

랫드 일차 배양 간세포에서 에탄올의 독성에 대한 헛개나무 물추출물의 보호효과

김종호 · 서영민* · 김주현* · 현선희* · 이상규* · 김춘화* · 강미정* · 전대원** · 윤수홍# · 정태천*#

대구가톨릭대학교 약학대학, *영남대학교 약학대학, **(주)바이오텍스텍

(Received December 3, 2007; Revised January 18, 2008)

Protective Effects of the Water Extracts of *Hovenia dulcis* Thunb Against Ethanol-Induced Toxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Jong Ho Kim, Young Min Seo*, Ju Hyun Kim*, Sun Hee Hyun*, Sang Kyu Lee*, Chun Hwa Kim*,
Mi Jeong Kang*, Tae Won Jeon**, Soo Hong Yoon# and Tae Cheon Jeong*#

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

**Biotoxtech Co., Ltd., Ochang 363-883, Korea

Abstract — The hepatoprotective effects of the water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb (HD) were investigated *in vitro*. Following the induction of hepatotoxicity by ethanol in primary cultures of rat hepatocytes, the protective effects of four different water extracts of HD were determined through serial dose-response and time-dependent studies. The individual extracts used in these studies were prepared from fruits, seeds, leaves and tubes. Treatment of hepatocyte cultures with the water extracts of HD provided a significant protection from the increased lactate dehydrogenase activity induced by ethanol. Particularly, the fruits extract was the most effective against ethanol-induced hepatotoxicity in the primary cultures of rat hepatocytes. The results demonstrated that the extracts might have the protective effect against ethanol-induced toxicity in hepatocyte cultures.

Keywords □ hepatoprotection, *Hovenia dulcis* Thunb, ethanol, primary cultures, rat hepatocytes, lactate dehydrogenase (LDH) leakage

헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb)는 갈매나무과(Rhamnaceae)의 낙엽활엽교목(落葉闊葉喬木)으로 호개나무 또는 허리개나무라고도 불리며, 한명(漢名)은 지구자(枳子), 백석목(白石木), 목밀(木蜜) 및 현포리(玄圃梨) 등으로 쓰이고 있다. 본초강목¹⁾에 따르면 열매는 단맛과 향을 내어 식용(食用) 또는 과주(果酒)로 이용되고, 술을 씹히는 작용이 있다고 하며, 생즙은 술독을 풀고 구역질을 멎게 한다고 하였다. 전통적으로 종자는 주정중독(酒精中毒), 정혈(靜血), 소변불리 및 구토 등에 이용되었고, 과경(果梗)은 건위, 자양보혈(滋養補血)에 효과가 있다고 전해진다.²⁻⁷⁾

이와 같은 문헌적 고찰을 통해 헛개나무의 효능에 대한 연구는

주로 음주 행위로부터 발생하는 인체에 미치는 악영향을 완화 또는 제거할 목적으로 이루어져 왔다. 몇몇 예로서, 주독에 의한 숙취제거, 갈증 해소, 대소변 불통의 치료,⁸⁾ 에탄올에 의해서 유발되는 근육이완 억제 효과⁹⁾ 및 에탄올의 체내 대사촉진과 간보호 효과¹⁰⁾ 등이 있는 것으로 보고되었다. 이러한 연구들은 주로 *in vivo*에서 실험동물을 대상으로 수행되었으나, 본 연구에서는 일차배양 간세포를 시험계로 이용하였다. 일반적으로 *in vitro*에서 암세포주를 이용한 세포배양시험에서는 효소의 발현이 정상 세포와는 다르게 나타나는데, 일차배양 세포시험의 경우는 정상 동물에서 분리한 조직세포를 배양하게 되므로 *in vivo* 상태에서와 유사한 결과를 확인할 수 있다는 장점을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾

본 연구는 전통적으로 민간에서 숙취해소, 알코올중독 등의 용도로 사용되어 온 헛개나무를 이용하여 기능성식품이나 알코올성 간질환 예방 및 치료제로서의 유용성을 실험적 간독성 모델을 이용하여 확인하였다. 방법적으로는 에탄올로 유발시킨 간독

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3618 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) mulyoon@cu.ac.kr
(전화) 053-810-2819 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) taechon@yumail.ac.kr

성에 대한 헛개나무 물추출액의 보호효과를 정상 랫드의 일차배양 간세포로부터 배양액 중으로 유리된 lactate dehydrogenase (LDH) 활성도를 비교, 측정하여 용량-반응 및 시간의존적인 간 보호 효과를 확인하였다.

