

## Original Article

# Anti-Toxoplasmosis Effect of *Meliae fructus* Ethanol Extract

Hak-Yong Lee<sup>1</sup>, Okjin Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Huvet Co. Ltd., and <sup>2</sup>Center for Animal Resource Development Research, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Toxoplasmosis is an important cause of foodborne, inflammatory, as well as congenital abnormalities. There is an urgent need for safe and effective therapies to eliminate or treat this cosmopolitan infectious disease. A medicinal herbal plant, *Meliae fructus*, has been used to soothe the liver and kills worms in Chinese medicine. In this study, *Meliae fructus* ethanol extract was examined and screened for its anti-*T. gondii* activity. For anti-*T. gondii* activity screening, *in vitro* study of *Meliae fructus* extract using tachyzoite of *T. gondii* RH strain-infected HeLa cells was performed. Further, *in vivo* anti-*T. gondii* study using a mouse infection model was conducted. Safety of herbal compounds was evaluated in SD rats by treatment with *Meliae fructus* extract for 28 days. As a result, selectivity of *Meliae fructus* ethanol extract was 5.85, which was higher than sulfadiazine selectivity (2.06). We also performed an *in vivo* study to evaluate the anti-*T. gondii* activity of *Meliae fructus* extract in a mouse model. The inhibition rate of *Meliae fructus* extract was as high as that of sulfadiazine. These results demonstrate that *Meliae fructus* can successfully cure *T. gondii* infection and could be a promising native herb treatment for prevention of *T. gondii* infection.

**Key words:** *Meliae fructus*, *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Anti-toxoplasmosis, Anti-protozoa

## Introduction

세포내 감염되는 포자원충에는 콕시디움(coccidium), 톡소포자충(toxoplasma) 및 말라리아 원충(plasmodium)이 있으며, 이들 원충에 의한 질환 중 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 사람을 비롯한 각종 포유동물 및 조류 등에 널리 감염되어 있는 대표적인 인수공통 기생충의 하나이다[1, 2]. 이중 톡소포자충은 전 세계적으로 분포하는 인체 및 동물의 톡소포자충 감염증(Toxoplasmosis)의 원인 원충이다[3]. 톡소포자충의 수평전이는 환경으로부터 감염된 접합자(oocysts)를 섭취하거나 다른 동물들의 내장이나 고기에 포함되어 있

는 조직포낭(bradyzoite)이나 영양형(tachyzoite)을 섭취하는 세가지 생활주기를 포함한다[4, 5]. 미국에서 최근 급성 톡소포자충이 인간에게서 일어나는 것은 환경으로부터 오염된 접합자(oocyst)와 관련이 있지만 한국에서의 발병은 조리하지 않은 돼지고기를 먹는 것과 관련이 있다[3, 4, 6].

또한 톡소포자충은 가축 및 야생동물 조직에 감염될 수 있어 날고기 또는 조리가 덜된 육류를 먹었을 경우 감염되며, 임신부가 감염되었을 경우 태반 감염에 의한 신생아의 기형 또는 유산이 일어날 수 있다[5, 7].

이러한 임상적인 중요성이 있음에도 지금까지 항톡소플라즈마 용도로 사용되는 약물인 sulfonamide 또는 pyrimethamine 등은 수년간 지속적으로 투여함으로써 내성이 계속 증가하고 있고, 감염형 원충(bradyzoite) 단계의 톡소플라즈마에 대한 효과도 별로 없다[5, 8, 9]. 임상에서 주로 이용되는 톡소포자충의 치료법은 정상 숙주에서 중추신경계, 심장, 간에 퍼져 있을 때 pyrimethamine과 sulfonamide를 사용하며, 선천적 톡소포자충일 경우 pyrimethamine과 sulfonamide, 안구 톡소포자충일 경우 pyrimethamine과 sulfonamide 및 스테로이드, 후천적 면역결핍증과 장기이식, 급성질환일 경우 pyrimethamine과 sulfonamide를 사용하고 있다[8, 9]. 그러나 톡소포자충의 주요 치료제인 pyrimethamine과 sulfonamide는 자주 부작용이 보고되고 있는 실정이다[8, 9].

