

DNA 염기서열과 미각패턴 분석을 이용한 사상자와 별사상자의 감별

김영화[#], 김영선, 채성욱, 이미영^{*}

한국한의학연구원 한의신약개발그룹

Comparison between *Torilis japonica* and *Cnidium monnieri* Using DNA Sequencing and Taste Pattern Analysis

Young Hwa Kim[#], Young Seon Kim, Sungwook Chae, Mi Young Lee^{*}

KM-Based Herbal Drug Development Group, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : Cnidii Fructus is prescribed as the fruit of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson or *Torilis japonica* (Houtt.) DC. in Korea pharmacopoeia. Although there are differences in the composition of useful components, two species have been used without distinction. In order to discriminate them, DNA sequencing and taste pattern analysis were used in this study.

Methods : Primers ITS 1 and ITS 4 were used to amplify the intergenic transcribed spacer(ITS) region of nuclear ribosomal DNA from seven *T. japonica* and six *C. monnieri* samples. Taste pattern of samples were measured by using taste-sensing system SA402B equipped with five foodstuff sensors(CT0, C00, AAE, CA0, and AE1). The five initial taste(sourness, bitterness, astringency, umami, and saltiness) and three aftertaste(aftertaste of bitterness, astringency, and umami) of two species were compared.

Results : According to the results of ITS region sequence analysis, two species showed 94 base pairs differences. The similarity of two sequences was 85%. From the taste pattern analysis, sourness, bitterness, aftertaste of bitterness(aftertaste-B), and umami showed a different pattern. Especially, bitterness and aftertaste-B of *C. monnieri* were significantly higher than *T. japonica*. In addition, two species were shown to have two markedly different clustering by these two flavors.

Conclusion : *T. japonica* and *C. monnieri* were effectively discriminated using DNA sequencing and taste pattern analysis. These methods can be used to identify the origin of traditional medicine in order to maintain therapeutic efficacy.

Key words : Cnidii Fructus, *Cnidium monnieri*, *Torilis japonica*, DNA sequencing, taste pattern analysis

서론

우리나라에서 蛇床子(Cnidii Fructus)는 별사상자 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 또는 사상자 *Torilis japonica* (Houtt.) DC.(산형과 Umbelliferae)의 열매¹⁾로 규정하고 있으며, 중국²⁾과 일본³⁾에서는 *Cnidium monnieri*만을 蛇床子(Cnidii Fructus)로 인정하고 있다.

대한약전외한약(생약)규격집¹⁾과 한약재 관능검사지침⁴⁾의

약재성상에 따른 감별요점에 의하면 사상자(*T. japonica*)는 등 쪽은 윤택하고 갈고리 같은 가시가 밀생하고 가시는 긴 것과 짧은 것이 불규칙하게 배열되어 있어 마치 고슴도치 같으며, 별사상자(*C. monnieri*)는 각 분과의 뒷면에는 얇고 튀어나온 세로 모서리 5조가 있으며 접합면이 평탄하고 2조는 갈색으로 약간 돌출된 중늑선이 있다고 기재되어 외부 형태학적으로 차이를 보인다.

사상자(*T. japonica*)의 주요성분은 methanol extract에서

*교신저자 : 이미영, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한의신약개발그룹

· Tel : 042-868-9504 · E-mail : mylee@kiom.re.kr

#제1저자 : 김영화, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한의신약개발그룹

· Tel : 042-868-9508 · E-mail : konion@kiom.re.kr

· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 05일 · 채택 : 2013년 11월 06일

분리된 guaiane-type sesquiterpene compound인 torilin 이며⁵⁾, 그 활성에 관한 연구보고로는 anti-angiogenic activity⁶⁾, anti-invasive activity⁷⁾, anti-protozoal efficacy⁸⁾, anti-wrinkle effect⁹⁾ 등이 보고되었다. 이에 반해, 별사상자(*C. monnieri*)의 유용성분은 coumarin 계열의 화합물인 osthole, xanthotoxol, auraptanol, imperatorin, bergaten 과 chromone 계열의 화합물인 cindimol, karentin과 umtatin 등이 알려져 있다¹⁰⁾. 그 중 가장 많은 활성이 보고된 화합물은 osthole과 xanthotoxol이며, neuroprotective effect^{11,12,13)}, antidiabetic effect¹⁴⁾, anti-cancer effect¹⁵⁾ 등이 보고되었다.

