

Immunological Activity of Solvent Fractions from *Epimedium koreanum* Nakai

Myoung-Su Park, Seo-Jin Kim, Jun Wang, Gwang-Hee Kim and Deog-Hwan Oh[†]

Department of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology and Bioengineering
and Institute of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Korea

삼지구엽초 용매별 분획 추출물의 면역관련 활성

박명수 · 김서진 · 왕 준 · 김광희 · 오덕환[†]

강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학과

Abstract

Epimedium koreanum Nakai is a wild medicinal plant commonly consumed in South Korea due to its beneficial health effects. In this study, the antimutagenic and immunological activities of *E. koreanum* Nakai extracts were investigated for their use in food. In the immunomodulating activity, the effects of *E. koreanum* Nakai on the B cell (Rhamos) and T cell (Molt-4) were investigated. The results showed that the growth and viability of the B and T cells were increased and activated more in the ethylacetate (1.35 and 1.48 times) and water fraction (1.30 and 1.40 times), respectively. In the Ames test, none of the fractions produced a mutagenic effect on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100. The ethylacetate fraction showed a strong antimutagenic effect (98%) on and a high butanol fraction (84%) of B(α)P in *S. typhimurium* TA98 and TA100, respectively. In 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), all the solvent fractions showed an over 70% antimutagenic effect, except for the chloroform extract. Especially, ethylacetate and butanol showed strong inhibition of the mutagenic effects (80 and 90%) on 4NQO in *S. typhimurium* TA98 and TA100, respectively. These results provide preliminary data for the development of *E. koreanum* Nakai as an edible food material.

Key words : *Epimedium koreanum* Nakai, MTT assay, Ames test, antimutagenic activity, immunological activity

서 론

삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 강원도, 경기도, 평안남도, 함경남도, 함경북도의 심산지역, 산지계곡 및 소림의 그늘에 자생하는 약용식물로서 다년생 초목이다. 줄기는 가늘고 원추형이며 표면은 황녹색 혹은 담황색이고 광택이 있다. 줄기에 붙은 잎은 대생이고 2회 3출복엽이다. 작은 잎은 난원형으로 길이 3~13 cm, 너비 2~7 cm이며 잎 끝은 약간 뾰족하다. 정생하는 작은 잎은 밑부분이 심장형이고 양쪽의 작은 잎은 비교적 작으며 심장형에 가깝고 바깥편은 비교적 크고 이(耳)형을 나타내며 가장자리는

황색으로 자모(刺毛)와 같은 잔톱니로 되어 있다. 상면표피는 황록색이고 하면표피는 회록색이며 주맥은 7~9줄이고 밑부분에는 드문드문 가늘고 긴 털이 있고 그물맥이 뚜렷하다. 작은 잎자루는 길고, 짙은 뾰뾰하며 냄새가 없고 맛은 조금 쓰다(1).

삼지구엽초의 주성분은 flavonoid인 icariin(2,3), epimedoside A(4), quercetin, anhydroicaritin-3-O-α-rhamnoside, n-alkanes, phytosterols, phytosteryl glucosides, epimedoside C, icarisiside A1, maltol, salidroside, epimedin I, icaritin-3-O-α-rhamnoside, ikarisoside A-F 등이 분리보고(5-7)되었다. 이중 icariin은 삼지구엽초의 주요 약효성분으로 고혈압에 효과를 나타내는 보고(8)와 간독성을 억제한다는 보고(9)가 있으며, flavonoid glycoside인 epimedin A, B 및 C가 추가로 보고(10)되었다. 이러한 삼지구엽초는 다른 생약재명으로

[†]Corresponding author. E-mail : deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone : 82-33-250-6457, Fax : 82-33-241-0508

음양곽이라고도 불리며 관상용, 약용으로 쓰이고 한방과 민간에서 잎과 줄기 및 전초를 강장, 이뇨, 창종, 생목, 장근골, 건망증, 음위 및 강정 등에 약재로도 쓰인다(11). 또한 말초혈관을 확장시켜 지속성이 뚜렷한 혈압강하작용을 나타내며 혈당강하 작용과 항이뇨 작용이 있는 생약재이다(11). 일반적으로 음양곽(*Epimedium Herba*)이라 함은 삼지구엽초 또는 기타 동속 근연 식물(매자나무과; *Berberidaceae*)의 지상부를 건조한 것을 사용하고 있으나 대한약전의 한약(생약) 규격집에 삼지구엽초의 지상부를 음양곽으로 규정하고 있다(11).