임상적으로 감염시 치명적인 뇌염이나 유산을 일으키는 병원체인 톡소포자충의 치료제로 주로 사용되고 있는 설파디아진이 사용되고 있으나, 이들 약물들은 부작용과 약물 내성에 의한 치료 실패 사례들이 자주 보고되고 있는 실정이다[10, 11]. 이러한 이유로 톡소포자충에 대한 새로운 치료제의 개발 필요성이 대두되고 있으며, 합성 화학약물들에 비교하여 부작용이 적고 안전성이 높은 천연물들을 원료로 한 톡소포자충의 치료가 모색되고 있다[5, 9, 12].

천련자(*Meliae fructus*)는 멸구슬나무과 식물 천련(*Meliazedarach*)의 열매이다. 천련자는 예로부터 습열을 제거하고 통증을 완화하고 기생충을 구제하는 효능이 있어 가슴통증과 산통 및 만성 회충증으로 인한 복통을 치료하는데 사용해 왔다[13].

본 연구는 천련자의 에탄올 추출물을 이용하여 톡소포자충에 대한 항원충 효과를 알아 보고자 선택성을 알아보는 시험과 동물실험을 통한 생체내 감염된 톡소포자충에 대한 항원충

\*Corresponding author: Okjin Kim, Center for Animal Resource Development Research, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan 570-749, Korea  
Tel: +82-63-850-6668, Fax: +82-63-850-7308, E-mail: kimoj@wku.ac.kr

효과 및 안전성을 알아보려고 계획되었다.

## Materials and Methods

### 천련자 에탄올 추출물 조제

시험에 사용된 천련자는 익산시 대학한약국으로부터 한국산으로 판매되고 있는 건조된 천련자(*Melaleuca fructus*)를 구입하여 분쇄기(DA700, Daesung Atron Co., Paju, Korea)로 입자 크기가 30메시 이하가 되도록 분쇄하여 천연물 분말을 수득한 후, 상기에서 수득한 건조된 천연물 분말(1 kg) 질량의 3배(v/w)에 해당하는 증류수를 포함하는 70% 에틸알콜 수용액을 가하여 100°C에서 3시간 동안 환류 냉각 추출하고 환류 냉각 추출한 후 추출물을 거여로 1차 여과하고 3000 × g에서 3분간 원심 분리하였다. 원심분리 후의 상층액을 취하여 0.2 μm filter (Nalgene, New York, USA)로 각각을 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에서 동결시켰다. 동결된 각각의 천연물 추출물들을 동결건조기(Labconco, USA)로 동결 건조하여 추출물 220 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20°C에 보관하였다.

### 톡소포자충의 유지

본 실험에 사용된 톡소포자충(RH strain of *Toxoplasma gondii*, ATCC, No.50174)의 영양형(tachyzoite)의 배양은 Song[14] 방법에 따라서 ICR mouse 암컷 마우스(female mouse)의 복강내 배양 방법을 실시하였다[14].  $1 \times 10^5$ 개의 톡소포자충의 영양형을 4주령 ICR mouse 암컷 마우스 복강에 주입한 뒤, 4일 후 마우스를 경추탈골 하였다. 그리고 2% FBS(GIBCO, Lot No. 1315128, USA)를 함유한 DMEM media(GIBCO, Lot No. 1300045, USA) 5 mL을 복강에 주입하고 1분 30초 동안 가볍게 마사지 해주었다. 다시 복수액을 10 mL짜리 주사기로 전부 뽑아내고 500 RPM에서 5분간 원심분리 후, 침전물은 버리고 상등액은 새로운 50 mL tube에 옮겨서 45 × g에서 5분간 원심분리 하였다. 이렇게 얻은 상등액은 새로운 50 mL tube에 옮겨서 1030 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리법으로 얻은 순수한 톡소포자충의 영양형으로 실험에 사용하였다.

### 톡소포자충 선택성(selectivity) 측정

HeLa 세포(한국세포주은행, 1002)는 96 well에  $9 \times 10^3$ /mL되게 접종하고 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 6시간 후, 2%의 FBS가 함유된 배지로 교환 및 톡소포자충 영양형을 HeLa 세포주의 5배되게 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 뒤, 배지를 교환함과 동시에 천연물을 농도별로 처리하였다. 이때 대조군으로서 설파디아아진(Sulfadiazine sodium salt, SIGMA, S6387, Germany)을 사용하였다. 24시간 뒤 세포증식분석으로 EZ-Cytox Kit (Daeil Lab. Co., Korea)을 실시하고, 15분 후, 흡광광도계로 450 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하여, 톡소포자충의 증식을 억제하는 농도 EC<sub>50</sub> (50% 세포증식억제농도)를 산출하였고, 항톡소플라즈마 효과에 대한 약효관정은 Park 등[15]의 방법에 따라서 선택성(selectivity)을 구하여 보다 높은 선택성을 가진 물질이

항톡소플라즈마 효과가 있는 것으로 판정하였다[15]. 선택성을 구하는 식은 다음과 같다. : 선택성(selectivity) = HeLa 세포에 대한 각 시료의 EC<sub>50</sub>값/T. *gondii*에 대한 각 시료의 EC<sub>50</sub>값.

