

RIN-m5F 세포에서 夜關淸血湯이 인슐린 분비에 미치는 영향

김진미, 조충식, 김철중
대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

Effect of YCT on Insulin Secretion in RIN-m5F Cells

Jin-Mi Kim, Chung-Sik Cho, Chul-Jung Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

Objective: This study was performed to investigate the effect of Yagwan-cheunghyeoltang (YCT) on insulin secretion in RIN-m5F cells.

Methods: After treatment with various concentrations of YCT to RIN-m5F cells, cell viability, free radical-scavenging activity, SOD activity, and insulin secretion were measured. Additionally, insulin-related gene expressions were measured using real-time RT-PCR.

Results:

1. YCT didn't show any influence on RIN-m5F cells viability.
2. YCT showed free radical-scavenging activity by 16% at 100 μ g/ml of concentration.
3. YCT showed enhancement of SOD activity by 60% at 100 μ g/ml of concentration.
4. YCT significantly increased insulin secretion in RIN-m5F cells in a dose-dependent manner.
5. YCT up-regulated INS-1, INS-2, IRS-1, IRS-2 and IRS-3 mRNA expressions compared to the control group.
6. YCT down-regulated INS-R, GCK, GLP-1R and GLP-2R mRNA expressions compared to the control group.

Conclusion: YCT has pharmaceutical properties enhancing insulin production and controlling glucose-associated metabolism, and could be a candidate for drug development after further research.

Key Words : Yagwan-cheunghyeoltang (YCT), RIN-m5F, Insulin secretion, Gene expression

서론

당뇨병이란 췌장에서의 인슐린 분비장애와 인슐린 작용기능 결함으로 탄수화물 대사장애와 이에 동반되는 단백질 및 지질대사 장애가 발생되고, 그 결과 지속적인 고혈당과 다갈, 다뇨, 다식, 체중감소, 의식장애, 혼수 등과 눈, 신장, 심혈관 및 신경장애 등의 급성 혹은 만성 합병증이 동반되는 만성질환이다¹⁾.

우리나라 당뇨병 환자 수는 전체 환자의 3.8%, 만성질환 환자의 24%를 차지하며, 최근 5년 동안 매년 환자수가 8.3% 증가하였다²⁾. 앞으로도 당뇨병 유병률은 계속 증가할 것으로 보이며, 따라서 당뇨병의 예방과 치료, 합병증 관리가 중요한 문제로 대두되고 있다.

포도당 자극에 의한 인슐린 분비의 장애는 췌장의 베타 세포의 양과 밀접한 관련이 있고, 인슐린을 분비할 수 있을 만큼 베타 세포가 충분히 증식하지

• Received : 2 March 2010 • Revised : 27 May 2010 • Accepted : 28 May 2010
• Correspondence to : 김철중(Chul-Jung Kim)
대전광역시 중구 대흥동 22-5번지 대전대학교 부속한방병원 신계내과학교실
Tel : +82-42-229-6880, Fax : +82-42-229-6758, E-mail : kidneykim@paran.com

못할 때 나타난다³⁾. 베타세포의 자연사를 촉진하는 자극 중에서 대표적인 것은 고혈당에 의한 당독성 (glucotoxicity), 지방산에 의한 지질독성 (lipotoxicity), 활성 산소기 (reactive oxygen species, ROS)들의 증가에 의한 산화 스트레스 등이다. 이 중 산화 스트레스는 당뇨병의 합병증을 일으키는데 중심적인 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있었으나, 최근에는 당독성, 지질독성 등의 여러 가지 자극들의 마지막 단계로서 직·간접적으로 베타 세포 자체의 세포자연을 촉진시키는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 또한 베타 세포는 산화 스트레스에 매우 취약한 세포로 알려져 있으며, 그 이유의 하나로 베타 세포에는 항산화 작용에 관여하는 효소가 매우 적은 것으로 보고되고 있다⁴⁾.

현재 당뇨병의 치료는 대부분 약물치료와 식이요법에 의존하고 있으나, 약물복용에 따른 부작용과 환자의 내성문제가 부각되면서 야생식용식물의 혈당강하 효과와 산화적 스트레스에 대한 췌장 베타 세포 보호활성 효과에 대한 관심이 증대하고 있으며, 이 분야에 대한 연구도 국내·외적으로 활발히 이루어지고 있다⁵⁻⁶⁾.

당뇨병은 한의학에서 消渴의 범주에 속하고, 기본 병기는 陰盡虧損으로 燥熱內生하므로 淸熱生津止渴 滋陰 등의 치법이 활용되고 있다⁷⁻⁸⁾.

본 실험에 사용된 夜關淸血湯 (Yagwan-cheung-hyeoltang : YCT)은 본원에서 대사증후군에 대응하

는 처방으로 임상적인 효과가 관찰되어 향후 당뇨병 치료에 활용될 것으로 기대되고 있다. YCT는 지구자, 구기자, 택사, 산사육, 결명자, 백하수오로 이루어진 청혈탕에 야관문을 더한 처방이다. 청혈탕은 祛風濕熱, 利水行氣의 효능이 있으며 최근 체중 및 total cholesterol 감소 효과가 보고되었고⁹⁾, 야관문은 산화 스트레스에 대하여 베타 세포 보호 효과가 있음이 실험적으로 증명되었다⁶⁾. 그러나 아직까지 YCT가 췌장 베타 세포의 인슐린 합성과 분비에 미치는 영향과 항산화 효과에 대해서는 명백히 밝혀져 있지 않다.

이에 저자는 당뇨에 있어서 YCT의 효능을 실험적으로 규명하고자, YCT에 노출된 RIN-m5F 세포에서 포도당 자극 대한 인슐린 분비 합성과 유전자 발현 및 항산화 작용을 관찰하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 夜關淸血湯 (YCT)은 한 침당 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1). 夜關門은 경북 영천에서 재배되어 건조된 것으로, 대전광역시 중구 백제당 한약방에서 구입하였고 다른 약제들은 대전

Table 1. Prescription of Yagwan-cheunghyeoltang (YCT)

Herbal name	Herbal medicine	Amount (g)
夜關門	Herba of Lespedeza cuneata	20
枳椇子	Hovenia Semen	15
枸杞子	Lycii Fructus	12
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
山楂肉	Crataegii Fructus	8
決明子	Cassiae Semen	6
白何首烏	Polygoni Multiflori Radix	8
Total amount		75(g)

대학교 부속 한방병원에서 구입한 후, 정선하여 사용하였다.

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, U.S.A.), p-nitrophenyl a-D-glucopyranoside, PIPES buffer(0.1M, pH 6.8), isopropanol 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), NaOH, dimethyl sulfoxide (DMSO), isopropyl alcohol은 Sigma (U.S.A.) 제품을 사용하였고, trizol (Life Technologies, U.S.A.), Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, U.S.A.), iQ SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., U.S.A.), 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. Rat insulin radioimmunoassay (RIA) kit (Linco Research, Inc., U.S.A.)는 acetonitrile (Merck, HPLC용)을 사용하였고, SOD assay kit (Dojindo, Japan)를 사용하였다. RIN-m5F 인슐린 종양 세포주는 ATCC (U.S.A.)에서 구입하였다.

