

구강안면통증모델에서 산자나무 추출물의 진통효과

김윤경 · 최자형 · 김희진 · 윤현서 · 현경예¹ · 이민경[†]

동의대학교 일반대학원 보건의과학과, ¹임상병리학과

Analgesic Effect of *Hippophae rhamnoides* Extract in Orofacial Pain in Rats

Yun-Kyung Kim, Ja-Hyeong Choi, Hee-Jin Kim, Hyun-Seo Yoon, Kyung-Yae Hyun¹, and Min-Kyung Lee[†]

Departments of Biomedical Health Science and ¹Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Hippophae rhamnoides L. (sea buckthorn) is a shrub wood that belongs to the bamboo tree family, and is rich in vitamin C, D, and E; it is referred to as a vitamin tree. It is mainly grown in the high mountains of Europe and Central Asia, and has been widely used in China and Russia as natural medicine. Recent studies have shown that it is effective in the treatment of cancer, liver diseases, cardiovascular diseases, and gastrointestinal diseases. However, results of studies on its effect on the regulation of pain are insufficient. In this study, we investigated the effect of sea buckthorn on the development and control of pain in two facial areas. The experimental animals included 7- to 8-week-old Sprague-Dawley rats (240 ~ 260 g). Formalin (5%), which is known as an inflammation inducer, was injected into the vibrissa pad or temporomandibular joints to induce orofacial acute pain. Rubbing or scraping of the region injected with formalin was regarded as a pain index, and the behavioral response was observed for 45 minutes after the injection. Sea buckthorn extract diluted to 150, 300 mg/kg (in 1 ml of distilled water) was orally administered 30 minutes prior to the acute pain. The facial pain behavior was effectively reduced in the 300 mg/kg group when compared to the control group (vehicle). Likewise, in an experiment in which formalin was injected into the temporomandibular joints, effective pain alleviation was confirmed at the same drug concentration. These results suggest that sea buckthorn extract may be useful in the development of therapeutic agents for acute inflammatory pain in the orofacial area and for controlling temporomandibular joint pain.

Key Words: *Hippophae*, Orofacial pain, Temporomandibular joint

서론

산자나무(*Hippophae rhamnoides* L., sea buckthorn)는 보리수과에 속하는 관목성 목본으로 비타민 C, D, E의 함량이 풍부하여 비타민나무로 일컬어진다. 유럽과 중앙아시아의 높은 산지에서 주로 자생하고 있으며, 예로부터 중국과 러시아에서 궤양, 상처치유, 피부질환 및 화상을 치료하기 위한 천연약제로 널리 사용해 왔다^{1,2)}.

최근 연구는 산자나무의 약리학적 성분과 효능을 규명하며 천연약물의 그 가치를 과학적으로 증명하고 있다.

Myricetin, quercetin, kaempferol, isorhamnetin과 같은 flavonoid가 풍부한 산자나무 추출물은 항비만효과를 나타내었고³⁾, 산자나무 씨앗의 메탄올 추출물은 *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis* 등에 대한 항균효과가 있다고 보고되었다⁴⁾. 또한 quercetin 대사산물의 하나인 isorhamnetin은 산화적 스트레스의 원인물질인 reactive oxygen species (ROS) 생성을 차단함으로써 C2C12 세포에서의 apoptosis 유발을 억제하였고⁵⁾, nuclear factor (NF)- κ B 신호의 조절을 통해 lipopolysaccharides (LPS)에 의해 유발된 염증반응을 완화시켰다고 보고하였다⁶⁾. 뿐만 아니라, 산

Received: September 4, 2017, Revised: September 25, 2017, Accepted: October 12, 2017

ISSN 1598-4478 (Print) / ISSN 2233-7679 (Online)

[†]Correspondence to: Min-Kyung Lee

Department of Biomedical Health Science, Dong-Eui University, 176 Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea
Tel: +82-51-890-4238, Fax: +82-0505-182-6878, E-mail: lmk849@deu.ac.kr

Copyright © 2017 by Journal of Dental Hygiene Science

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

자나무잎 추출물이 NF-κB 활성화 및 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 인산화를 억제함으로써 LPS에 의한 nitric oxide (NO), interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase 및 cyclooxygenase-2 단백질의 발현을 억제하였다는 보고는 산자나무의 항산화 및 항염증 효과를 설명하는 연구결과이다⁷⁾.