### 마우스 감염 모델에서의 항톡소포자충 활성 평가

항톡소포자충 효과를 확인하기 위하여 4주령 ICR 암컷 마우스를 썬타코(오산, 한국)에서 구입하여 원광대학교 동물사육시설에서 7일간 순화 사육하여 질병이 없고 외관상 건강한 암컷 마우스를 선별하여 군 구성을 하였다. 군구성은 Table 1과 같이, Group I은 정상군으로서 톡소플라즈마 감염 없이 천련자 추출물 급여도 없는 군이고, Group II는 음성대조군으로서 톡소플라즈마 감염만 있는 군, Group III은 양성대조군으로서 톡소플라즈마 감염 후 임상에서 실제 톡소포자충의 치료제로 사용되고 있는 설파디아아진 50 mg/kg 투여군, Group IV은 톡소플라즈마 감염 후 천련자 추출물을 30 mg/kg 투여한 군으로 5마리씩으로 분류하여 실험을 수행하였다.

Group I을 제외한 모든 군의 마우스에는 톡소포자충의 영양형  $1 \times 10^5$ /mL을 1 mL 복강에 투여하였다. 톡소포자충 감염 2시간 후, Group III에는 설파디아아진을 50 mg/kg 용량으로, Group IV에는 천련자 추출물을 30 mg/kg 용량으로 투여하고 이 후 1일 간격으로 4일간 경구 투여하였다. 이 후 4일째 되는 날 마우스를 경추탈골하여, 각 마우스 복강내의 톡소포자충의 영양형을 모두 얻어 측정하였다. 실험 종료 후 투여물질들의 톡소포자충 억제율은 Park [15]의 방법에 따라서 다음과 같은 수식으로 계산하여 구하였다. : 톡소포자충 억제율 (inhibition ratio of tachyzoites of *T. gondii*) = [(음성대조군의 톡소포자충 수 - 물질투여군의 톡소포자충 수) / 음성대조군의 톡소포자충 수] × 100.

실험 수행 기간 동안 실내 온도  $24 \pm 4^\circ\text{C}$ 의 온도와 동일한 환경이 적용될 수 있도록 하였고 원광대학교 동물실험윤리위원회의 실험계획 평가 후 승인 과정을 거쳤으며 실험과정 및 종료까지 원광대학교 동물실험윤리 지침을 준수하며 수행되었다.

### 천련자 추출물의 독성 평가 실험

천련자 추출물을 오랜 기간 섭취함으로써 인해 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위한 독성 평가 실험을 수행하였다. 실험은 6주령 수컷 SD 랫드를 썬타코(오산, 한국)에서 구입하여 원광대학교 동물사육시설에서 7일간 순화 사육하여 질병이 없고 외관상 건강한 랫드를 선별하여 각 군당 5마리의 랫드를 이용하여 2개 군으로 나누어 실험이 수행되었다. Group I은 control 군으로 천련자 추출물 비투여군으로 하였고, Group II는 28일 동안 매일 100 mg/kg 용량으로 시험물질을 경구 투여하였다. 실험 종료일 에테르 마취 하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 후, 대뇌(Cerebrum), 소뇌(Cerebellum), 연수(Pons), 고환(Testis), 심장(Heart), 간(Liver), 폐장(Lung), 신장(Kidney), 근육(Muscle), 비장(Spleen), 전립선(Prostate), 췌장(Pancreas), 흉선(Thymus), 부신(Adrenal gland), 소장(Small Intestine), 대장(Large Intestine), 골수(Bone marrow), 갑상선(Thyroid gland) 및 정낭(Seminal vesicle)을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하였다. 고정이 완료된

조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매한 후, 4  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 H&E 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다.

## Results

### 항톡소포자충 선택성(selectivity) 측정 결과

HeLa 세포에서 수행된 톡소포자충 감염과 천연자 추출물의 항톡소포자충 효과에 대한 관점은 Park 등[15]의 방법에 따라서 EZ-Cytox Kit (Daeil Lab. Co., Korea)를 이용하여 세포증식분석을 실시하여 선택성을 산출하여 수행되었다.