이와 같이, 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)는 외부 형태 및 함유하고 있는 유용성분의 조성에도 차이가 있으나, 우리나라에서는 蛇床子(Cnidii Fructus)로 함께 쓰이고 있는 실정이다.

한약은 전통적으로 전해 내려온 기본 처방에 임상 경험을 바탕으로 약재를 가감하여 조제되고 있는 경우가 많으며, 특히 우리나라에서는 처방에 대한 한약물의 구성 및 용량이 거의 공개되지 않아 한약에 대한 소비자의 신뢰도 저하 문제가 끊임없이 제기되고 있다. 즉, 약재의 선별과 처방이 주관적으로 이루어짐에 따라, 하나의 처방에 기원이 다른 약재가 사용될 가능성이 있어 약효의 일관성을 유지하기 위해 기원 확인은 필수적이다.

대부분 한약재의 기원 확인은 전문가의 관능검사에 의존하고 있으며 최근, 기원 확인의 정확성을 증대시키기 위해 지표성분의 비교를 통한 이화학 분석과 특정 부위 염기서열 비교를 통한 유전자 분석 방법 등이 널리 쓰이고 있다. 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)의 경우, 지표성분이 아직 설정되지 않았으며, 유전자 분석은 중국 내 산형과 식물들에서 nuclear ribosomal DNA의 internal transcribed spacer(ITS) sequence 비교를 통한 유연관계 연구¹⁶⁾만이 보고되어, 객관성과 정확성을 증대시키기 위한 다양한 감별연구가 필요한 실정이다.

최근, 인간의 미각에 비해 최대 100배까지 정밀한 비교가 가능한 미각센서를 이용하여 한약재를 감별하는 연구가 시도되고 있다. 미각센서는 기존의 전자 혀와 달리 인간의 미뢰와 유사하게 구현된 인공 지질막에 의해 신맛, 쓴맛, 떫은맛, 감칠맛, 짠맛 등을 각각 인지할 수 있다¹⁷⁾. 일본에서는 가공된 附子(Aconite Root)의 crude drug와 Kampo formular의 미각패턴 비교 연구¹⁸⁾, 국내에서는 중국산 감초와 우즈베키스탄산 광과감초의 감별¹⁹⁾ 및 당귀류의 비교 연구²⁰⁾에 미각센서가 이용된바 있다.

본 연구에서는, 두 개의 기원종이 인정되고 있는 蛇床子(Cnidii Fructus)의 유전자 염기서열 분석과 미각패턴을 비교한 결과 일정한 감별점을 확인하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

蛇床子(Cnidii Fructus)는 한약재 유통업체 10개소로부터 사상자(*Torilis japonica*) 7점과 별사상자(*Cnidium monnieri*)

6점, 총 13점을 구입하여 기원의 진위(眞僞)와 품질 상태를 확인 후 실험에 사용하였으며(Table 1), 표본은 한국한의학연구원에 보관되어 있다.

Table 1. List of samples in this study.

No.	Sample	Origin
1	<i>Torilis japonica</i>	China
2	<i>Torilis japonica</i>	China
3	<i>Torilis japonica</i>	Korea
4	<i>Torilis japonica</i>	Korea
5	<i>Torilis japonica</i>	China
6	<i>Torilis japonica</i>	Korea
7	<i>Torilis japonica</i>	Korea
8	<i>Cnidium monnieri</i>	China
9	<i>Cnidium monnieri</i>	China
10	<i>Cnidium monnieri</i>	China
11	<i>Cnidium monnieri</i>	China
12	<i>Cnidium monnieri</i>	China
13	<i>Cnidium monnieri</i>	China

2. 방법

1) 염기서열 분석을 통한 기원종 확인

약 100 mg의 시료를 멸균된 막자사발에 담고 액체질소를 부어가며 미세분말 상태로 마쇄한 후, Nucleospin[®] PlantII kit(MACHERY-NAGEL, GmbH & Co. KG, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 순도 검정 및 정량은 NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer(Thermo Scientific, USA)로 실시하였다.

