

원 저

인체 간 Microsome에서의 우슬 추출물의 Cytochrome P450 약물 대사효소에 대한 억제작용

김경아, 이지숙, 박허준, 김진우, 김창주, 심인섭, 한승무, 임사바나
경희대학교 동서의학연구소 통증 및 신경의학연구팀

The Inhibitory Effect of *Achyranthes bidentata radix* Extracts on Cytochrome P450-Catalyzed Reactions in Human Liver Microsomes

Kyoung-Ah Kim, Ji-Suk Lee, Hi-Joon Park, Jin-Woo Kim, Chang-Ju Kim,
In-Sop Shim, Seung-Moo Han, Sabina Lim

Research Group of Pain and Neuroscience, East-West Medical Research Institute, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Objectives : *Achyranthes bidentata radix* (Usul) has been used as anti-arthritic, antiallergic, antidiuretic, and so on. Recently extracts of *Achyranthes bidentata radix* have shown anti-inflammatory and cancer preventive effects in vitro and in vivo.

Methods : We therefore evaluated the inhibitory potential of ethanol extracts of *Achyranthes bidentata radix* on cytochrome P450 (CYP) isoforms-catalyzed reactions, which relate to causes of cancer and inflammation, including CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6, CYP2C8, and CYP3A4, using human liver microsomal preparations.

Results : The extracts showed weak or negligible inhibitory effects on CYP2C9-catalyzed (S)-warfarin 7-hydroxylation, CYP2C19-catalyzed S-mephenytoin 4-hydroxylation, and CYP2D6-catalyzed dextromethorphan O-demethylation with each IC50 over 1750 g/ml, respectively. However, it showed relatively significant inhibitory effect on CYP1A2-catalyzed phenacetin O-deethylation and CYP2E1-catalyzed chlorzoxazone 6-hydroxylation with IC50s of 970.5 g/ml and 821.4 g/ml, respectively.

Conclusions : These results suggest that extracts of *Achyranthes bidentata radix* have inhibitory effects on CYP-catalyzed reactions, especially CYP1A2 and CYP2E1, in human liver microsomes. These effects appear to relate to anti-inflammatory and cancer prevention following decrease of reactive oxygen species formed by CYP, especially CYP1A2 and CYP2E1, by *Achyranthes bidentata radix*. However, further evaluation is necessary to demonstrate and to confirm its effects in human. (J Korean Oriental Med 2003;24(2):40-46)

Key Words: *Achyranthes bidentata radix*, cytochrome P450, Herb-drug interactions

서 론

- 접수 : 2003년 1월 20일 · 논문심사 : 2003년 2월 10일
- 채택 : 2003년 4월 9일
- 교신저자 : 임사바나, 서울시 동대문구 회기1동 경희대학교 동서의학연구소 통증 및 신경의학연구팀 (Tel. 02-961-0324, Fax. 02-961-7831, E-mail: lims@khu.ac.kr)
- 이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단과 경희대학교의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2001-005-F00024)

우슬 (牛膝, *Achyranthes bidentata radix*)은 Amaranthaceae 종에 속하는 약물로서 우리나라를 비롯하여 중국, 베트남 등에 널리 분포한다. 우슬은 항관절염 (antiarthritic), 최음효과 (aphrodisiac), 항마이

러스 (antiviral), 피임 (antifertility), 지사효과 (laxative), 분 만 유 도 (ecbolic), 낙 태 유 도 (abortifacient), 항경련 (antispasmodic), 항고혈압 (antihypertensive), 항응고효과 (anticoagulant), 이뇨 (diuretic), 및 항암효과 (antitumor) 등이 알려진 약재이다¹⁾. 또한 기침, 신수종 (renal dropsy), 치루 (fistula), 피부발진 (skin rash), 비염 (nasal infection), 천식 (asthma), 만성 말라리아 (chronic malaria), 발열, 무월경 (amennorhea), 복통 (abdominal cramp) 및 사교상 (snake bite) 등에도 널리 사용되기도 한다²⁾. 우슬의 함유 성분을 밝히는 많은 연구가 이루어져 왔고 특히, rutin, saponin, achyranthine, caffeic acid, oleanolic acid, inokosterone, ecdysterone, rubbrosterone 및 physcion 등이 함유된 것으로 보고되고 있다^{3,4)}. 최근에 많은 연구를 통해 *in vitro* 실험상에서 우슬의 면역 조절작용⁵⁾ 급성 및 아급성 염증에 대한 항염증효과에 대한 효과가 알려져 있으며⁶⁾, 또한 human cancer colon cell에서의 cisplatin에 의한 세포독성 (cytotoxicity)을 증가시켜 항암 효과가 있음이 증명되고 있다⁸⁾. 이러한 효과들의 입증을 통해 신약의 가능성을 제시 받고 있다.

