



Original Article / 원저

홍화의 생쥐 소장 및 대장 카할 간질세포의 향도잡이 전위 조절에 미치는 효능에 관한 연구

김병주*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학부

Effects of *Carthami flos* on pacemaker potentials of small intestinal and colonic interstitial Cells of Cajal

Byung Joo Kim*

Division of Longevity and Biofunctional Medicine
School of Korean Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effects of *Carthami flos* on pacemaker potentials of small intestinal and colonic Interstitial Cells of Cajal (ICC).

Methods : To dissociate the ICC, we used enzymatic digestions from the small intestine and colon in mice. In the ICC, the electrophysiological whole-cell patch-clamp configuration was used to record pacemaker potentials in the cultured ICC.

Results : 1. The ICC generated pacemaker potentials in the murine small intestine and colon.

2. Pretreatment with a Ca^{2+} free solution and thapsigargin, a Ca^{2+} -ATPase inhibitor in the endoplasmic reticulum, stopped the pacemaker potentials. In the case of Ca^{2+} -free solutions, *Carthami flos* did not induce membrane depolarizations in the murine small intestine and colon. However, when thapsigargin in a bath solution was applied, *Carthami flos* induced membrane depolarizations only in the murine colon.

3. Pretreatment with 2-APB (transient receptor potential melastatin (TRPM) channel inhibitor) abolished the pacemaker potentials and suppressed *Carthami flos*-induced effects in the murine small intestine and colon.

4. However, pretreatment with T16Ainh-AO1 (Ca^{2+} activated Cl^- channel; anoctamin 1 (ANO1) inhibitor) did not affect the pacemaker potentials and induced *Carthami flos*-induced effects only in the murine small intestine.

© 2019 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : These results suggest that *Carthami flos* can modulate the pacemaker activity of ICC and the mechanisms underlying pacemaking in ICC might be different in the small intestine and the colon.

Key words : *Carthami flos*, Interstitial Cells of Cajal, Pacemaker potentials.

I. 서론

홍화(紅花, safflower, *Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 1년생 초본으로서 꽃은 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐 아니라, 중성지방 저하 작용도 있어 한방에서 널리 사용해 왔다. 또한 피의 순환을 원활하게 하고 해독하는 작용을 하며 천연두를 치료하는 효과가 있다고 한다¹⁾. 그리고 혈당 콜레스테롤 함량을 낮추는 기능이 있어 심장병 치료에 이용되며, 뼈 질환을 예방한다는 연구결과가 나오면서 홍화의 소비가 증가하고 있는 실정이다¹⁾. 홍화꽃은 예로부터 어혈 및 통경 치료약으로서 뿐만 아니라 식품의 착색제로서 널리 이용되어져 왔고²⁾ 홍화씨는 항산화 및 항염증작용 뿐만 아니라 세포증식 효과^{2,3)} 및 tyrosinase 저해제로서 미백효과⁴⁾가 있음이 보고된 바 있다. 또한 뼈 형성을 촉진함으로써 갱년기 여성의 골다공증을 예방할 수 있음을 세포 및 동물 실험을 통하여 밝힌 바가 있다^{5,6)}.

오래전부터 위장관의 평활근에서 자율적으로 발생하는 규칙적 수축운동(rhythmic contraction)은 서파(slow wave)라고 불리우면서 연동운동이나 분절운동과 같은 위장관의 운동의 기본이 된다^{7,8)}. 이러한 위장관 운동은 카할세포(Interstitial Cells of Cajal, ICC)라는 특수한 세포에 의해서 발생하는 향도잡이 전위(pacemaker potential)에 의한 것으로 알려지고 있다^{9,10)}. 또한 카할간질세포의 향도잡이 전위 발생에 일과성 수용체 전압 멜라스타틴 (Transient Receptor Potential melastatin; TRPM) 7 이온통로¹¹⁾와 칼슘에 의해 활성화되는 염소이온채널 (Ca²⁺ activated Cl⁻, Anoctamin 1 (ANO1)) 이온통로가 관여함이 알려지고 있다¹²⁾. 따라서 카할세포에 대한 연구는 위장관 운동 조절 기전에 관한 연구를 의미하고 많은 위

