

苦蔘이 RIN-m5F 세포의 인슐린 분비와 α -glucosidase 활성 억제에 미치는 영향

안소현, 조충식, 김철중
대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

Effects of Radix Sophora Flavescentis Extract on Insulin Secretion in RIN-m5F Cells and α -glucosidase Inhibition

So-hyun An, Chung-sik Cho, Cheol-jung Kim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

ABSTRACT

Background : Radix Sophora Flavescentis (SF) is used for the treatment of diabetes mellitus in Traditional Korean Medicine. However, little is known about the effects of Radix Sophora Flavescentis extract (SFE) on the hypoglycemic mechanism.

Objective : We performed a series of experiments to verify the effects of SFE on the proliferation of RIN-m5F, the secretion and synthetic processes of insulin with glucose stimulation and inhibition of α -glucosidase.

Methods : Various amounts of SFE were added to the RIN-m5F cell culture to identify the effects on the cell proliferation, total amounts of insulin secretion, and related gene expression at the molecular level. Also to identify the inhibitory effect on the α -glucosidase activities, pNPG assay was done with various SFE concentrations followed by comparison with control.

Results : SFE did not show considerable effects on RIN-m5F cells proliferation, insulin secretion or insulin mRNA expression, whichever phenomena did not depend on the glucose concentration. However, SFE significantly inhibited α -glucosidase activity in a dose dependent manner compared to control.

Conclusions : This study showed that SFE has potent α -glucosidase inhibitory activity. Thus, SF may be used for the improvement of overall glycemic control. Further mechanism studies on the lipid toxicity and oxidation stress of SF seem to be necessary.

Key words : Radix Sophora Flavescentis, RIN-m5F, α -glucosidase, diabetes mellitus

1. 서론

당뇨병은 인슐린 분비 및 작용 등의 이상으로 고혈당이 발생하는 대사질환군으로 국내성인 인구

의 10%이상이 당뇨병을 앓고 있으며¹, 2007년 당뇨병으로 인한 사망은 인구 10만 명 당 22.9명으로 국내 사망원인 중 5위를 차지한다².

당뇨병 및 당뇨병합병증의 발생에는 고혈당이 주요한 원인으로 작용하며^{3,4}, 제2형 당뇨병에서 혈당상승의 원인으로 포도당 독성⁵과 지질 독성⁶ 등이 주목받고 있다. 이러한 포도당 독성과 지질 독성은 산화스트레스에 기인하며, 산화스트레스는 배

· 교신저자: 조충식 충남 천안시 두정동 621번지
대전대학교 부속천안한방병원 신계내과
TEL: 041-521-7531 FAX: 041-521-7007
E-mail: cho01o2@chol.com

타세포기능부전 및 세포사멸을 일으키고⁵, 스트레스 및 염증관련 키나아제의 활성화를 유도하여 인슐린저항성에도 관여한다고 보고되고 있다^{7,8}. 또한, 경제수준의 발달로 인한 식생활 변화와 함께 식후 고혈당과 대혈관 합병증의 관련성이 알려지면서 식후 고혈당 조절이 중시되고 있으며⁹, 이에 항산화 효과와 베타세포 보호 및 인슐린 작용 향상, 식후 혈당 조절에 대한 천연물 및 한약재 연구들이 이루어지고 있다^{10,11}.

당뇨병은 한의학에서 '消渴'의 범주에 속하며, 熱邪가 주요원인으로 津液損傷, 陰虛燥熱의 병기로 나타나고, 치료는 淸熱降火와 生津補陰으로 대별된다¹².

본 연구에 사용된 苦蔘은 苦寒한 性味와 淸熱燥濕의 효능이 있는 약물¹³로, 항균 작용¹⁴, 항산화 효과¹⁵, 항바이러스 작용¹⁶, 항독성 작용¹⁷ 등이 보고되었다. 또한, 혈당강하와 관련하여 당뇨병 白鼠에 苦蔘 열수추출물이 유의하게 혈당강하 효과가 있음^{18,19}과 苦蔘 열수추출물에 인슐린성 물질이 함유되었을 가능성²⁰이 보고되었고, 苦蔘 메탄올추출물의 α -glucosidase 억제효과²¹와 苦蔘 메탄올추출물이 산화적 스트레스에 대한 베타세포 보호활성에 미치는 영향에 관한 연구²²가 보고되었다.

그러나 아직까지 苦蔘 열수추출물의 포도당 독성에 대한 베타세포 보호효과와 인슐린 분비 및 합성에 미치는 영향, α -glucosidase 활성 억제효과에 대해서는 연구가 없는 실정이다.

이에 저자는 苦蔘 열수추출물이 포도당 독성에 대한 RIN-m5F 세포 보호효과와 인슐린 분비 및 합성에 미치는 영향, α -glucosidase 활성 억제에 대한 실험을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 苦蔘(Radix Sophora Flavescentis, SF)은 지리산 지역에서 생산되어 건조된 것으로, 서울 경동시장에서 구입하였다.

2) 시약 및 세포주

Cell culture에 사용된 FBS(Gibco-BRL, U.S.A.), RPMI 1640(Gibco-BRL, U.S.A.), 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 μ M 2-mercaptoethanol, D-PBS dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco-BRL Life Technology, U.S.A.), potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, trypsin-EDTA(Gibco-BRL), p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside, PIPES buffer (0.1M, pH 6.8), α -glucosidase, isopropanol 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), NaOH, Dimethyl Sulfoxide(DMSO), isopropyl alcohol은 Sigma(U.S.A.) 제품을 사용하였고, Trizol(Life Technologies, Gaithersburg, MD), Superscript II reverse transcriptase(Life Technologies, Gaithersburg, MD), iQ SYBR green supermix(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. Rat insulin radioimmunoassay(RIA) kit(Linco Research, Inc., St. Charles, MO)는 acetonitrile(Merck사, HPLC용)을 사용하였다. RIN-m5F 인슐린 종양 세포주는 ATCC(Manassas, VA)에서 구입하였다.