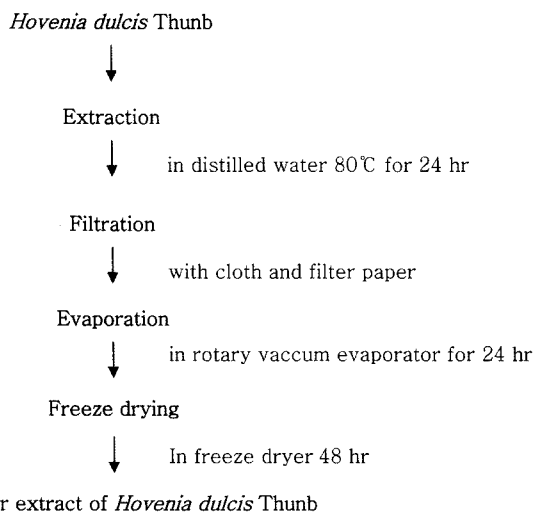
재료 및 방법

시약 및 기구

Ethanol은 Merck사(Merck, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. Collagenase, dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 pentobarbital sodium은 Sigma Chemical사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, Waymouth's MB 752/1 powdered medium, insulin, sodium bicarbonate, sodium oleic acid, gentamycin sulfate, L-serine, L-alanine, L-asparagine, sodium linoleic acid, 5-aminolevulinic acid, α -tocopherol, hydrocortisone, D-thyroxine, estradiol, testosterone 및 glucagon은 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 특급으로 구입, 사용하였다.

시료의 조제

본 시험에 사용된 헛개나무 열매, 종자, 잎 및 줄기는 경기도 양평군 두메지구 수목원에서 구입하였으며, 건조된 열매(200 g)와 종자(100 g)는 분쇄하였고 잎과 줄기(각각 100 g)는 잘게 썰어 열매의 경우는 증류수 1000 ml를, 나머지 부위는 증류수 500 ml씩을 넣고 환류 냉각기를 이용하여 80°C에서 24시간 동안 추출한 후 3회 여과하였다. 이 여과액을 감압농축기(Buchi, Switzerland)를 이용하여 농축, 동결건조(MAXI-Dry Lyo, Germany)시켜 각각 26 g, 8 g, 9 g 및 8.5 g의 시료를 얻었다. 획득한 부위



Scheme 1 – Preparation of the water extract of *Hovenia dulcis* Thunb.

별 물추출물은 시험직전에 증류수에 용해 시켜 여과 및 멸균과정을 거친 후 시료로 사용하였다(Scheme 1).

동물 및 시험물질

동물은 4주령의 Sprague-Dawley계 웅성 랫드를 바이오제노믹스(서울, 한국)로부터 구입하여 14일 동안 순화시킨 후 체중이 200~250 g 되었을 때 간세포 분리시험에 사용하였다. 일반 고형 사료와 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육환경은 23±3°C의 온도와 40~60%의 습도에서 12시간씩 명암주기를 조절하여 관리하였다. 모든 동물의 사육 및 관리는 미국독성학회에서 권장하고 있는 실험동물관리지침(Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology)에 준하였다.

일련의 예비시험을 통해 *in vitro* 간세포 배양계에 2.5%의 에탄올을 처리할 때 간독성 지표인 LDH의 유출이 유의성 있게 관찰되었으므로 본시험에서는 간독성 유발을 위해 에탄올의 농도를 2.5%로 선택, 사용하였다(예비시험의 결과는 나타내지 않음).