장관 질환 관련 연구에 카할세포를 이용하고 있다. 과거 연구에서 홍화유(紅花油)는 소장이나 호흡기근육 등의 내장 평활근의 기능을 활성화시킨다는 보고와 홍화약침에 의한 만성변비를 치료한 연구결과가 있지만¹³⁾ 홍화에 의한 소화기 계통, 즉 위장관 카할간질세포에서의 작용에 대한 연구는 많이 부족한 현실이다. 따라서 이미 구축된 카할세포 모델을 이용하여 홍화의 위장관 운동 조절 능력을 생쥐 소장과 대장에서 비교해보고, 향도잡이 전위 조절과 관련된 이온통로의 조절에 차이가 있는지를 확인해 보는 기초적 연구를 수행하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 홍화자 추출물은 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행 (Plant Extract Bank; CA04-085 (2nd))에서 구입한 알콜 추출물 홍화시료를 사용하였다.

2. 방법

1) 카할세포 배양

카할세포의 배양을 위해 주로 이용되는 마우스는 3-5일령 Balb/C를 사용하고 ether로 마취 시킨 후 희생시킨 다음 개복하여 pyloric ring에서부터 회장에 해당하는 소장부위를 적출한다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로 채워진 준비 용기속에서 창자 간막 가장자리를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 윤상근을 노출시킨 후 분리된 소장 근육조직을 collagenase (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), ATP (Sigma-

*Corresponding author : Byung Joo Kim. Division of Longevity and Biofunctional Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yongsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea.
Tel : +82-51-510-8469, Fax : +82-51-510-8420, E-mail : vision@pusan.ac.kr

•Received : September 16, 2019 / Revised : November 17, 2019 / Accepted : November 18, 2019

Aldrich, St Louis, MO, USA) 등이 들어 있고, Ca^{2+} 이 들어 있지 않은 Hank's 용액에 옮긴 다음 37°C에서 20분간 항온 소화 시킨 후 진탕시켜 세포를 분리한다. 분리된 세포들을 유리 coverglass 위에 분주하고, 10분후에 stem cell factor (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)와 antibiotic/antimycotic (Gibco, Grand Island, NY, USA) 이 들어 있는 SmGm (smooth muscle growth medium; Clonetics, San Diego, CA, USA) 용액을 분주한 후, 37°C (95% O_2 -5% CO_2) 배양기에서 배양 시킨다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 antibiotic/antimycotic만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주고 실험은 배양 2일째 후부터 시행한다.

2) 전기 생리학적 실험

카할간질세포에서 막전압 또는 전류를 기록하기 위해 patch clamp 실험기법 중 whole cell patch 방법이 많이 이용되고 있다. 전압 또는 전류는 standard patch clamp amplifiers (Axon Instruments, Foster, CA, USA) 를 통해 증폭시키며, 나오는 신호는 생리적 기록기 (Gould 2200; Gould, Valley View, OH, USA) 를 통해서 관찰된다. 세포막 전류는 -70 mV 의 유지전압에 고정하여 기록하며 얻어진 결과는 pClamp (version 6.1 and version 10.0; Axon Instruments, Foster, CA, USA) 등의 프로그램을 통해 분석처리하게 된다. 막전압 또는 전류를 기록하는 동안 세포외 관류 용액의 조성은 다음과 같다. KCl 5 mM, NaCl 135 mM, $CaCl_2$ 1.2 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정한다. 전극내 용액의 조성은 KCl 140 mM, $MgCl_2$ 5 mM, K_2ATP 2.7 mM, Na_2GTP 0.1 mM, creatinine phosphate disodium 2.5 mM, HEPES 5 mM, EGTA 0.1 mM, Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정한다. 배양된 카할간질세포에서 세포막 전압 또는 전류 고정법을 시행하면 자발적으로 발생하는 내향성 향도잡이 전류 및 전압이 기록된다. 본문에 사용된 Ca^{2+} free 용액은 세포외 관류 용액에서 단지 $CaCl_2$ 1.2 mM 만을 제거하여 사용하였다.