추출된 DNA의 nuclear ribosomal DNA(nrDNA)의 intergenic transcribed spacer(ITS) 부위를 증폭하기 위해 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer²¹⁾를 Macrogen社(Korea)에서 합성하여 사용하였다. PCR 반응액은 Solg[™] 2X Multiplex PCR Smart mix(Solgent, Korea) 25 μ L에 20 ng template DNA 2 μ L와 10 pmole의 primer를 각각 2 μ L씩 혼합하여 총 50 μ L로 조성하였다. PCR은 C1000 Thermal cycler(BIORAD, USA)를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 pre-denaturation한 후 95 $^{\circ}$ C에서 20초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 40초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다.

증폭된 산물에 LoadingSTAR(Dynebio, Korea) 3 μ L를 넣어 혼합한 후, 1.5% agarose gel에서 135 V로 40분간 전기 영동하여 젤 영상 분석 장치(U:Genius, Syngene, England)로 관찰하였다. 이 후 증폭된 밴드만을 잘라내어 LaboPass[™] Gel extraction kit(Cosmogenetech, Korea)를 사용하여 정제한 후, Macrogen社(Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 결정된 염기서열은 DNASYS[®] MAX-Ver. 2.05(MiraiBio, USA)를 이용하여 정렬하였다.

2) 미각패턴 측정

사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*) 20 g에 3차 증류수 200 mL를 가하여 15시간 동안 냉장(4~6 $^{\circ}$ C)에서 침출한 뒤, 삼베보로 여과하고, 동량의 3차 증류수를 더하여 2배 희석한 것을 미각센서 측정을 위한 검액으로 사용하였다.

미각센서 기기는 SA402B(Insent, Japan)를 이용하였으며, 센서는 ‘foodstuff sensor’ 5종(CT0, C00, AAE, CA0 및 AE1)을 장착하고, ‘2 step washing sample measurement’ 모드에서 4회 반복 측정하였다. 측정결과는 분석 소프트웨어 (Taste analysis application, Insent, Japan)를 이용하여 ‘Basic process’ 모드에서 산출하였다.

표시 단위는 분석 소프트웨어에서 산출되는 미각정보 단위 (taste information unit)로 하였으며, 이는 Kobayasi 등¹⁷⁾이 제안한 단위로써, 인간이 구별할 수 있는 맛의 최소 차이를 1 단위로 정한 것이며 본 미각센서는 0.01 단위까지 측정이 가능하다.

3) 통계처리

결과 값의 표기는 ‘평균±표준편차’ 로 표시하였으며, 실험 군별 차이의 유의성 검증은 독립표본 *t*-test를 실시하여 *p* < 0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

본 연구에 사용된 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)의 유전자 분석을 통한 기원확인을 위해 nuclear ribosomal DNA(nrDNA)의 intergenic transcribed spacer(ITS) 부위를 이용하였다. ITS 부위 염기서열 분석 결과, 사상자는 602 bp, 별사상자는 600 bp의 길이를 나타내었다. 미국 NCBI GenBank의 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 검색을 이용하여 기존의 등록된 염기서열과 유사성을 비교한 결과, 기존 등록된 사상자(Accession No. : EU236214)와 1 bp 차이로 99% 유사도를 나타내었다. 사상자(*T. japonica*) 7개의 시료가 모두 동일한 염기서열을 보였으며, 585 bp에서 G base, EU236214는 base deletion을 보여 이 염기서열을 새로운 사상자(*T. japonica*)의 ITS 부위 염기서열로 등록하였다(Accession No. : KF310901). 별사상자(*C. monnieri*)는 기존 등록된 별사상자(Accession No. : HQ316168)의 염기서열과 100% 일치하였다. 정렬이 완료된 사상자(*T. japonica*-KF310901)와 별사상자(*C. monnieri*-HQ316168)의 염기서열을 서로 비교한 결과, 94 bp 차이로 85%의 유사도만을 나타내어 유전적인 거리의 차이가 있음을 확인하였다(Fig 1).