부위별 헛개나무 물추출물의 처리 방법으로, 용량-반응시험에서는 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml의 농도로 간세포 배양계에 처리한 후, 24시간 동안 배양하였으며, 시간의존시험에서는 1.0 mg/ml 농도의 시료를 간세포 배양계에 처리한 후, 4, 8, 16 및 24시간 동안 배양하였다. 시험의 결과는 부위별 헛개나무 물추출물 시료 및 에탄올을 처리한 시간을 배양 0시간으로 간주하여 표현하였다. 시험물질의 농도는 예비시험의 결과와 이전의 보고에 준하여 선정하였다.¹²⁾

간세포의 분리 및 일차배양 조건

간세포는 Berry와 Friend의 방법¹³⁾에 따라 두 단계로 분리하였다. 랫드에 pentobarbital sodium(100 mg/kg/2 ml)을 복강 주사하여 마취시킨 후 복부 정중선을 절개하였다. 간문맥을 통해 관류용액(Table I)을 주입하면서 즉시 하대정맥을 절단하여 간으로부터 혈액을 제거하였다. 약 100 ml의 관류용액을 통과시킨 후 하대정맥을 실로 묶었다. 15~20 ml/min의 유속으로 간을 통과한 관류용액은 상대정맥을 통해 관류병에 유출되도록 하여 재순환 시켰다. 이때의 관류용액은 37°C를 유지시켰으며, 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스로 포화시킨 상태에서 사용하였다.

Table I – Composition of calcium, magnesium-free Hank's balanced salt solution (HBSS)

Components	Concentration
Potassium chloride	0.40 mg/ml
Potassium phosphate, monobasic	0.06 mg/ml
Sodium chloride	8.00 mg/ml
Sodium bicarbonate	1.12 mg/ml
Sodium phosphate, dibasic	0.12 mg/ml
Glucose	1.00 mg/ml
Phenol red	0.01 mg/ml
Insulin	1.0×10 ⁻⁷ M
Gentamicin solution	50 µg/ml

Table II - Composition of basal (WO/BA-M2) and complete (AB) media

Constituents	Basal (WO/BA-M2)	Complete (AB)
Waymouth's MB 752/1 liquid insulin	Medium (1×) 1.0×10 ⁻⁷ M	Medium (1×) 1.0×10 ⁻⁷ M
Albumin, bovine serum	2.0 mg/ml	2.0 mg/ml
Sodium bicarbonate	2.67×10 ⁻² M	2.67×10 ⁻² M
Sodium oleic acid	2.0×10 ⁻⁵ M	2.0×10 ⁻⁵ M
Gentamicin sulfate	50.0 µg/ml	50.0 µg/ml
L-Serine	5.32×10 ⁻⁴ M	1.22×10 ⁻⁴ M
Sodium linoleic acid		1.8×10 ⁻⁵ M
5-Aminolevulinic acid		1.0×10 ⁻⁶ M
DL-α-Tocopherol		5.0 µg/ml
Hydrocortisone 21-acetate		1.0×10 ⁻⁵ M
D-Thyroxine		1.0×10 ⁻⁴ M
Testosterone		1.0×10 ⁻⁴ M
Glucagon		30.0 ng/ml

재순환이 시작된 후 관류용액에 0.05~0.06% 농도의 collagenase 용액을 관류병에 첨가하여 간외 팽창될 때까지 15~20분 동안 관류시켰다. 팽창된 간을 적출하여 100 ml의 관류용액이 담긴 비이커에 넣고 수술용 가위로 잘게 자른 후, 약 250 µm 나일론 천을 통과시켜 얻은 단일세포액을 50×g에서 4분간 원심분리시켰다. 상층액을 버리고 다시 관류용액으로 2번 반복하여 세척하였다. 0.4% trypan blue를 이용하여 세포 생존도를 확인한 후 cell counter(Coulter Inc, USA)로 세포수가 1.0×10⁶ 세포/ml이 되도록 배양용 액체배지(Table II)로 조정하였다. Collagen을 미리 처리한 60×15 mm 플라스틱 Petri dish에 3 ml의 간세포현탁액을 넣어 37°C에서 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스를 포함하는 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였으며, 4시간 후 새로운 배지로 교환하였다.