3) 통계 분석

실험성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내

었으며, 결과의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 생쥐 소장 카할간질세포에서 홍화의 향도잡이 전위 조절 효과

생쥐 소장 카할간질세포의 향도잡이 전위 조절에서 홍화에 의한 조절능을 알아 보았다. 홍화는 농도 의존적으로 향도잡이 전위를 탈분극(depolarization)을 일으키고 진폭(amplitude)이 감소함을 알 수 있다 (Fig. 1A-1C). 탈분극이 일어나는 정도는 5 μ g/ml 홍화에서는 1.8 ± 0.9 mV, 10 μ g/ml 에서는 11.9 ± 0.4 mV, 30 μ g/ml 에서는 36.7 ± 1.0 mV 정도를 나타내었다 (Fig. 1D). 진폭의 정도는 5 μ g/ml 홍화에서는 24.4 ± 0.9 mV, 10 μ g/ml 에서는 10.7 ± 0.5 mV, 30 μ g/ml 에서는 4.3 ± 0.7 mV 정도를 나타내었다 (Fig. 1D).

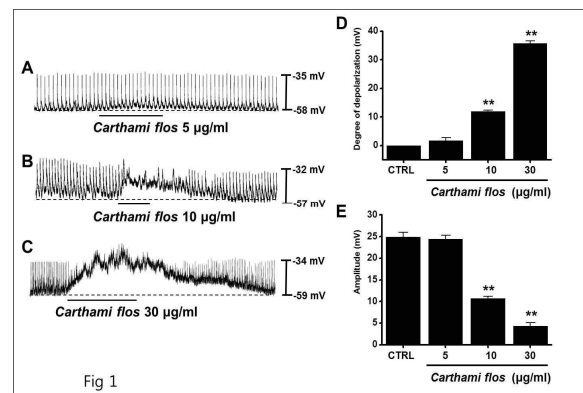


Fig. 1. Effects of *Carthami flos* on pacemaker potentials in cultured murine small intestinal ICC. (A-C) After the primary ICC culture in the mouse small intestine, various dose of *Carthami flos* were applied in a bath and the membrane potentials in current clamp mode ($I = 0$) were estimated. Responses to *Carthami flos* are summarized in D and E. Bars represent mean values \pm S.D. $**P < 0.01$. CTRL: Control.

2. 생쥐 소장 카할간질세포에서 홍화의 세포 내의 Ca^{2+} 농도 조절 효과

생쥐 소장 카할간질세포의 향도잡이 전위 조절에서 세포 내외 Ca^{2+} 농도 조절능을 알아 보았다. 세포밖 Ca^{2+} 을 제거하면 향도잡이 전위 발생이 억제되고 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응이 나타나지 않았다 (Fig. 2A and 2C). 또한 세포내 Ca^{2+} 농도 조절 기관인 근소포체의 Ca^{2+} -ATPase 작용을 억제하는 thapsigargin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 에 의해서 향도잡이 전위 발생이 억제되고 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응 역시 억제 되었다 (Fig. 2B and 2C).

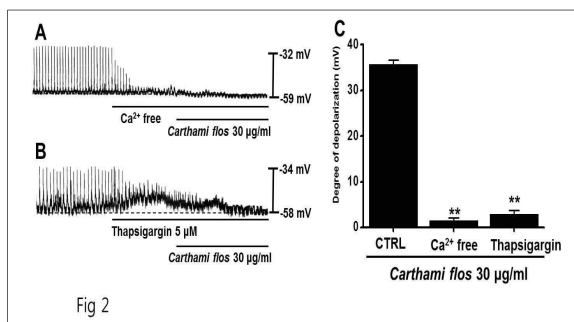


Fig. 2. Effects of an external Ca^{2+} -free solution or thapsigargin, a Ca^{2+} -ATPase inhibitor of endoplasmic reticulum on Carthami flos-induced pacemaker potentials in cultured murine small intestinal ICC. (A) The external Ca^{2+} -free solution stopped the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, Carthami flos-induced membrane depolarizations were inhibited. (B) Thapsigargin (5 μ M) stopped the generation of pacemaker potentials and thapsigargin blocked the Carthami flos-induced membrane depolarizations. (C) The responses to Carthami flos in the external Ca^{2+} -free solution and in the presence of thapsigargin are summarized. Bars represent the mean values \pm S.D. ****** $P < 0.01$. CTRL: Control.