구강안면부의 통증은 치과를 내원하게 되는 주요인으로 치통, 턱관절기능장애, 삼차신경통 등을 포함하며 그 발생과 전달 과정에 산화적 스트레스가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{8,9)}. 동물실험에서 phenyl-N-tert-butyl nitron이나 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl과 같은 ROS 제거제는 포르말린이나 캡사이신 유발 통각 과민을 약화시켰고^{9,10)}, 강력한 항산화제로 알려진 비타민 E의 복용과 투여와 척수강내 투여는 포르말린으로 유도한 통증반응을 감소시켰다¹¹⁾. 이러한 연구결과는 산화적 스트레스의 감소를 통한 안면부통증조절의 가능성을 시사한다.

치과 임상에서 환자가 호소하는 통증의 발병원인과 증상은 매우 다양하나 이들을 대상으로 임상연구를 수행하기에는 많은 위험과 윤리적 문제가 존재한다. 따라서 통증의 발생과 전달 기전을 이해하고 효과적인 통증치료약물이나 치료법을 개발하기 위해서 환자의 상태와 유사한 동물통증모델을 만들어 통증연구에 사용되고 있다¹²⁾. 현재까지도 널리 사용되고 있는 안면부통증모델로는 실험동물의 입술, 안면부 피하 또는 악관절 강내에 capsaicin, mustard oil, formalin 등과 같은 염증성 물질을 주입하는 것으로, 이러한 제제의 적용 후에는 부종, 발열, 세포 이동, 흥반, 이질통 및 통각 과민을 포함하는 염증반응이 일어나^{13,14)} 통증반응평가와 염증 및 통증신호의 주요인자에 관한 연구에 이용되고 있다.

앞서 기술한 바와 같이 산자나무의 염증 및 통증신호의 주요인자에 대한 조절효과는 이전 연구들은 통해 보고된 바 있으나 통증신호가 전달되어 실제로 표현되는 행위반응의 조절과 관련한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서 실험동물에 포르말린으로 유도한 안면부와 턱관절 통증 두 가지 모델을 적용하여 산자나무의 통증행위반응 조절효과에 대해 확인하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(240~280 g)를 효창사이언스(Daegu, Korea)에서 공급받아 그룹 당 6마리씩, 총 48마리가 실험에 사용되었다. 12시간 주/야 순환주기 및 23~24°C의 일정한 환경을 유지하면서 물과 사료는

자유로이 공급하였다. 행동적인 억압 등에 의한 실험 전 스트레스를 가능한 최소화하였다. 본 연구는 의식이 있는 동물의 실험에 관한 통증연구학회의 윤리적 규정에 따라 수행하였으며, 동의대학교 동물실험윤리위원회의 심의를 거쳐 심의를 받아 진행하였다(R2016-020).

2. 시약준비

산자나무 추출물(비타민나무열매 추출분말; Shanghai Brichtolinternatinal Co., Ltd., Tibet, China)은 150, 300 mg/kg (1 ml)의 농도로 희석하여 경구로 투여하였다. 각 실험군은 formalin 주입군, distilled water (DW) 투여 후 5% formalin 주입군, 산자나무 추출물(150, 300 mg/kg) 투여 후 5% formalin 주입군으로 분류하였다. 산자나무 추출물 적용 30분 후 5% formalin을 주입하여 통증행위반응을 관찰하였다.