3) 기기

열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (model FDU-540, Eylea, 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.), C18역상 HPLC column (Hypersil, U.S.A.), HPLC (Shimadzu, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

YCT 75g을 증류수 1,000ml에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 7.26g (수거율 : 9.68%)의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고 (-20 $^{\circ}$ C)에 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 PBS에 희석 후, 0.22 μ m의 필터링 후 사용하였다.

2) YCT의 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석

YCT의 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) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging 활성 측정

YCT의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로, YCT를 phosphate buffer에 녹여 다양한 농도 (0.1, 1, 10, 100 μ g/ml)로 처리한 후 100 μ l에 200mM DPPH 900 μ l를 섞은 후에 상온에서 10분간 방치 후에 eppendorf tube에서 96-well plate의 각 well에 분주하여 O.D 517nm에서 측정하였다. (Blank : phosphate buffer, Control : phosphate buffer+DPPH)

Free radical scavenging activity (%)=

$$\left(1 - \frac{\text{Absorbance of test compound}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

4) Superoxide dismutases (SOD) 활성 측정 실험
96-well plate의 각 well에 다양한 농도 (0.1, 1, 10, 100 µg/ml)의 YCT 20 µl를 첨가한 후 Reagent solution 200 µl를 넣은 후 마지막으로 enzyme working solution을 넣어준 후, 37°C에서 20분간 반응시킨다. ELISA reader를 이용하여 O.D 450nm에서 측정하여, SOD activity (inhibition rate, %)를 계산하였다. SOD 활성을 측정하는 nitrobltetrazolium (NBT)을 이용한 method는 formazan dye의 물에 대한 난용성과 환원된 xanthine oxidase와의 상호작용하는 단점을 가지고 있다. 그래서 이 논문에서 사용한 방법은 tetrazolium salt를 이용, SOD에 의한 환원으로 수용성의 WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 형성하여 SOD activity를 측정하였다. 측정은 SOD assay kit (Dojindo, Japan)로 하였다.

5) RIN-m5F 세포의 배양

인슐린중 세포주인 RIN-m5F 세포는 10% FBS, 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 RPMI 1640 Media에서 5% CO₂ air, 37°C에서 배양하였다¹⁰⁾. 배양액은 3~4일 간격으로 교대하였고 세포들은 trypsin-EDTA를 사용하여 떼어낸 후 계대배양 하였다.

6) MTT를 이용한 세포증식 측정

배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA를 사용하여 분리 후, PBS로 3회 세척한 다음, 96-well에 2×10⁴ cells/well의 세포수가 되도록 분주하였다. 세포는 FBS가 들어있는 RPMI배양액에서 YCT를 각각 다양한 농도 (2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml)로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 이후 50 µg/ml MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]

를 처리하여 반응시킨 다음 microplate reader로 570 nm에서 측정하였다.

7) RIN-m5F 세포에서 인슐린 분비 측정

RIN-m5F 세포를 well 당 3.0×10⁵개로 12-well plate에 분주하여 완전배지에서 3일간 배양한 후, 다양한 농도 (2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml)의 YCT와 D-PBS를 첨가하여 1~2일간 배양하였다. YCT를 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 MgSO₄, 1.2mmol/l KH₂PO₄, 5mmol/l NaHCO₃, 10mmol/l HEPES, 1 mg/ml BSA, pH 7.4)으로 2회 세척하고 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 바꾸어 1시간 배양한 후, 상층액을 취하여 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다. 분비된 인슐린의 양을 rat insulin RIA kit으로 측정하였다. 각 well의 세포 단백질의 농도를 측정하여, 각 단위 그램 단백질 당 인슐린 분비량을 계산하였다.

8) 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 인슐린 합성 측정

RIN-m5F 세포를 well 당 3.0×10⁵개로 6-well plate에 분주하여 20mM의 포도당 배지와 YCT를 함유한 배지 (6, 12 µg/ml)에서 48시간 동안 배양하였다. KRBB-HEPES 완충액으로 2회 세척하고 1시간 동안 배양한 후, 각각 20mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 배양한 한 후, trizol로 총 RNA를 추출하였다. 세포에 1ml의 trizol 용액을 첨가한 후 실온에서 5분 동안 배양한 후 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 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻은 후 iQ SYBR green supermix를 이용하여 β-actin에 대한 중합효

Table 2. Sequences of Primer Set

Primers	Foward Reverse	Product size (bp)
β -actin	TCTGAACCCTAAGGCCAACCGTG ATGGCATGAGGGAGCGCGTA	198
Insulin 1 (Ins1)	CAAACAGCACCTTTGTGGTCCTCAC CACAATGCCACGCTTCTGCC	199
Insulin 2 (Ins2)	CAGCACCTTTGTGGTTCTCACTTGG ATCCACGATGCCGCGCTTCT	198
Insulin receptor (Ins-R)	CCGAAAGCGAAGATCCCTTGAAG ATGCTGCAGCTCAATGCGG	200
Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)	AGAACGAGAAGAAGTGGCGGCAC TGCAGCTGCAGAAGAGCCTG	199
Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)	AGCGAGAAGAAGTGAAGAGCAAGG TGACCAAGTCGGTGAGTGCG	199
Insulin receptor substrate 3 (IRS-3)	CCATCTGAGGAAGCAGAAGTCCCA TGACGATCAGGTGGCGCTGA	200
Glucokinase (GCK)	ATTGGACCAAGGGCTTCAAGGC CATTGCAGCCAGTGCCACA	198
Glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-R1)	CACTGCACCAGGAAGTACATCCACC GCCGCCACGCAGTATTGCAT	200
Glucagon-like peptide 2 receptor (GLP-R2)	CTTGTGGGCACCAATCACTTGTG TCCCATTTGTGGCCAGCAC	200

소 연쇄반응을 시행하였다.

각 유전자 발현 정도를 real-time RT-PCR을 이용해 측정하였다. 각각의 유전자들의 염기 서열은 Table 2와 같다. 각 sample의 추출된 RNA에 2X SYBR green master mix (Bio-Rad) 25 μ l와 각각의 유전자들과 10pM forward and reverse primers를 1 μ l씩 첨가하여 각각 50 μ l 반응이 이루어졌으며 95 $^{\circ}$ C에서 10분 후 30초간 40cycle을 돌린 다음 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 반응을 일으켰다. β -actin mRNA를 control로, target mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다.

9) 통계적 분석

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 통계적 처리는 Student t-test 또는 one-way ANOVA를 사용하였으며 P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 의미 있는 것으로 하였다.

결 과

1. YCT의 HPLC 분석 결과

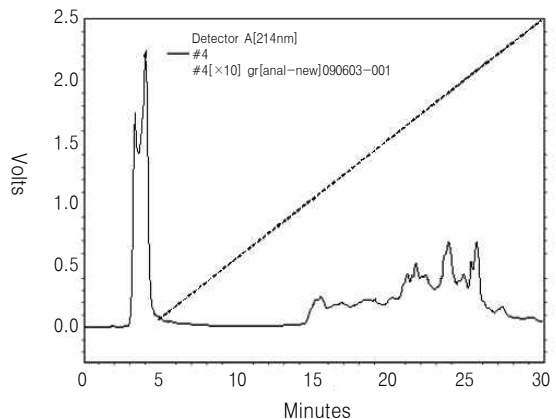


Fig. 1. Analysis of HPLC profile of YCT.