3. 홍화의 생쥐 소장 카할간질세포에서 홍화의 TRPM7 및 ANO1 이온통로 조절 효과

생쥐 소장 카할간질세포의 향도잡이 전위 조절에 관여하는 TRPM7 및 ANO1 이온통로 조절능을 알아 보았다. TRPM7 이온통로 억제제인 2-APB (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 를 투여하면 카할간질세포의 향도잡이 전위가 억제되고 이 조건에서 홍화는 아무런 반응을 나타내지 않았다 (Fig. 3A and 3C). 하지만 ANO1 이온통로 억제제인 T16Ainh-AO1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 을 투여하면 카할간질세포의 향도잡이 전위발생에는 아무런 영향이 없으며 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응이 나타났 (Fig. 3B and 3C).

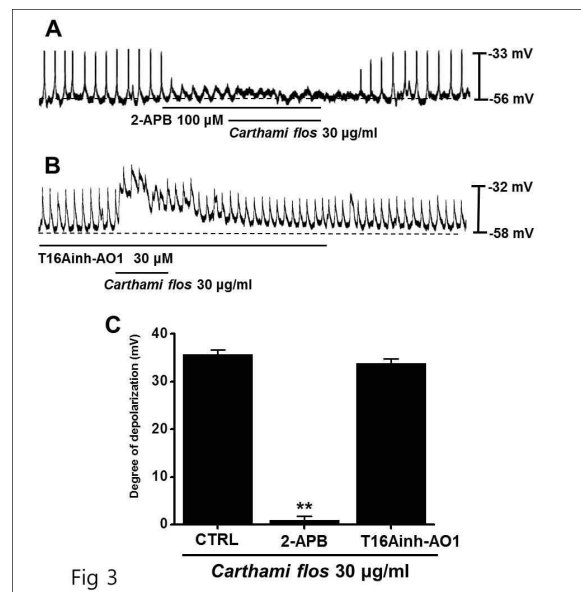


Fig. 3. Effects of Carthami flos on TRPM7 or ANO1 inhibitor in cultured murine small intestinal ICC. (A) 2-APB, TRPM7 inhibitor, stopped the generation of pacemaker potentials. 2-APB blocked the Carthami flos-induced effects. (B) T16Ainh-AO1, ANO1 inhibitor, had no effects on the generation of pacemaker potentials. T16Ainh-AO1 did not block the Carthami flos-induced effects. (C) The responses to Carthami flos in TRPM7 or ANO1 inhibitors are summarized. Bars represent the mean values \pm S.D. ****** $P < 0.01$. CTRL: Control.

4. 홍화의 생쥐 대장 카할간질세포에서 홍화에 의한 향도잡이 전위 조절 반응

생쥐 대장 카할간질세포의 향도잡이 전위 조절에서 홍화에 의한 조절능을 알아보았다. 홍화는 농도 의존적으로 향도잡이 전위를 탈분극(depolarization)을 일으키고 진폭(amplitude)이 감소함을 알 수 있다 (Fig. 4). 또한 세포막 Ca^{2+} 을 제거하면 향도잡이 전위 발생이 억제되고 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응이 나타나지 않았다 (Fig. 5A and 5C). 또한 세포내 근소포체의 Ca^{2+} -ATPase 작용을 억제하는 thapsigargin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)에 의해서 향도잡이 전위 발생이 억제되지만 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응은 잘 나타났다 (Fig. 5B and 5C). TRPM7 이온통로 억제제인 2-APB (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 투여하면 카할간질세포의 향도잡이 전위가 억제되고 이 조건에서 홍화는 아무런 반응을 나타내지 않았다 (Fig. 6A and 6C). 또한 ANO1 이온통로 억제제인 T16Ainh-AO1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 투여하면 향도잡이 전위발생이 억제되고 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응도 억제되었다 (Fig. 6B and 6C).

