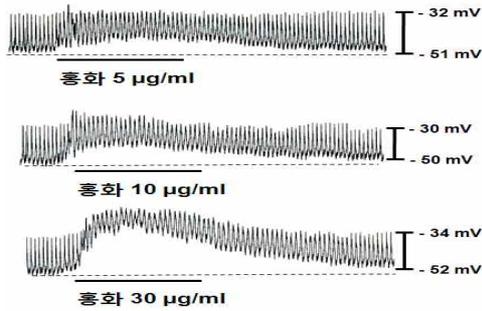


Fig. 4. Carthami Flos depolarized the pacemaking activity in ICCs. Carthami Flos depolarized the pacemaking activity in concentration dependent manner in ICCs.

## 고찰

홍화 꽃의 약용성분인 carthamin은 약성이 따뜻하고 피를 다스린다하여 어혈, 통경약으로 한방에 널리 사용되어 왔다<sup>16-18)</sup>. 또한 꽃잎에서 추출한 색소는 식품 및 화장품의 착색료로 사용되고 있으며 종실에는 지방이 다량(15-37%) 함유되어 있다. 특히 필수 지방산인 linoleic acid는 혈중 cholesterol수치를 저하시켜 동맥경화증의 예방과 치료에 효과가 있으며, 고혈압, 협심증, 고지혈증<sup>19-21)</sup>에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>22)</sup>. 홍화씨는 골절, 골다공증 등의 골질환 치료제로 쓰이고 있으며, 그 외에 고혈압, 동맥경화증, 척추디스크, 신경통, 혈액순환 촉진에서 효과적인 것으로 알려지고 있다<sup>23)</sup>. 또한 그 성분인 adenosine diphosphate가 혈소판 응집을 억제하여 항응혈효과와 항염효과등을 나타낸다고 확인된 바도 있다<sup>24)</sup>. 하지만 현재까지 홍화에 의한 소화기 질환 중 위장관 운동에 조절에 관한 연구는 이루어 지지 않고 있었다. 홍화가 사용되는 광출계전탕(廣朮潰堅湯), 당귀윤조탕(當歸潤燥湯), 생진감로탕(生津甘露湯) 등의 한의학적 처방과 본초학적으로 보았을 때, 홍화는 성질이 따뜻하고, 그 맛은 매우며, 독이 없기 때문에 이러한 성미가 위장관 운동에 효과가 있을 것이라고 생각하였으며, 산청군에서 홍화의 위장관 운동연구를 의뢰함에 따라 본 연구에서는 홍화를 사용하여 이전에 카할세포로 확립된 위장관 운동조절 모델에서 홍화에 의한 조절 가능성을 연구하였다.

카할세포가 소화관 근육운동에 있어 향도잡이 역할(pacemaking activity)을 수행할 뿐만 아니라, 서파를 평활근으로 널리 전파시키고, 창자신경세포로부터 오는 신경전도를 매개 조절한다는 주장이 최근 여러 보고에 의해 밝혀지고 있다<sup>25-27)</sup>. 이들 카할세포는 원암유전자(proto-oncogene)인 c-kit 유전자를 발현하고 있는데, 이 유전자를 통해 생산되는 kit 수용체는 세포막에서 tyrosine kinase수용체로 작용하고 있다. 카할세포는 c-kit을 발현하여 세포막에 수용체로 가지고 있기 때문에 조직 또는 세포 수

준에서 카할세포를 구별, 확인하기 위해 c-kit 단백질에 대한 항체를 활용한 면역조직 또는 면역세포화학 기법이 활용되고 있다<sup>28)</sup>.

카할세포가 위장관 운동에서의 알려진 기능은 ① 서파를 유발하는 향도잡이 세포로의 역할, ② 유발된 향도잡이전압의 전파(propagation)를 담당하며, ③ stretch에 관련된 이온통로가 존재하여 위장관 평활근의 흥분도(excitability)에 관여, ④ 신경층과 평활근층 사이에 존재함으로써 신경에서 평활근에 전달되는 억제성(inhibitory)과 흥분성(excitatory) 조절을 매개하는 역할에 관여하고 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서 위장관 운동 기전에 대한 연구에 있어서 카할세포는 중요한 도구로 생각되고 있고 많은 실험실에서 관련 연구를 진행중에 있다.

이번 연구로 홍화가 위장관 운동 조절 작용을 하는 카할세포에서 항산화효과를 보이고, 향도잡이를 조절하는 것을 알게 되었다. 특히 홍화가 위장관 운동을 촉진시키는 점으로 보아 변비 등 장운동 조절에 이상이 있는 환자에게 투여시 장운동을 도와주는 보조제로서의 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 아직 어떤 기전을 통해서 어떤 이온통로가 관여하는지는 아직 알지 못하고 좀 더 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 보인다. 이번 연구의 결과로 홍화에 의한 소화기 질환 중 위장관 운동질환으로 고생하는 분들에게 홍화에 의한 새로운 위장관 운동 건강보조식품이 개발되는 기초자료가 되어 삶의 질 향상에 도움이 되길 바란다.

