



Original Article / 원저

생쥐 소장 및 대장 카할세포의 자발적 탈분극에서 텍사의 효과에 관한 비교연구

권효은, 박동석, 김정남, 김병주*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학교실

Effects of *Alisma canaliculatum* Extract in Pacemaker Potential of Intestinal Interstitial cells of Cajal in mice

Hyo Eun Kwon, Dong Suk Park, Jeong Nam Kim, Byung Joo Kim*

*Division of Longevity and Biofunctional Medicine School of Korean Medicine,
Pusan National University*

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to examine the effects of *Alisma canaliculatum* Extract (ACE) on pacemaker potentials of small and large intestinal interstitial Cells of Cajal (ICC) in mice.

Methods : We used enzymatic digestions to dissociate the ICC in the small and large intestine in mice. The whole-cell patch-clamp method was used to record pacemaker potentials in ICC.

Results :

1. The ICC generated the pacemaker potentials in small intestine in mice. ACE (0.1-1mg/ml) induced membrane depolarization and decreased frequency with concentration-dependent manners.
2. Pretreatment with a Ca^{2+} free solution, Na^+ 5 mM solution or 2-APB, a nonselective cation channel blocker, stopped the small intestinal ICC pacemaker potentials. In the case of Ca^{2+} -free solution, Na^+ 5 mM solution or 2-APB, ACE had no effects on the membrane depolarizations in small intestinal ICC.
3. The ICC generated the pacemaker potentials in large intestine in mice. Membrane depolarization appears regularly in the small intestine, but irregularly in the large intestine. ACE induced membrane depolarization (0.1-1mg/ml) and increased frequency (0.1-0.5mg/ml).
4. Pretreatment with a Ca^{2+} free solution, Na^+ 5 mM solution or 2-APB, stopped the large intestinal ICC pacemaker potentials. In the case of Ca^{2+} -free solution, Na^+ 5 mM solution or 2-APB, ACE depolarized the membrane depolarizations in large intestinal ICC.

5. In mice, intestinal transit rate (ITR) values were dose-dependently decreased by the intragastric administration of ACE.

Conclusions : These results suggest that ACE can regulate the pacemaker activity of ICC and the reaction by ACE is different from the small and large intestinal ICC, and the control of the intestinal motion by ACE may be caused by many complex processes.

Key words : *Alisma canaliculatum*, Pacemaker Potentials, Interstitial Cells of Cajal, Intestinal motion.

I. 서론

카할세포 (Interstitial cells of Cajal; ICC)는 위장관 전체에 존재하며 pacemaker 역할을 하는 세포다^{1,2)}. 위장관에서 서파(Slow wave)는 카할세포에 의해 발생하며, 카할세포는 주변의 카할세포, 평활근 또는 신경과 gap junction을 통해 전기적으로 연결되어 있다³⁾. 이 카할세포가 임상학적으로 중요한 이유는 카할세포가 손상을 받게 되면 다양한 위장관 운동성 질환과 관련된 질환을 일으키기 때문이다⁴⁾. 따라서 위장관 운동성 연구에서는 카할세포를 이용한 연구를 많이 하고 있다.

텍사는 한국, 중국, 일본에서 흔히 사용되는 전통의학으로⁵⁾, 항균, 항암 등 다양한 약리학적 특성을 보이며, 간세포를 보호하는 효과도 있다⁶⁻⁸⁾. 또한 폐경 후 골다공증 치료와 유방암 전이 억제에도 효과적이다⁹⁻¹¹⁾. 하지만, 텍사가 위장관 운동성에 미치는 작용에 대한 연구는 많이 부족한 현실이다. 본 연구에서는 위장관 운동성과 관련된 카할세포를 이용해서 텍사에 의한 소장과 대장에서의 텍사의 효과를 확인하고 차이점을 확인하는 기초적 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

(1) 약재

텍사 추출물 *Alisma canaliculatum* extract (ACE)은 한국 식물추출물은행 (청주, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 증류수에 0.5 g/ml의 농도로 녹인 후에 냉장고에 보관 사용하였다.