많은 약물들은 체내 흡수 후 간세포 (hepatocyte)에 존재하는 내망세포계 (endoplasmic reticulum)의 cytochrome P450 (CYP)에 의해 신체의외로의 제거를 위한 대사과정을 거친다. 최근 서구에서도 민간요법으로 널리 사용되며 '4G'로 잘 알려진 인삼 (ginseng), 은행잎 (ginko biloba), 마늘 (garlic), 생강 (ginger) 뿐만 아니라 항우울제로 널리 사용되고 있는 St. John's wart 등과 처방약물간의 약물상호작용이 꾸준히 보고되고 있고 이들 각각의 중요 활성성분 등인 인삼에서의 ginsenoside, 은행잎에서의 ginkgolide-B, 마늘에서의 diallyl disulfide, 생강의 gingerol 및 shogaol 등과 약물대사효소간의 상호작용 가능성에 대해서도 학계에서 꾸준히 연구결과가 발표되고 있는 실정이나⁹⁾, 아직까지 우리나라 전통한약 제제에 대한 약물상호작용의 가능성에 대한 연구는 전무한 실정이다. 또한 많은 한약제제들의 추출물들에 대한 항염증 작용이나 암발생 (carcinogenesis)의

억제 작용기전에 대한 CYP의 관련성이 최근 대두되고 있고 이에 대한 연구가 꾸준히 보고 되고 있다.

본 연구에서는 약재로 주로 쓰이는 중국산 우슬을 사용하여 전래로부터 내려오는 민간요법뿐만 아니라 최근 여러 연구를 통한 항염증작용과 항암효과를 보이고 있는 우슬의 CYP에 대한 억제작용의 가능성에 대해 규명해보고자 하였으며 이를 통해 우슬의 효능의 우수성을 알아보하고자 하였다.

방 법

1. 사용 시약 및 인체 간 microsomes

dextromethorphan, dextrophan, phenacetin, acetaminophen, chlorzoxazone, paclitaxel 등은 Sigma-Aldrich 사 (St. Louis, USA)로부터 구입하였으며, (S)-warfarin, 7-hydroxywarfarin, (S)-mephenytoin, 4-hydroxymephenytoin, midazolam, 1-hydroxymidazolam은 Ultrafine Chemicals 사 (Manchester, UK)로부터 구입하였다. 증류수 (deionized water), methanol, 및 acetonitrile은 HPLC (High-performance liquid chromatography) grade를 사용하였다. Pooled human liver microsomes는 Gentest 사 (Woburn, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 인체간 microsomes을 이용한 CYP 동효소 활성도 평가

우슬의 CYP에 대한 억제 효과를 평가하기 위해 다음의 7 가지 CYP 동효소 활성도를 나타내는 지표 약물 (probe drug) 대사 과정에 대한 억제 유무 및 억제 정도를 평가하였다. 먼저 CYP1A2는 phenacetin O-deethylation을¹⁰⁾, CYP2C8은 Paclitaxel 6-hydroxylation을¹¹⁾, CYP2C9은 (S)-warfarin 7-hydroxylation을¹²⁾, CYP2C19은 (S)-mephenytoin 4'-hydroxylation을¹³⁾, CYP2E1은 chlorzoxazone 6-hydroxylation을¹⁴⁾, CYP3A4는 midazolam 1-hydroxylation을¹⁵⁾, CYP2D6는 dextromethorphan O-demethylation을¹⁶⁾ 측정함으로써 평가하였다. 모든 대사 억제 연구에서 억제제로서 사용된 우슬은 중국산이며 70% ethanol에 추출하여