최근에는 국민소득의 향상과 환경의 악화 등에 따라 건강에 대한 관심도가 고조되면서 각종 건강식품이 개발되고 그 수요 또한 증가하고 있는 실정이다(12). 그 중에서도 삼지구엽초는 앞에서 언급된 바와 같이 이용성이 높은 식물임에도 불구하고 국내에는 면역관련 활성에 대하여 연구하여 보고된 바가 많지 않으며, 다만 한방에서 약제 첨가물로서 일부 사용되고 있을 뿐이다. 따라서 본 연구에서는 예로부터 약용으로 이용되고 있는 삼지구엽초를 극성에 따라 용매별로 분획·추출하여 각 추출물들의 면역관련 활성을 검토함으로써 기능성 식품 소재로서 활용하기 위한 기초자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 경기도 농업기술원에서 재배된 것을 제공받아 실험에 사용하였다(13).

추출 및 분획

삼지구엽초의 뿌리, 줄기, 잎을 증류수로 2-3차례 수세한 다음 음건한 후 잘게 세절하였다. 세절된 삼지구엽초를 일정량 취하여 삼각플라스크에 넣고, 10배의 70% 에탄올을 첨가하여 50°C에서 3시간동안 2회 환류 추출한 다음 No. 2 여과지로 여과하였다. 여과액을 4°C에서 12시간 냉장 후 감압 농축하여 용매의 극성에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물 층으로 순차적으로 분획하였고, 획득한 분획물은 동결건조하여 실험에 사용하였다.

면역 활성 측정

본 실험에 사용한 면역 증진 효과 검증세포는 인간 면역세포인 T세포(Molt-4)와 B세포(Rhamos)를 이용하여 검증하였다. 삼지구엽초 용매분획 추출물의 면역 증진 효과는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetra-zolium bromide (MTT; Sigma, St Louis, MD, USA) assay(14, 15)와 24 well plate에 세포를 2.0×10^4 cells/mL의 농도로 조절한

후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시키며 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포수를 측정하여 생육증강도를 측정하는 두 가지 방법을 사용하였다. MTT assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase에 의해 황색 수용성 물질인 MTT로부터 purple formazan이 생성되는 원리를 이용하였다. 이를 위해 각 세포주는 4×10^4 cells/mL의 농도로 조절하고 96 well plate에 cell을 100 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 20 μ L씩 첨가하여 2-3일 동안 다시 배양하였다. 배양 완료 후 PBS에 2 mg/mL 농도의 용해시켜 제조한 MTT용액을 각 well에 10 μ L씩 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT가 환원되도록 하였다. 시약이 포함된 배지를 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μ L를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA microplate reader(EL \times 808, Bio-teck[®] Inc., Highland Park, St Louis, MD, USA)를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{(\text{대조군 O.D.} - \text{실험군 O.D.})}{\text{대조군 O.D.}} \times 100$$

돌연변이원성 실험

변이원성 및 항돌연변이원성 실험에 사용한 균주 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100은 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아 사용하였다. 변이원성 및 항돌연변이 원성 실험은 Ames test를 개량한 preincubation mutagenicity 방법(16)으로 실시하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각의 삼지구엽초 용매분획 추출물 50 μ L씩 가하고, TA culture 배지에서 하룻밤 배양된 균주 100 μ L를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록 하였다. Histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his⁺ revertant colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 항 돌연변이 실험에 사용된 발암물질은 benzo(a)Pyrene (B(a)P) 및 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)를 사용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 icariin 50 μ L를 첨가한 다음 하룻밤 배양된 균주를 100 μ L씩 주입한 후, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 20분간 preincubation한 다음 histidine/ biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 돌연변이 억제효과의 정도 (inhibition rate)는 아래의 식에 의하여 계산하였으며, 대조

구로는 삼지구엽초 추출물을 첨가하지 않은 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하여 균 생육억제 유무를 판정하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(a-b) / (a-c)] \times 100$$

여기서 a는 돌연변이원에 의하여 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수이다.