2. 방법

(1) 카할세포 배양

카할세포의 배양을 위해 주로 이용되는 마우스는 ICR을 사용하고 ether로 마취 시킨 후 희생시킨 다음 개복하여 pyloric ring에서부터 회장에 해당하는 소장 및 대장부위를 적출한다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로 채워진 준비 용기속에서 창자간막 가장자리를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 운상근을 노출시킨 후 분리된 소장 근육조직을 collagenase, bovine serum albumin, trypsin inhibitor, ATP 등이 들어 있고, Ca^{2+} 이 들어 있지 않은 Hank's 용액에 옮긴 다음 37°C에서 20분간 항온 소화 시킨 후 진탕시켜 세포를 분리한다. 분리된 세포들을 유리 coverglass위에 분주하고, 10분후에 stem cell factor와 antibiotic/antimycotic이 들어 있는 SmGm (smooth muscle growth medium) 용액을 분주한 후, 37°C (95% O_2 -5% CO_2) 배양기에서 배양 시킨다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 antibiotic/antimycotic만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주고 실험은 배양 2일째 후부터 시행한다.

(2) 전기생리학적 실험

카할세포에서 막전압 또는 전류를 기록하기 위해 patch clamp 실험기법 중 whole cell patch 방법이 많이 이용되고 있다. 전압 또는 전류는 standard patch clamp amplifiers를 통해 증폭시키며, 나오는 신호는 디지털 오실로스코프 및 생리적 기록기를 통해서 관찰된다. 세포막 전류는 -70 mV의 유지전압에 고정하여 기록하며 얻어진 결과는 pClamp 등의 프로그램을 통해 분석처리하게 된다. 막전압 또는 전류를 기록하는 동안 세포외의 관류 용액의 조성은 다음과 같다. KCl 5 mM, NaCl 135 mM, $CaCl_2$ 1.2 mM, glucose 10 mM,

*Corresponding author: Byung Joo Kim, Division of Longevity and Biofunctional Medicine School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea
Tel : +82-51-510-8469, Fax : +82-51-510-8420, E-mail : vision@pusan.ac.kr

•Received : March 2, 2022 / Revised : May 10, 2022 / Accepted : May 11, 2022

HEPES 10 mM, Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정한다. 전극내 용액의 조성은 KCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂ATP 2.7 mM, Na₂GTP 0.1 mM, creatinine phosphate disodium 2.5 mM, HEPES 5 mM, EGTA 0.1 mM, Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정한다. 배양된 카할간질세포에서 세포막 전압 또는 전류 고정법을 시행하면 자발적으로 발생하는 내향성 향도잡이 전류 및 전압이 기록된다.

(3) 장 이동능(intestinal transit rate, ITR) 측정

장 이동능력은 Evans blue solution을 이용한 장 이동거리(distance)로 측정하였다. 정상 생쥐에 택사를 위내 직접 투여 후 30분이 지나 Evans blue를 위내 투여하였다. 다시 30분이 지난 후 생쥐 장에서 Evans blue가 유문(pylorus)에서 장까지 이동한 거리를 측정하여 전체 장 거리에서 Evans blue가 이동한 거리의 비율로 ITR을 결정하였다. 모든 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하면서 진행하였다(PNU-2022-0120).

(4) 통계 분석

실험성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 결과의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로

검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 생쥐 소장 카할세포에 의한 자발적 탈분극에서 택사의 조절 효과