HeLa 세포에 천연자 에탄올 추출물과 설과디아아진을 농도별로 처리했을 때 세포와 톡소포자충에서의  $\text{EC}_{50}$  값을 산출한 결과는 Table 2와 같았다. 천연자 에탄올 추출물을 처리하였을 때 HeLa 세포에서의  $\text{EC}_{50}$  값은 2501.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 톡소포자충에서의  $\text{EC}_{50}$  값은 427.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 선택성은 5.85이었다. 설과디아아진 처리시 HeLa 세포에서의  $\text{EC}_{50}$  값은 398.639  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 톡소포자충에서의  $\text{EC}_{50}$  값은 193.327  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 선택성은 2.06을 나타내었다(Table 2). 이러한 결과로부터 천연자 에탄올 추출물은 톡소포자충에 감염된 HeLa 세포에서 항톡소포자충 약물인 설과디아아진 보다 2.84배 높은 선택성을 보여 톡소포자충의 증식을 효과적으로 억제하는 효과가 있다는 결론을 도출할 수 있었다.

### 마우스 감염 모델에서의 항톡소포자충 활성 평가

설과디아아진 보다 2.84배의 선택성을 보인 천연자 에탄올 추출물을 가지고 항톡소포자충 효과를 확인하기 위해 ICR 암컷 마우스를 사용하여 *in vivo* 효능 평가 시험을 진행하였다. 천연자 에탄올 추출물은 30 mg/kg으로 4주령 ICR 암컷 마우스에 4일간 하루에 한 번씩 경구 투여하였다. 4일째, 복강내의 톡소포자충의 영양형을 모두 얻어 계량하였다. 실험 종료 후 각 군의 측정된 톡소포자충 수를 가지고 계산한 투여물 질들의 톡소포자충 억제율은 양성 대조로 사용된 설과디아아진을 투여한 Group III군에서는  $84.0 \pm 9.62\%$ 이었고, 천연자 에탄올 추출물을 투여한 Group IV군은  $82.2 \pm 2.28\%$ 이었다. 이러한 결과로부터 천연자 에탄올 추출물은 톡소포자충의 치료제로 사용되고 있는 설과디아아진의 톡소포자충 억제율과 비교하여 통계적으로 차이가 없는 효과를 가지고 있는 것을 알 수 있었으며, 대조군과 비교했을 때 유의한 결과를 얻을 수 있었다 (Table 1,  $P < 0.05$ ). 본 연구에서 또한 항톡소포자충 효과를 확인하기 위해 마우스를 이용한 항톡소포자충 시험을 실시한 결과, 천연자 에탄올 추출물의 톡소포자충 억제

율은  $82.2 \pm 2.28\%$ 으로 양성 대조로 사용된 설과디아아진의  $84.0 \pm 9.62\%$ 과 비교하여 통계적으로 차이가 없는 효과를 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

### 천연자 추출물에 의한 독성 평가 결과

천연자 추출물을 오랜 기간 섭취함으로써 인해 독성발현으로 의심되는 세포 손상이 있는지 알아보기 위해 6주령 수컷 SD rat을 사용하여 28일 동안 매일 100 mg/kg 용량으로 시험물질을 경구 투여하고 천연자의 독성 발현 유무를 평가한 결과 대조군 및 천연자 추출물 투여군의 모든 개체에서 폐사 또는 특이 임상증상은 관찰되지 않았다. 실험 종료일 에테르 마취하에 안락사하여 부검을 실시하고 각 실질 장기의 육안병변을 관찰한 결과 유의한 병변은 관찰할 수 없었다. 또한 실질 장기들의 병리조직학적 검사에서도 별다른 세포손상은 관찰되지 않았다.

최근에 마우스를 이용하여 천연자의 에탄올추출물과 여기서 분리된 두 가지 limonoid 성분의 항염증 및 진통 효과에 대한 연구결과가 발표된 바 있다[16]. 그러나 현재까지 천연자의 항톡소포자충 효과에 대한 보고는 없었다. 본 연구 결과 천연자는 *in vitro*와 *in vivo* 실험 둘 다에서 우수한 항톡소포자충 효능이 있음을 확인하였다. 또한 SD rat을 이용한 28일간의 안전성 연구 결과, 독성 현상으로 추정되는 특이 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 천연자 에탄올 추출물은 톡소포자충의 치료제로서 효능과 안전성이 우수한 것을 알 수 있었다.