LDH 효소 활성도 측정

LDH 효소 활성도는 Sigma사 또는 아산제약(안산, 한국)에서 구입한 kit를 이용하여 함께 제공된 시험방법에 준하여 측정하였다. Pyruvate 기질 1.0 ml를 NADH vial에 넣은 후 37°C에서 3분간 preincubation한 후, 배양액 0.1 ml를 첨가, 잘 혼합한 다음 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 각각의 vial에 1.0 ml의 color reagent를 넣어 실온에서 20분간 방치한 후, 10 ml의 0.4 N NaOH 용액을 첨가하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 시험결과는 평균±표준오차로 표시하였으며, 대조군에 대한 유의성 여부는 Dunnett의 t-test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

용량-반응 시험

간세포 배양 시작 4시간 후에 배지를 교환하고 2.5% 에탄올

과 0.1, 0.5 및 1.0 mg/ml의 헛개나무 부위별 물추출액을 24시간 동안 처리하였다.

헛개나무의 부위별 물추출물의 일차배양 간세포에 대한 보호 작용을 용량-반응 관계의 여부 측면에서 검토한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 배양액에 2.5%의 에탄올을 24시간 동안 처리한 경우, 모든 헛개나무 물추출물에서 세포로부터 배양액으로 유출된 LDH의 활성이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하여($P<0.05$) 간손상 유발 모델로 확인되었다(Fig. 1A-D).

LDH는 pyruvate를 lactic acid로 전환시키는 효소로 세포질에 존재하므로 에탄올에 의해 간세포막이 손상을 받으면 세포 밖으로 유출되고, 간세포로부터 유출된 LDH의 활성이 높을수록 간독성이 심하게 유발된 것으로 해석할 수 있다.

헛개나무의 열매추출물의 경우, 0.5 및 1.0 mg/ml 물추출액 그 자체가 간세포의 LDH 유출을 대조군에 비해 유의성 있게($P<0.05$) 억제하였을 뿐만 아니라, 에탄올로 유발시킨 간독성에 대해서도 현저한 용량의존성을 보이면서 간세포의 LDH 유출 억제를 나타내었다(Fig. 1A).

헛개나무의 종자 및 잎추출물의 경우는 추출물 그 자체 뿐만 아니라 에탄올로 유발시킨 간독성에 대해서도 보호효과를 나타내지 않았다(Fig. 1B 및 C).

헛개나무의 줄기추출물은 에탄올로 유발시킨 간독성에 대해서 에탄올을 처리 후 0.5 및 1.0 mg/ml 물추출액을 처리한 경우, 유의성 있는 보호작용을 나타내었으나 용량의존성은 나타내지 않았다(Fig. 1D).

용량-반응시험의 결과, 물추출물 중에서 특히 열매부위 추출물의 간보호 작용이 가장 강하였는데 열매추출물의 경우는 이미 화학물질에 의해 야기된 간손상을 치료 및 예방하는 효과가 있는 것으로 몇몇 연구^{9,14,15}를 통해 알려져 있다. 한편, Fig. 1A에서 열매추출물 자체가 정상 세포의 LDH 유출을 억제하는 것으로 보아 에탄올에 의한 간독성을 보호하는 기작이 정상세포 자체에 미치는 영향인지 에탄올에 의한 간독성을 억제하는 지에 대한 추