생쥐 소장 카할세포의 자발적 탈분극(depolarization)에서 택사의 효능을 알아보았다. 전기 패치 클램프 기법을 사용하여 배양된 소장 카할세포의 특성을 알아보면, 카할세포는 12시간이내 동안 배양 후 네트워크와 같은 구조를 형성했으며 자발적 리듬 수축이 발생하였다. 택사는 농도 의존적으로 안정막 전압 탈분극을 일으키고 빈도(frequency)은 감소함을 알 수 있다 (Fig. 1A-1C). 안정막 전압 탈분극이 일어나는 정도는 택사 0.1 mg/ml에서는 3.7±0.5 mV ($P<0.01$), 0.5 mg/ml에서는 24.5±1.0 mV ($P<0.01$), 1 mg/ml에서는 26.7±1.3 mV ($P<0.01$)를 나타내었다 (Fig. 1D). 빈도의 정도는 택사 0.1 mg/ml에서는 7.4±0.5 cycles/30sec, 0.5 mg/ml에서는 2.9±1.7 cycles/30sec ($P<0.01$), 1 mg/ml에서는 2.4±1.3 cycles/30sec ($P<0.01$)를 나타내었다 (Fig. 1E).

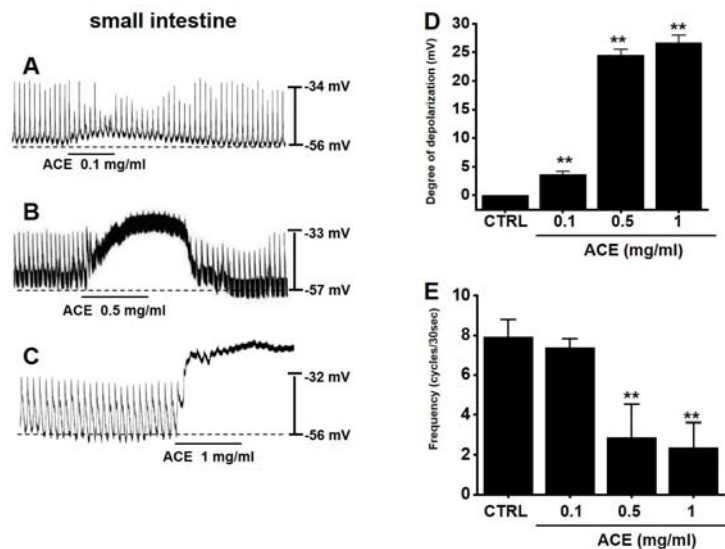


Fig. 1. Effects of ACE in pacemaker potentials of murine small intestinal ICC. (A-C) ACE depolarized the membrane potential and decreased the frequency in pacemaker potential in small intestinal ICC. (D) Depolarization and (E) frequency responses to ACE in small intestinal ICC are summarized. Bars represent mean values ± S.D. ** $P < 0.01$. CTRL: Control. ACE: *Alisma canaliculatum* extract.

2. 생쥐 소장 카할세포에 의한 자발적 탈분극에서 텍사의 효능에 세포밖 Ca^{2+} 과 Na^+ 및 비선택성 양이온 통로 억제제의 효과

생쥐 소장 카할세포의 자발적 탈분극에서 세포밖 Ca^{2+} 및 Na^+ 농도 조절능을 알아 보았다. 세포밖 Ca^{2+} 을 제거하거나 세포밖 Na^+ 농도를 5 mM로 감소시키면 자발적 탈분극 발생이 억제되고 이 조건에서 텍사에 의한 반응이 나타나지 않았다 (Fig. 2A and 2B). 또한

비선택성 양이온 통로 억제제인 2-APB를 처리해보면 자발적 탈분극 현상은 발생하지 않았고 이 조건에서 텍사에 의한 반응 또한 나타나지 않았다 (Fig. 2C). 텍사 0.5 mg/ml에서 안정막 전압 탈분극이 일어나는 정도는 세포밖 Ca^{2+} 제거한 경우는 1.4 ± 1.0 mV ($P < 0.01$), Na^+ 5 mM인 경우는 1.3 ± 0.5 mV ($P < 0.01$), 2-APB를 처리한 경우는 2.4 ± 0.9 mV ($P < 0.01$)를 나타냈다 (Fig. 2D).