물에 녹여 사용하였고 경시적 회색은 같은 용액으로 회색하여 각각 최종 농도가 1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 반응액에 첨가하였다. 각 CYP 동효소의 활성도는 특정 기질 약물들로부터 각각 생성되는 대사산물을 단위 microsomes에 대한 단백질 농도 (mg) 에서 단위 반응시간 (분)당 생성되는 양을 기준으로 나타내었다. 각각의 선택적 지표약물의 기질농도는 억제효과 평가시 사용할 microsomes에서의 대사능을 평가하였을 때 얻어진 평균 K_m 값을 기준으로 하여 정하였다. 모든 *in vitro* incubation 실험은 duplicate로 시행하였으며 평균값을 사용하였다. Incubation 혼합액 (mixture)는 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 및 NADPH-regenerating system (0.5 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, 및 1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)와 함께 pooled human liver microsomes은 최종 농도가 1 mg/ml이 되게 사용하였다. 억제제로 사용된 각각의 우슬과 incubation 혼합액을 5 분간 preincubation시킨 후 각각의 CYP에 대한 기질약물을 첨가함으로써 반응을 시작하였다. CYP1A2에 대한 활성도를 측정하기 위하여 50 μM 의 phenacetin을 첨가하여 사용하였으며 30 분간 반응시켰으며, CYP2C8, CYP2C9 및 CYP2C19의 경우 각각 100 μM 의 (S)-warfarin 및 5 μM 의 (S)-mephenytoin을 각각 한 시간 동안 반응시켰다. CYP2D6의 경우 50 μM 의 dextromethorphan을 30 분 동안 반응시켰으며 CYP3A4의 경우 25 μM 의 midazolam을 30 분 동안 반응시켰다.

3. HPLC를 이용한 약물 농도 분석

각각의 지표약물에 대한 대사산물의 농도분석은 HPLC (high-performance liquid chromatography, Shiseido사 Nanospace SI-1 model 2001 pump, model 2023 injector, SI-1 model 2002 UV검출기, model 2004 column oven, 및 Jasco사의 형광검출기)를 사용하여 측정하였다. Phenacetin을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사 물질인 acetaminophen은 Shiseido사 (Tokyo, Japan)의 Capcell Pak CN column(4.6 x 250 mm; particle size 5 μM)을 이용하여 분리하였고, 245

nm 파장의 UV검출기에서 정량분석하였다. 이때 이동상의 조성은 0.01 % phosphoric acid: 25 mM KH_2PO_4 : CH_3CN (750:185:65, v/v/v, pH 9.0)의 비율로 하였다.

Paclitaxel을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사물질인 6-hydroxypaclitaxel의 분석조건은 Shiseido사 (Tokyo, Japan)의 Capcell Pak CN column(4.6 x 250 mm; particle size 5 μM)을 사용했고 227 nm 파장에서 UV검출기를 이용하여 정량 분석하였다. 이동상의 조성은 15mM ammonium acetate: CH_3CN (630:370,v/v)의 비로 분석 하였다. (S)-warfarin을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사 물질인 7-hydroxywarfarin의 분석 조건은 Waters사 (Milford, USA)의 Novapak C18 column (3.9 x 150 mm, particle size 5 μm)을 사용했고, 320 nm 파장에서 UV검출기에서 정량 분석하였다. 이동상의 조성은 1.5 % acetic acid: CH_3CN (690:310, pH 4.7)의 비로 하였다. S-Mephenytoin을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사물질인 4'-hydroxymephenytoin은 Merck사 (Milford, USA)의 LiChrosorb RP-18 column (3.9 x 250 mm, particle size 5 μm)을 이용하여 분리하였고, 225 nm 파장의 UV 검출기에서 정량 분석하였다. 이때 이동상의 조성은 1% acetic acid: CH_3CN (670:330, v/v, pH 4.0)이었다. Dextromethorphan을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사 물질인 dextrophan은 Shiseido사 (Tokyo, Japan)의 Capcell Pak CN column (4.6 x 250 mm, particle size 5 μm)을 이용하였으며, 형광 검출기의 excitation 및 emission 파장은 각각 278 nm과 312 nm의 파장에서 정량 분석하였다. 이때 이동상의 조성은 10 mM KH_2PO_4 : methanol: CH_3CN (570:230:200, v/v, pH 4.0)이었다. Midazolam을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사 물질인 1-hydroxymidazolam의 농도는 Waters사 (Milford, USA)의 (-Bondapak C18 column (3.9 x 300 mm, particle size 5 μm)을 이용하였으며, 245 nm 파장의 UV 검출기에서 분석하였다. 이때 이동상의 조성은 0.4 M acetate buffer (pH 4.0): methanol: CH_3CN (550:50:400, v/v)이었다. 모든 샘플들은 반응이 끝나고 10분간 원심 분리하여 얻은