Figure 1. Nucleotide sequence comparisons of *T. japonica* and *C. monnieri* samples based on ITS1/ITS4 regions sequence data, according to the ClustalW method.

대한약전의한약(생약)규격집¹⁾에서 蛇床子(Cnidii Fructus)의 정상 기준 중 미(味)에 대하여, 사상자(*T. japonica*)는 “맛은 약간 맵고 쓰다.”, 별사상자(*C. monnieri*)는 “맛은 약간 맵고 혀를 자극한다.” 라고 정하고 있다. 미각센서 시스템을 이용하여 측정한 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*) 냉침액의 미각패턴을 비교한 결과, 사상자(*T. japonica*)는 짠맛(saltiness), 떫은맛(astringency), 감칠맛의 후미(richness), 쓴맛의 후미(aftertaste-B)의 순으로, 별사상자(*C. monnieri*)는 짠맛(saltiness), 떫은맛(astringency), 쓴맛의 후미(aftertaste-B), 쓴맛(bitterness)의 순으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Taste intensities (mean ± standard deviation) of each taste factor in *T. japonica* and *C. monnieri* samples.

Sample	Sourness	Bitterness	Astringency	Aftertaste-B	Aftertaste-A [†]	Umami	Richness [‡]	Saltiness
1 <i>T. japonica</i>	-2.69±10.61	-3.85±0.64	7.12±1.48	1.20±0.29	0.31±0.06	-3.83±3.23	5.06±2.89	17.70±3.85
2 <i>C. monnieri</i>	-4.06±9.73	5.27±1.03	8.43±1.71	5.50±0.86	1.14±0.32	-0.49±2.68	4.83±2.50	20.12±2.85

^{*}Aftertaste-B is aftertaste of bitterness. [†]Aftertaste-A is aftertaste of astringency. [‡]Richness is aftertaste of umami. The unit is ‘taste information unit’ suggested by Kobayashi *et al.* (2010).

전체적인 蛇床子(Cnidii Fructus)의 미각 패턴 분석 결과, 신맛(sourness), 쓴맛(bitterness), 쓴맛의 후미(aftertaste-B), 감칠맛(umami) 등에서 서로 다른 패턴을 보였다(Fig. 2). 특히 쓴맛(bitterness)에서 사상자(*T. japonica*)는 -3.85±0.64 단위인데 비해 별사상자(*C. monnieri*)는 5.27±1.03 단위로 가장 큰 차이를 보였으며(*p*=5.55E-08), 쓴맛의 후미(aftertaste-B)는 사상자(*T. japonica*)는 1.20±0.29 단위인데 별사상자(*C. monnieri*)는 5.50±0.86 단위로 뚜렷한 차이(*p*=2.36E-05)를 보였다(Table 2, Fig. 3).

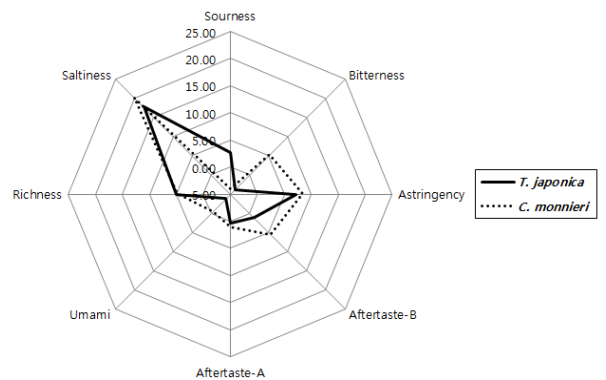


Figure 2. Taste patterns of *T. japonica* and *C. monnieri* samples. Aftertaste-B is aftertaste of bitterness. Aftertaste-A is aftertaste of astringency. Richness is aftertaste of umami. The unit is ‘taste information unit’ suggested by Kobayashi *et al.* (2010).