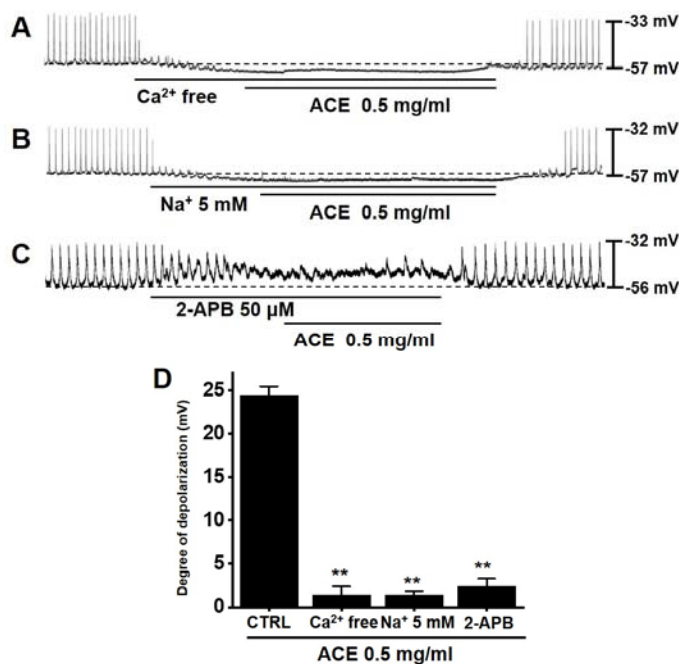


Fig. 2. Effects of an external Ca^{2+} -free solution, Na^+ 5 mM solution or 2-APB, a nonselective cation channel blocker, on ACE-induced pacemaker potentials of murine small intestinal ICC. (A) The external Ca^{2+} -free solution stopped the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, ACE-induced membrane depolarizations were inhibited. (B) The external Na^+ 5 mM solution stopped the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, ACE-induced membrane depolarizations were inhibited. (C) 2-APB (50 μ M) stopped the generation of pacemaker potentials and 2-APB blocked the ACE-induced membrane depolarizations. (D) Depolarization responses to ACE in the external Ca^{2+} -free solution, Na^+ 5 mM solution or 2-APB in small intestinal ICC are summarized. Bars represent the mean values \pm S.D. ** $P < 0.01$. CTRL: Control, ACE: *Alisma canaliculatum* extract.

3. 생쥐 대장 카할세포에 의한 자발적 탈분극에서 텍사의 조절 효과

생쥐 대장 카할세포의 자발적 탈분극(depolarization)에서 텍사의 효능을 알아보았다. 전기 패치 클램프 기법을 사용하여 배양된 대장 카할세포의 특성을 알아보

면, 소장에서처럼 카할세포는 12시간이내 동안 배양 후 네트워크와 같은 구조를 형성했으며 자발적 리듬 수축이 발생하였다. 하지만 소장에서는 자발적 탈분극이 규칙적으로 발생하지만 대장에서는 불규칙적으로 자발적 탈분극이 나타남을 확인할 수 있다. 텍사는 농도 의존

적으로 안정막 전압 탈분극을 일으키고 빈도(frequency)은 점점 증가함을 알 수 있다. 하지만 고농도인 1 mg/ml에서는 오히려 빈도가 감소하였다 (Fig. 3A-3C). 대장 카할세포에서 안정막 전압 탈분극이 일어나는 정도는 텍사 0.1 mg/ml에서는 3.7 ± 0.5 mV ($P < 0.01$), 0.5 mg/ml에서는 17.1 ± 0.8 mV ($P < 0.01$), 1 mg/ml

에서는 21.0 ± 0.9 mV ($P < 0.01$)를 나타내었다 (Fig. 3D). 빈도의 정도는 텍사 0.1 mg/ml에서는 8.0 ± 1.0 cycles/30sec, 0.5 mg/ml에서는 12.9 ± 1.0 cycles/30sec ($P < 0.01$), 1 mg/ml에서는 1.2 ± 0.2 cycles/30sec ($P < 0.01$)를 나타내었다 (Fig. 3E).