## Discussion

임상적으로 감염시 치명적인 뇌염이나 유산을 일으키는 병원체인 톡소포자충의 치료제로 주로 사용되고 있는 설과디아아진이 사용되고 있으나, 이들 약물들은 부작용과 약물 내성에 의한 치료 실패 사례들이 자주 보고되고 있다. 이러한 이유로 톡소포자충에 대한 새로운 치료제의 개발 필요성이 대두되고 있으며, 합성 화학약물들에 비교하여 부작용이 적고 안전성이 높은 천연물들을 원료로 한 톡소포자충의 치료가 모색되고 있다.

천연자는 구조가 확인된 몇 가지 화합물을 함유하고 있는데, toosendanin이 주성분이고, 그 외에 kulinone, methylkulanate, melianol, melianodiol, melialactone, azadiarachtin 등을 함유 한다[17]. 천연자의 주요 생리활성 물질인 toosendanin은 화학구조식  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_{11}$ 로 Fig. 1과 같은 구조로 구성되어 있으며, 분자량 574.68, 밀도 1.44  $\text{g}/\text{cm}^3$ , 비등점 760 mmHg에서 714°C, 녹는점 178~180°C의 백색의 크리스탈

**Table 1.** Experimental designs for the anti-toxoplasmosis study using the mouse model

Group	<i>T. gondii</i>	Treatment	Active evaluation	n
I	-	Vehicle	$0 \pm 0.0\%^*$	5
II	$1 \times 10^5/\text{mouse}$	Vehicle	$99.2 \pm 3.06\%$	5
III	$1 \times 10^5/\text{mouse}$	Sulfadiazine (50 mg/kg)	$84.0 \pm 9.62\%^*$	5
IV	$1 \times 10^5/\text{mouse}$	<i>Meliae fructus</i> (30 mg/kg)	$82.2 \pm 2.28\%^*$	5

**Table 2.** *In vitro* anti-Toxoplasma gondii selectivity of *Meliae fructus* extract

Treatment	HeLa cell $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>T. gondii</i> $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Selectivity <sup>a</sup>
<i>Meliae fructus</i>	2501.2	427.3	5.85
Sulfadiazine	398.639	193.327	2.06

$\text{EC}_{50}$ : Median effective concentration.

<sup>a</sup>Ratio of the  $\text{EC}_{50}$  value for HeLa cells to the  $\text{EC}_{50}$  value for *T. gondii* strain.

분말의 형태를 가지고 있다[17]. 천련자의 생리활성에 대한 실험연구는 주성분으로 알려진 toosendanin으로 진행된 것이 주를 이루는데, 암세포에 대한 apoptosis 효과 및 성장억제 효과[18], 항보툴리누스 효과[19], 항균 효과[20], 아세틸콜린 분비억제 효과[18], 간의 약물대사효소 및 담즙 분비활성 효과[21], 항고지혈증 효과[22], 항산화 및 항염효과[17] 등이 보고되어 있다.

선택성(selectivity)은 신약 개발을 위한 항약물 스크리닝에 사용하는 지표의 하나이다. 이 수치가 높으면 높을수록 의약품으로서 인체에 대한 효능과 안전성이 높아지는 것을 의미한다[9, 15, 23]. 천련자 에탄올 추출물은 설과다이나진에 비교하여 선택성이 높으며 이는 천련자 추출물이 세포에 대한 독성은 적으며 특소포자충에 대하여 효과적인 억제 효과를 가지고 있는 것을 의미한다. 또한 천련자 추출물에 대한 28일 투여 안전성 평가를 수행한 결과, 천련자 추출물의 100 mg/kg 연일 투여에 의하여 유의한 독성 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 천련자 에탄올 추출물은 특소포자충의 치료제로서 효능과 안전성이 우수한 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로, 천련자 에탄올 추출물은 향후 특소포자충 치료에 항생제를 대체할 수 있는 내성이 없는 천연물 추출물로 개발될 수 있을 것으로 판단되었다.