상층액 일부를 취하여 HPLC 시스템에 직접 주입하였다.

4. 효소역학 경수 산출 및 평가

각 CYP 동효소에 대한 우슬의 억제 정도를 나타내는 경수인 IC₅₀ 값은 WinNonlin® (Version 2.0, Scientific Consulting, Inc., Apex, NC, USA) 프로그램을 이용하여 비선형 회귀분석법(nonlinear regression analysis)을 이용하여 산출하였다.

결 과

우슬 추출물의 농도를 0 - 1000 µg/mL로 하여 각각의 CYP 동효소 (CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, 및 CYP3A4)에 대한 대사능 (metabolic activity)의 억제 유무 및 정도를 각각의 CYP 동효소에 대한 지표 약물을 인체 간

microsomes와 함께 반응시킨 *in vitro* 실험을 통해 관찰하였다.

본 연구에서 얻어진 각각의 CYP에 대한 지표 약물에 대한 대사물의 생성 속도 (mean ± S.D., n=6)는 acetaminophen (CYP1A2)의 경우 24.1 ± 1.8 pmol/min/mg protein이었으며, 6-hydroxyacetylsalicylic acid (CYP2C8)의 경우 21.0 ± 1.4 pmol/min/mg protein, 7-hydroxywarfarin (CYP2C9)의 경우 128.4 ± 15.9 pmol/min/mg protein, 4-hydroxymephenytoin (CYP2C19)의 경우 142.5 ± 5.1 pmol/min/mg protein, 6-hydroxychlorzoxazone (CYP2E1)의 경우 265.2 ± 1.3 pmol/min/mg protein, dextropropriofen (CYP2D6)의 경우, 207.9 ± 5.4 pmol/min/mg protein, 1-hydroxymidazolam (CYP3A4)의 경우 57.1 ± 7.2 pmol/min/mg protein이었다.