3) 기 기

본 실험에는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, U.S.A.), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), homogenizer

(OMNI, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

苦蔘 100g을 증류수 1,000ml에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 10.6g(수거율 : 10.6%)의 苦蔘 열수 추출물(Radix Sophora Flavescentis Extract, 이하 SFE)을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고에 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 phosphate buffer에 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 약물의 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석

苦蔘의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C18역상 HPLC column을 장착한 HPLC를 사용하였다. 전체 분석시간은 30분으로, 이동상의 구성은 초기 5분 동안 H₂O를 흘려주었고, 이후 20분 동안은 acetonitrile gradient를 하여 acetonitrile을 100%까지 올렸으며, 그 상태를 5분간 지속하였다. 214nm에서의 흡광도를 측정하여 시료의 양을 확인하였다.

3) α-glucosidase 활성 억제 측정

혈당강하실험은 α-glucosidase를 10mM PIPES buffer에 용해시킨 0.15U/ml α-glucosidase 효소액 50μl, 200mM KPB(pH 7.0) 50μl와 혼합하여 희석한 추출물 50μl와 3mM pNPG 100μl를 가하여, 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 0.1M Na₂CO₃ 750μl로 반응을 정지시키고, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RIN-m5F 세포의 배양

인슐린종 세포주인 RIN-m5F 세포는 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin을 혼합한 RPMI 1640 Media에서 5% CO₂-9% air, 37°C에서 배양하였다²³. 배양액은 3~4일 간격

으로 교대하였고, 세포들은 trypsin-EDTA로 계대 배양하였다.

5) MTT를 이용한 세포증식 측정

배양한 세포를 0.25% trypsin을 사용하여 분리 후, PBS로 3회 세척한 다음, 96-multiwell에 2×10⁴cells/well의 세포수가 되도록 산정하여 사용하였다. 세포는 3일간 FBS가 들어있는 RPMI배양액에서 각각 다양한 농도로 처리한 SFE와 24시간 동안 배양하였으며, 이후 세포증식은 배양이 완료된 세포에 50μg/ml MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]를 희석 처리하여 반응시킨 다음 microplate reader로 570nm에서 측정하였다.

6) RIN-m5F 세포에서 인슐린 분비 측정

RIN-m5F 세포를 well 당 3.0×10⁵개로 12-well plate에 분주하여 완전배지에서 3일간 배양한 후, SFE와 동일한 D-PBS를 첨가하여 1~2일간 배양하였다. SFE를 함유한 배지에서 배양한 후 modified Kreb's ringer bicarbonate 완충액(KRBB-HEPES, 134mmol/l NaCl, 4.8mmol/l KCl, 1mmol/l CaCl₂, 1.2mmol/l SO₄, 1.2mmol/l KH₂PO₄, 5mmol/l NaHCO₃, 2.8mmol/l Glucose, 10mmol/l HEPES, 1mg/ml BSA, pH 7.4)으로 2회 세척하고 5mM 또는 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 바꾸어 1시간 배양한 후, 상층액을 취하여 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다. 분비된 인슐린의 양을 RIA kit로 측정하고, 각 well의 세포 단백질의 농도를 측정하여, 각 단위 그램 단백질 당 인슐린 분비량을 계산하였다.

7) RIN-m5F 세포에서 인슐린 관련 유전자 발현 측정

RIN-m5F 세포를 6-well plate에 분주하여 SFE와 vehicle을 함유한 저농도와 고농도 포도당 배지에서 각각 2일간 배양하였다. KRBB-HEPES 완충액으로 2회 세척하고 1시간 동안 배양한 후, 각각 5mM 또는 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-

HEPES 완충액으로 배양한 후, Trizol로 총 RNA를 추출하였다. 세포에 1ml의 Trizol 용액을 첨가하고 실온에서 5분 동안 배양하고, Trizol 용액 1ml당 0.2ml의 chloroform을 첨가한 후, 4°C에서 15분 동안 12,000×g로 원심 분리하였다. 상층부의 액상 부위를 새로운 튜브에 옮겨 담은 후 0.5ml의 isopropyl alcohol을 첨가하고 실온에서 15분간 배양한 후 4°C에서 10분간 12,000×g로 다시 원심 분리하였다. Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 2 μ g의 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻은 후, iQ SYBR green supermix를 이용하여 β -actin 및 insulin 관련 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응을

시행하였다.

각 유전자 발현 정도를 RT-PCR을 이용해 측정하였으며, 각각의 유전자 염기 서열은 Table 1과 같다. 각 sample의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix(Bio-Rad) 25 μ l와 각각의 유전자들과 10pmol forward and reverse primers를 1 μ l씩 첨가하여 각각 50 μ l 반응이 이루어졌으며 95°C에서 10분 후 30초간 40cycle을 돌린 다음 60°C, 72°C에서 각각 30초 동안 반응을 일으켰다. β -actin mRNA을 대조 유전자로 이용하여, target mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다.

Table 1. Sequences of Primer Set Used Quantative RT-PCR

Primers	Foward	Reverse	Tm(°C)	Product size(bp)
β -actin (Actb)	TCTGAACCCCTAAGGCCAACCGTG	ATGGCATGAGGGAGCGCGTA	60	198
Insulin 1 (Ins1)	CAAACAGCACCTTTGTGGTCCTCAC	CACAATGCCACGCTTCTGCC	60	199
Insulin 2 (Ins2)	CAGCACCTTTGTGGTTCTCACTTGG	ATCCACGATGCCGCGCTTCT	60	198
Insulin receptor (Ins-R)	CCGAAAGCGAAGATCCCTTGAAG	ATGCCTGCAGCTCAATGCGG	60	200
Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)	AGAACGAGAAGAAGTGGCGGCAC	TGCAGCTGCAGAAGAGCCTG	60	199
Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)	AGCGAGAAGAAGTGGAAGAGCAAGG	TGACCAAGTCGGTGAGTGCG	60	199
insulin receptor substrate 3 (IRS-3)	CCATCTGAGGAAGCAGAAGTCCCA	TGACGATCAGGTGGCGCTGA	60	200

8) 통계 분석
실험결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 통계적 처리는 Student t-test를 사용하였으며, 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 검증하였다.

1. 약물의 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석 결과
C18역상 HPLC를 사용하여 SFE의 수용성 성분을 분석 결과, 앞부분의 수용 성분을 확인하였다 (Fig. 1).