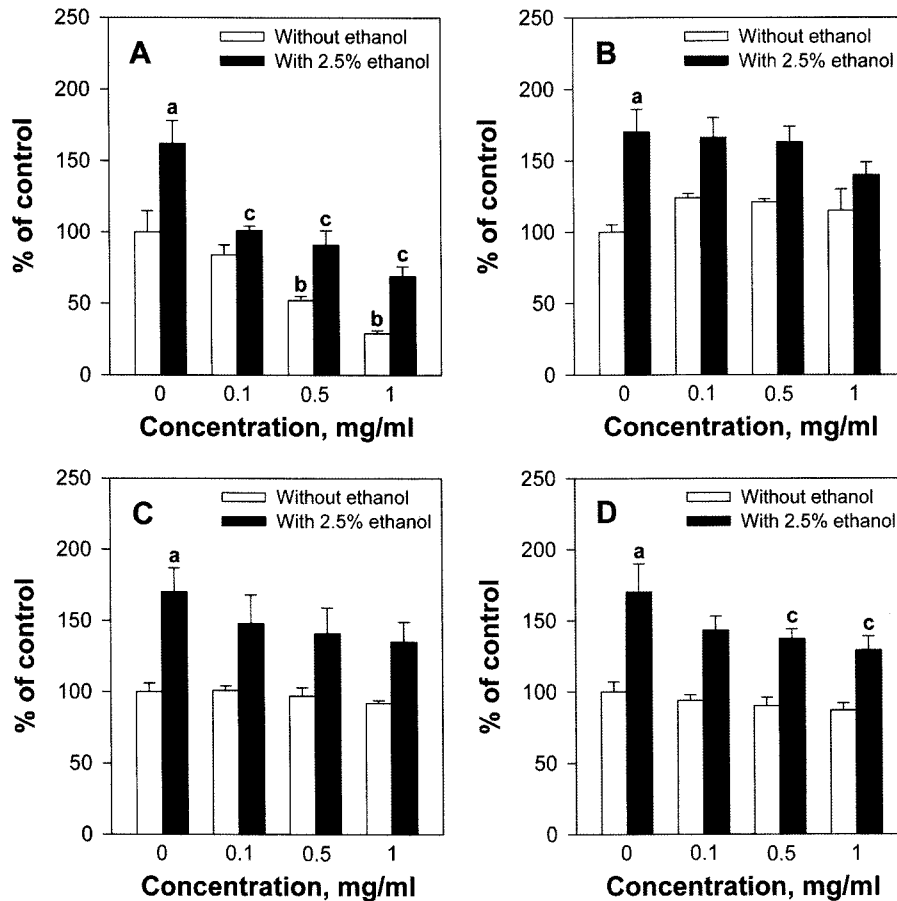


Fig. 1 – Dose-response effects of the water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on ethanol-induced hepatotoxicity in primary cultures of adult rat hepatocytes. Four hr after the culture initiation, the hepatocytes were treated with 2.5% ethanol and the given concentration of the water extract for 24 h. After the incubation, the release of lactic dehydrogenase (LDH) into the culture medium was determined. (A) Fruits, (B) Seeds, (C) Leaves and (D) Tubes. Each bar represents the mean percent activity \pm S.E. of triplicate cultures. The 'a' indicates a significant LDH leakage induced by ethanol at $P < 0.05$. The 'b' indicates the value significantly different from the control at $P < 0.05$. The 'c' indicates the value significantly different from the ethanol control at $P < 0.05$.

가 연구가 필요한 것으로 판단되었다. 이와 관련하여 앞으로 열매추출물이 보이는 보호작용의 기작을 더 연구해 보아야 하지만 현재로서는 크게 사염화탄소의 대사활성화 과정을 헛개나무 물추출물이 억제하던지, 사염화탄소에 의한 지질과산화물을 억제하는 두 가지의 가능성이 가장 클 것으로 판단되어 이에 관한 연구를 수행 중에 있다.