통계처리

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차 (mean±SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SAS(ver. 12.0, Statistical Analysis System, Milwaukee, WI, USA)를 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 사용하였고, Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

면역 활성 측정

인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B 세포와 T 세포에 대하여 면역증진 효과를 확인하기 위하여 면역세포의 생육 촉진 효과는 생육도를 통하여 측정하였으며, 각 용매 분획별 추출물의 B 세포(Rhams)와 T 세포(Molt-4)에서의 생육 촉진 결과는 Fig. 1에 나타내었다. B 세포의 생육촉진 결과, 시료농도 1,000 µg/mL에서 모든 각 용매별 분획 추출물은 대조군보다 높은 생육 촉진 활성을 나타냈으며, 에틸아세테이트 1.35배, 물 1.3배, 부탄올 1.28배, 헥산 1.18배 그리고 클로로포름 분획 추출물 1.15배의 순으로 생육촉진 활성을 나타내었다(Fig. 1). T 세포에서의 각 용매분획별 추출물의 생육 촉진 활성 또한 에틸아세테이트 1.48배, 물 1.4배, 부탄올 1.32배, 헥산 1.30배 그리고 클로로포름 분획 추출물 1.20배의 순으로 B 세포의 생육활성과 동일한 순으로 각 용매분획별 추출물의 농도가 높을수록 생육촉진도 높게 나타났다(Fig. 1). B 세포와 T 세포의 생육 활성도를 8일 동안 배양 시간별로 생 세포수를 측정 한 결과, 삼지구엽초 용매별 분획물 모두 B세포와 T세포에서 4일째 생육 활성도가 최대였으며, 전체적으로 B 세포보다 T 세포에서 생육 활성도가 더 높게 나타났다(Fig. 2). 또한 한약재로 상용되는 물질들의 에틸아세테이트 용매 분획 추출물 면역활성과 삼지구엽초 에틸아세테이트 용매 분획 추출물을 비교해 보면 대조군에 비해 B 세포와 T 세포에서 Kim 등(17)은 씀바귀의 면역활성이 각각 1.25배, 1.2배, Hwang 등(18)는 참취 뿌리의 면역활성이 각각 1.3배, 1.1배

라고 하였고, Ahn 등(19)은 숙지황의 면역활성이 각각 1.3배, 1.2배, Park 등(20)은 가시오가피의 면역활성이 각각 1.2배, 1.1배라고 보고하였으나, 본 연구의 시료인 삼지구엽초 에틸아세테이트 용매 분획 추출물의 면역활성이 이들보다 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 삼지구엽초 여러 용매 분획물 중 에틸아세테이트 용매 분획 추출물이 가장 높은 면역 증진 효과를 보였으므로, 향후 식품산업에 있어서의 면역 증진 효능을 가진 삼지구엽초의 기능성 식품 소재개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

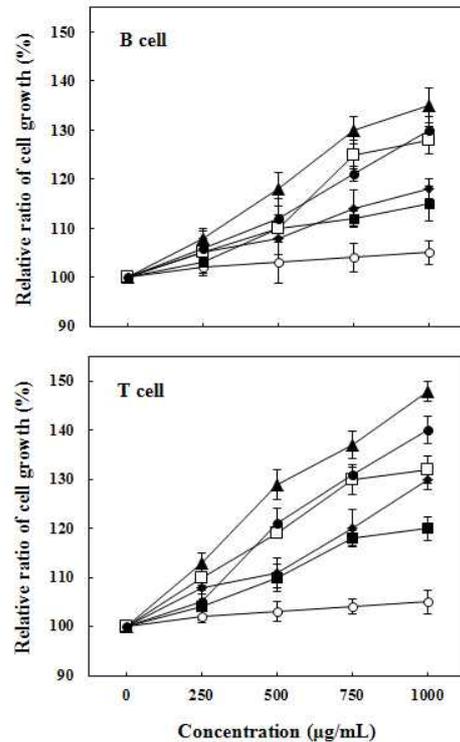


Fig. 1. Effect of solvent fractions from *Epimedium koreanum* Nakai on the growth of human B cell (Rhams) and T cell (Molt-4).