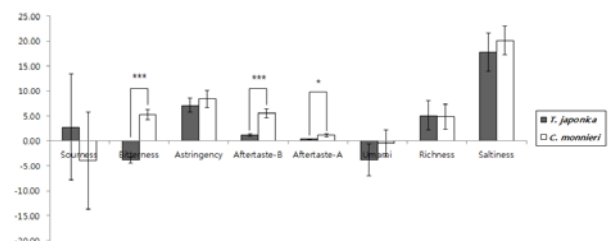


Figure 3. Taste difference between *T. japonica* and *C. monnieri*

samples. The bar graphs show taste respectively. Each bar represents the mean (\pm standard deviation, $n=3$) taste difference. $p < 0.05$ and $***p < 0.001$ compared with each other. Aftertaste-B is aftertaste of bitterness. Aftertaste-A is aftertaste of astringency. Richness is aftertaste of umami. The unit is 'taste information unit' suggested by Kobayashi et al. (2010).

또한, 쓴맛(bitterness)과 쓴맛의 후미(aftertaste-B)를 기준으로 하였을 때, 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)가 서로 뚜렷하게 군집되어 나누어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

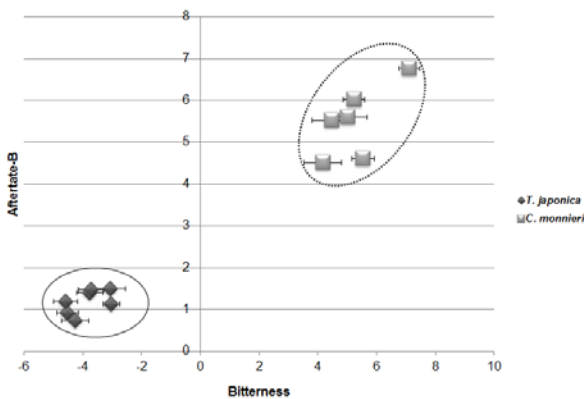


Figure 4. Taste clustering between *T. japonica* and *C. monnieri* samples. The unit is 'taste information unit' suggested by Kobayashi et al. (2010).

고찰

본초학에서 補益藥으로 분류되어 널리 쓰이고 있는 蛇床子(Cnidii Fructus)는 산형과(Umbelliferae)에 속한 일년생 초본인 별사상자 *Cnidium monnieri*의 성숙한 과실을 陰乾한 것이다²²⁾. 중국에서는 오로지 별사상자(*C. monnieri*)만을 蛇床子(Cnidii Fructus)로 인정하고 있지만²⁾, 우리나라¹⁾에서는 별사상자(*C. monnieri*)와 함께 산형과의 두해살이 초본인 사상자 *Torilis japonica*도 蛇床子(Cnidii Fructus)로 인정한다²³⁾. 일본에서는 공정서³⁾에 기재되어 있지 않지만, 별사상자(*C. monnieri*)의 대용품으로 사상자(*T. japonica*)를 사용하고 있다^{24,25)}.

縮精의 대표적인 약물군인 五子 중의 하나인 별사상자(*C. monnieri*)는 溫腎助陽의 효능이 있어서 男子의 陽痿와 陰囊濕痒, 女子의 帶下陰痒와 寒冷不孕 등을 치료함으로써²²⁾, 성호르몬 조절²⁶⁾, 발기부전²⁷⁾ 등과 같은 불임치료에 사용되는 약재이다. 이에 비해, 사상자(*T. japonica*)는 항염증²⁸⁾, 항균²⁹⁾, 피부주름 예방⁹⁾과 멜라닌 생성 억제³⁰⁾ 관련 효과가 강조되어 보고되고 있으며, 불임관련 효과에 대한 연구는 찾기 힘들다. 이와 같이, 기원식물이 다르면 약성이 다르게 나타날 수 있으므로, 정확한 기원의 한약재 설정은 약효의 일관성 유지를 위해 연구 및 임상에서 가장 우선적으로 고려되어야 할 사항이다.