3. 구강안면부 염증성 통증 유발

구강안면부의 염증성통증모델의 이전 실험과 동일한 방법으로 동일하게 진행하였다^{15,16)}. 실험동물의 안면부 피하(50 μl) 또는 측두하악관절(30 μl)에 5% formalin을 인슐린 주사기(31 gauge)를 이용하여 주입하였고, 주입 직 후부터 5분단위로 누적하여 총 45분간 행위반응을 관찰하였다. Formalin이 주입된 구강안면 부위를 문지르거나 긁는 행위를 통증 지표로 간주하였다.

4. 통계분석

실험결과는 IBM SPSS Statistic ver. 22.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 least significant difference 사후분석법을 적용한 일원배치 분산분석을 하였고, Sigmaplot 2001 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 그래프를 나타내었다. 결과는 평균±표준오차(standard error of the mean)로 표시하였고, 유의수준은 0.05로 설정하였다.

결 과

1. 산자나무 추출물의 안면부통증행위반응 조절효과

5% formalin을 안면부 피하로 주입하여 유도한 안면부통증에서 산자나무 추출물의 통증행위반응 조절효과를 Fig. 1에 나타냈다. Formalin의 주입에 의한 안면부를 긁거나 문지르는 통증행위반응은 422.3±30.0회로 나타났으며, 용매로 사용된 saline의 경구투여군에서는 411±30.3회로 용매에 의해 통증행위반응의 변화는 나타나지 않았다. 하지만

산자나무 추출물(150, 300 mg/kg)의 경구투여는 각 305.3 ± 20.7 회, 137.3 ± 21.8 회로 포르말린으로 유도된 통증행위반응을 감소시켰다. Fig. 2는 시간의 경과에 따라 행위반응의 변화를 확인한 결과로, formalin의 주입으로 인한 통증행위반응은 15분 이후부터 증가하여 25, 30분에 가장 높게 나타났으며 40분까지 지속되다가 45분에 감소되었다. 산자나무 추출물의 300 mg/kg 경구투여는 25~40분에서 formalin에 의해 증가된 안면부통증행위반응을 현저하게 감소시켰다.

2. 산자나무 추출물의 턱관절통증행위반응 조절효과
 턱관절 강 내로 주입한 포르말린으로 유도된 통증모델에

서의 산자나무 추출물의 통증조절효과는 Fig. 3에 나타내었다. Formalin군에서 턱관절 통증행위반응은 306.8 ± 31.4 회로 나타났으며, 용매군에서는 275.3 ± 19.3 회로 용매에 의한 턱관절 통증조절효과는 나타나지 않았다. 하지만 산자나무 추출물(150, 300 mg/kg)의 경구투여는 각 184.7 ± 20.0 , 125.7 ± 9.8 회로 포르말린으로 유도된 통증행위반응을 감소시켰다. Fig. 4는 시간의 경과에 따라 행위반응의 변화를 확인한 결과로, formalin의 주입으로 인한 통증행위반응은 15분 이후부터 증가하여 포르말린 주입 후 25분에 가장 높게 나타났으며 35분까지 지속되다가 이후 감소하였다. 산자나무 추출물의 경구투여는 포르말린 주입 30분에서 유의한 턱

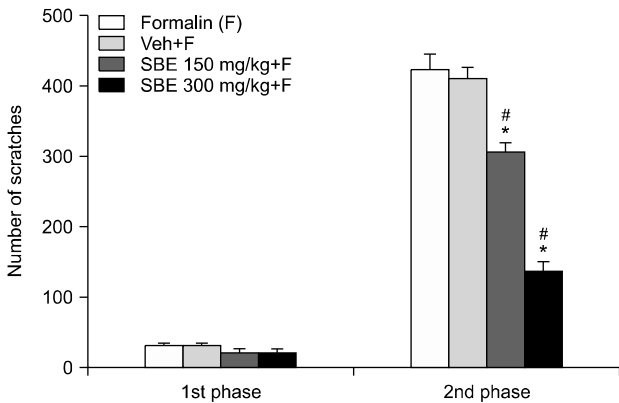


Fig. 1. The effect of the sea buckthorn extract (SBE: 150, 300 mg/kg) on behavioral responses following injection of formalin (5%, 50 μ l) into vibrissa pad. SBE reduced behavioral responses during the second phase compared with 5% formalin-treated group. * $p < 0.05$ vs. F, [#] $p < 0.05$ vs. vehicle (veh) + F.