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.

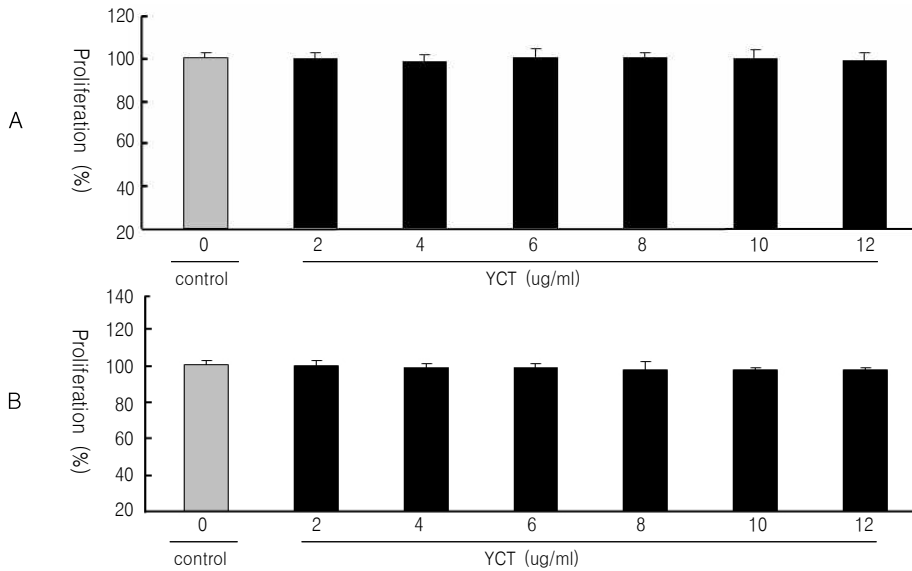


Fig. 2. Effects of YCT on proliferation.

Proliferation was determined after culturing 2×10^4 cells per well with or without various concentration (0~12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of YCT for 48hours using MTT assay. (A) Cells were cultured with 5mM glucose. (B) Cells were cultured with 20mM glucose. Data represent the mean \pm SD (n=3).

C18역상 HPLC를 사용하여 YCT의 수용성 성분을 분석하였다. 역상 HPLC 분석 결과 앞부분의 수용 성분을 확인하였다(Fig. 1).

2. Cell viability에 미치는 영향

5mM glucose의 경우, YCT를 함유하지 않은 배지

에서 RIN-m5F 세포를 배양한 군 (control)에 비하여 YCT 2, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 99.97 \pm 3.05%, 100.62 \pm 4.14%, 99.33 \pm 3.51%로 세포 증식에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2). 20mM glucose의 경우, 대조군에 비하여 YCT 2, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 99.99 \pm 2.41%, 98.78 \pm 2.40%, 97.89 \pm 1.03%로 세포증식에 영향을 미

Table 3. Effect of YCT on DPPH Radical-Scavenging Activity

Sample	Concentraion	Scavenging effect (%)
YCT	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16.13 \pm 2.64*
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	13.20 \pm 1.05*
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.52 \pm 2.05
	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.19 \pm 3.65
Negative control	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0
Positive control	1000mM	83.58 \pm 0.20*
	500mM	82.53 \pm 0.14*
	250mM	76.13 \pm 0.29*
	120mM	74.54 \pm 0.58*
	60mM	71.76 \pm 0.20*

Values indicate the mean \pm standard deviation (SD)(n>3). (*, P<0.05)

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of test compound}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

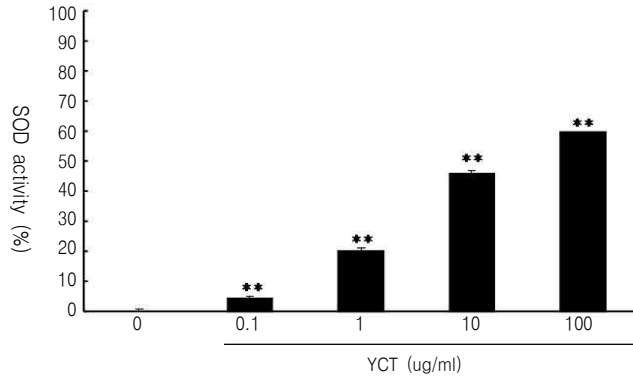


Fig. 3. Effect of YCT on SOD activity.

The effect of YCT on SOD activity was determined using BTB method. Data represent the mean±SD (n=3). Statistical significance was considered as P<0.01 compared with control group. ** P<0.01.

치지 않았다(Fig. 2).

3. DPPH 라디칼 소거에 미치는 영향

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응에서 YCT 은 농도 의존적으로 항산화 작용이 나타났으며, 통계적 유의성은 YCT 10, 100µg/ml(P<0.05)에서 나타났다(Table 3).

4. SOD 활성에 미치는 영향

SOD 활성은 YCT 0.1, 1, 10, 100µg/ml에서 각각 4.21±0.79%(P<0.01), 20.04±0.71%(P<0.01), 45.87±1.16%(P<0.01), 59.54±0.77%(P<0.01)로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 3).

5. 포도당 자극과 YCT에 의한 인슐린 분비

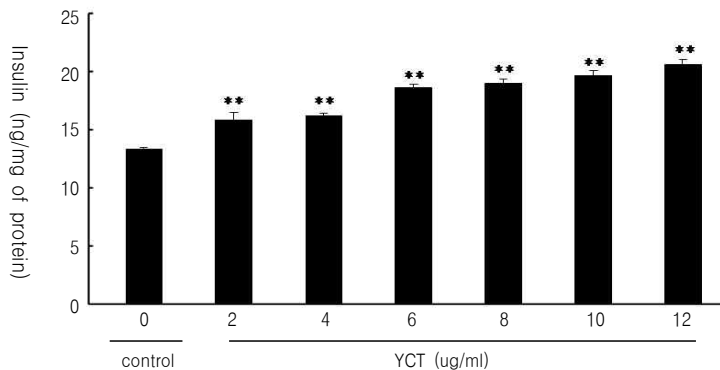


Fig. 4. Effect of YCT on glucose-stimulated insulin secretion.

Secretion was determined after culturing 3.0×10^5 cells per well with or without various concentration (0~12µg/ml) of YCT for 48hours. Cells were cultured in KRBB-HEPES containing 20mM glucose for 1hours. Insulin amount was measured by rat insulin RIA kit. Data represent the mean±SD (n=3). Statistical significance was considered as P<0.01 compared with control group. ** P<0.01.

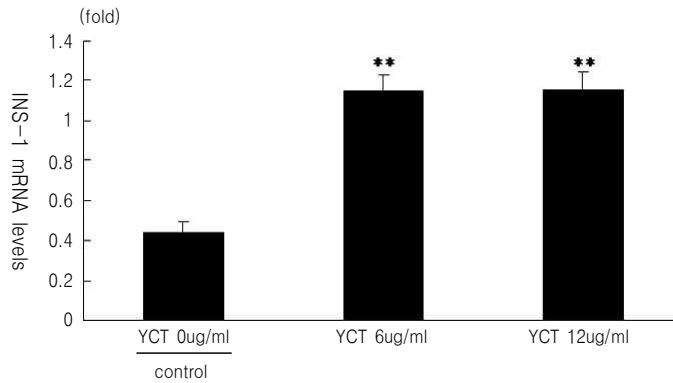


Fig. 5. Effect of *YCT* on INS-1 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of *YCT* for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P<0.01$ compared with control group. ** $P<0.01$.