우슬은 CYP2E1 및 CYP1A2에 대해 상대적으로 강한 억제 작용을 보였다 (IC₅₀s; 821.4 µM 및 970.5 µ

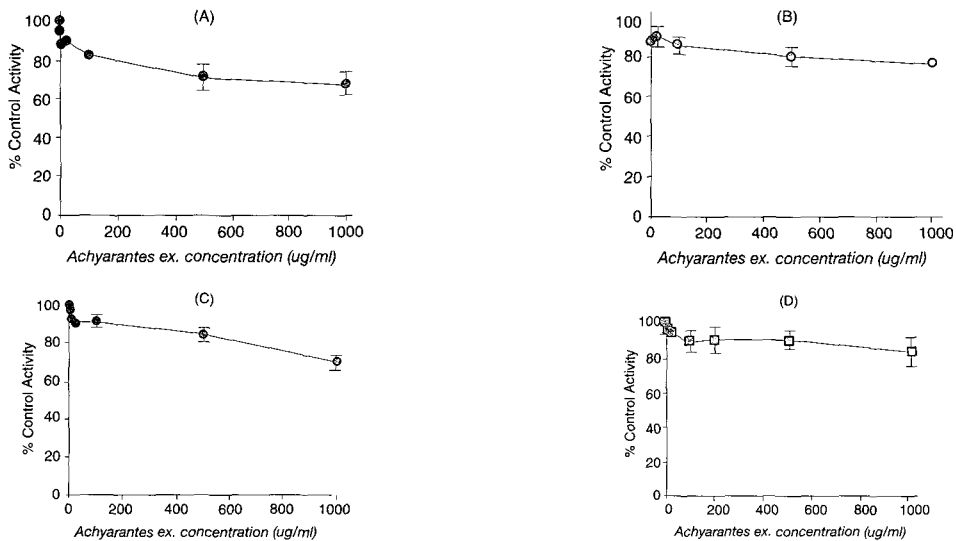


Fig. 1. Inhibitory effect of extracts of *Achyranthes bidentata radix* on CYP2C19 (A), CYP3A4 (B), CYP2C9 (C), and CYP2D6 (D)-catalyzed reactions in pooled human liver microsomes.

Achyranthes bidentata radix extracts was incubated using conditions described under materials and methods. The enzyme reactions evaluated were (S)-mephenytoin 4-hydroxylation (A), midazolam 1-hydroxylation (B), (S)-warfarin 7-hydroxylation (C), and dextromethorphan O-demethylation. (S)-mephenytoin, midazolam, (S)-warfarin, and dextromethorphan were used at concentrations around their corresponding Km values. Each data point represents mean ± S.D.

M) (Fig 2. 및 Table 1). 하지만, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2C8, 및 CYP3A4에 대해서는 억제작용이 매우 약하거나 거의 관찰되지 않았다 (Fig 1 및 2, Table 1).

고 찰

우슬의 CYP에 대한 억제작용을 인체 간 microsome을 이용하여 검증하였을 때, CYP1A2 및 CYP2E1에 대한 억제작용이 관찰되었고 이러한 결과는 두가지의 중요한 의미를 가진다고 볼 수 있다. 첫째, 우슬의 지속적인 복용시 우슬 성분에 의한 약물상호작용의 가능성을 추측해 볼 수 있다. 둘째로, 약물에 의한 간독성 및 발암성과 관련이 있는 CYP1A2 및 CYP2E1에 대한 억제작용이 관찰되었다는 점이다. 미국을 포함한 많은 나라에서 건강보조식

품의 형태로 한약제제들이 시중에서 꾸준히 시판되고 있는 실정이며 보고에 의하면 미국의 경우 1991년 한약제제의 사용이 3%이던 것이 1998년 37%로 급증하였고 연간 소요금액만 30억 달러에 이르고 있다^{17,18)}. 이렇게 꾸준한 사용의 증가와 함께 St. John's wart, 은행잎 추출물 (gingo biloba), 감초 (licorice), 인삼 (ginseng)과 같은 많은 한약제제들과 양약간의 약물상호작용 (herb-drug interaction)에 대해서도 증례 보고가 꾸준히 증가추세에 있다⁹⁾. 대부분 이러한 약물상호작용을 유발하는 약제의 경우 거의 공통적으로 CYP에 의한 약물대사억제작용 또는 유도작용을 나타냄으로써 약물상호작용을 유발한다고 알려져 있다. 본 연구에서도 우슬의 경우 단미제 또는 복합제 형태로 많이 복용되고 있으며 다른 병발 질환으로 인한 약물병용시 약물상호작용의 가능성이 크다고 할 수 있다. 하지만, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4에 대한 억제작용이 매우 약하거나 거의 관찰되지 않고 있어 이 CYP에 의해 대사되는 약물과의 상호작용의 가능성은 배제할 수 있으리라 추측된다. 하지만, CYP2E1 및 CYP1A2에 대한 억제작용이 관찰되었으므로 이 두 동효소에 의해 대사되어지는 약물인 소염진통제인 acetaminophen(타이레놀[®]), 근이완제인 chlorzoxazone, ethanol, 마취가스, 천식약물인 theophylline 등과 병용투여시 약물상호작용의 가능성을 추측해 볼 수 있다. 하지만, 우슬

Table 1. Estimated IC50s for each CYP-catalyzed Reaction in Human Liver Microsomes.