(○, Control; ■, Chloroform; ◆, Hexane; □, Butanol; ●, Aqueous; ▲, Ethylacetate)

돌연변이원성 실험

Salmonella typhimurium TA98과 TA100을 이용하여 삼지구엽초 용매별 분획물들의 Ames test를 수행한 결과, 음성 대조군의 복귀 돌연변이율은 TA98 균주에서 헥산 14.0 µL/mL, 에틸아세테이트 12.5 µL/mL, 물 12.0 µL/mL, 클로로포름 10.7 µL/mL, 그리고 부탄올 분획 추출물 10.0 µL/mL의 순으로 나타났으며, spontaneous 14.6 µL/mL과 차이점 및 유의성이 없었다(Table 1). TA100 균주에서도 클로로포름 301.5 µL/mL, 부탄올 291.5 µL/mL, 에틸아세테이트 288.2, 물 287.7 µL/mL 그리고 헥산 분획 추출물 287.0 µL/mL으로 spontaneous 293.3 µL/mL과 비교한 결과 TA98 균주에서와 마찬가지로 큰 차이점 및 유의성이 없었다(Table 1). 이러한

Table 1. Mutagenicity of *Epimediium koreanum* Nakai extract against *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Samples	Concentration (μL/mL) ¹⁾							
	25	50	75	100	25	50	75	100
Strains	TA98				TA100			
Spontaneous	14.6 ^a				293.3a			
Hexane	16±1.15 ^a	13±1.13 ^a	15±1.09 ^a	12±1.01 ^a	275±1.04 ^a	301±1.01 ^a	285±1.21 ^a	287±1.21 ^a
Chloroform	11±1.04 ^a	10±1.01 ^a	12±1.08 ^a	10±1.01 ^a	307±1.95 ^a	288±0.88 ^a	307±1.23 ^a	304±1.34 ^a
Ethylacetate	11±1.03 ^a	10±1.07 ^a	13±1.07 ^a	16±1.15 ^a	284±1.57 ^a	285±0.94 ^a	279±0.83 ^a	305±1.43 ^a
Butanol	10±1.00 ^a	9±0.95 ^a	11±1.11 ^a	10±0.96 ^a	287±1.31 ^a	284±0.94 ^a	286±1.14 ^a	309±1.57 ^a
Water	10±0.98 ^a	13±1.12 ^a	12±1.09 ^a	13±1.13 ^a	299±1.21 ^a	281±1.11 ^a	282±1.01 ^a	297±1.06 ^a

¹⁾The data represent the mean±SD of three determination (p<0.05).

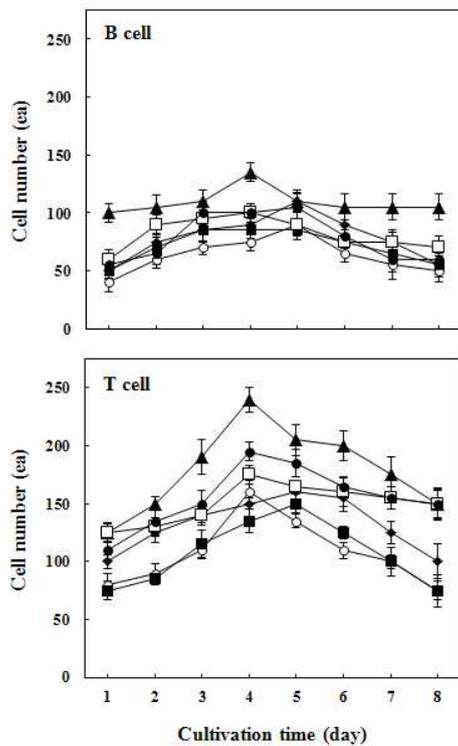


Fig. 2. The cell growth of human B cell (Rhamos) and T cell (Molt-4) line of solvent fraction (500 μg/mL) from *Epimediium koreanum* Nakai.