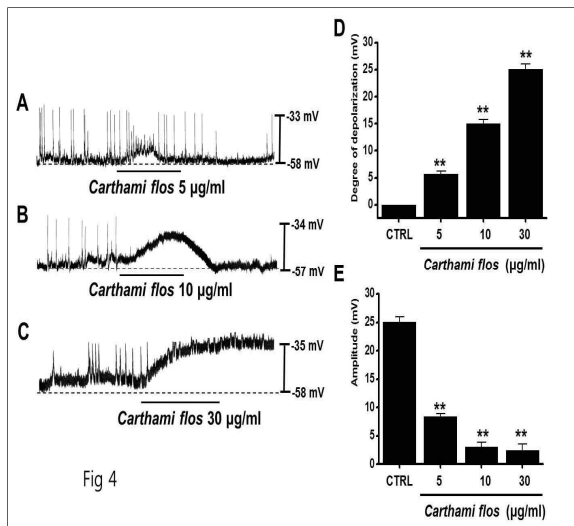


Fig. 4. Effects of *Carthami flos* on pacemaker potentials in cultured murine colonic ICC. (A-C) After the primary ICC culture in the mouse colon, various dose of *Carthami flos* were applied in a bath and the membrane potentials in

current clamp mode ($I = 0$) were estimated. Responses to *Carthami flos* are summarized in D and E. Bars represent mean values \pm S.D. ** $P < 0.01$. CTRL: Control.

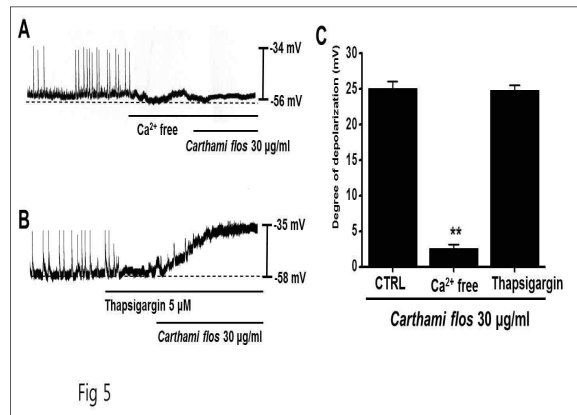


Fig. 5. Effects of an external Ca^{2+} -free solution or thapsigargin, a Ca^{2+} -ATPase inhibitor of endoplasmic reticulum on *Carthami flos*-induced pacemaker potentials in cultured murine colonic ICC. (A) The external Ca^{2+} -free solution stopped the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, *Carthami flos*-induced membrane depolarizations were inhibited. (B) Thapsigargin (5 μ M) stopped the generation of pacemaker potentials and thapsigargin did not block the *Carthami flos*-induced membrane depolarizations. (C) The responses to *Carthami flos* in the external Ca^{2+} -free solution and in the presence of thapsigargin are summarized. Bars represent the mean values \pm S.D. ** $P < 0.01$. CTRL: Control.

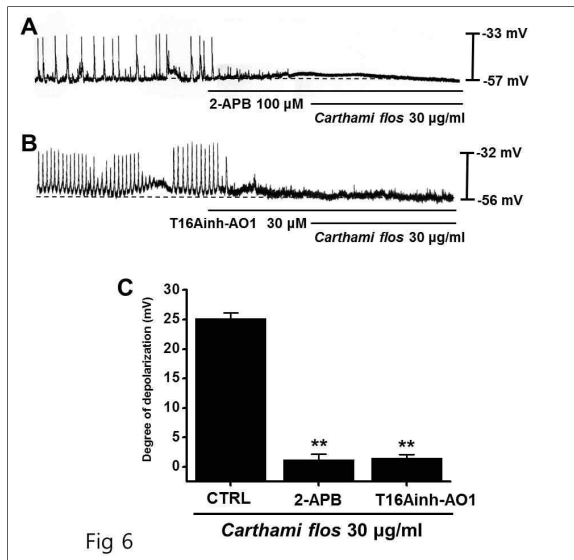


Fig. 6. Effects of Carthami flos on TRPM7 or ANO1 inhibitor in cultured murine colonic ICC. (A) 2-APB, TRPM7 inhibitor, stopped the generation of pacemaker potentials. 2-APB blocked the Carthami flos-induced effects. (B) T16Ainh-AO1, ANO1 inhibitor, blocked the generation of pacemaker potentials. T16Ainh-AO1 blocked the Carthami flos-induced effects. (C) The responses to Carthami flos in TRPM7 or ANO1 inhibitors are summarized. Bars represent the mean values \pm S.D. ** $P < 0.01$. CTRL: Control.