III. 결 과

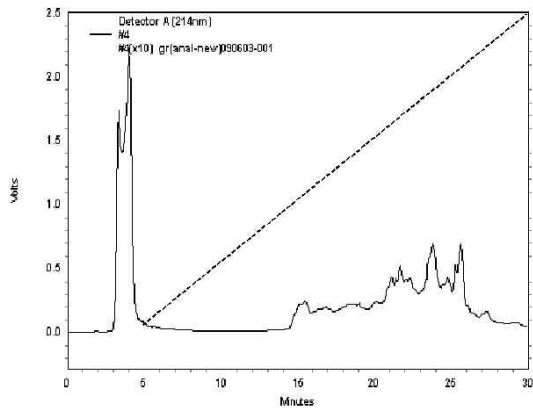


Fig. 1. Analysis of HPLC profile of SFE.

Water extracts were subjected to C18 column chromatography on acetonitrile linear gradient (line) over a 30min period at a flow rate of 1ml/min. Absorbance was monitored at 214nm.

2. 세포증식에 미치는 영향

포도당을 처리하지 않은 경우, SFE 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 96.54 ± 2.64 로 대조군에 비하여 세포증식이 억제되었으나, 유의성은 없었다. 저농도 포도당(5mM) 자극을 가한 경우, SFE 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 91.17 ± 2.16 , SFE 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 87.5 ± 1.34 로 SFE 25와 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비하여 유의성 있게 세포증식이 억제되는 소견을 보였다. 고농도 포도당(20mM) 자극을 가한 경우, SFE 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 94.00 ± 3.1 , SFE 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 94.6 ± 2.75 로 대조군에 비하여 세포증식이 억제되었으나, 유의성은 없었다(Fig. 2).

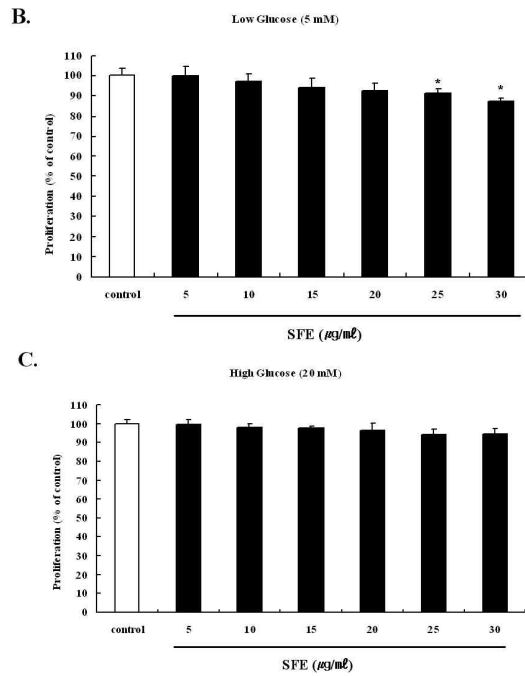
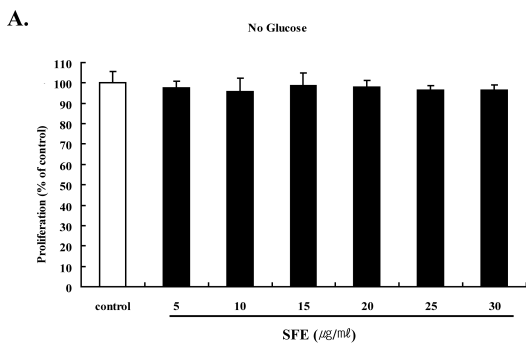


Fig. 2. Effects of SFE on proliferation of RIN-m5F cells.

A panels are the proliferation rates with single treatment with SFE. B and C panels are the proliferation rates with concomitant treatments with SFE and low glucose(B) or SFE and high glucose(C). RIN-m5F cells were treated with SFE for 48hr. The cell proliferation was measured by MTT assay as described in material and methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm S.E. of three determination.

A : The effects of simultaneous addition of SFE on cell proliferations.

B : Addition of low glucose to RIN-m5F cells in combination with 5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SFE on proliferation of RIN-m5F cells.

C : Addition of high glucose to RIN-m5F cells in combination with 5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SFE on proliferation of RIN-m5F cells.

* : $p < 0.05$ vs control.

SFE를 함유하지 않은 배지에서 RIN-m5F 세포를 배양한 군(SFE(-))과 SFE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함유한 배지에서 RIN-m5F 세포를 배양한 군(SFE(+))에

저농도(5mM)와 고농도 포도당(20mM) 자극을 가한 후, 세포증식을 비교하였다. SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에 의한 세포증식은 100.55 ± 2.64 였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에 의한 세포증식은 91.36 ± 1.86 로 세포증식에 감소를 보였으나, 유의성은 없었다. SFE(+)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에 의한 세포증식은 92.83 ± 3.08 였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에 의한 세포증식은 88.23 ± 3.34 로 세포증식에 감소를 보였으나, 유의성은 없었다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군과 SFE(+)군 간에 유의한 차이는 없었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군과 SFE(+)군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

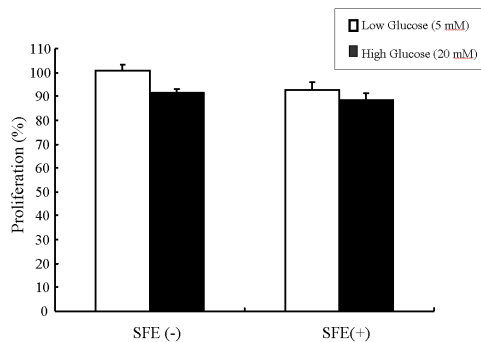


Fig. 3. Effects of SFE on proliferation of RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with SFE to $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ for 48hr. The cell proliferation was measured by MTT assay as described in material and methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ SFE.

3. 인슐린 분비에 미치는 영향

저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, 대조군에서 $17.00 \pm 0.15 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 였고, SFE $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $15.25 \pm 0.68 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$, SFE $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $14.85 \pm 0.15 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 로 SFE의 농도에 따라 인슐린

분비량에 유의성 있는 감소가 확인되었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, 대조군에서 $13.00 \pm 0.11 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 였고, SFE $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $11.14 \pm 0.34 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$, SFE $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $11.38 \pm 0.75 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 로 SFE의 농도에 따라 인슐린 분비량에 유의성 있는 감소가 확인되었다(Fig. 4).