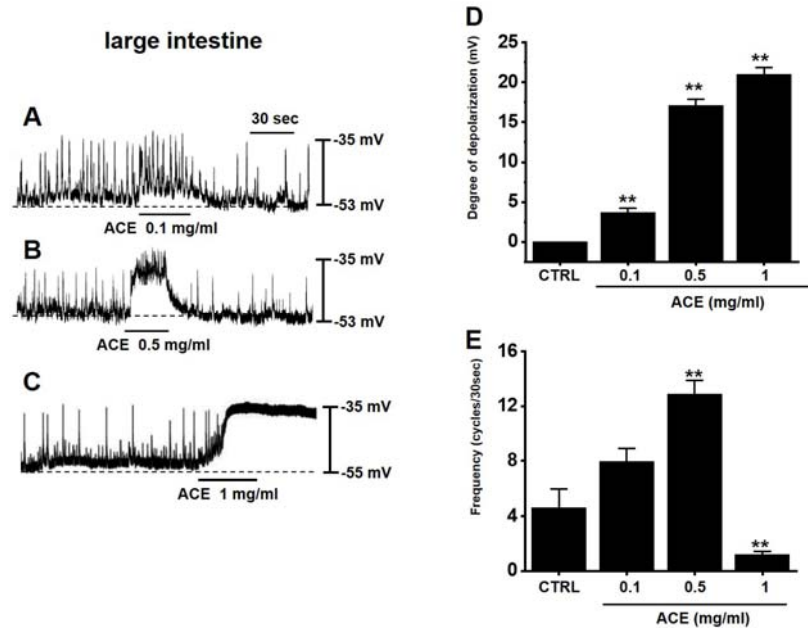


Fig. 3. Effects of ACE in pacemaker potentials of murine large intestinal ICC. (A-C) ACE depolarized the membrane potential and increased the frequency in pacemaker potential in large intestinal ICC. (D) Depolarization and (E) frequency responses to ACE in large intestinal ICC are summarized. Bars represent mean values \pm S.D. ** $P < 0.01$. CTRL: Control, ACE: *Alisma canaliculatum* extract.

4. 생쥐 대장 카할세포에 의한 자발적 탈분극에서 텍사의 효능에 세포밖 Ca^{2+} 과 Na^+ 및 비선택성 양이온 통로 억제제의 효과

생쥐 대장 카할세포의 자발적 탈분극에서 세포밖 Ca^{2+} 및 Na^+ 농도 조절능을 알아 보았다. 세포밖 Ca^{2+} 제거하거나 Na^+ 농도를 5 mM로 하면 자발적 탈분극 발생이 억제되고 이 조건에서 텍사에 의해 안정막 전압 탈분극 현상이 나타났다 (Fig. 4A and 4B). 또한 비선

택성 양이온 통로 억제제인 2-APB를 처리해보면 자발적 탈분극 현상은 발생하지 않았고 이 조건에서 텍사에 의해 안정막 전압 탈분극 현상이 나타났다 (Fig. 4C). 텍사 0.5 mg/ml에서 안정막 전압 탈분극이 일어나는 정도는 세포밖 Ca^{2+} 제거한 경우는 12.3 ± 0.8 mV ($P < 0.01$), 세포밖 Na^+ 5 mM인 경우는 18.6 ± 1.3 mV, 2-APB를 처리한 경우는 11.7 ± 1.4 mV ($P < 0.01$)를 나타냈다 (Fig. 4D).