IV. 고찰

홍화는 민간에서 한방약재로 사용되어온 물질로 주로 통경 등의 부인병에 효과가 있다고 알려져 있으며¹⁴⁾, 항염증¹⁵⁾, 마우스 피부의 tumor promotion에 대한 억제효과¹⁶⁾, 혈전증 개선¹⁷⁾, Ca^{2+} antagonistic 활성¹⁸⁾, 신경 보호작용¹⁹⁾, 혈압강하작용²⁰⁾, 면역기능 조절²¹⁾, 뇌경색에 대한 보호작용²²⁾이 보고되었다. 하지만 홍화에 의한 위장관에 대한 효능은 잘 알려져 있지 않다. 홍화의 생쥐 소장 카탈간질세포에 대한 반응은 5-HT₃ 또는 5-HT₄ 수용체를 통해서 조절되고 있다²³⁾. 또한 생체내 연구에서는 정상 위장관에서 intestinal transit rate (ITR)을 증가시키고, 위장관 운동 병태 동물 모델에서도 ITR을 증가시키는 것으로 알려지고 있다²³⁾.

카탈세포가 소화관 근육운동에 있어 향도잡이 역할을 수행할 뿐만 아니라, 서파를 평활근 및 신경세포로 전파시키는 것으로 알려지고 있다^{24,25)}. 카탈세포는 세포막 바이오 마커로 c-kit 또는 ANO1 단백질을 발현 하여 세포막에 가지고 있기 때문에 조직 또는 세포 수준에서 카탈세포를 구별, 확인하기 위해 c-kit 또는 ANO1 단백질에 대한 항체를 활용한 면역조직 또는 면역세포화학 기법이 활용되고 있다^{12,26)}. 카탈세포가 위장관 운동에서의 알려진 기능은 ① 서파를 유발하는 향도잡이 세포로서의 역할, ② 유발된 향도잡이 전압의 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^{11,12,24-26)}. 따라서 위장관 운동 기전에 대한 연구에 있어서 카탈세포는 중요한 도구로 생각되고 있고 많은 실험실에서 관련 연구를 진행중에 있다. 이번 연구에서는 소장과 대장 향도잡이 전위에서 홍화에 의한 반응의 차이를 알아보았다. 본 연구에서 보면 소장에서는 세포내 Ca^{2+} 농도 조절 기관인 근소포체의 Ca^{2+} -ATPase 작용을 억제하는 thapsigargin에 의해서 향도잡이 전위 발생이 억제되고 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응 역시 억제 되었다 (Fig. 2B). 하지만 대장에서는 thapsigargin에 의해서 향도잡이 전위 발생이 억제되지만 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응은 잘 나타났다 (Fig. 5B). 또한 ANO1 이온통로 억제제인 T16Ainh-AO1을 생쥐 소장 카탈간질세포의 향도잡이 전위에 투여하면 아무런 영향이 없으며 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응이 나타났다 (Fig. 3B). 하지만, T16Ainh-AO1은 생쥐 대장 카탈간질세포 향도잡이 전위발생을 억제시키고 이 조건에서 홍화에 의한 탈분극 반응도 억제되었다 (Fig. 6B). 따라서 같은 생쥐 위장관이라도 소장과 대장에서의 반응 및 홍화의 효능에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 홍화에 의한 반응에 소장과 달리 대장에서는 세포내 근소포체의 Ca^{2+} 조절능이 홍화의 반응에 관여하지 않으며, 또한 ANO1의 조절에서는 소장에서 큰 의미가 없음을 알 수 있다. 이번 연구로 홍화가 위장관 운동 조절 작용을 하는 카탈간질세포에서 향도잡이를 조절하고 소장과 대장의 반응 기전

이 다름을 알 수 있었다.

일반적으로 변비 등 위장관 운동성 장애에 의한 치료는 주로 대장에서 이루어지고 있음을 알 수 있다. 본 연구로 홍화가 위장관 특히 대장운동을 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 이런 반응이 나타나고 다른 기전에서는 소장과 대장이 어떤 차이점이 있는지에 대한 좀 더 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었다.