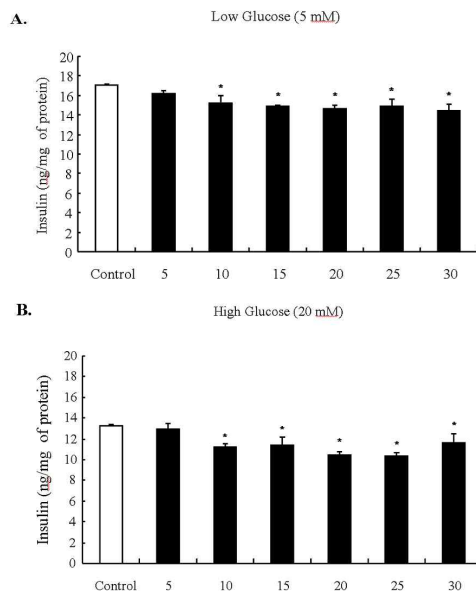


Fig. 4. Effect of SFE on GSIS in RIN-m5F cells.

GSIS was evaluated from RIN-m5F cells in the absence(white bar) or presence(black bar) of SFE for low glucose(A) and high glucose(B). The amount of secreted insulin was normalized by total protein amount in the cell lysates. Each column represents the mean \pm S.E.

* : P < 0.05 vs control.

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서 $17.02 \pm 0.15 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 $13.18 \pm 0.11 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 로 인슐린 분비량에 유의한 감소를 보였다. SFE(+)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 $14.66 \pm 0.30 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 $10.43 \pm 0.32 \text{ ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 로 인슐린 분비량에 유의한 감소를 보였다. 저농도 포도당(5mM) 자극

의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 인슐린 분비량에 유의한 감소를 보였다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 인슐린 분비량에 유의한 감소를 보였다 (Fig. 5).

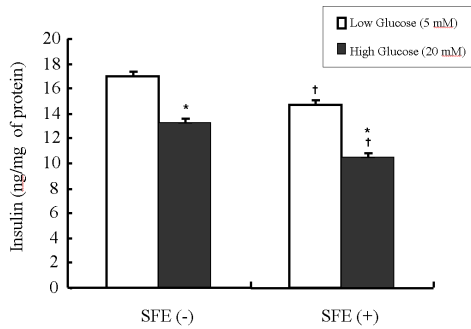


Fig. 5. Effect of SFE on GSIS in RIN-m5F cells.

After the cells were cultured with or without SFE for 2 days, and then cultured in KRBB-HEPES containing 5mM and 20mM glucose for 1 hours. Insulin content was measured from RIN-m5F cells cultured in RPMI 1640 media. Insulin amount was normalized by total protein amount in the cell lysates. Values are means±S.E. SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+): Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20µg/ml SFE.

* : P < 0.05 the former vs addition of low glucose to SFE(-), the latter vs addition of low glucose to SFE(+).

† : P < 0.05 the former vs addition of low glucose to SFE(-), the latter vs addition of high glucose to SFE(-).

4. 인슐린 관련 유전자 발현에 미치는 영향

1) Insulin-1(INS-1)

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 0.38±0.12였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 0.25±0.16로 INS-1 mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다. SFE(+의 경우, 저농도 포도당(5mM)에서는 0.55±0.16였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 0.16±0.014로 INS-1 mRNA

발현이 유의하게 감소하였다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 INS-1 mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 INS-1 mRNA 발현에 유의한 감소를 보였다(Fig. 6).

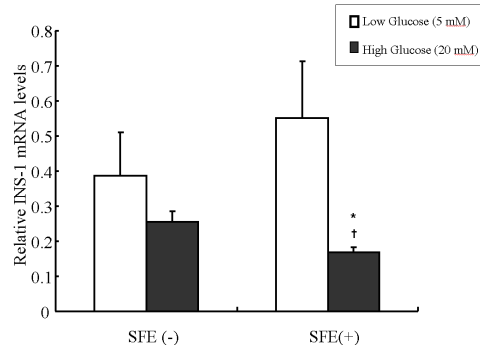


Fig. 6. Effect of SFE on INS-1 mRNA in RIN-m5F cells.

The expression levels of preproinsulin mRNA and β-actin were analyzed by RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to β-actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means±S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+): Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20µg/ml SFE.

* : P < 0.05 vs addition of low glucose to SFE(+).

† : P < 0.05 vs addition of high glucose to SFE(-).

2) Insulin-2(INS-2)

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 0.32±0.17였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 0.3±0.17로 INS-2 mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다. SFE(+의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 0.59±0.11였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 0.17±0.09로 INS-2 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 INS-2 mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없

었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-) 군에 비하여 SFE(+)군에서 INS-2 mRNA 발현에 유의한 감소를 보였다(Fig. 7).

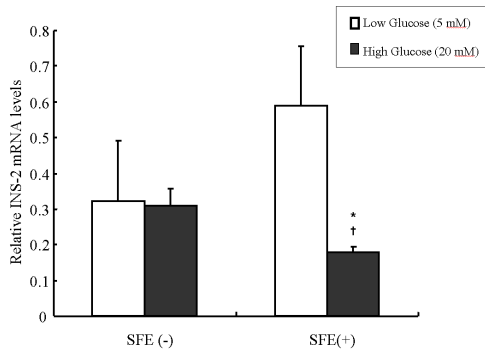


Fig. 7. Effect of SFE on INS-2 mRNA in RIN-m5F cells.

The expression levels of preproinsulin mRNA and β -actin were analyzed by RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to β -actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means \pm S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20 μ g/ml SFE.

* : P < 0.05 vs addition of low glucose to SFE(+).

† : P < 0.05 vs addition of high glucose to SFE(-).

3) Insulin receptor substrate 1(IRS-1)

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 34.77 \pm 2.19였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 27.85 \pm 3.13로 IRS-1 mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다. SFE(+)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 37.53 \pm 8.18였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 24.42 \pm 2.15로 IRS-1 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+)군에서 IRS-1 mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+)군에서 IRS-1 mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 8).