## 감사의 글

본 논문은 (재)산청한방약초연구소 공동개발사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 최한기. 고농서국역총서11-농정회요II (農政會要). 농촌진흥청. pp 271-277.
2. 최성희, 임성임, 장은영, 조영수. 홍화꽃 및 홍화씨의 휘발성 성분. 한국식품과학회지 14: 36-42, 2004.
3. 김미진, 윤경섭, 김자영, 최상원, 홍진태. Anti-wrinkle Effect of Safflower (Carthamus tinctorius) Seed Extract (I). 대한화장품학회지 30(1):15-22, 2004.
4. Zhang, H.L., Nagatsu, A., Sakakibara, J. Novel antioxidants from safflower (Carthamus tinctorius L.) oil cake. Chem. Pharm. Bull. 44: 874-876, 1996.
5. Zhang, H.L., Nagatsu, A., Watanabe, T., Sakakibara, J., Okuyama, H. Antioxidative compounds isolated from safflower (Carthamus tinctorius L.) oil cake. Chem. Pharm. Bull. 45(12):1910-1914, 1997.
6. Takii, T., Hayashi, M., Hiroma, H., Chiba, T., Kawashima, S., Zhang, H.L., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Onozaki, K. Serotonin derivative, N-(p-Coumaroyl)serotonin, isolated from safflower (Carthamus tinctorius L.) oil cake augments the proliferation of normal human and mouse fibroblasts in

- synergy with basic fibroblast growth factor (bFGF) or epidermal growth factor (EGF). *J. Biochem.* 125: 910-915, 1999.
7. Kim, M.J., Kim, J.Y., Choi, S.W., Hong, J.T., Yoon, K.S. Anti-wrinkle effect of safflower seed extract (I). *J. Soc. Cosmet. Scientists.* 30: 15-20, 2004.
  8. 이광현. 홍화씨로부터 추출된 세포토닌계 화합물 및 이를 함유하는 조성물. 한국공개특허 출원번호 10-2002-0008315, 2002.
  9. Kim, H.J., Bae, Y.C., Park, R.W., Choi, S.W., Cho, S.H., Choi, Y.S., Lee, W.J. Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue. Int.* 71(1):88-94, 2002.
  10. 김미진, 김자영, 최상원, 홍진태, 윤경섭. Anti-wrinkle Effect of Safflower (*Carthamus tinctorius*) Seed Extract (II). *대한화장품학회지* 30(4):449-456, 2004.
  11. Szurszewski, J.H. Electrical basis for gastrointestinal motility. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd edn, ed. Johnson LR, Raven Press, New York, pp 383-422, 1987.
  12. Tomita, T. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. In *Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge*, ed. Brading AF, Jones AW & Tomita T, Edward Arnold, London, pp 127-156, 1981.
  13. Farrugia, G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 45-84, 1999.
  14. Cajal, S.R. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *CR Soc Biol (Paris)* 45: 217-223, 1893.
  15. Sanders, K.M. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 111: 492-515, 1996.
  16. Heo J. Dong-I Bogam 5. 3th eds., In: *Safflower*. Yekang Publishers, Seoul, Korea. pp 2763-2764, 1986.
  17. Kee, C.H. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC press, pp 249-250, 1993.
  18. Kim, M.N., Kim, K.H. Researches for analgesic and hepatoprotective action of *Carthami Flos*. *Pusan Bull. Pharm. Sci.* 26: 32-36, 1992.
  19. Cleary, M.P., Phillips, F.C., Morton, R.A. Genotype and diet effects in lean and obese Zucker rats fed either safflower or coconut oil diets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Mec.* 220: 153-161, 1999.
  20. Cox, C., Mann, J., Sutherland, W., Chisholm, A., Skeaff, M. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. *J. Lipid Res.* 36: 1787-1795, 1995.
  21. Iwata, T., Ohya, K., Takehisa, F., Tsutsumi, K., Furukawa, Y., Kimura, S. The effect of dietary safflower phospholipid on sterols in gastrointestinal tract of rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38: 615-622, 1992.
  22. 최영주, 최상욱. 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)씨의 sterol 및 phytoestrogen 분석. *Korean Journal of Life Science* 13(4):529-534, 2003.
  23. 한국생약교수협의회. 본초학. 사단법인 약사회. pp 553-555, 1995.
  24. 이연우, 최진규. 홍화씨 건강법. 태일출판사, pp 45-70, 1998.
  25. Tokutomi, N., Maeda, H., Tokutomi, Y., Sato, D., Sugita, M., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Nakao, J., Imamura, T., Nishi, K. Rhythmic Cl<sup>-</sup> current and physiological roles of the intestinal c-kit positive cells. *Pflugers Arch.* 431: 169-177, 1995.
  26. Ward, S.M., Morris, G., Reese, L., Wang, X.Y., Sanders, K.M. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 115: 314-329, 1998.
  27. Koh, S.D., Sanders, K.M., Ward, S.M. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J. Physiol.* 513: 203-213, 1998.
  28. Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Klüppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H.B., Bernstein, A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373: 347-349, 1995.