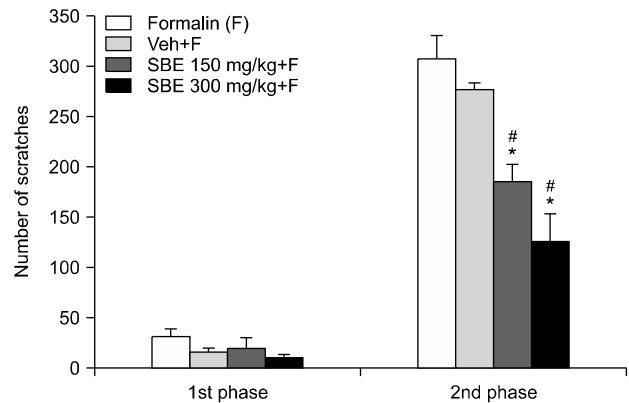


Fig. 3. The effect of the sea buckthorn extract (SBE: 150 mg/kg, 300 mg/kg) on behavioral responses following injection of formalin (5%, 30 μ l) into temporomandibular joint. SBE reduced behavioral responses during the second phase compared with 5% formalin-treated group. * $p < 0.05$ vs. F, [#] $p < 0.05$ vs. vehicle (veh) + F.

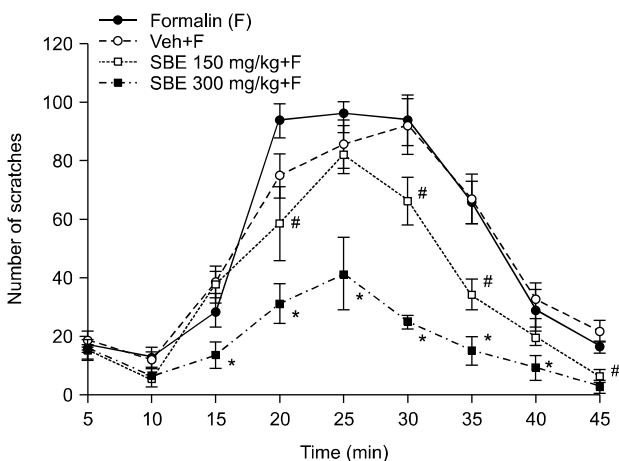


Fig. 2. Time response curve for the number of scratches responses following injection of formalin (5%, 50 μ l) into vibrissa pad 30 minutes after oral administration of sea buckthorn extract (SBE). * $p < 0.05$ vs. F, [#] $p < 0.05$, vs. vehicle (veh) + F.

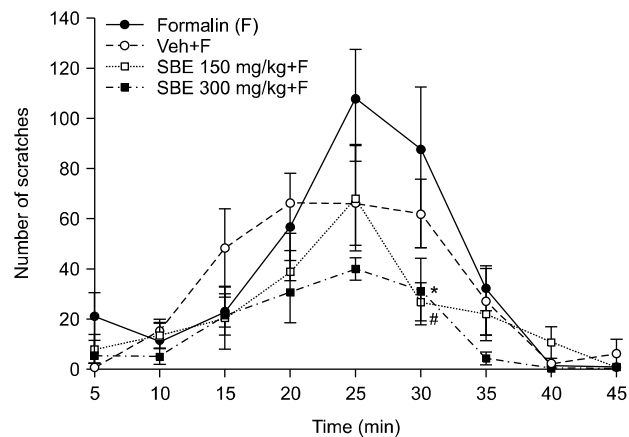


Fig. 4. Time response curve for the number of scratches responses following injection of formalin (5%, 30 μ l) into temporomandibular joint 30 minutes after oral administration of sea buckthorn extract (SBE). * $p < 0.05$ vs. F, [#] $p < 0.05$ vs. vehicle (veh) + F.