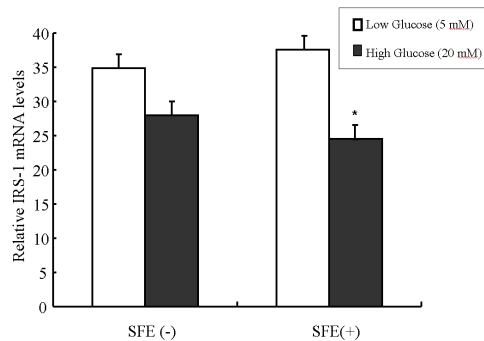


Fig. 8. Effect of SFE on IRS-1 mRNA in RIN-m5F cells.

The expression levels of IRS-1 mRNA and β -actin were analyzed by RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to β -actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means \pm S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20 μ g/ml SFE.

* : P < 0.05 vs addition of low glucose to SFE(+).

4) Insulin receptor substrate 2(IRS-2)

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 34.53 \pm 2.13였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 33.59 \pm 1.54로 포도당 농도에 따른 IRS-2 mRNA 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다. SFE(+)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 36.5 \pm 1.86였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 28.5 \pm 1.51로 IRS-2 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+)군에서 IRS-2 mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+)군에서 IRS-2 mRNA 발현에 유의한 감소를 보였다(Fig. 9).

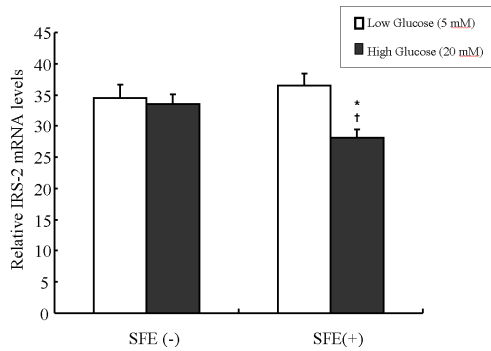


Fig. 9. Effect of SFE on IRS-2 mRNA in RIN-m5F cells.

The expression levels of IRS-2 mRNA and β -actin were analyzed by RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to β -actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means \pm S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+): Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20 μ g/ml SFE.

* : P < 0.05 vs addition of low glucose to SFE(+).

† : P < 0.05 vs addition of high glucose to SFE(-).

5) Insulin receptor substrate 3(IRS-3)

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 135.29 \pm 9.38였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 64 \pm 11.01로 IRS-3 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. SFE(+의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 143.01 \pm 7.75였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 47.5 \pm 5.84로 IRS-3 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 IRS-3 mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 IRS-3 mRNA 발현에 유의한 감소를 보였다(Fig. 10).

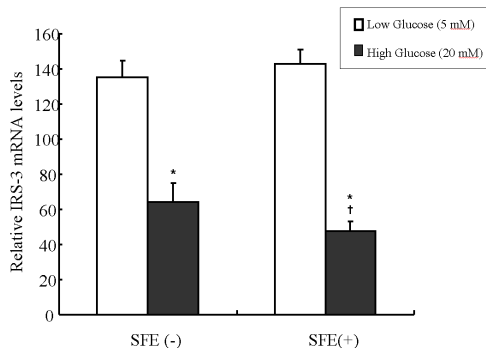


Fig. 10. Effect of SFE on IRS-3 mRNA in RIN-m5F cells.

The expression levels of IRS-3 mRNA and β -actin were analyzed by RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to β -actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means \pm S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+): Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20 μ g/ml SFE.

* : P < 0.05 the former vs addition of low glucose to SFE(-), the latter vs addition of low glucose to SFE(+).

† : P < 0.05 vs addition of high glucose to SFE(-).

6) Insulin receptor(Ins-R)

SFE(-)의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 5.36 \pm 0.37이었고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 1.84 \pm 0.25로 Ins-R mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. SFE(+의 경우, 저농도 포도당(5mM) 자극에서는 1.25 \pm 0.43였고, 고농도 포도당(20mM) 자극에서는 1.99 \pm 0.27로 Ins-R mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다. 저농도 포도당(5mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 Ins-R mRNA 발현에 유의한 감소를 보였다. 고농도 포도당(20mM) 자극의 경우, SFE(-)군에 비하여 SFE(+군에서 Ins-R mRNA 발현이 증가하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 11).

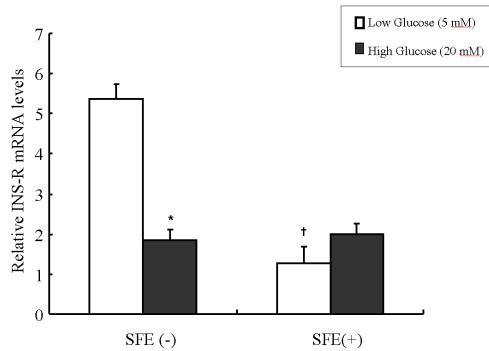


Fig. 11. Effect of SFE on Ins-R mRNA in RIN-m5F cells.

The expression levels of Ins-R mRNA and β -actin were analyzed by RT-PCR. The RIN-m5F mRNA expression was normalized to β -actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means \pm S.E.

SFE(-) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells without SFE.

SFE(+) : Addition of low glucose or high glucose to RIN-m5F cells with 20 μ g/ml SFE.

* : P < 0.05 vs addition of low glucose to SFE(-).

† : P < 0.05 vs addition of low glucose to SFE(+).

5. α -glucosidase 활성 억제에 미치는 영향

SFE 80 μ g/ml에서 96.44 \pm 2.48였고, SFE 160 μ g/ml에서 92.61 \pm 4.17, SFE 320 μ g/ml에서 87.9 \pm 1.34, SFE 640 μ g/ml에서 86.23 \pm 3.25로 농도 의존적으로 α -glucosidase의 활성이 유의성 있게 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

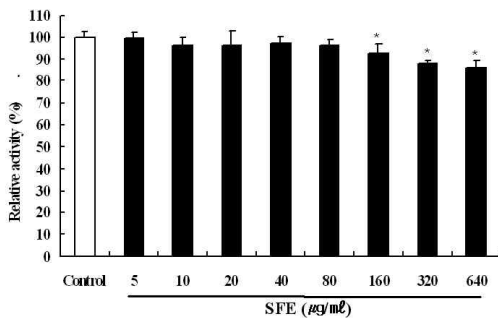


Fig. 12. Inhibition effect of SFE α -glucosidase activity.