시간의존시험

시간의존시험에서는 간세포 배양 4시간 후에 배지를 교환한 다음, 2.5%의 에탄올과 1.0 mg/ml 농도의 부위별 물추출물 시료를 간세포 배양계에 처리한 후, 4, 8, 16 및 24시간 동안 배양하였다. 이때 배양액으로 유출된 LDH 활성도를 측정하여 헛개나무 부위별 물추출물의 간보호 효과를 시간의존성 여부 측면에서 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

처리시간에 따른 에탄올에 의한 간독성은 처리 후 8시간에서

24시간 사이에 유발되는 것을 확인하였다(Fig. 2A~D).

랫드의 일차배양 간세포 시험계에 에탄올을 처리 후 8시간째에 배양액 증으로 LDH의 유리 현상이 관찰된 결과는 일차배양 간세포가 에탄올과 같은 간독성 물질의 독성평가에 유용한 시험계가 됨을 암시하고 있다.

열매추출물의 경우, 그 자체가 대조군의 LDH 유출을 처리 8시간째부터 24시간 까지 유의성 있게 감소시키는 결과를 나타내었고, 에탄올에 의한 간손상에 대해서도 처리 16시간째부터 유의성 있는 보호작용을 나타내었다(Fig. 2A).

종자추출물의 경우, 용량-반응시험의 결과와는 달리 시간의존 시험에서는 그 자체가 대조군의 LDH 유출을 처리 8시간째부터 16시간 까지 유의성 있게 감소시키는 결과를 나타내었고, 에탄올에 의한 간손상에 대해서도 처리 8시간째부터 유의성 있는 보호작용을 나타내었다(Fig. 2B).