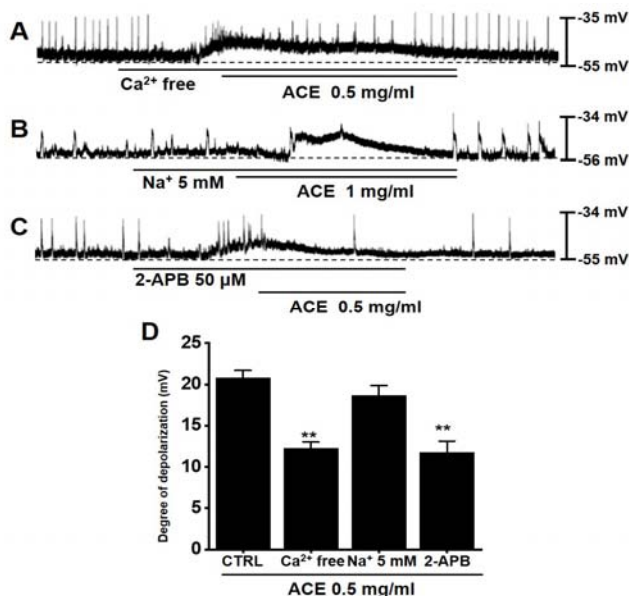


Fig. 4. Effects of an external Ca²⁺-free solution, Na⁺ 5 mM solution or 2-APB, a nonselective cation channel blocker, on ACE-induced pacemaker potentials of murine large intestinal ICC. (A) The external Ca²⁺-free solution stopped the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, ACE induced membrane depolarizations. (B) The external Na⁺ 5 mM solution stopped the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, ACE induced membrane depolarizations. (C) 2-APB (50 μM) stopped the generation of pacemaker potentials and under these circumstances, ACE-induced membrane depolarizations. (D) Depolarization responses to ACE in the external Ca²⁺-free solution or 2-APB in large intestinal ICC are summarized. Bars represent the mean values ± S.D. **P < 0.01. CTRL: Control. ACE: *Alisma canaliculatum* extract.

5. 생쥐의 장 이동능(ITR)에서 택사의 효과

생쥐에서는 44.1±8.7 %의 평균 ITR을 나타냈으며, 택사 0.01 g/kg 투여 시에는 30.0±8.5 %, 0.1 g/kg에

서는 18.1±11.3 % (P<0.05), 0.5 g/kg에서는 18.1±11.4 % (P<0.05)를 나타냈다 (Fig. 5). 택사 농도가 증가할 수록 ITR이 감소하는 현상을 보였다.

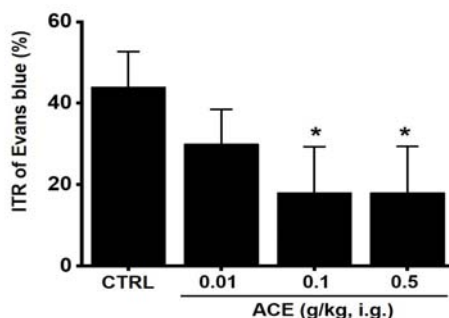


Fig. 5. Effect of ACE on intestinal transit rate (ITR) in mice. Mice were treated with FLR and then intragastrically administered Evans blue 30 minutes later. ITR (%) values were determined 30 minutes after Evans blue administration. Bars represent the mean values ± S.D. *P < 0.05. CTRL: Control. i.g.: intragastric infusion. ACE: *Alisma canaliculatum* extract.

IV. 고찰

전통의학은 질병뿐만 아니라 전신을 전체적으로 치료하는 고대의 치료법이다¹²⁾. 택사는 아시아에서 전통의학으로 사용되는 식물이며 많은 좋은 효과를 발휘하는 것으로 알려지고 있다⁶⁻¹⁰⁾. 또한 암세포에도 효과가 있으며 암의 전이를 억제할 수도 있다¹¹⁾. 또한, 이번 연구는 택사가 카할세포를 조절하는 것을 보여주며 위장관 운동성 조절에 관여할 수 있음을 보여준다.