The α -glucosidase activity was measured as

described in material and methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm S.E.

* : p < 0.05 vs control.

IV. 고찰

당뇨병은 고혈당을 보이는 모든 대사성 질환들의 집합체로, 당뇨병에서 나타나는 대사이상은 여러 장기들에 이차적 병태생리적인 변화를 일으켜, 합병증을 유발하고 사망률을 높인다²⁴. 당뇨병 환자에서의 높은 사망률은 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 등의 혈관합병증과 관련이 있으며, 고혈당은 이러한 합병증의 직접적인 원인이 되기 때문에, 제1형 및 제2형 당뇨병 모두 정상에 가까운 혈당조절을 유도함으로써 만성합병증을 줄이고 사망률을 낮추는 것이 치료의 목표이다^{3,4}.

고혈당 상태는 reactive oxygen species(ROS)를 생성하고 산화스트레스를 증가시켜, 산화손상으로 인한 세포사멸에 민감한 베타세포에 손상을 주어 베타세포 기능부전 및 세포사멸을 촉진시킨다고 보고되며⁵, ROS는 스트레스 및 염증관련 키나아제의 활성화를 유도하여 인슐린저항성의 원인이 되기도 한다고 알려져 있다^{7,8}. 그 외에 고혈당에 의한 포도당 독성이 소포체스트레스를 유발시킴으로써 인슐린유전자의 발현을 감소시킨다는 연구결과가 있으며²⁵, 포도당 독성 외에 혈중 유리 지방산과 조직 내 fatty acyl-CoA의 증가가 인슐린 저항성과 인슐린 분비억제를 유발하고, 베타세포 내의 중성 지방 축적이 인슐린 분비장애의 원인이 된다는 지질 독성에 대한 연구도 있다⁶. 또한, 식후 고혈당과 대혈관 합병증의 관련성이 알려지고⁹, 경제수준의 발달로 인한 식생활 변화로 식후 고혈당 조절에 대한 관심이 증가되면서, 소장 근위부에서 다당류의 소화를 억제하여 저혈당 유발 없이 혈당을 낮추는 α -glucosidase 억제제에 대한 관심도 증가하고 있다²⁶.

제2형 당뇨병의 경우, 혈당조절의 방법으로 약물

치료가 큰 부분을 차지하고 있으나¹, 당뇨병 자체가 만성 소모성 질환이므로 대부분의 경우 시간이 지날수록 추가적인 치료방법이 필요하게 되고²⁷, 약물 내성과 부작용이 점차 알려지면서, 새로운 치료법들의 연구개발이 요망되고 있으며, 이에 천연물 및 한약재의 항산화 효과와 베타세포 보호 및 α -glucosidase 활성 억제 작용 등에 대한 연구가 이루어지고 있다^{10,11,28}.

최근 당뇨병에 대한 한약재 연구로 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 白鼠에서의 혈당강화효과¹⁸와 산화 스트레스²⁹를 살펴보는 실험, 3T3-L1 지방세포를 이용한 인슐린성 물질의 탐색³⁰, 탄수화물 분해효소인 α -amylase와 α -glucosidase 활성 억제 효과를 살펴보는 실험³⁰, SNAP³¹ 및 싸이토카인³² 유발 RIN-m5F 세포독성에 대한 방어효과에 관한 실험 등이 이루어지고 있다.

당뇨병은 한의학에서 消渴에 해당하고, 濕熱內生, 脾胃積熱, 肝火鬱結, 相火熾盛, 水火不交 등의 熱邪가 원인이 되어 陰虛燥熱의 병기로 발전하는 질환으로 치료는 크게 清熱降火와 生津補陰으로 나뉜다¹².

본 연구에 이용된 苦蔘은 苦寒한 性味와 清熱燥濕의 효능으로 주로 濕熱로 인한 痢疾, 帶下, 小便不利, 陰痒 등에 다용되었고¹³, 消渴의 치료처방³³⁻³⁵에도 이용되었던 약물이다. 최근 연구에서는 항균 작용¹⁴, 항산화 효과¹⁵, 항바이러스 작용¹⁶, 항독성 작용¹⁷ 등이 보고되었으며, 혈당강화와 관련한 연구로는 당뇨병 白鼠에 苦蔘 열수추출물이 유의하게 혈당강화 효과가 있음^{18,19}과 苦蔘 열수추출물에 인슐린성 물질이 함유되었을 가능성²⁰이 보고되었고, 苦蔘 메탄올추출물의 α -glucosidase 억제효과²¹와 苦蔘 메탄올추출물이 산화적 스트레스에 대한 베타세포 보호활성에 미치는 영향에 관한 연구²²가 보고되었다.

그러나 아직까지 苦蔘 열수추출물의 포도당 독성에 대한 베타세포 보호효과와 인슐린 분비 및 합성에 미치는 영향, α -glucosidase 활성 억제효과

에 대해서는 연구된 바가 없기에, 본 실험을 실시하였다.

베타세포 증식의 경우, 5~30 μ g/ml 농도의 苦蔘 열수추출물에서 배양한 RIN-m5F 세포에 저농도와 고농도 포도당을 가한 후, MTT를 이용하여 세포증식 정도를 비교 관찰하였다. 실험결과, 저농도 포도당 처리군에서는 SFE 25와 30 μ g/ml에서 세포증식이 유의하게 억제되는 소견을 보였으나, 포도당 비처리군과 고농도 포도당 처리군은 대조군과의 유의한 차이가 없었다. 포도당 비처리군의 결과를 통해 苦蔘 열수추출물 자체에 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다. 또한, 저농도 포도당 처리군에서 세포증식에 유의한 감소가 보였으나, 고농도 포도당 처리군에서는 유의한 변화가 없음을 볼 때, 苦蔘 열수추출물이 포도당 독성에 대한 베타세포 증식에 유의한 영향을 미치지 못했음을 알 수 있었다. 또한, SFE(-)군과 SFE(+군) 비교 실험에서도 두 군 간에 유의한 차이는 없었으며, 다만 SFE(-)군에 비하여 SFE(+군)에서는 저농도와 고농도 포도당 자극에 의한 세포증식의 차이가 줄어든 소견을 보였으나, 유의성은 없었다. 과거 苦蔘 열수추출물과 ethyl acetate추출물이 H₂O₂로 산화적 손상을 유발한 심근세포주에 대하여 세포 보호 효과가 있다는 보고¹⁷가 있었으나, 苦蔘 메탄올추출물이 H₂O₂로 산화적 손상을 유발한 RIN-m5F 세포의 증식을 촉진시키지 못했다는 보고²²와 본 실험의 결과로 미루어 볼 때, 苦蔘은 베타세포의 보호 및 증식에는 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