잎추출물의 경우, 시간의존시험에서 대조군의 LDH 유출을 처

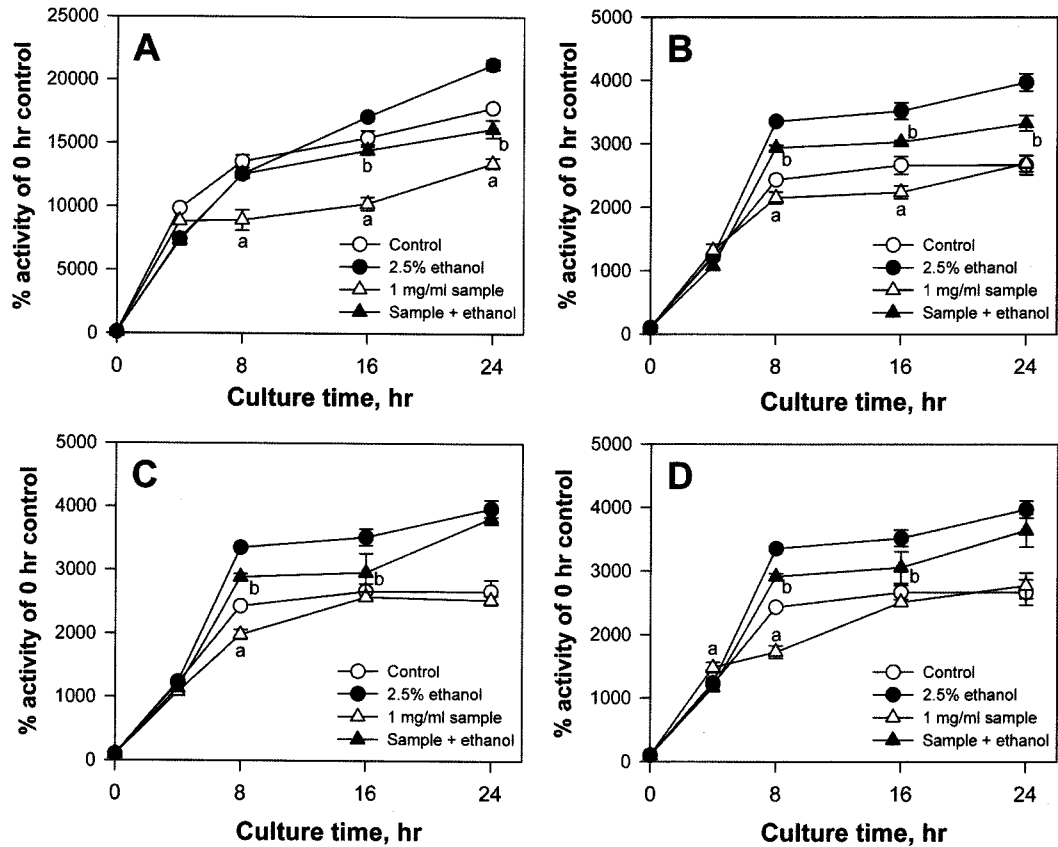


Fig. 2 - Time-dependent effects of the water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on ethanol-induced hepatotoxicity in primary cultures of adult rat hepatocytes. Four hr after the culture initiation, the hepatocytes were treated with 2.5% ethanol and the given concentration of the water extract for 4, 8, 16 and 24 h. After the incubation, the release of lactic dehydrogenase into the culture medium was determined. (A) Fruits, (B) Seeds, (C) Leaves and (D) Tubes. Values represent the mean percent activity \pm S.E. of triplicate cultures. The 'a' indicates the value significantly different from the control at $P < 0.05$. The 'b' indicates the value significantly different from the ethanol control at $P < 0.05$.

리 8시간째에 유의성 있게 감소시키는 결과를 얻을 수 있었으나, 처리 16시간 후에는 보호작용을 나타내지 못하였다. 또한 에탄올에 의한 간손상에 대해서도 처리 8시간 및 16시간째에는 유의성 있게 보호하였으나 24시간 후에는 보호작용을 나타내지는 못하였다. 이러한 결과는 용량-반응시험에서 나타난 잎추출물의 결과와도 유사하였다(Fig. 2C).

줄기추출물의 경우, 대조군의 LDH 유출을 처리 8시간째에는 유의성 있게 감소시키는 결과를 나타내었으나, 처리 16시간 후에는 보호작용을 나타내지 못하였다. 또한 에탄올에 의한 간손상에 대해서도 처리 8시간 및 16시간째에는 유의성 있게 보호하였으나 24시간째에는 보호작용을 나타내지 않았다(Fig. 2D).

헛개나무 열매의 유효성분으로는 flavonoid 계열의 hovenitin I, II, III, (+)-ampelopsin, laricetrin, myricetin, (+)-gallicocatechin 등이 보고되어 있고, saponin과 glycoside 계열의 hovenidulcoside, hovenodulinol, hodulsin, hoduloside 등이 알려져 있다.^{9,16-19)} 하지만 아직 본 연구에서 수행한 각 부위별 유효성분의 종류 및 함량의 차이에 대해서는 보고가 없으며, 이에 관한 추가 연구가

진행된다면 각 부위별로 간독성 보호효과를 나타내는 유효성분의 추정 가능성이 가능해질 것으로 판단되며, 유효성분별 간독성 보호작용 및 그 작용기작에 대한 연구가 가능해질 것으로 사료되었다.

결론

Sprague-Dawley계 랫드에서 분리한 일차배양 간세포 시험계에서 헛개나무 열매, 종자, 잎 및 줄기의 물추출물의 간독성 보호작용을 시험하기 위하여 에탄올을 간독성 유발 모델물질로 사용하여 용량-반응 및 시간의존적 경향의 여부를 확인하였다. 간독성 지표로는 간세포질 효소 중 하나인 LDH가 독성물질에 의한 간세포막 손상의 결과로서 배양액 내로 유출되는 정도를 측정하였다.

헛개나무 물추출물은 부위별로 차이는 있었지만 추출물 자체가 에탄올이 처리되지 않은 정상적인 간세포 배양계에서 LDH의 유리를 유의성 있게 억제하는 결과를 나타내었으며, 에탄올에 의한 간독성을 용량 및 시간의존적으로 상관성을 보이며 보

호작용을 나타내었다. 4가지 물추출물 중에서 특히 열매 물추출물의 작용이 가장 강하였다.