앞서 언급한바와 같이 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)는 외부 형태^{1,4,25)} 및 함유하고 있는 유용성분의 조

성에도 차이^{22,25)}가 있으나, 우리나라에서 蛇床子(Cnidii Fructus)로 함께 쓰이고 있어 두 종간의 감별 연구의 필요성을 제시하고자 한다. 현재, 정확한 기원의 한약재 감별을 위해 내·외부 형태 및 이화학 패턴^{31,32)}과 유전자 분석^{33,34)} 방법 등이 주로 수행되고 있다. 하지만, 蛇床子(Cnidii Fructus)의 경우 공정서¹⁾에 아직 지표성분이 선정되지 않아 이화학 분석에 의한 감별은 어려우며, 유전자 분석에 의한 감별 연구는 미미한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 산지나 생육환경에 영향을 받지 않는 유전자 분석과 최근 한약재 감별의 새로운 가능성을 확인한^{19,20)} 미각패턴 분석을 이용하여 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)의 정확하고 객관적인 감별 연구를 수행하고자 하였다.

시중에 유통되는 사상자(*T. japonica*) 7점과 별사상자(*C. monnieri*) 6점, 총 13점을 구입하여 ITS 부위의 염기서열을 분석한 결과, 유사도 85%로 94 bp의 염기서열 차이를 보여 유전자 분석에 의한 감별이 가능함을 확인하였다(Fig 1). 또한, 미각 패턴 분석 결과에서도 신맛(sourness), 쓴맛(bitterness), 쓴맛의 후미(aftertaste-B)와 감칠맛(umami)에서 두 종이 서로 다른 패턴을 보임을 확인하였다.

우리나라 공정서의 미(味) 기준에서 별사상자(*C. monnieri*)는 “약간 맵고 혀를 자극한다”로, 사상자(*T. japonica*)는 “약간 맵고 쓰다”라고 기재되어 있다¹⁾. 그러나, 실제 미각패턴 분석 결과 상당히 유의한 차이($p < 0.001$, Fig. 3)를 보이며 별사상자(*C. monnieri*)가 사상자(*T. japonica*)보다 쓴맛(bitterness)과 쓴맛의 후미(aftertaste-B)에서 더 높은 미각단위를 보였다. 따라서, “쓰다”라는 미(味) 기준은 사상자(*T. japonica*)보다는 별사상자(*C. monnieri*)에 더 적절하다고 사료되는 바이다. 또한, 이 두 가지 맛을 기준으로 두 종이 서로 뚜렷이 구분되어 군집되었으며, 결과적으로, 미각패턴 분석이 유전자 분석과 함께 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)의 감별에 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

향후, 蛇床子(Cnidii Fructus)의 이화학적 분석을 이용한 지표성분의 설정 및 비교 연구, 염기서열을 이용한 감별 마커 개발 연구 등이 수행된다면, 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)의 감별 가능성을 한층 높일 수 있을 것이다.

결론

우리나라 공정서에서 서로 다른 종임에도 蛇床子(Cnidii Fructus)로 인정되고 있는 사상자(*T. japonica*) 7점과 별사상자(*C. monnieri*) 6점의 DNA 염기서열과 미각패턴을 분석하여 비교한 결과는 다음과 같다.

- nrDNA의 ITS 부위 염기서열 분석 결과, 유사도 85%로 94 bp의 염기서열 차이를 보여 유전자 분석에 의한 두 종간의 구별이 가능함을 확인하였다.
- 미각패턴 분석 결과, 별사상자(*C. monnieri*)는 사상자(*T. japonica*)에 비해 쓴맛(bitterness)과 쓴맛의 후미(aftertaste-B)가 상당히 유의하게 높게 나타났으며, 이를 기준으로 두 종이 서로 뚜렷이 구분되어 군집되는 것

을 확인할 수 있었다.