인슐린 분비 기능의 경우, 포도당 독성에 대한 베타세포의 인슐린 분비능 변화를 알아보기 위해, 5~30 μ g/ml 농도로 처리한 SFE에 2일 동안 RIN-m5F 세포를 배양하고, 저농도와 고농도 포도당 자극을 가한 후, GSIS를 측정하였다. 실험결과, 대조군에 비하여 저농도와 고농도 포도당 자극 모두에서 인슐린 분비가 감소되었다. 또한, SFE(-)군과 SFE(+군) 비교 실험에서도 SFE(-)군에 비하

여 SFE(+)-군의 경우, 저농도와 고농도 포도당 자극 모두에서 인슐린 분비량의 감소를 확인할 수 있었으며, 이를 통해 苦蔘 열수추출물이 베타세포의 인슐린 분비기능을 촉진시키지 못했음을 알 수 있었다. 또한, SFE(-)군과 SFE(+)-군 모두에서 저농도에 비하여 고농도 포도당 자극에서 인슐린 분비에 유의한 감소를 보였으며, 이는 고농도 포도당 독성으로 인한 것으로 사료된다.

인슐린 관련 유전자 발현의 경우, SFE에 RIN-m5F 세포를 배양하고 저농도와 고농도 포도당 자극을 가한 후, INS-1, INS-2, IRS-1, IRS-2, IRS-3, Ins-R의 mRNA를 측정하였다. INS-1, INS-2, IRS-1, IRS-2, IRS-3의 경우, 저농도 포도당 자극에서는 SFE(-)군에 비하여 SFE(+)-군에서 유전자 발현이 증가되었고, 고농도 포도당 자극에서는 SFE(-)군에 비하여 SFE(+)-군에서 유전자 발현의 감소를 보였다. 또한, SFE(-)군과 SFE(+)-군 모두에서 저농도에 비하여 고농도 포도당 자극에서 유전자 발현이 감소되는 소견을 보였으며, 이는 고농도 포도당 독성으로 인한 것으로 사료된다. Ins-R의 경우, 저농도 포도당 자극에서는 SFE(-)군에 비하여 SFE(+)-군에서 유전자 발현이 감소되었고, 고농도 포도당 자극에서는 SFE(-)군에 비하여 SFE(+)-군에서 유전자 발현이 증가되는 소견을 보였으나, 유의한 차이는 아니었다. 이를 통해, 苦蔘 열수추출물이 인슐린 관련 유전자 발현 촉진에 유의한 효과를 미치지 못했음을 알 수 있었다.

α -glucosidase 활성 억제의 경우, 흡광도를 이용하여 α -glucosidase 효소액이 탄수화물을 분해하는 정도를 측정하였다. 실험결과, 대조군에 비하여 SFE 160 μ g/ml부터 농도 의존적으로 α -glucosidase의 활성이 유의성 있게 억제됨을 확인할 수 있었다. α -glucosidase는 소장에 존재하는 효소로, 우리 몸이 탄수화물을 섭취하였을 때 다당류를 단당류로 바꾸어 장에서 흡수되도록 촉진하는 역할을 한다. 따라서 α -glucosidase의 활성을 억제시키면, 소장에서 다당류의 분해가 억제되고 복합탄수화물의

소화와 흡수가 지연되어, 식후 고혈당을 감소시키는 방향으로 작용한다²⁶. 그러나 α -glucosidase 억제제의 부작용으로 가스형성, 복부팽만감, 소화불량, 설사 등이 유발되며, 그로 인해 약 25-45%가 복용을 중단한다는 결과가 보고되면서³⁶, 부작용이 적은 천연물 및 한약재에서 α -glucosidase 억제 물질을 개발하려는 연구가 점차 활발히 이루어지고 있다^{37,38}. 김²¹의 연구에서도 苦蔘 메탄올추출물에 α -glucosidase 활성 억제 효과가 있음을 밝힌 바 있어, 이번 연구를 통하여 苦蔘이 α -glucosidase 억제제로서 당뇨병치료에 이용될 수 있는 가능성을 재차 확인할 수 있었다.

이상을 종합하면, 苦蔘 열수추출물에서 포도당 독성에 대한 베타세포 보호효과와 인슐린 분비 및 합성을 촉진시키는 효과는 관찰되지 않았지만, α -glucosidase 활성을 유의하게 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 향후 苦蔘이 지방 독성, 산화스트레스 등에 미치는 영향에 대한 추가적인 기전 연구 및 α -glucosidase 억제제로서의 역할에 대한 보다 임상적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

苦蔘 열수추출물의 포도당 독성에 대한 베타세포 보호효과와 인슐린 분비 및 합성에 미치는 영향, 그리고 α -glucosidase 활성 억제에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 苦蔘 열수추출물은 대조군에 비하여 저농도 포도당 자극에서는 베타세포의 증식을 유의성 있게 감소시켰고, 포도당을 처리하지 않은 경우와 고농도 포도당 자극에서는 베타세포의 증식을 감소시켰으나, 유의성은 없었다.
2. 苦蔘 열수추출물은 대조군에 비하여 저농도와 고농도 포도당 자극에서 모두 베타세포의 인슐린 분비를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 苦蔘 열수추출물은 대조군에 비하여 저농도 포