(○, Control; ■, Chloroform; ◆, Hexane; □, Butanol; ●, Aqueous; ▲, Ethylacetate)

결과로 보아, 삼지구엽초 분획물들은 TA98 및 TA100 균주 모두에서 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 돌연변이율의 큰 변화를 나타내지 않았으며, 이러한 결과로 삼지구엽초의 각 용매분획 추출물들은 돌연변이원성이 없는 것으로 판명되었다.

Microsomal enzyme의 대사활성에 의해서만 돌연변이원성을 나타내는 간접변이원으로써 실제로 식품을 통해 흡수될 수 있는 polycyclic aromatic hydrocarbon인 B(a)P을 사용하여 실험을 하였다. B(a)P (10 μg/mL)에서는 TA98 균주 1,000 μg/mL의 시료농도에서 에틸아세테이트 분획 추출물

이 98%로 가장 높은 억제효과를 보였으며, TA100 균주 1,000 μg/mL의 시료농도에서는 부탄올 분획 추출물이 84%로 가장 높은 억제효과를 보였다(Fig. 3). TA98 균주에 대한 B(a)P의 변이원성은 90% 이상의 높은 억제효과를 보이고 있는데, 이는 Gruter 등(21)에 의한 mushroom의 B(a)P에 대한 최고 항변이 활성도인 97%보다는 낮은 활성도를 나타냈으나, 비교적 높은 항돌연변이 활성도를 나타냈다. Lai 등(22)은 식물체의 주요 성분인 chlorophyll이 3-methyl cholanthene (3-MC)와 B(a)P이 변이원성을 억제시킨다고 보고하였다. 강력한 발암물질로써 직접 변이원으로 사용된 4NQO (0.15 μg/mL)에 대한 *S. typhimurium* TA98와 TA100 균주 실험결과는 Fig. 4와 같았다. TA98 균주와 TA100 균주에서 클로로포름 분획 추출물을 제외한 모든 시료가 70% 이상의 높은 억제효과를 나타내었으며, 특히 TA98 균주에서는 에틸아세테이트 용매 분획 추출물이 80%, TA100 균주에서는 부탄올 용매 분획 추출물이 90%의 높은 억제효과를 나타내었다(Fig. 4). 삼지구엽초의 항돌연변이원성을 알아본 결과, 4NQO나 B(a)P에서 전반적으로 TA98과 TA100 균주 모두에서 항돌연변이원성 활성이 높았다. 따라서, 삼지구엽초 분획물은 직접변이원이 직접 DNA에 결합하여 유전적 변이원을 일으키는 것을 차단하는 작용을 하는 항변이원성 물질인 것으로 생각된다. Lee(23)는 냉이, 민들레, 수리취, 질경이 등 11종의 산채류 생즙에 대하여 돌연변이 억제율을 조사한 결과, 부추, 민들레, 냉이, 수리취, 씀바귀, 삼지구엽초 그리고 질경이가 B(a)P, 4NQO에 의해 유발된 변이원성에 대해 억제활성이 가장 컸다고 보고하였으며, Ito 등(24)은 양파, 가지, 호박 그리고 양배추의 생즙 및 가열즙이 DMBA (7,12-dimethylbenzo(a)anthracene)에 의해 유발된 돌연변이원성을 억제하는 활성을 갖고 있으며, 이것은 양파나 가지에 존재하는 SH 화합물이 glutathione transferase의 활성을 증가시키기 때문이라고 보고하였다 (25). 따라서, 본 연구에서 삼지구엽초는 *S. typhimurium* strain TA98 및 TA100에 대한 돌연변이를 유발하지 않으며, 이러한 Ames test 결과 안전한 식품소재라 할 수 있다. 아울러