이상 결과를 종합하면 헛개나무 물추출물은 일차배양 간세포 시험계에서 에탄올에 의한 간독성에 대하여 우수한 보호 효과를 갖는 것으로 판단되었다.

참고문헌

- 1) 李時珍 : 本草綱目, 人民衛生出版社, 北京 (1981).
- 2) 안상욱, 김영길, 김민희, 이병익, 이상호, 권혁일, 황백, 이현용 : 헛개나무와 오리나무 추출물의 간 해독작용 및 체내 알코올 분해능 비교. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **7**, 263 (1999).
- 3) 박후연 외 : 두산 세계 대백과사전, 제일출판사, p. 105 (1989).
- 4) 정창호, 심기환 : 헛개나무 잎과 과병의 화학성분. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **6**, 469 (1999).
- 5) 이영노 : 원색 한국 식물도감, 교학사, 서울, p. 476 (1987).
- 6) 주상우 : 원색 한국 식물도감, 산과 들의 계절식물, p. 535 (1992).
- 7) Kim, T. J. : Korean resources plants. *Seoul National University Press, Seoul, Korea* (1996).
- 8) 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 : 중약대사전. 도서출판 정담, 서울, pp. 5078-5081 (1998).
- 9) Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueda, T., Yoshizumi, S., Ninomiya, K., Murakami, N., Matsuda, H., Saito, M., Fujii, W., Tanaka, T. and Yamahara, J. : Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II, and III, isolated from hoveniae semen seu fructus, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi* **117**, 108 (1997).
- 10) Sakai, K., Yamane, T., Saitoh, Y., Ikawa, C. and Nishihata, T. : Effect of water extracts of crude drugs in decreasing blood ethanol concentrations in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **35**, 4597 (1987).
- 11) Jemnitz, K., Veres, Z., Torok, G., Toth, E. and Vereczkey, L. : Comparative study in the Ames test of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene metabolic activation using rat hepatic S9 and hepatocytes following *in vivo* or *in vitro* induction. *Mutagenesis* **19**, 245 (2004).
- 12) Kim, J. H., Hyun, S. H., Lee, S. K., Kim, J. H., Seo, Y. M., Kang, M. J., Jeon, T. W., Yun, S. H. and Jeong, T. C. : Hepatoprotective effects of the water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the primary cultures of adult rat hepatocytes. *Lab. Anim. Sci.* **23**(4), 385 (2007).
- 13) Berry, M. N. and Friend, D. S. : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506 (1969).
- 14) Hase, K., Ohsugi, M., Xiong, Q., Basnet, P., Kadota, S. and Namba, T. : Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 381 (1997).
- 15) Kim, O. K. : Protective effects of extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 1260 (2001).
- 16) Yoshikawa, K., Nagai, Y., Yoshida, M. and Arihara, S. : Antisweet natural products. VIII. Structures of hodosides VI-X from *Hovenia dulcis* Thunb. var. *tomentella* Makino. *Chem. Pharm. Bull.* **41**(10), 22 (1993).
- 17) Yoshikawa, M., Ueda, T., Muraoka, O., Aoyama, H., Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, J. and Murakami, N. : Absolute stereostructures of hovenidulciosides A1 and A2, bioactive novel triterpene glycosides from *Hovenia* semen seu fructus, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* **43**(3), 532 (1995).
- 18) Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueda, T., Matsuda, H., Yamahara, J. and Murakami, N. : Bioactive saponins and glycosides. IV. Four methyl-migrated 16,17-seco-dammarane triterpene glycosides from Chinese natural medicine, *Hovenia* semen seu fructus, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB: absolute stereostructures and inhibitory activity on histamine release of hovenidulciosides A1, A2, B1, and B2. *Chem. Pharm. Bull.* **44**(9), 1736 (1996).
- 19) Li, G., Min, B. S., Zheng, C., Lee, J., Oh, S. R., Ahn, K. S. and Lee, H. K. : Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis*. *Arch. Pharm. Res.* **28**(7), 804 (2005).