인슐린 분비량은 대조군에서, $13.00\pm 0.11\text{ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ 이었고, *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 $18.54\pm 0.36\text{ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ ($P<0.01$), $20.57\pm 0.34\text{ng}/\text{mg protein}/1\text{h}$ ($P<0.01$)로, *YCT*의 농도에 따라 대조군에 비하여 인슐린의 분비량이 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 4).

6. *YCT*가 인슐린 분비 관련 유전자 발현에 미치는 영향

1) Insulin-1 (INS-1)

INS-1 mRNA 발현은 대조군에서 0.44 ± 0.004 였고, *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 1.15 ± 0.078 ($P<0.01$), 1.15 ± 0.083 ($P<0.01$)로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5).

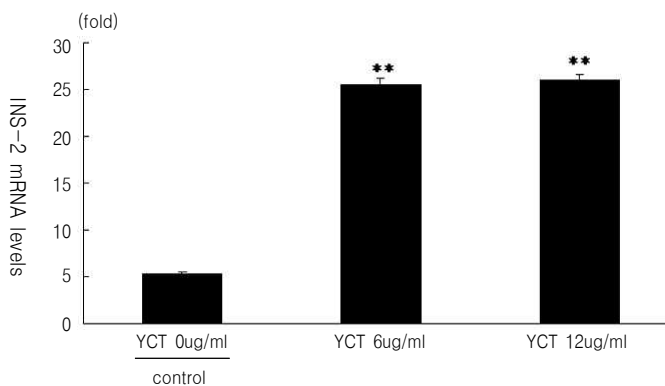


Fig. 6. Effect of *YCT* on INS-2 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of *YCT* for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P<0.01$ compared with control group. ** $P<0.01$.

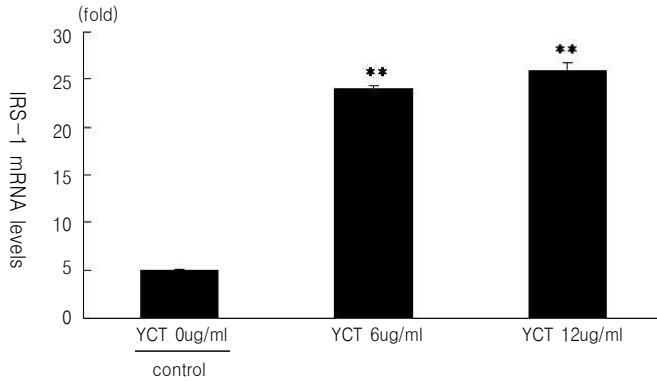


Fig. 7. Effect of YCT on IRS-1 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of YCT for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P<0.01$ compared with control group. ** $P<0.01$.

2) Insulin-2 (INS-2)

INS-2 mRNA 발현은 대조군에서는 5.24 ± 0.24 이었고, YCT 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 25.47 ± 0.69 ($P<0.01$), 25.91 ± 0.69 ($P<0.01$)으로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6).

YCT 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 24.05 ± 0.25 ($P<0.01$), 25.93 ± 0.86 ($P<0.01$)로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 7).

3) Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)

IRS-1 mRNA 발현은 대조군에서 4.88 ± 0.15 였고,

4) Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)

IRS-2 mRNA 발현은 대조군에서 9.56 ± 1.77 이었고 YCT 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 79.59 ± 3.12 ($P<0.01$), 78.52 ± 5.10 ($P<0.01$)으로 대조군에 비하여 유의성 있

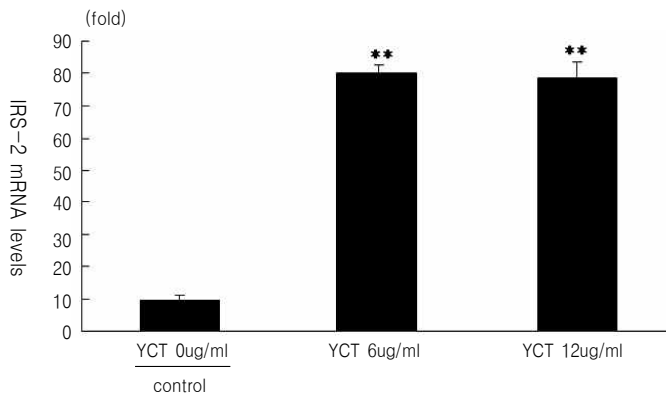


Fig. 8. Effect of YCT on IRS-2 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of YCT for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P<0.01$ compared with control group. ** $P<0.01$.

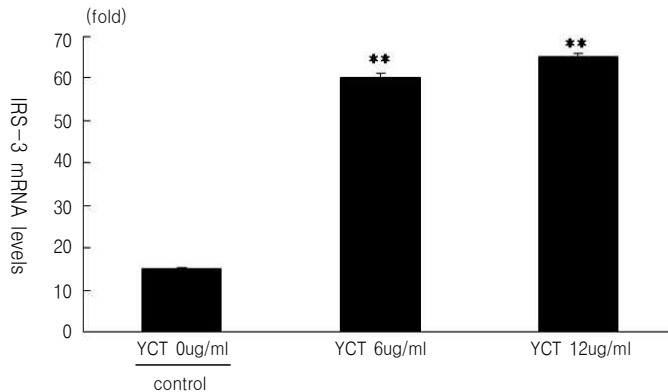


Fig. 9. Effect of *YCT* on IRS-3 mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of *YCT* for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P<0.01$ compared with control group. ** $P<0.01$.

게 증가하였다(Fig. 8).

5) Insulin receptor substrate 3 (IRS-3)

IRS-3 mRNA 발현은 대조군에서 14.93 ± 0.42 이었고 *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 60.24 ± 0.94 ($P<0.01$), 65.23 ± 0.83 ($P<0.01$)로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 9).

6) Insulin receptor (Ins-R)

Ins-R mRNA 발현은 대조군에서 0.46 ± 0.002 이었고, *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 0.013 ± 0.0004 ($P<0.01$), 0.014 ± 0.0005 ($P<0.01$)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10).

7) Glucokinase (GCK)

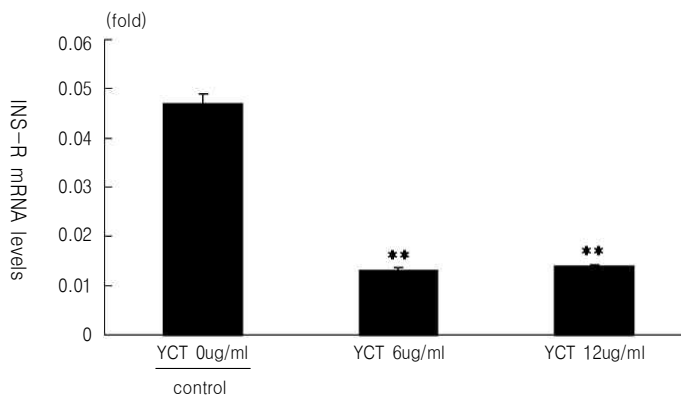


Fig. 10. Effect of *YCT* on INS-R mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of *YCT* for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P<0.01$ compared with control group. ** $P<0.01$.