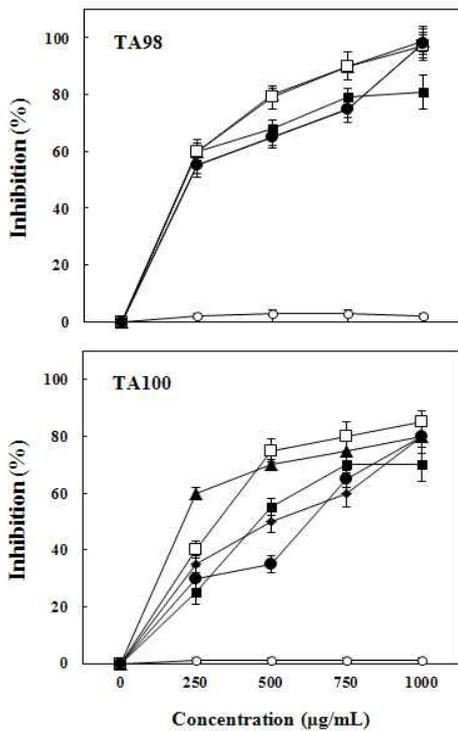


Fig. 3. The antimutagenic effects of solvent fractions from *Epimedium koreanum* Nakai against B(a)P induced *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

(○, Control; ■, Chloroform; ◆, Hexane; □, Butanol; ●, Aqueous; ▲, Ethylacetate)

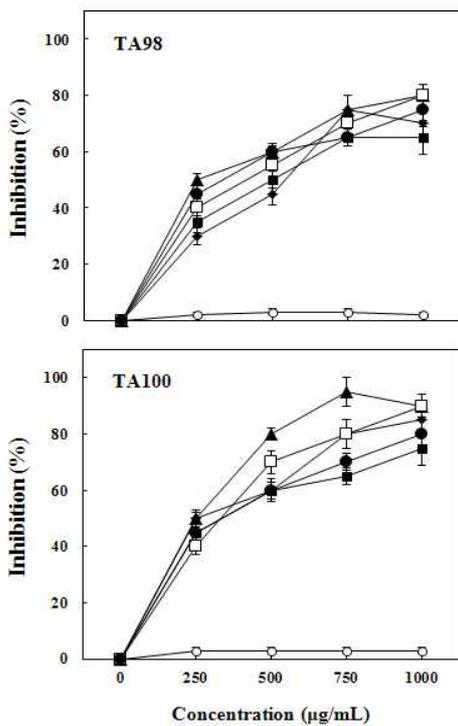


Fig. 4. The antimutagenic effects of solvent fractions from *Epimedium koreanum* Nakai against 4NQO induced *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

(○, Control; ■, Chloroform; ◆, Hexane; □, Butanol; ●, Aqueous; ▲, Ethylacetate)

러 삼지구엽초가 항돌연변이능을 가지는 것으로 보아 이러한 안전성과 건강기능성을 활용한 식품소재로서 효용 가치가 높을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 삼지구엽초의 기능성식품 이용성 증진을 위한 기초적인 연구로써 우리나라 산야에서 존재하며 예로부터 약용으로 이용되고 있는 삼지구엽초를 극성에 따라 용매별 분획 추출물들의 면역관련 활성을 검토하였다. 삼지구엽초 분획물별 생육촉진 활성은 B와 T cell 모두에서 에틸아세테이트와 물 분획 추출물이 대조구에 비해 활성이 높게 나타났으며, 시료의 농도가 증가할수록 생육도 증가하였다. 삼지구엽초 추출물의 돌연변이 및 항돌연변이성에 미치는 영향을 조사한 결과, 삼지구엽초 추출물뿐만 아니라 각 용매별 분획물들도 돌연변이성을 나타내지 않았다. 간접변이원 B(a)P에서는 TA98 균주에서 에틸아세테이트 분획 추출물이 98%, TA100 균주에서는 부탄올 분획 추출물이 84%로 가장 높은 억제효과를 보였다. 직접변이원 4NQO에서는 TA98 균주와 TA100 균주에서 클로로포름 분획 추출물을 제외한 모든 시료가 70% 이상의 높은 억제효과를 나타내었으며, 특히 TA98 균주에서는 에틸아세테이트 분획 추출물이 80%, TA100 균주에서는 부탄올 분획 추출물이 90%의 높은 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 삼지구엽초를 이용한 기능성 식품 및 소재로서의 이용성 증진을 위한 기초자료로 제공될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Kang SS, Kim JS, Kang YJ, Han HK (1990) Studies on the underground parts of *Epimedium koreanum*. Kor J Pharmacogn, 21, 56-59
2. Kang SS, Shin KH, Chung SG, Cho EH (1998) Flavonoids from *Epimedium koreanum*. Kor J Pharmacogn, 19, 93-98
3. Xu SC, Xu BJ, Wang MT (1987) Isolation and identification of icariin and icariside I. Chin Pharm Bull, 22, 129-132
4. Xu SC, Wang ZX, Wu LJ, Wang NB, Chen YJ (1982) Isolation and identification do icariin and epimedeside A. Chin Tard Herb Drug, 13, 9-15
5. Fukai T, Nomura T (1988) Seven prenylated flavonol glycosides from two epimedium species. Phytochem, 27, 259-266
6. Mizuno M, Hanioka S, Suzuki N, Iinuma M, Tanaka