관절 통증경감효과를 나타내었다.

고 찰

본 연구는 다양한 양상과 정도, 범위로 나타날 수 있는 구강안면영역의 통증을 실험에 적용하기 위해 안면부 피하와 턱관절내에 formalin을 주입하여 유발한 두 통증모델에서 산자나무 추출물의 통증조절에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

구강질환의 다양한 증상 중 통증은 환자가 치과를 내원하게 만드는 주요 원인인 동시에 치과치료 중 발생하는 통증은 치과에 대한 공포심을 야기한 요인이기도 하다^{17,18}. 구강안면부의 통증조절을 위해 아스피린, 이부프로펜 등의 비스테로이드성 소염진통제가 주로 처방되어 지나 과다 복용 시간 손상 및 장출혈 등의 부작용이 알려져 있고, 진신질환을 가진 환자에 대한 약물처방 시 또는 복용 중인 약과의 병용에 따른 부작용은 합성의약품의 의존적 처방에 대한 우려가 천연약물에 대한 관심으로 이동하는 이유이기도 하다. 최근 합성의약품에 비해 비교적 독성이 적어 장기 복용이 가능하고 복합적인 효능을 가지는 천연약물에 대한 약리학적 효과와 그 작용 기전에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{16,19}. 본 연구에서는 천연약물로서의 다양한 생리학적 효능이 밝혀진 산자나무 추출물이 구강안면 통증을 조절에도 효과적일 것으로 기대하였다.

산자나무 추출물은 항산화 및 항염증 효과를 나타내는 다양한 생리활성성분들을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 실험동물의 피부조직 상처모델에서 산자나무 잎 추출물은 육아조직의 항산화 수준을 증가시켜 상처치유효과를 나타내었으며²⁰, 실험동물의 화상을 유도하여 생긴 상처에도 현저한 치료 효과를 나타내었다고 보고하였다²¹. LPS를 처리한 RAW 264.7 세포실험에서 산자나무의 줄기, 잎, 뿌리, 열매의 에탄올 추출물은 NO 생산을 억제하였고, LPS와 D-galactosamine hydrochloride로 유도한 실험동물의 급성간기능부전 모델에서 산자나무 다당류추출물은 Toll-like receptor 4, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-p38 MAPK의 발현을 억제함으로써 간 손상에 대한 보호효과를 나타냈다고 보고된 바 있다²². 본 연구에서 포르말린으로 유도한 실험동물의 안면부와 턱관절통증모델에서 통증행위반응은 산자나무 추출물의 투여로 인해 감소되어 나타났다. 이는 앞서 설명한 산자나무 추출물이 가진 산화적 스트레스, 염증 및 통증 신호의 전달물질을 억제시키는 효과에 기인한 것으로 생각되며, 본 연구의 한계점으로써 추후 산자

나무 추출물이 구강안면통증의 신호를 매개하는 전달물질의 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 요구 바이다.

약물의 적용 시 제기되는 부작용 및 안정성 문제와 관련하여 산자나무 추출물은 상당히 우수한 것으로 보고된다. 급성독성실험에서 실험동물의 반수치사량 LD50은 14일 동안 매일 산자나무 잎 추출물을 10 g/kg 이상을 경구투여했을 때였고, 14일 동안 1일 1~2 g/kg과 30일 동안 1일 100 mg/kg씩 투여한 아급성 실험 후 대조군과 비교에서 생화학적 및 혈액학적 매개 변수, 기관중량/체중의 비율(1 g/kg 및 2 g/kg 체중량의 간 및 신장 제외)의 유의한 변화는 관찰되지 않았다²³. Yang 등³의 연구결과에서도 300 mg/kg을 경구투여한 실험군의 기관중량/체중의 비율이 정상군과 차이가 없었고, Upadhyay 등²¹도 산자나무 잎 추출물은 BHK-21 셀 라인에서 세포독성을 나타내지 않았다고 보고하였다. 이러한 연구들을 참고하여 본 연구의 약물농도를 결정하였고, 적용된 150, 300 mg/kg의 산자나무 추출물은 두 통증모델에서 행위반응을 유의하게 감소시켰다. 특히, 안면부모델에서는 농도의존적인 효과를 나타내었다.