- 도당 자극에서는 INS-1, INS-2, IRS-1, IRS-2, IRS-3의 유전자 발현을 증가시켰고, 고농도 포도당 자극에서는 유전자 발현을 감소시켰으나, 유의성은 없었다.
4. 苦蔘 열수추출물은 대조군에 비하여 저농도 포도당 자극에서는 Ins-R의 유전자 발현을 유의성 있게 감소시켰고, 고농도 포도당 자극에서는 유전자 발현을 증가시켰으나, 유의성은 없었다.
 5. 苦蔘 열수추출물은 대조군에 비하여 α -glucosidase의 활성을 유의성 있게 억제하였다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 편. 전정판 내분비학. 서울: 서울대학교출판부; 2006, p. 351-73, 415-23.
2. 통계청. 2007년 사망 및 사망원인통계결과. 2008. Available at http://meta.kosis.kr/bzmt/main.jsp?surv_id=19
3. The diabetes control and complications trial research group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J med.* 1993;329:977-86.
4. UK Prospective Diabetes study group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes(UKPDS 33). *UK Prospective Diabetes Study(UKPDS) Group. lancet.* 1998;352:837-53.
5. 원규장, 윤지성. 제2형 당뇨병에서 포도당 독성과 췌도 베타세포 기능저하. *대한당뇨병학회.* 2008;32:175-81.
6. Unger RH. Lipotoxicity in the Pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. *Diabetes.* 1995;44:863-70.
7. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 2005;87:99-109.
8. 김상수, 손석만. 당뇨병과 산화스트레스: 미토콘드리아 및 NAD(P)H Oxidase에 의한 ROS의 생성과 역할. *대한당뇨병학회지.* 2008;32:389-98.
9. Fonseca V. Clinical Significance of targeting postprandial and fasting hyperglycemia in managing type 2 diabetes mellitus. *Current Medical Research and opinion.* 2003;19:635-41.
10. 고병섭, 권대영, 홍상미, 박선민. In vitro에서 길경 추출 분획물의 항당뇨 효과 조사. *한국식품과학회지.* 2007;39(6):701-7.
11. 고병섭, 전동화, 장진선, 김주호, 박선민. In vitro에서 조릿대, 연근과 연잎이 인슐린 작용 및 분비에 미치는 영향. *한국식품과학회지.* 2006;38(1):114-20.
12. 두호경 편저. *동의신계학.* 서울: 정보사; 2003, p. 1131-2.
13. 신민교. *임상본초학.* 서울: 영림사; 2000, p. 394-6.
14. 조훈, 원성란, 양은영, 김종수, 유일수, 류도곤 등. 苦蔘추출물의 항균효과(I). *대한약학회지.* 1999;43(4):419-22.
15. 박용기. 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 抗酸化作用에 關한 比較研究. *대한본초학회지.* 2001;16(1):41-53.
16. 권두한, 김만배, 윤도영, 이영희, 김재화, 이희구 등. 바이러스 활성 식물자원 탐색. *한국약용작물학회지.* 2003;11(1):24-30.
17. 권강범, 김은경, 임양의, 송용선, 박종하, 문형철 등. 심근세포에서 苦蔘 유기용매 추출물의 항독성 효과. *동의생리병리학회지.* 2004;18(3):754-8.
18. 김진철, 김미려, 양재하, 최종백. 苦蔘이 당뇨에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *동서의학.* 1991;16(3):47-67.
19. Chang-Johng Kim, Seung-Kil Cho, Myung-su Shin, Hyun Cho, Dong-suk Ro, Jong-Sei Park et al. Hypoglycemic Activity of medical plants. *Arch. Pharm. Res.* 1990;13(4):371-3.

20. 주영승, 고병섭. 동의보감 당뇨 처방에 사용되는 한약재에서 인슐린성물질의 탐색. 한국응용생명화학회지. 2002;45(1):47-52.
21. Jin Hyo Kim, Young Bae Ryu, Nam Suk Kang, Byong Won Lee, Jong Soo Heo, Ill Yun Jeong et al. Glucosidase Inhibitory Flavonoids from *Sophora flavescens*. Pharmaceutical Society of Japan. 2006;29(2):302-5.
22. 이동성, 정길생, 안인파, 리빈, 변에리사, 김윤철. 산화적 스트레스에 대한 췌장 베타세포 보호활성 식물추출물 탐색. 생약학회지. 2008;39(4):335-40.
23. Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. Clin Sci. 1999;96:513-23.
24. Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson 외. 해리슨내과학 16th. 서울: MIP; 2006, p. 2351-82.
25. 김미경, 서혜영, 윤태승, 김남경, 하유진, 김윤정 등. INS-1 세포에서 소포체스트레스에 대한 만성 고농도 포도당의 효과. 대한당뇨병학회지. 2008;32:112-20.
26. Zhang BB, Moller DE. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. Curr opin chem biol. 2000;4:461-7.
27. 김재현, 이명식. 제2형 당뇨병의 고혈당 치료: 치료 시작과 조절에 대한 알고리즘 미국 및 유럽 당뇨병학회 권고안. 대한당뇨병학회지. 2009;10(1):1-9.
28. 최혁재, 김남재, 김동현. 석이에서 분리한 GE974의 α -glucosidase 저해효과. 생약학회지. 2000;31(2):196-202.
29. 김오곤, 정지천. 고혈당 흰쥐에서 상엽의 혈당 조절과 항산화 작용에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2006;27(4):811-21.
30. 이영옥, 정성일, 조훈석, 김정인, 임화재, 김정상 등. 사상체질별 약물의 항당뇨 효능에 관한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):962-8.
31. 류도곤, 권강범, 양정예, 김은경, 김강산. SNAP 유도성 RIN5mF 세포 독성에 대한 황련 추출물의 방어효과. 대한한의학회지. 2003;24(2):159-65.
32. 송미영, 김은경, 송제호. 싸이토카인 유발 췌장 베타세포 독성에 대한 천화분 추출물의 방어효과. 대한동의생리학회. 2008;22(2):422-5.
33. 왕희. 외대비요. 북경: 문광도서유한공사; 1979, p. 303.
34. 허준. 대역 동의보감. 하동: 동의보감출판사; 2005, p. 1453.
35. 이제마. 동의수세보원. 서울: 행림출판사; 1979, p. 36, 59-62, 75-7.
36. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose treatment and risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOPNIDDM Trial. JAMA. 2003;290:486-94.
37. 황지영, 한지숙. 조릿대잎 추출물의 탄수화물 소화효소활성 저해 및 식후 혈당강하효과. 한국식품영양과학회지. 2007;36(8):989-94.
38. 최혁재, 김남재, 김동현. 석이에서 분리한 GE974의 α -glucosidase 저해효과. 생약학회지. 2000;31(2):196-202.