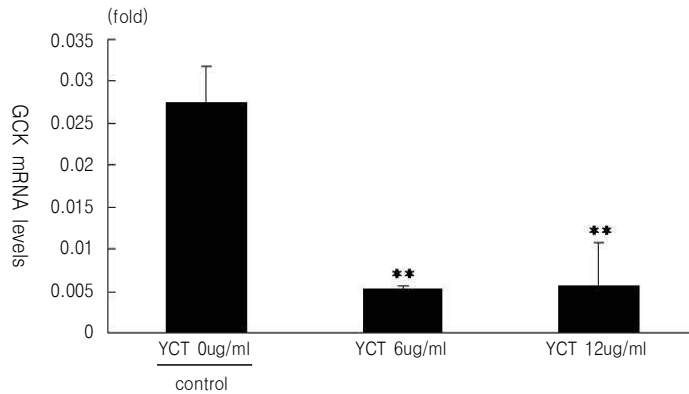


Fig. 11. Effect of *YCT* on GCK mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of *YCT* for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P < 0.01$ compared with control group. ** $P < 0.01$.

GCK mRNA 발현은 대조군에서 0.027 ± 0.004 이었고, *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 0.0053 ± 0.0002 ($P < 0.01$), 0.0056 ± 0.0005 ($P < 0.01$)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11).

이었고, *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 0.00042 ± 0.0002 ($P < 0.01$), 0.00059 ± 0.0002 ($P < 0.01$)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

8) Glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R)

GLP-1R mRNA 발현은 대조군에서 0.016 ± 0.0005

9) Glucagon-like peptide 2 receptor (GLP-2R)

GLP-2R mRNA 발현은 대조군에서 0.041 ± 0.015 였고, *YCT* 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 0.0036 ± 0.0037

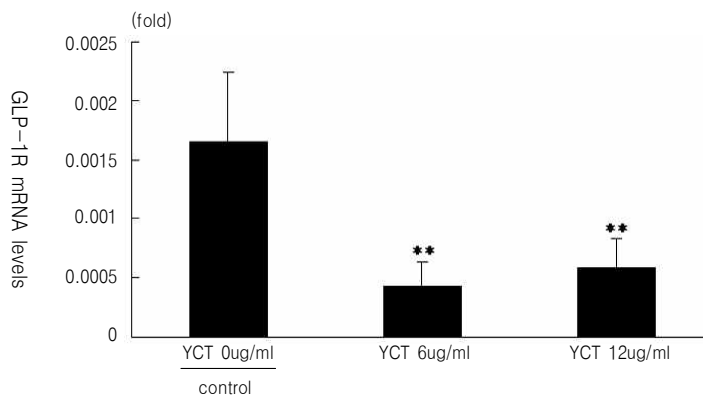


Fig. 12. Effect of *YCT* on GLP-1R mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of *YCT* for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as $P < 0.01$ compared with control group. ** $P < 0.01$.

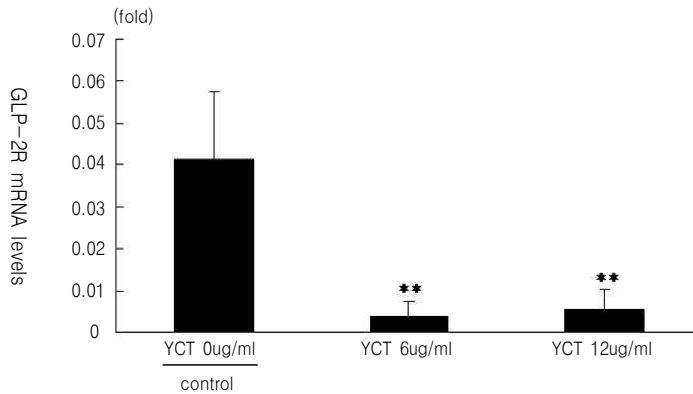


Fig. 13. Effect of YCT on GLP-2R mRNA expression.

Expression was determined after culturing 6-well plate with or without various concentration (0, 6, 12 μ g/ml) of YCT for 48hours. Cells are cultured with 20mM glucose. Expression levels were analyzed by real-time RT-PCR. Using β -actin mRNA as a control, target mRNA expression was quantified and compared. Data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical significance was considered as P<0.01 compared with control group. ** P<0.01.

(P<0.01), 0.0053 \pm 0.0049(P<0.01)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13).

고찰

당뇨병에서 만성적인 고혈당 상태는 여러 기관의 구조적, 기능적 독성 작용을 일으키게 되어 당뇨병성 망막병증, 신병증, 신경병증, 대혈관 질환 등의 합병증을 유발한다¹⁾. 또한 고혈당이 지속되고 높아질수록 베타세포 기능이 악화되어 인슐린 분비가 점

점 줄어들면서 결국 베타세포가 그 기능을 상실하게 된다. 산화스트레스는 당뇨병의 합병증을 일으키는 데 중심적인 역할을 하며, 베타세포에는 항산화 작용에 관여하는 효소가 매우 적어 산화스트레스에 매우 취약한 것으로 알려져 있다⁴⁾.

따라서 약물치료에 있어 혈당강하 효과와 산화적 스트레스에 대한 췌장 베타 세포 보호활성 효과에 대한 관심이 증대하고 있으며, 한약물에 대한 연구도 진행되고 있다¹¹⁻¹⁵⁾.

한의학에서 당뇨병은 消渴의 범주에 속하고, 陰盡

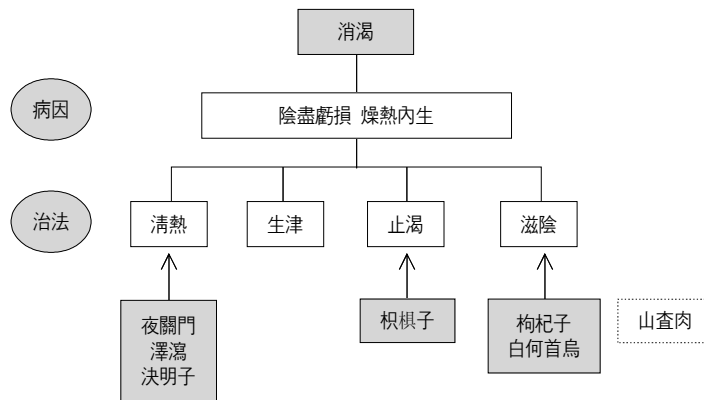


Fig. 14. Pathogenesis of diabetic mellitus in Traditional Korean Medicine and action points of configuration medicines of YCT.

虧損으로 燥熱内生하는 것을 기본 병인으로 하며 淸熱生津 止渴 滋陰 등의 치법이 활용되고 있다⁷⁻⁸⁾(Fig. 14).