본 연구는 항산화 및 항염증 효과를 가지는 산자나무 추출물을 이용하여 구강안면 통증을 조절능력에 대해 평가하고자 하였다. 실험동물의 안면부 피하와 턱관절 강에 각각 포르말린을 주입하여 유발한 두 가지 통증모델을 적용하였으며, 통증행위반응을 평가한 결과, 산자나무 추출물의 경구투여는 두 모델에서 유의한 통증경감효과를 나타내었음을 확인하였다. 이러한 실험적 연구결과를 기초로 하여 산자나무 추출물은 구강안면 통증조절에 대한 예방적 또는 치료적 제제로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 실험동물 대상으로 하는 두 가지 구강안면통증 모델을 이용하여 산자나무 추출물 *H. rhamnoides* (sea buckthorn)의 통증조절효과를 확인하고자 하였다. 5% formalin을 실험동물 안면부 피하(50 µl) 또는 측두하악관절(30 µl) 내로 주입하여 안면부를 긁거나 문지르는 통증행위반응을 유도하였다. Formalin의 주입으로 인한 안면부 통증행위반응은 15분 이후부터 증가하여 25, 30분에 가장 높게 나타났으며 40분까지 지속되다가 45분에 감소되었다. 안면부 통증 유발 30분 전 150 mg, 300 mg/kg (1 ml)의 농도로 산자나무 추출물을 희석하여 경구투여하였다. DW를 경구투여한 대조군에서는 formalin에 의한 통증행위반응의 변화에 영향을 미치지 않았으나 산자나무 추출물(150, 300 mg/kg)의 경구투여는 각 305.3±20.7회, 137.3±21.8회로

포르말린으로 유도된 안면부통증행위반응을 감소시켰다. 시간에 따른 변화의 결과로, 산자나무 추출물의 300 mg/kg 경구투여는 25~40분에서 formalin에 의해 증가된 안면부 통증행위반응을 현저하게 감소시켰다. 측두하악관절에 주입한 포르말린은 306.8±31.4회의 통증행위반응을 나타내어 턱관절 통증을 유도하였고, 산자나무 추출물(150, 300 mg/kg)의 경구투여는 턱관절통증행위반응을 각 184.7±20.0회, 125.7±9.8회로 감소시켰다. 시간의 경과에 따라 결과에서 산자나무 추출물의 경구투여는 포르말린 주입 30분에서 유의한 턱관절 통증경감효과를 나타냈다. 따라서, 본 연구의 결과는 산자나무 추출물의 구강안면 통증조절에 대한 예방적 또는 치료적 제제로의 활용가능성에 대한 기초자료로 활용가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교과부)의 재원으로 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2012-M3A9B6055414).