- T, Liu XS, Min ZD (1987) Flavonol glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochem*, 226, 861-863
7. Sun P, Zhao Ye W, Pei J, Wang Z, Chen Y, Ogihara Y, Takeda T (1995) Studies on the constituents of *Epimedium koreanum*. *Chem Pharm Bull*, 43, 703-704
 8. Lee MK, Choi YJ, Sung SH, Shin DI, Kim JW, Kim YC (1995) Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum*. *Planta Med*, 61, 523-526
 9. Miyase T, Ueno A, Takizawa N, Kobayashi H, Oguchi H (1987) Studies in the glycosides of *Epimedium grandiflorum*. *Chem Pharm Bull*, 35, 3713-3716
 10. Kang SS, Shin KH, Ahn SD, Park KY, Kang CS (1997) Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection. *Kor J Med Crop Sci*, 4, 321-328
 11. Lee YG, Sohn HO, Lee DW, Lim HB (2002) The effect of water-extract of *Epimedium koreanum* Nakai on age-related change of the xenobiotic metabolizing enzyme system in the liver of rats. *Kor J Med Crop Sci*, 10, 29-36
 12. Noh JH, Kim YJ, Choi KJ, Kim SW, Kim SK, Kim JH (2003) Characteristics of seeding and rhizome propagation in *Epimedium koreanum* Nakai. *Kor J Med Crop Sci*, 11, 155-160
 13. Kang CS, Choi BR, Park KY, Ahn SD (1997) Establishment of growth environment and mass propagation system development for *Epimedium koreanum*. *Kor J Pharmacogn*, 30, 378-381
 14. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48, 589-601
 15. Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of the tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 936-942
 16. Ames BN, Maron DM (1983) Revised methods for the *Salmonella typhimurium* mutagenicity test. *Mutation Res*, 113, 173-215
 17. Kim MJ, Kim JS, Kang WH, Jeong DM (2002) Effect on antimutagenic and cancer cell growth inhibition of *Lxeris dentata* Nakai. *Kor J Med Crop Sci*, 10, 139-143
 18. Hwang HS, Ham SS (1999) Antimutagenic and cytotoxic effects of aster acaber root ethanol extract. *Kor J Food Sci Technol*, 31, 1065-1070
 19. Ahn BY, Lee KS, Maeng IK, Song GS, Choi DS (1998) Bioantimutagenic effects of water extract from *Rehmannia glutinosa* Liboschitz in SOS chromotest. *Kor J Food Sci Technol*, 30, 439-445
 20. Park MH, Kang SM, Jung HY, Hong SG (2003) Protecting effects of vitamin E against immobilization stress-induced oxidative damage in rat brain. *Kor Nutr*, 36, 570-576
 21. Gruter A, Friederich V, Wurgler FE (1990) Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutation Res*, 231, 243-249
 22. Lai CH, Butler MN, Matney TS (1980) Antimutagenic activities of common vegetable and their chlorophyll content. *Mutation Res*, 77, 245-250
 23. Lee JH. (1989) Studies on the demutagenic effect of the edible mountain herb juices. MS Thesis, Kangwon National University
 24. Ito Y, Maeda S, Sugiyama T (1986) Suppression of 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells by vegetable juices. *Mutation Res*, 172, 55-60
 25. Han KS, Ham SS, Jeong EH, Lee HK (1992) Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2-AF. *Kor J Food Hyg*, 7, 161-168