- 유전자 분석과 미각패턴 분석을 이용하여 사상자(*T. japonica*)와 별사상자(*C. monnieri*)의 감별점을 찾을 수 있었으며, 이와 같은 분석법은 향후 동일한 약효 유지를 위해 정확한 기원의 한약을 구별할 수 있는 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업 "미각센서를 이용한 한약 표준화 연구(K12260)"와 "한의 생체에너지대사 기반 노화조절 연구(K13101)"의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

References

- Korea Food and Drug Administration, The Korean Herbal Pharmacopoeia, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2011 : 177.
- Chinese pharmacopoeia commission, Pharmacopoeia of The People's Republic of China, Beijing : China Medical Science and Technology Press, 2010 : 295-6.
- Ministry of Health, Labour and Welfare, The 16th Japanese Pharmacopoeia, Tokyo : Minister of Health, Labour and Welfare, 2011 : 1626.
- Korea Food and Drug Administration, The guideline on the visual and organoleptic examination of herbal medicine, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2009 : 53.
- Hwang EI, Lee SK, So SH, Koo BS, Han GH, Kim NM, Isolation and development of quantitative determination of Torilin from the *Torilis Fructus*, Kor J Pharmacogn, 2007 ; 38(4) : 321-6.
- Kim MS, Lee YM, Moon EJ, Kim SE, Lee JJ, Kim KW, Anti-angiogenic activity of Torilin, a sesquiterpene compound isolated from *Torilis japonica*, Int J Cancer, 2000 ; 87(2) : 269-75.
- Kim MS, Baek JH, Park MT, Sohn TK, Kim SE, Lee JJ, Kim KW, Anti-invasive activity of torilin, a sesquiterpene compound isolated from *Torilis japonica*, Oncol Rep, 2001 ; 8(2) : 359-64.
- Youn HJ, Lakritz J, Rottinghaus GE, Seo HS, Kim DY, Cho MH, Marsh AE, Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of *Torilis japonica* and *Sophora flavescens* extracts on *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, Vet Parasitol, 2004 ; 125(3-4) : 409-14.
- Koo BS, Hwang EI, So SH, Lee SK, Han GH, Kim NM, Effect of *Torilis Fructus* on procollagen biosynthesis and activity of Matrix Metalloproteinase-I(MMP-1) in human dermal fibroblast, Kor J Pharmacogn, 2007 ; 38(4) : 349-53.
- Zhao J, Zhou M, Liu Y, Zhang G, Luo Y, Chromones and coumarins from the dried fructus of *Cnidium monnieri*, Fitoterapia, 2011 ; 82(5) : 767-71.
- Chen T, Liu W, Chao X, Qu Y, Zhang L, Luo P, Xie K, Huo J, Fei Z, Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway, Neuroscience, 2011 ; 183 : 203-11.
- Wang XY, Dong WP, Bi SH, Pan ZG, Yu H, Wang XW, Ma T, Wang J, Zhang WD, Protective effects of osthole against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats, Int J Mol Med, 2013 ; 32(2) : 365-72.
- He W, Chen W, Zhou Y, Tian Y, Liao F, Xanthotoxol exerts neuroprotective effects via suppression of the inflammatory response in a rat model of focal cerebral ischemia, Cell Mol Neurobiol, 2013 ; 33(5) : 715-22.
- Lee WH, Lin RJ, Lin SY, Chen YC, Lin HM, Liang YC, Osthole enhances glucose uptake through activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells, J Agric Food Chem, 2011 ; 59(24) : 12874-81.
- Xu XM, Zhang Y, Qu D, Feng XW, Chen Y, Zhao L, Osthole suppresses migration and invasion of A549 human lung cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in vitro, Mol Med Rep, 2012 ; 6(5) : 1018-22.
- Zhou J, Peng H, Downie SR, Liu ZW, Gong X, A molecular phylogeny of Chinese Apiaceae subfamily Apioideae inferred from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences, Taxon, 2008 ; 57(2) : 402-16.
- Kobayashi Y, Habara M, Ikezaki H, Chen R, Naito Y, Toko K, Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores, Sensors (Basel), 2010 ; 10(4) : 3411-43.
- Anjiki N, Hosoe J, Fuchino H, Kiuchi F, Sekita S, Ikezaki H, Mikage M, Kawahara N, Goda Y, Evaluation of the taste of crude drug and Kampo formula by a taste-sensing system (4): taste of Processed Aconite Root, J Nat Med, 2011 ; 65(2) : 293-300.
- Choi GY, Kim YH, Chae SW, Lee HW, Ko GS, Lee MY, Discrimination of Chinese *Glycyrrhiza uralensis* and Uzbek *Glycyrrhiza glabra* using