카할세포는 위장관 운동성 조절에 관여하는 세포를 발생시킨다¹⁻⁴⁾. 카할세포는 주변의 카할세포와 전기적으로 연결되어 있고, gap junction을 통해서 근육이나 신경과 연결되어 있어 자극을 전달할 수 있다³⁾. 즉 위장관 운동은 카할세포, 평활근 세포, 장내 운동신경세포, 호르몬등의 통합 조절에 의해서 조절되며 그중에서 가장 중요한 것은 카할세포라고 말할 수 있다^{3,13)}. 카할세포에 의한 자발적 탈분극의 발생은 다양한 이온통로가 관여한다고 알려지고 있다. 가장 대표적인 이온통로는 Ca^{2+} 가 활성화된 Cl^- 채널과 일과성 수용체 전압 채널 등이다^{1,14,15)}. 또한, proto-oncogene인 c-kit이 카할세포의 세포막에 많이 분포하여 바이오 마커로서 역할을 하면서 다양한 반응 기전을 일으켜 전기 리듬의 진도성에 필수적이다^{16,17)}.

이번 연구에서는 택사에 의한 소장 및 대장 카할세포에서 자발적 탈분극에 미치는 효과와 기전을 알아보았다. 본 연구에서 보면 택사는 먼저 소장 카할세포에서 안정막 전압의 탈분극을 일으키고 빈도는 감소시킨다 (Fig. 1). 이러한 탈분극 현상은 세포밖 Ca^{2+} 이 없거나 또는 Na^+ 농도가 5 mM로 감소할 경우나 비선택성 양이온 통로 억제제인 2-APB를 투여하면 감소되고 이 상황에서 택사를 투여하면 반응이 없다 (Fig. 2). 하지만 대장 카할세포인 경우에는 택사에 의해서 안정막 전압의 탈분극을 일으키고 빈도도 증가하는 소장과는 다른 반응을 확인할 수 있다 (Fig. 3). 또한 대장 카할세포 탈분극 현상은 세포밖 Ca^{2+} 이 없거나 Na^+ 농도가 5 mM로 감소한 경우나 비 선택성 양이온 통로 억제제인 2-APB를 투여하면 감소되지만 이 상황에서 택사를 투여하면 안정막 전압 탈분극 현상이 나타난다 (Fig. 4). 소장 카할세포에서는 세포밖 Ca^{2+} 이 없거나 Na^+ 농도가 감소하거나 2-APB를 투여하면 택사에 의한 반응이 전혀 없지만 대장 카할세포에서는 비록 완벽한 탈분극은 아니지만 탈분극 현상이 나타남을 알 수 있다. 따라

서 같은 동물의 위장관 조직의 카할세포라도 반응이 다를 수 있고 각각의 작용 기전 또한 다를 수 있음을 알 수 있다. 따라서 앞으로 소장 및 대장 카할세포에서의 각각의 한약제제 반응이 다를 수 있음을 알고 각각 반응과 작용기전을 확인할 필요가 있다고 생각된다. 그리고 이 논문에서 사용한 2-APB는 비 선택성 양이온 통로 억제제로 세포밖 Ca^{2+} 및 Na^+ 을 모두 억제한다¹⁸⁾. 세포밖 Ca^{2+} 및 Na^+ 이 카할세포에서 택사의 반응에 어떤 영향을 미치는지는 앞으로 좀 더 연구를 진행해 명확한 기전을 확인 해야겠다. 이번 연구에서 특이한 결과는 in vivo연구로 확인된 ITR 결과이다. 일반적으로 카할세포를 탈분극 시키면 장 운동성이 증가하기 때문에 ITR이 증가하는 결과를 보이는 경우가 많은데 택사의 경우는 오히려 반대로 ITR이 감소하는 결과를 보였다 (Fig. 5). 장 운동성 조절에는 카할세포, 평활근, 신경 등 상당히 복잡한 다양한 요소에 의해서 이루어진다고 알려지고 있다³⁾. 따라서 본 결과는 택사에 의한 장 운동성 조절은 카할세포 보다는 평활근이나 신경에 의해 조절된다고 생각되고 이 부분은 앞으로 더 연구를 해볼 가치가 있다고 생각된다.