CYP Isoform	IC ₅₀ (µg/mL)
CYP1A2	970.5
CYP2C9	2963.9
CYP2C19	2051.7
CYP2D6	3301.4
CYP2C8	1750.1
CYP2E1	821.4
CYP3A4	4277.8

IC₅₀ represents the concentration that inhibit 50 % of control activity. The results represents the mean of duplicate experiments.

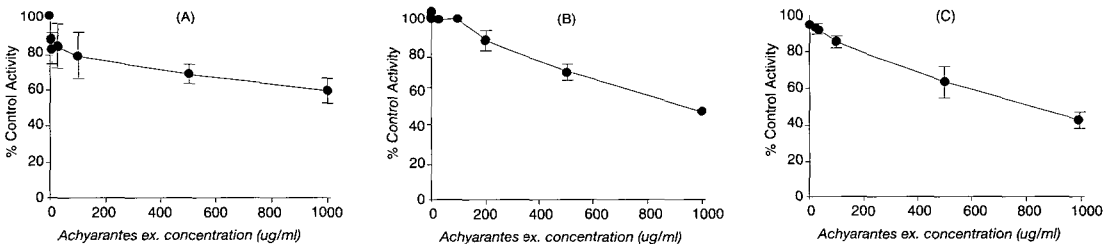


Fig. 2. Inhibitory effect of extracts of *Achyranthes bidentata radix* on CYP2C8 (A), CYP1A2 (B), and CYP2E1 (C)-catalyzed reactions in pooled human liver microsomes.

Achyranthes bidentata radix extracts was incubated using conditions described under materials and methods. The enzyme reactions evaluated were paclitaxel 6-hydroxylation (A), phenacetin O-deethylation (B), and chlorzoxazone 6-hydroxylation (C). Paclitaxel, phenacetin, and chlorzoxazone were used at concentrations around their corresponding Km values. Each data point represents mean ± S.D.

내 rutin, saponin, achyranthine, caffeic acid, oleanolic acid 등과 같은 많은 활성 물질들이 함유되어 있는 것이 알려져 있으나^{4,19)} 이들 각각의 활성 물질들의 인체내에서의 효능에 대한 연구 뿐만 아니라, 복용시 발생할 수 있는 약물 상호작용의 가능성에 대한 연구는 전무한 실정인바 이데 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Carbon tetrachloride, nitrosamine 및 polycyclic aromatic carbon과 같은 간독성을 유발하는 물질들이 인체내에서 독성을 나타내기 위해서는 간세포내에 존재하는 CYP에 의해 특히 CYP1A1/CYP1A2 또는 CYP2E1 등에 의하여 이들 물질의 활성화를 통한 독성 활성물질의 생성으로 독작용을 나타낸다고 알려져 있다^{20,21)}. 이러한 활성과정을 통해 만들어지는 활성산소물질 (reactive oxygen species, ROS)들은 단백질 또는 지방에 부착하거나 불포화지방산으로부터 수소원자를 제거함으로써 지방과산화 (lipid peroxidation)을 통한 간손상 또는 암발생에 관여하는 것으로 알려져 있다^{22,24)}. 이러한 사실을 볼 때, 우슬이 이러한 ROS의 생성과 관련이 깊은 CYP1A2 및 CYP2E1에 대해 억제작용을 나타낸다고 볼 때 간독성물질의 활성화를 억제함으로써 약물로 인한 간독성을 억제한다고 생각할 수 있다. 또한 이러한 ROS의 생성이 급성 및 만성 염증과의 관련성이 있음이 잘 알려져 있고²⁵⁾, 우슬에 의한 CYP1A2 및 CYP2E1 억제작용으로 인한 ROS의 생성억제는 우슬의 항염증물질로서의 가능성을 제시하고 있다²⁶⁾. 이러한 결과로 볼 때 우슬의 CYP의 억제에 의한 ROS의 생성억제는 최근에 밝혀진 항암효과 및 항염증 효과 등의 우슬의 효능을 일부 설명할 수 있으리라 생각된다.