References

1. Choi SJ, Kim NR, Shin JY, Lee KM, Kyong KY: Evaluation of anti-wrinkle efficacy in Seabuckthorn (*hippophae rhamnoides L.*) extracts, oil and nanoemulsion containing them. *Korean Soc Cosmet Cosmetol* 6: 127-137, 2016.
2. Park YH, Lim SH, Ham HJ, et al.: Comparison of biological activities of extracts from different parts of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 975-979, 2010.
3. Yang X, Wang Q, Pang ZR, Pan MR, Zhang W: Flavonoid-enriched extract from *Hippophae rhamnoides* seed reduces high fat diet induced obesity, hypertriglyceridemia, and hepatic triglyceride accumulation in C57BL/6 mice. *Pharm Biol* 55: 1207-1214, 2017.
4. Negi PS, Chauhan AS, Sadia GA, Rohinishree YS, Ramteke RS: Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed extracts. *Food Chem* 92: 119-124, 2005.
5. Choi YH: Protective effects of isorhamnetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in c2c12 murine myoblasts. *J Soc Korean Med Obes Res* 15: 93-103, 2015.
6. Li Y, Chi G, Shen B, Tian Y, Feng H: Isorhamnetin ameliorates LPS-induced inflammatory response through downregulation of NF-κB signaling. *Inflammation* 39: 1291-1301, 2016.
7. Jiang F, Guan H, Liu D, Wu X, Fan M, Han J: Flavonoids from sea buckthorn inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through the MAPK and NF-κB pathways. *Food Funct* 8: 1313-1322, 2017.
8. Hacimuftuoglu A, Handy CR, Goettl VM, Lin CG, Dane S, Stephens RL Jr: Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Res* 173: 211-216, 2006.
9. Lee I, Kim HK, Kim JH, Chung K, Chung JM: The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133: 9-17, 2007.
10. Ko YK, Youn AM, Hong BH, et al.: Antinociceptive effect of phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, on the rat formalin test. *Korean J Anesthesiol* 62: 558-564, 2012.
11. Kim MJ, Hong BH, Zhang EJ, Ko YK, Lee WH: Antinociceptive effects of intraperitoneal and intrathecal vitamin E in the rat formalin test. *Korean J Pain* 25: 238-244, 2012.
12. Park JY: Animal pain models and behavior tests. *Hanyang Med Rev* 31: 103-106, 2011.
13. Kaan TK, Ohara PT, Jasmin L: Orofacial pain models and behavior assessment. In: David Luo Z, ed. *Pain research: methods and protocols*. 2nd ed. Humana Press, New York, pp.159-170, 2012.
14. Krzyzanowska A, Avendaño C: Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav* 2: 678-697, 2012.
15. Kim YK, Choi JH, Lee HJ, et al.: Analgesic effects of triptolide via peripheral and central administration in rat model of inflammatory orofacial pain. *J Dent Hyg Sci* 15: 424-429, 2015.
16. Lee HJ, Kim YK, Choi JH, et al.: Effects of red or black ginseng extract in a rat model of inflammatory temporomandibular joint pain. *J Dent Hyg Sci* 17: 65-72, 2017.
17. Park SY, Won YS: Influences of previous pain experiences during dental treatment on dental fear. *Korean J Health Serv Manag* 6: 141-151, 2012.
18. Jung MH, Jun SH: Patients who visit to dental clinic utilization behavior, dental fear and oral and maxillofacial

- pain. J Dent Hyg Sci 9: 361-367, 2009.
19. Jung JK, Park YK: Dose range finding study of KOB03, a new polyherbal medicine for the treatment of allergic rhinitis, by oral administration for four weeks in Sprague-Dawley rats. Korean J Herbol 27: 101-106, 2012.
 20. Gupta A, Kumar R, Pal K, Banerjee PK, Sawhney RC: A preclinical study of the effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf extract on cutaneous wound healing in albino rats. Int J Low Extrem Wounds 4: 88-92, 2005.
 21. Upadhyay NK, Kumar R, Siddiqui MS, Gupta A: Mechanism of wound-healing activity of *Hippophae rhamnoides* L. leaf extract in experimental burns. Evid Based Complement Alternat Med 2011: 659705, 2011.
 22. Liu H, Zhang W, Dong S, et al.: Protective effects of seabuckthorn polysaccharide extracts against LPS/d-GalN-induced acute liver failure in mice via suppressing TLR4-NF- κ B signaling. J Ethnopharmacol 176: 69-78, 2015.
 23. Saggu S, Divekar HM, Gupta V, Sawhney RC, Banerjee PK, Kumar R: Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. Food Chem Toxicol 45: 609-617, 2007.