- taste sensor. Kor J Herbology. 2011 ; 26(1) : 35-9.
20. Kim YH, Choi GY, Lee HW, Lee GH, Chae SW, Kim YH, Lee MY. Comparison of *Angelica* species roots using taste sensor and DNA sequencing analysis. Kor J Herbology. 2012 ; 27(6) : 37-42.
 21. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ eds. In PCR Protocols : A guide to methods and applications. San Diego : Academic Press. 1990 ; 315-22.
 22. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology[Boncho- hak]. Seoul : Younglim Press. 1998 : 576-7.
 23. Lee IK, Lee JH, Hwang EI, Yun BS. New guaiane sesquiterpenes from the fruits of *Torilis japonica*. Chem Pharm Bull. 2008 ; 56(10) : 1483-5.
 24. Kitajima J, Suzuki N, Satoh M, Watanabe M. Sesquiterpenoids of *Torilis japonica* fruit. Phytochemistry. 2002 ; 59(8) : 811-5.
 25. Ju YS. Ungok Herbology. Jeonju : Woosuk Press. 2013 : 1299-302.
 26. Yan F, Liang Z, Jianna C, Zhengtao W, Losahan X, Zhengxing Z. Analysis of *Cnidium monnieri* fruits in different regions of China. Talanta. 2001 ; 53(6) : 1155-62.
 27. Chen CY. Computational screening and design of traditional Chinese medicine(TCM) to block phosphodiesterase-5. J Mol Graph Model. 2009 ; 28(3) : 261-9.
 28. Lee EB, Kim SM, Kim TH. Anti-inflammatory activities of *Torilis japonica* fruit. Kor J Pharmacogn. 1998 ; 29(4) : 384-90.
 29. Cho WI, Choi JB, Lee K, Chung MS, Pyun YR. Antimicrobial activity of torilin isolated from *Torilis japonica* fruit against *Bacillus subtilis*. J Food Sci. 2008 ; 73(2) : M37-46.
 30. Yun CY, Kim D, Lee WH, Park YM, Lee SH, Na M, Jahng Y, Hwang BY, Lee MK, Han SB, Kim Y. Torilin from *Torilis japonica* inhibits melanin production in alpha-melanocyte stimulating hormone-activated B16 melanoma cells. Planta Med. 2009 ; 75(14) : 1505-8.
 31. Kim JH, Lee GS, Choi GY, Hwang SY, Kim HJ, Jeong SI, Ju YS. A study on external · internal morphology and pattern analysis of *Atractylodes Rhizomes*. Kor J Herbology. 2009 ; 24(2) : 77-85.
 32. Kim JH, Lee GS, Choi GY, Kim YS, Lee SH, Kim HJ, Jeong SI, Ju YS. Comparative study on different species of medicinal herbs used as Jeonho (Qianhu) using morphological appearance and chromatographic fingerprint. Kor J Herbology. 2012 ; 27(3) : 15-21.
 33. Lee JW, Kim YH, Ko BS, Ryuk JA, Oh SE, Park SU, Lee MY. ITS-PCR analysis for the discrimination of Moutan Cortex. Korean J Medicinal Crop Sci. 2010 ; 18(1) : 40-5.
 34. Lee JW, Kim YH, Choi GY, Ko BS, Kim YS, Chae SW, Lee HW, Oh SE, Park SU, Lee MY. PCR analysis for the discrimination of Leonuri Herba medicine on the basis of chloroplast DNA sequence comparison in six Lamiaceae species. Kor J Herbology. 2011 ; 26(3) : 15-21.