고대부터 지금까지 다양한 질병을 치료하기 위한 한약의 중요성을 연구하고 있다. 현재 한약은 건강유지와 큰 부작용 없는 효과적인 치료를 목표로 하고 있다. 최근에는 한약 치료법이 고지혈증, 당뇨병 등 대부분 질병치료의 대체 약 중 하나로 받아들여지고 있다. 대부분의 한약은 생물 활성 화합물이 많고 이것은 인간의 건강에 매우 도움이 될 것이다. 또한 일반적인 건강관리 전문가와 개개인들은 한약이 부작용이 없어 한약에 대한 신뢰가 높다. 따라서 한약은 임상에서 상당한 매력을 얻고 있으며 환자들의 관심이 높아지고 있다. 본 연구로 택사가 카할세포 조절을 통해 위장관 운동 조절 가능성을 확인할 수 있었고 앞으로 in vivo 연구 등 보충실험을 통해서 택사가 위장관 운동성 조절약으로 발전할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었다.

References

1. Kim BJ, Lim HH, Yang DK, Jun JY, Chang IY, Park CS, et al. Melastatin-type transient receptor potential channel 7 is required for intestinal pacemaking activity. *Gastroenterology*. 2005;129:1504–1517.
2. Zhu MH, Sung TS, O'Driscoll K, Koh SD, Sanders KM. Intracellular Ca(2+) release from endoplasmic reticulum regulates slow wave currents and pacemaker activity of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;308:C608–C620.
3. Sanders KM, Ward SM, Koh SD. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiol Rev*. 2014;94:859–907.
4. Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech*. 1999;47:344–360.
5. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 2008;267:226–244.
6. Mikamo H, Kawazoe K, Izumi K, Sato Y, Tamaya T. Effects of crude herbal ingredients on intrauterine infection in a rat model. *Curr Ther Res*. 1998;59:122–127.
7. Huang YT, Huang DM, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Alisol B acetate, a triterpene from *Alismatis rhizoma*, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells. *Cancer Lett*. 2006;231:270–278.
8. Jang MK, Han YR, Nam JS, Han CW, Kim BJ, Jeong HS, et al. Protective Effects of *Alisma orientale* Extract against Hepatic Steatosis via Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress. *Int J Mol Sci*. 2015;16:26151–26165.
9. Kim KJ, Leutou AS, Yeon JT, Choi SW, Kim SH, Yee ST, et al. The Inhibitory Effect of Alisol A 24-Acetate from *Alisma canaliculatum* on Osteoclastogenesis. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:132436.
10. Hwang YH, Kang KY, Lee SJ, Nam SJ, Son YJ, Yee ST. The Protective Effects of Alisol A 24-Acetate from *Alisma canaliculatum* on Ovariectomy Induced Bone Loss in Vivo. *Molecules*. 2016;21:74.
11. Choi J, Ahn SS, Lim Y, Lee YH, Shin SY. Inhibitory Effect of *Alisma canaliculatum* Ethanolic Extract on NF- κ B-Dependent CXCR3 and CXCL10 Expression in TNF α -Exposed MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19:2607.
12. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*. 2016;21:559.
13. Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9:633–645.
14. Hirst GD, Bramich NJ, Teramoto N, Suzuki H, Edwards FR. Regenerative component of slow waves in the Guinea-pig gastric antrum involves a delayed increase in [Ca(2+)](i) and Cl(-) channels. *J Physiol*. 2002;540:907–919.
15. Hwang SJ, Blair PJ, Britton FC, O'Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, et al. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol*. 2009;587:4887–4904.
16. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, et al. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development*. 1992;116:369–753.
17. Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S, Sanders KM. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*. 1995;280:97–111.
18. Sung SK, Kim SJ, Ahn TS, Hong NR, Park HS, Kwon YK, et al. Effects of Dangkwisoo-san, a traditional herbal medicine for treating pain and blood stagnation, on the pacemaker activities of cultured interstitial cells of Cajal. *Mol Med Rep*. 2015;12:6370–6376.