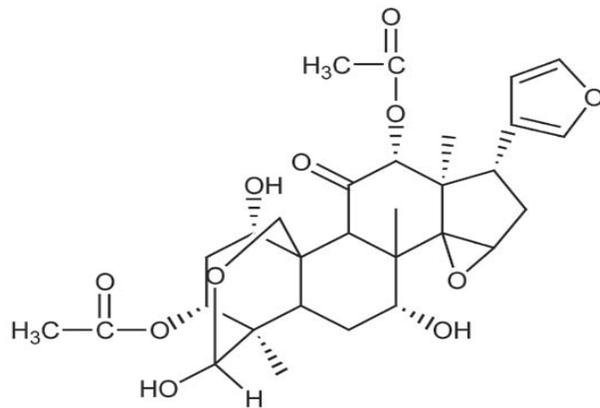


Fig. 1. The chemical structure of toosendanin, which is a triterpenoid derivative found in *Melaleuca fructus*.

## Acknowledgements

본 연구는 2014년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(NRF-2010-0021940)을 지원받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## ORCID

Okjin Kim, <http://orcid.org/0000-0002-2070-2865>

## References

- Blader IJ, Koshy AA. *Toxoplasma gondii* development of its replicative niche: in its host cell and beyond. *Eukaryot Cell* 2014;13:965-976.
- Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter C. Plasmodium, human and anopheles genomics and malaria, *Nature* 2000;415:702-709.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30:1217-1258.
- Montoya JG, Liesenfeld L. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965-1976.
- Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends Parasitol* 2013;29:380-384.
- Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, Dubey JP. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1997;175:1280-1282.
- Petersen E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:214-223.
- Abdin MZ, Israr M, Rehman U and Jain SK. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Plasta Med* 2003;69:289-299.
- Choi KM, Gang J, Yun J. Anti-*Toxoplasma gondii* RH strain activity of herbal extracts used in traditional medicine *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:360-362.
- Djurković-Djaković O, Milenković V, Nikolić A, Bobić B, Grujić J. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:981-987.
- Ferreira R, Oliveira AB, Ribeiro MF, Tafuri WL, Vitor RW. *Toxoplasma gondii*: In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1, 4-naphthoquinone alone or combined with sulphadiazine. *Exp Parasitol* 2006;113:125-129.
- Abuel Ezz NM. Effect of *Nigella sativa* and *Allium cepa* oils on *Trichinella spiralis* in experimentally infected rats. *J Egypt Soc Parasitol* 2005;35:511-523.
- Kim HY, Shin HS, Park H, Kim YC, Yun YG, Park S, Shin HJ, Kim K. In vitro inhibition of coronavirus replications by the traditionally used medicinal herbal extracts, *Cimicifuga rhizoma*, *Melaleuca cortex*, *Coptidis rhizoma*, and *Phellodendron cortex*. *J Clin Virol* 2008;41:122-128.
- Song HO, Ahn MH, Ryu JS, Min DY, Joo KH, Lee YH. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*, *Korean J Parasitol* 2004;42:185-193.
- Park H, Kim MS, Jeon BH, Kim TK, Kim TM, Ahn JH, Kwon DY, Takaya T, Wataya Y, Kim HS. Antimalarial activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1623-1624.
- Xie F, Zhang M, Zhang CF, Wang ZT, Yu BY, Kou JP. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from melia toosendan fruit. *J Ethnopharmacol* 2008;117:463-466.
- Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Kim BW, Park SD. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of *Melaleuca toosendan* in

- mouse macrophage cells. *Kor J Herbology* 2008;23:121-134.
18. Shi YL, Wang WP, Xu K. Electrophysiological analysis on the presynaptic blocking effects of toosendanin on neuromuscular transmission. *Acta Physiol Sin* 1981;33:259-265.
19. Shi YL, Wang ZF. Cure of experimental botulism and antitoxigenic effect of toosendanin. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:839-848.
20. Lirussi D, Li J, Prieto JM, Gennari M, Buschiazzo H, Rios JL, Zaidenberg A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. *Fitoteria* 2004;75:718-723.
21. Kim BS, Choi JW, Lee CK. Effect of *Melia toosendan* fructus on liver function (I)-Effect of each fractions from *meliae toosendan* fructus on drug metabolism enzyme system and bile secretion. *Kor J Pharmacogn* 1993;24:63-68.
22. Ryu MY, Kim BS, Choi JW, Lee CK. Effects of *Melia toosendan* fructus on liver function (2) - effects of seed oil on lipid metabolism in rats. *Kor J Pharmacogn* 1994;25:272-277.
23. Kim HK, Jiang JH, Lee DH, Kim HS, Park H. Anti-toxoplasmosis effect of *Citrus unshiu* Markovich against *Toxoplasma gondii*. *Kor J Ori Med Physiol Pathol* 2008;22:96-99.