본 연구에 사용된 YCT 구성 약물의 효능을 살펴 보면, 夜關門은 益肝, 明目, 利尿, 解熱하고¹⁶⁾, 枳椇子是 止渴止煩, 利大小便하며, 枸杞子是 滋肝益腎, 生精助陽, 除風濕痺하고, 山查肉는 健脾行氣, 散瘀化痰하며 澤瀉는 利水瀉火, 治濕熱하고, 白何首烏는 補肝益陰, 收斂精氣하며, 決明子는 祛風熱, 消腫毒한다¹⁷⁾(Fig. 14).

각 약제에 관한 연구로, 야관문은 항산화 효과⁴⁵⁾와 혈당 강하 효과⁴⁶⁾가 보고되었으며, 야관문 메탄올 추출물이 H₂O₂를 이용한 산화적 스트레스에 대한 RIN-m5F 세포의 보호에 유의한 효과가 있음이 보고되었다⁶⁾. 지구자에 관한 연구로는 해독 효능¹⁸⁾과 간독소를 제거하는 물질에 관한 연구¹⁹⁾ 등이 이루어졌는데, 특히 Yoshikawa 등²⁰⁾은 지구자 잎에서 천연 항당물질인 다섯 종류의 hodulosides을 밝힌 바 있다. 또한 지구자 추출물은 streptozotocin으로 고혈당이 유발된 생쥐에서 베타세포의 회복 또는 재생과 췌장 샘포세포의 insulin-like growth factor (IGF) 발현에 관여한다²¹⁾. 구기자는 항암효과²²⁾, 면역증진효과²³⁾, 혈압강하²⁴⁾ 및 항당뇨 효과²⁴⁻²⁵⁾, 항산화효과²⁷⁾, 혈중 콜레스테롤 저하 효과²⁸⁾가 있는 것으로 알려져 있다. 산사육은 항균효과를 비롯하여²⁹⁾,

혈관확장기능에 대한 약리활성 성분이 있다고 보고 되었으며³⁰⁾, 산화적 스트레스에 대한 항산화작용에도 유효한 성분이 있다고 제시된 바 있다³¹⁾. 또한 α-amylase, α-glucosidase 저해효과가 있음이 보고되었다³²⁾. 택시는 이노작용 및 혈중 콜레스테롤과 혈당을 낮추는 효능이 있는 것으로 알려져 있으며³³⁾, 결명자에 대한 연구로는 당뇨에서 혈당 수준의 감소³⁴⁾, 산화적 스트레스 억제효과³⁵⁾, free radical 소거작용³⁶⁾ 등이 보고되고 있다. 백하수오는 실험적으로 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 흰쥐에서 혈당 강하효과가 있으며³⁷⁾, 청혈탕은 체중 및 total cholesterol 감소 효과가 보고되었다⁹⁾(Table 4).

그러나 아직까지 YCT가 췌장 베타세포의 인슐린 분비와 합성, 유전자 발현에 미치는 영향 및 항산화 효과에 대해서는 보고된 연구가 없어, 본 실험을 실시하였다.

세포 증식 실험에서 YCT는 5mM과 20mM glucose 자극에서 RIN-m5F 세포의 증식에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응 실험에서, YCT는 농도에 의존적인 항산화 작용을 보였으며 통계적 유의성은 대조군에 비하여 10µg/ml과 100 µg/ml에서 나타났다(Table 3). 또한 SOD 활성 측정 결과, YCT는 농도 의존적으로 대조군에 비하여 유의성 있게 SOD 활성을 증가시켰다(Fig. 3). SOD는

Table 4. Proven Effects of Configuration Medicines of YCT by Experiments

Herbal name	Reported effects
夜關門	Antioxidative activity ^{6,45)} , reduction of serum blood glucose level ⁴⁶⁾
枳椇子	Antibacterial activity ¹⁸⁾ , hepatoprotective effect ¹⁹⁾ , antisweet effect ²⁰⁾
枸杞子	Anticarcinogenic effect ²²⁾ , enhance of immune response ²³⁾ , antihypertensive effect ²⁴⁾ antisweet effect ²⁵⁻²⁶⁾ , antioxidative activity ²⁷⁾ , reduction of total cholesterol ²⁸⁾
澤瀉	Diuretic activity and reduction of total cholesterol ³³⁾
山楂肉	Antibacterial activity ²⁹⁾ , vasodilation ³⁰⁾ , antioxidative activity ³¹⁾ , inhibition of α-amylase and α-glucosidase ³²⁾
決明子	Reduction of serum blood glucose level ³⁴⁾ , antioxidative activity ³⁵⁾ , free radical-scavenging activity ³⁶⁾
白何首烏	Reduction of serum blood glucose level ³⁷⁾
淸血湯	Reduction of body weight and total cholesterol ⁹⁾

산소 대사과정에서 가장 먼저 생성되는 산소라디칼을 제거시켜서 free radical 반응에 대한 방어 기전으로서 그 역할이 매우 큰 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾. 이전의 연구에서, YCT의 구성 약물이 개별적으로 항산화 효과가 있음이 밝혀졌고^{6,27,31,35)}, 본 연구에서도 유의성 있는 항산화 효능이 나타났다.

만성적인 고농도 포도당 노출이 인슐린 분비능에 미치는 효과를 알아보는 실험에서 YCT가 농도 의존적으로 대조군에 비하여 인슐린 분비량을 증가시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이로써, YCT가 인슐린 분비기능을 촉진시킴을 알 수 있었다.

인슐린 분비 관련 유전자 발현의 경우, INS-1, INS-2 mRNA 발현은 대조군 보다 YCT 투여군에서 유의성 있게 증가하였고(Fig. 5,6), INS-1과 INS-2 mRNA는 각각 90% 이상의 상동성을 가진 insulin 1과 insulin 2를 합성하는 유전자로³⁸⁾ 이를 통해 YCT가 인슐린 분비를 증가시키고 있음을 알 수 있었다.

IRS는 인슐린 신호전달의 매개체로 세포의 성장, 생존, 대사와 같은 기능을 유지시키는 역할을 하는 인슐린 수용체와 세포내의 복잡한 신호전달 분자사이의 도킹 단백질이다. IRS-1은 골격근에서 당 섭취에 중요한 역할을 하고, 근육에서 IRS-1의 발현과 기능의 결함은 비만이나 2형 당뇨병과 같은 인슐린 저항성 질환에서 보고되고 있다. IRS-2는 췌장 베타

세포의 발달과 생존 뿐만 아니라 간에서 인슐린 작용을 조절하고, IRS-3는 IRS 신호체계를 증폭시키는 역할을 한다³⁹⁾.

본 실험에서 IRS-1, IRS-2, IRS-3 mRNA 발현은 대조군 보다 YCT 투여군에서 유의성 있게 증가하여(Fig. 7,8,9), YCT가 세포내 인슐린 신호 전달 체계를 촉진시켜 인슐린 저항성을 감소 효과를 나타낼 것으로 보인다.

Ins-R는 인슐린에 의해 활성화되는 막 수용체이다. 인슐린은 Ins-R과의 결합을 통해서만 세포내로 들어갈 수 있으며, Ins-R가 활성화되면 세포 내의 다른 물질들이 작동되거나 활성화된다⁴⁰⁾.