이상으로 본 연구를 통해 우슬이 다른 CYP에 비해 CYP1A2 및 CYP2E1에 대한 선택적 억제작용을 나타내었고 이들 CYP의 억제에 의한 ROS의 생성억제작용을 통하여 간접적으로 항염증 및 항암효과를 가진다고 생각된다.

참고문헌

1. Ratra PS, Misra KC. Seasonal variation in chemical composition of *Achyranthes aspera* and *A. bidentata*. *Indian Forester*. 1970;96:372-75.
2. Selvanayagam ZE, Gnanavendan SG, Balakrishnan K, Rao RB. Antinake venom botanicals from Ethnomedicine. *J Herbs Spices Med Plants*. 1994; 2:45-100.
3. Bishit G, Sandhu H, Verma S. Constituents of *Achyranthes bidentata*. *Fitoterapia*. 1993;64:85.
4. Chang YS, Chen CY, Ko LK. Studies on the chemical constituents of *Achyranthes bidentata* Blume. *J Chin Med*. 1997;8:177-187.
5. Li ZK and Li DD. The immunomodulatory effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. *Yao Xue Xue Bao*. 1997;32(12):881-87.
6. Rajnarayana K, Sripal RM, Chaluvadi MR. Bioflavonoids Classification, Pharmacological. Biochemical effects and Therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 2001;33:2-16.
7. Singh RK, Pandey BL. Further study of anti-inflammatory effects of *Abies pindrow*. *Phytotherapy Research*. 1997;11:535-37.
8. Mitaine-Offer AC, Marouf A, Pizza C, Khanh TC, Chauffert B, Lacaille-Dubois MA. Bidentatoside I, a new triterpene saponin from *Achyranthes bidentata*. *J Nat Prod*. 2001;64(2):243-45.
9. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. *Lancet*. 2000;355(9198):134-38.
10. Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Veronese ME, McManus ME, Turkey RH, Quattrochi LC, Gelboin HV, Miners JO: Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265:401-07.
11. Desai PB, Duan JZ, Zhu YW, Kouzi S. Human liver microsomal metabolism of paclitaxel and drug interactions. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1998;23(3):417-24.
12. Relling MV, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA: Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;252:442-47.

13. Wrighton SA, Stevens JC, Becker GW, Vanden Branden M: Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. Arch Biochem Biophys. 1993;306:240-45.
14. Court MH, Von Moltke LL, Shader RI, Greenblatt DJ. Biotransformation of chlorzoxazone by hepatic microsomes from humans and ten other mammalian species. Biopharm Drug Dispos. 1997;18(3):213-26.
15. Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Harmatz JS, Duan SX, Harrel LM, Cotreau-Bibbo MM, Pritchard GA, Wright CE, Shader RI: Triazolam biotransformation by human liver microsomes in vitro: effects of metabolic inhibitors and clinical confirmation of a predicted interaction with ketoconazole. J Pharmacol Exp Ther. 1996;276:370-79.
16. Ko JW, Desta Z, Soukhova NV, Tracy T, Flockhart DA: In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6. Br J Clin Pharmacol. 2000;49:343-51.
17. Brevoort P: The blooming U.S. botanical market: a new overview. Herbalgram. 1998;44:33-46.
18. Glaser: Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. Nat Biotechnol. 1999;17:17-18.
19. Nguyen T, Nikalov S, Nguyen TD. Chemical research of the aerial part of *Achyranthes bidentata Blume*. Tap Chi Duoc Hoc. 1995;6:17-18.
20. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. Pharmacol Rev. 1988;40:243-288.
21. Guengerich FP. Analysis and characterization of enzymes. In: Hayes, A.W. (Ed.), Principles and Methods of Toxicology. Raven Press, New York. 1984:1259-1313.
22. Brattin WJ, Glende EA Jr, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. J Free Radic Biol Med. 1985;1(1):27-38.
23. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol Ther. 1989;43(1):139-54.
24. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. Semin Liver Dis. 1990;10(4):279-84.
25. Vetrichelvan T, Jegadeesan M. Effect of alcoholic extraction of *Achyranthes bidentata blume* on acute and sub acute inflammation. Indian Journal of Pharmacology. 2002;34:115-18.
26. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic Biol Med. 2000;28(10):1456-62.