References

1. Choi SH, Im SI, Jang EY, Cho YS. Volatile Components of Flower and Seed of Safflower. Food Science and Biotechnology. 2004;36(2): 196-201.
2. Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, Yoon KS. Anti-wrinkle Effect of Safflower (*Carthamus tinctorius*) Seed Extract (I). J Soc Cosmet Sci Korea. 2004;30(1):15-22.
3. Takii T, Hayashi M, Hiroma H, Chiba T, Kawashima S, Zhang HL, et al. 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. 1999;125: 910-5.
4. Han MR, Lee Y, Kim NW. Anti-wrinkle and Antioxidative Effects of Ethanolic Extracts of *Inula Flos*, *Chrysanthemi Flos* and *Carthami Flos*. J Invest Cosmetol. 2013;9(4):29-37.
5. Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS, et al. Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int. 2002;71(1):88-94.
6. Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, Yoon KS. Anti-wrinkle Effect of Safflower (*Carthamus tinctorius*) Seed Extract (II). J Soc Cosmet Scientists. 2004;30(4):449-56.
7. Szurszewski JH. Electrical basis for gastrointestinal motility. In Physiology of the gastrointestinal tract, 2nd Edition, ed. Johnson LR, Raven Press, New York, pp 383-422, 1987.
8. 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.
9. Farrugia G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. Annu Rev Physiol 1999;61:45-84.
10. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 1996;111:492-515.
11. Kim BJ, Lim HH, Yang DK, Jun JY, Chang IY, Park CS, et al. Melastatin-type transient receptor potential channel 7 is required for intestinal pacemaker activity. Gastroenterology. 2005;129(5):1504-17.
12. Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD, et al. A Ca(2+)-activated Cl(-) conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. J Physiol. 2009;587(Pt 20):4905-18.
13. Park JW, Yoon SW, Kim JS, Ryu BH. A Clinical Pilot Study of Carthami-Semen Herbal Acupuncture Treatment for Chronic Constipation. J Korean Acupunct Moxib Soc. 2008;25(5):127-37.
14. Wu SY, Man KM, Shen JL, Chen HY, Chang CH, Tsai FJ, et al. Effect of *Flos carthami* Extract and α 1-Adrenergic Antagonists on the Porcine Proximal Ureteral Peristalsis. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:437803.

15. Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*. 1996;43(6):1255-60.
16. Yasukawa K, Akihisa T, Kasahara Y, Kaminaga T, Kanno H, Kumaki K, et al. Inhibitory effect of alkane-6,8-diols, the components of safflower, on tumor promotion by 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 1996;53(2):133-6.
17. Zhao L, Zhang Y, Xu ZX. Clinical effects and experimental study of xijian tongshuan pill. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1994;14(2):71-3.
18. Meselhy MR, Kadota S, Momose Y, Hatakeyama M, Kusai A, Hattori M, et al. Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca²⁺ antagonistic activity of tinctormine. *Chem Pharm Bull*. 1993;41(10):1796-802.
19. Leung AW, Mo ZX, Zheng YS. Reduction of cellular damage induced by cerebral ischemia in rats. *Neurochem Res*. 1991;16(6):687-92.
20. Liu E, Wei Y, Yang XZ, UEG, Hu J, Cheng RE. Hypotensive effects of safflower in spontaneous hypertensive rats and influence on plasma renin activity and angiotensin II level. *Yao Xue Xue Bao*. 1992;27(10):785-7.
21. Oh C, Lee H, Yim YK, Seong N. Influence on the Anti-cancer and Immune response improvement of Herbal-acupuncture with *Carthami Flos* infusion solution into Chungwan(CV12). *Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society*. 2004;21(5); 205-18.
22. Romano C, Price M, Bai HY, Olney JW. Neuroprotectants in Honghua; glucose attenuates retinal ischemic damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(1):72-80.
23. Hwang MW, Lee JH, Kim BJ. *Carthami flos* depolarizes the interstitial cells of Cajal and increases the motility in gastrointestinal tract. *Int J Pharmacol*. 2014;10(5):248-57.
24. Tokutomi N, Maeda H, Tokutomi Y, Sato D, Sugita M, Nishikawa S, et al. Rhythmic Cl⁻ current and physiological roles of the intestinal c-kit positive cells. *Pflugers Arch*. 1995;431:169-77.
25. Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 1998;115:314-29.
26. Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol*. 1998;513:203-13.