Ins-R mRNA 발현은 대조군 보다 YCT 투여군에서 mRNA 발현이 유의성 있게 감소하였으며(Fig. 10) 이는 췌장의 베타 세포에서의 Ins-R mRNA 발현 감소를 나타낸 것이므로 실제적으로 포도당을 많이 소비하는 간조직이나 다른 골격근에서의 Ins-R mRNA 발현에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

GCK는 췌장의 베타 세포에서 대사과정에 필요한 glucose 인산화 효소로, glucose를 glucose-6-phosphate (G-6-P)로 인산화시키고⁴¹⁾, 췌장의 GCK는 당대사와 인슐린 분비조절인자로 알려져 있다⁴²⁾. 그리고 GLP-1R는 GLP-1의 agonist로, GLP-1은 음식을 먹으면 소화기계에서 반응하여 생성 분비되며 당 의존

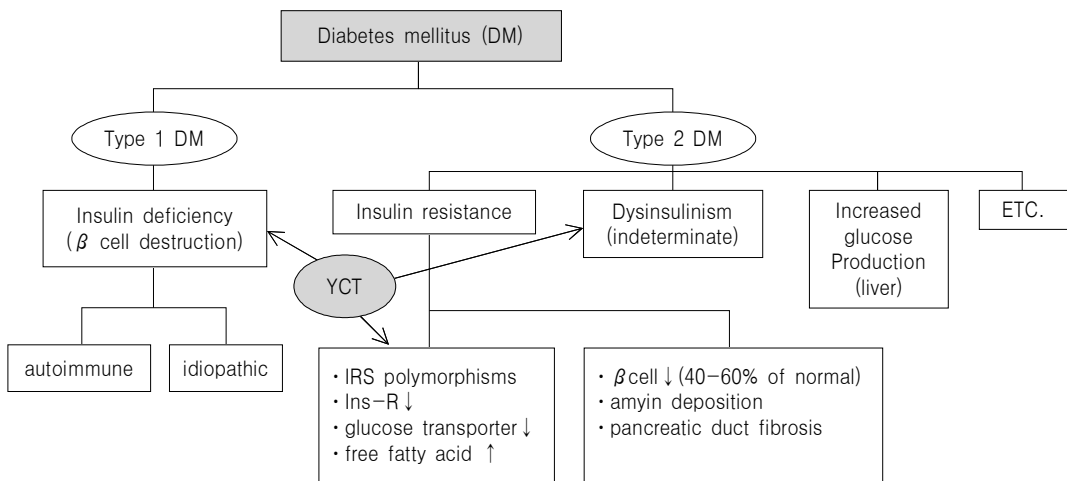


Fig. 15. Pathogenesis of diabetic mellitus in western and action points of YCT.

인슐린 분비를 자극하고, 포도당 저항성이 있는 베타 세포에서 포도당 감수성을 회복시키며 인슐린 유전자 발현과 생합성을 자극한다. 나아가 GLP-1은 베타세포의 증식, 생존, 신생을 증진시키는 작용을 통해 성장인자처럼 활약하여 당뇨병치료로 부각되고 있다⁴³⁾. GLP-2R는 GLP-2의 agonist로, GLP-2는 주로 장 점막의 성장을 자극하고 장세포사를 억제하며 장세포의 포도당 운송과 영양분 흡수에 주로 작용하는 것으로 알려져 있다⁴⁸⁾.

GCK, GLP-1R, GLP-2R mRNA 발현은 대조군보다 YCT 투여군에서 mRNA 발현이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11,12,13). CGK, GLP-1R의 mRNA 발현이 YCT 투여군에서 감소한 것은 YCT으로 인해 인슐린 분비가 증가했기 때문이거나, YCT가 다른 경로로 이들의 발현을 억제했기 때문으로 보이며 향후 기전적 연구가 필요하리라 사료된다. GLP-2R의 mRNA 발현이 YCT 투여군에서 감소한 것은 YCT가 소장에서 당의 흡수를 억제하여, 혈당강하에 효과적으로 작용할 가능성을 시사한다.

이번 실험 결과로 볼 때, YCT는 인슐린 분비 촉진이나 인슐린 저항성 감소에 효과를 보이는 것으로 사료된다(Fig. 15).

이상을 종합하면, YCT에서 포도당 독성과 산화 스트레스에 대한 베타세포 보호 효과와 인슐린 분비 및 합성을 촉진시키는 효과가 관찰되어 향후 당뇨병 치료에 이용될 수 있는 가능성을 실험적으로 확인할 수 있었다. 앞으로 YCT가 포도당 독성과 산화 스트레스로부터 베타 세포를 보호하는 역할에 대한 보다 구체적인 기전과 임상적인 연구가 요구되며, 나아가 최근 관심이 증가하고 있는 소장 근위부에서 다당류의 소화를 억제하여 저혈당 유발 없이 혈당을 낮추는 α -glucosidase 억제제⁴⁴⁾로서의 역할 규명에 대한 추가적인 연구도 필요하리라 사료된다.

결론

YCT에 노출된 RIN-m5F 세포에서 인슐린 함량과 포도당 자극 대한 인슐린 합성과 분비, YCT에 의한

항산화 작용에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. YCT은 대조군에 비하여 저농도 (5mM)와 고농도 (20mM) 포도당 자극에서 RIN-m5F 세포의 증식에 영향을 주지 않았다.
2. YCT은 대조군에 비하여 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응과 SOD 활성 측정에서 모두 농도에 의존적인 항산화 작용을 보였다.
3. YCT은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 인슐린의 분비량을 유의하게 증가시키는 효과가 있었다.
4. YCT은 대조군에 비하여 INS-1, INS-2의 유전자 발현을 유의하게 증가시키는 효과가 있었다.
5. YCT은 대조군에 비하여 IRS-1, IRS-2, IRS-3의 유전자 발현을 유의하게 증가시키는 효과가 있었다.
6. YCT은 대조군에 비하여 Ins-R의 유전자 발현을 유의하게 감소시키는 효과가 있었다.
7. YCT은 대조군에 비하여 GCK, GLP-1R, GLP-2R의 유전자 발현을 유의하게 감소시키는 효과가 있었다.

이상의 결과에서 YCT는 RIN-m5F 세포에서 항산화 효과, 인슐린 분비량 증가 효과와 일부 인슐린 분비 관련 유전자의 발현 증가 효과가 있음이 관찰되어 향후 당뇨병 치료에 이용될 수 있는 발전적인 가능성을 실험적으로 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 가톨릭의과대학 내과학교실 공저. Current principles and clinical practice of internal medicine 2nd ed. 서울: 군자출판사. 2008:823.
2. 건강보험심사평가원. 질병·수술명 진료정보. Available at: URL:<http://www.hira.or.kr/common/dummy.jsp?pgmid=HIRAA021100000000>. Accessed July 16, 2009.
3. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of

- evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004;53:S16-21.
4. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(Suppl.1):S119-24.
 5. Lim SJ, Kim SY, Lee JW. The effects of Korean wild vegetables on blood glucose levels and liver-muscle metabolism of streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr*. 1995;28: 585-94.
 6. Lee DS, Jeong GS, An RB, Li B, Byun E, Kim YC. Search for plant extracts with protective effects of pancreatic beta cell against oxidative stress. *Kor J Pharmacogn*. 2008;39(4):335-40.
 7. 方藥中. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1986:477.
 8. 余永譜. 中醫治療內分泌代謝疾病. 浙江: 浙江科學技術出版社. 1992:239-43.
 9. Kim MH, Cho CS, Kim CJ. The Effects of Cheunghyeoltang(CHO) and Gami-Cheunghyeoltang(GCHO) on the Obesity. *Korean J. OrientInt. Med*. 2006;27(2):305-15.
 10. Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci*. 1999;96:513-23.
 11. Jeong CG, Kim EY, Shin JW, Sohn YJ, Lee HS, Jung HS et al. Effect of Chungpaesagan-tang on Ischemic Damage Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Diabetic Rats. *J Korean Oriental Med.* 2005;26 (2):217-30.
 12. Park JS, Lee BC, Doo HK, Ahn YM, Ahn SY. The Effects of Supungsunki-hwan on High Fat, High Carbohydrate Diet-induced Obese Type 2 Diabetic Mouse Model. *Korean J Orient-Int Med*. 2009;30(2):257-69.
 13. Choi JS, Chang SK, Cho CS, Kim CJ, Han DU. Effects of Sopyung-tang Extract on Blood Glucose &Antioxidant Enzyme Activities of Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Korean J Orient-Int Med*. 2008;29(1):90-103.
 14. Kim YS, Lee BC, Ahn SY, Doo HK, Ahn YM. The Effects of Salvia Miltiorrhiza on Renal Function and Histopathological Changes in Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Rat Model. *Korean J Orient-Int Med*. 2008;29 (3):787-99.
 15. An SH, Cho CS, Kim CJ. Effects of Radix Sophora Flavescentis Extract on Insulin Secretion in RIN-m5F Cells and α -glucosidase Inhibition. *Korean J Orient-Int Med*. 2009;30(3):481-94.
 16. 김창민, 신민교, 안덕균, 이정순 등. 中藥大辭典. 서울:도서출판 정담. 1997:2771.
 17. 전국한의과대학본초학교수 공저. 본초학. 서울:영림사. 1991:305-6, 369-70, 419-20, 510-1, 583-4, 596-7.
 18. Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, Namba T. Hepatoprotective effect of Hovenia dulcis Thunb on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysacchride. *Biol Pharm Bull*. 1997;20: 381-5.
 19. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomuya K, Murakami N et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicines, III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II, and III, isolated from Hoveniae Semen Seu fructus, the seed and fruit of Hoveniae dulcis Thunb (Rhamnaceae): Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakukaku Zasshi*. 1999;117: 108-18.
 20. Yoshikawa K, Nagai Y, Yoshida M, Arihara S. Antisweet natural products. VIII. Structures of hodulosides VI-X from Hoveniae dulcis Thunb. var. tomentella Makino. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1993;41:1722-5.
 21. Kim JS, Na CS, Eun JB. Effect of Hovenia dulcis thunb extract on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin. *J Korean Soc Food Sci Nutr*.

- 2005;34(5):632-7.
22. Park YJ, Kim MH, Bae SJ. Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of Lycii fructus with vitamin C. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2002;31:143-8.
 23. Park JS, Park JD, Lee BD, Choi KJ. Effects of extracts from various parts of Lycium chinese Mill on proliferation of mouse spleen cells. *Korean J Medical Crop Sci.* 2000;18:291-6.
 24. Do JR, Kim SB, Park YH, Kim DS. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by the component of traditional tea material. *Korean J Food Sci Technol.* 1993;25:456-60.
 25. Shin JS, Kim KS, Jeong GH, Cheong CS. Antidiabetic activity of Lycii fructus. *Kor J Pharmacogn.* 1998;28:138-42.
 26. Kim KS, Shim SH, Jeong GH, Cheong CS. Antidiabetic activity of constituents of Lycii fructus. *J Applied Pharmacology.* 1998;6:378-82.
 27. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol.* 1995;27:80-5.
 28. Kim HS, Park YS, Kim CL. Changes of serum lipid profiles after eating Lycii fructus in rats fed high fat diet. *Korean J Nutr.* 1998;31:263-70.
 29. Choi SM, Kim MJ, Choi YH, Ahn HJ, Yun YP. Screening of the Antibacterial Activity of Natural Products against Propionibacterium acnes. *Journal of the Pharmaceutical Society of Korea.* 1998;42(1):89-94.
 30. 王浴生, 鄧文龍, 薛春生. 中藥藥理與應用. 北京: 人民衛生出版社. 1998:103-4.
 31. Shin HM, Shin DH, Kim GW. Antioxidant Effects and Roles of Endogenous Sulfhydryls in the Gastric Mucous Protection of Crataegus Cuneata. *The Journal of Oriental Medical Physiology.* 2000;15(1):127-35.
 32. Kim JH, Kim MU, Cho YJ. Natural Products, Organic Chemistry ; Isolation and Identification of Inhibitory Compound from Crataegi Fructus on α -amylase and α -glucosidase. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2007;50(3):204-9.
 33. Kim CM, Shin MK, An, 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순, 강병수, 강상수 등. *완역 中藥大辭典*. 서울:정담. 1998:5671-7.
 34. Lim SJ, Han HK. Hypoglycemic effect of fractions of Cassia tora extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Soc Food Sci.* 1997;13(1):23-9.
 35. Choi JS, Lee HJ, Park KY, Ha JO, Kang SS. In vitro antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from Cassia tora. *Planta Med.* 1997;63:11-4.
 36. Choi JS, Lee HJ, Kang SS. Alaternin, cassiaside and rubrofusarin gentiobioside, radical scavenging principles from the seed of Cassia tora on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical. *Arch Pharm Res.* 1994;17:462-9.
 37. Kim HS. Effects of Cynanchum wilfordii Extract on Serum Lipid Components and Enzyme Activities in Hyperlipidemic and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korean journal of human ecology.* 2004;7(2):1-11.
 38. Ling H, Heimberg A, Foriers F, Schuit D, Pipeleers. Differential expression of rat insulin I and II messenger ribonucleic acid after prolonged exposure of islet {beta}-cells to elevated glucose levels. *Endocrinology.* 1998; 139:491-5.
 39. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *The FASEB Journal.* 2001; 15:2099-111.
 40. Ward CW, Lawrence MC. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays.* 2009;31(4): 422-34.

41. Sharma C, Manjeshwar R, Weinhouse S. Effects of diet and insulin on glucos-adenosine triphosphate phosphotansferase of rat liver. *J Biol Chem.* 1963;238:3841-5.
42. Bedoya FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D, Matschinsky FM. The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. *Diabetes.* 1986;35:61-7.
43. Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab.* 2008;34:73-7.
44. Zhang BB, Moller DE. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr opin chem biol.* 2000;4:461-7.
45. Kim SJ, Kim DW. Antioxidative Activity of Hot Water and Ethanol Extracts of *Lespedeza cuneata* Seeds. *Korean journal of food preservation .* 2007;14(3):332-5.
46. Kim MS, Min OJ, Rhyu DY. Effect of *Lespedeza cuneata* Extracts on Diabetes and Diabetic Nephropathy. *한국자원식물학회 학술심포지엄.* 2008;4:83.
47. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J Bio Chem.* 1973;248: 3582-92.
48. Meier JJ, Nauck MA, Pott A, Heinze K, Goetze O, Bulut K et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology.* 2006;130(1):44-54.