

## 창출 · 지모 · 육계 복합추출물의 고지방식이 유도 당뇨병 마우스에서의 항당뇨 효능 및 C2C12 골격근세포에서의 조절기전 연구

박기호<sup>1#</sup>, 강석용<sup>1,2</sup>, 강안나<sup>1</sup>, 정효원<sup>1,2</sup>, 박용기<sup>1,2\*</sup>

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

### Anti-diabetic effects of the extract from *Atractylodes lancea*, *Anemarrhena asphodeloides* and *Cinnamomum Cassia* mixture in high fat diet-induced diabetic mice and regulation of the function in C2C12 mouse skeletal muscle cells

Ki Ho Park<sup>1</sup>, Seok Yong Kang<sup>1,2</sup>, Anna Kang<sup>1</sup>, Hyo Won Jung<sup>1,2</sup>, Yong-Ki Park<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Herbology, college of Korean Medicine, Dongguk University

2 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objective** : This study investigated the anti-diabetic effects of DM1, a herbal mixture with *Atractylodes Rhizoma*, *Anemarrhenae Rhizoma*, and *Cinnamomi Cortex* in high fat diet (HFD)-induced diabetic mice and the mechanism in C2C12 mouse skeletal muscle cells.

**Methods** : The C57B/6 mice were fed high fat for 12 weeks, and then administrated DM1 extract (500 mg/kg, p.o.) for 4 weeks. The changes of body weight, calorie and water intakes, fasting blood glucose levels and the serum levels of glucose, insulin, triglyceride, HDL-cholesterol, AST and ALT were measured in mice. The histological changes of liver and pancreas tissues were also observed by H&E stain. C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes and then treated with DM1 extract (0.5, 1, and 2 mg/ml) for 24 hr. The expression of myosin heavy chain (MHC), PGC1 $\alpha$ , Sirt1 and NRF1, and the AMPK phosphorylation were determined in the myotubes by western blot, respectively.

**Results** : The DM1 extract administration significantly decreased the calorie and water intakes, glucose, triglyceride, AST and ALT levels and increased insulin and HDL-cholesterol in HFD-induced diabetic mice. DM1 extract inhibited lipid accumulation in liver tissue and improved glucose tolerance. In C2C12 myotubes, DM1 treatment increased the expression of MHC, PGC1 $\alpha$ , Sirt-1, NRF-1 and the AMPK phosphorylation.

**Conclusion** : In our results indicate that DM1 can improve diabetic symptoms by decreasing the obesity, glucose tolerance and fatty liver in HFD-induced diabetic mice, and responsible mechanism is might be related with energy enhancement.

**Key words** : Antidiabetic Effect, *Atractylodes Rhizoma*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, C2C12 cell, High Fat Diet, Obesity, Skeletal Muscle

## I. 서 론

과체중과 비만은 체내 지방이 비정상적으로, 또는 과도하게 축적되어 각종 질병을 야기하게 되는 질환이며, 유발 요인으로

\*Corresponding author: Yong-Ki Park, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2661 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#First author: Ki Ho Park, Korean Medicine R&D Center, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2658 · Fax : +82-54-770-2647

· Received : 10 October 2019 · Revised : 12 November 2019 · Accepted : 30 November 2019

과도한 지방을 포함한 고칼로리 음식의 섭취, 산업화와 도시화에 따른 생활환경 변화로 인한 활동량의 감소 등을 들 수 있다. 특히 비만은 심혈관계, 근골격계, 일부 암 등의 주된 위험요소로 알려져 있으며,<sup>1)</sup> 특히 인슐린 저항성에 영향을 미치는 주요 인자인 만큼 제2형 당뇨병과도 매우 밀접하게 연관된다.<sup>2)</sup>

제2형 당뇨병(type 2 diabetes mellitus, T2DM)은 신체 조직에서 인슐린 저항성이 발생하고 이를 체내에서 분비되는 인슐린이 극복하지 못한 결과, 혈당 조절 능력을 상실하게 되는 질환이다.<sup>2)</sup> 또한 비만과 제2형 당뇨병 발생은 체내 지질의 이상 축적으로 인한 염증이 근육세포에서의 각종 대사기능을 저하시킬 뿐만 아니라,<sup>3)</sup> 포도당 수송체인 glucose transporter (GLUT) 단백질과 인슐린 수용체의 기능을 억제하는 등 근육 기능을 저하시키는 요인으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 따라서 최근에는 비만과 당뇨병의 합병증 치료에 있어 염증 제어와 대표적 인체 에너지 소모기관인 근육의 대사기능 회복이 중요하다고 보고 있다.

최근 한방에서의 비만 변증은 <한방비만변증실문지>의 肝鬱, 脾虛, 氣虛, 陽虛, 痰飲, 瘀血 등을 사용하고 있으며 임상에서는 痰飲, 瘀血, 脾虛, 食積, 濕痰, 氣虛 순으로 증상을 호소하고 있음이 보고된 바 있다.<sup>5)</sup> 또한 당뇨병은 消渴 및 그 전변증의 증상과 유사한 것으로 보고 있고, 東醫寶鑑 <消渴門>에서 소갈류의 원인을 각각 ‘熱氣上騰, 心虛受之’, ‘熱蓄於中, 脾虛受之’, ‘熱伏於下, 腎虛受之’ 등으로, 장부가 허약한 가운데 체내에 열이 있는 것으로 기재하고 있으며, 三消病症에서 특히 上消는 肺에 속하고, 中消는 胃에 속하고, 下消는 腎에 속한다 하였으므로<sup>6)</sup> 당뇨병 치료에 있어서 肺, 脾胃, 腎의 기능회복이 중요함을 생각할 수 있다.

蒼朮(*Atractylodes lancea*, *Atractylodis Rhizoma*)은 性味가 溫, 苦辛하고 脾, 胃, 肝, 으로 들어가 燥濕健脾, 祛風散寒하므로<sup>7)</sup> 濕과 痰飲에 의한 脾胃의 허약을 개선하고 明目하는 효능이 있음이 알려져 있어 肝鬱, 氣虛, 脾虛, 陽虛, 痰飲 등에 의한 증상을 개선할 것으로 기대할 수 있다. 知母(*Anemarrhena asphodeloides*, *Anemarrhenae Rhizoma*)는 성미가 寒, 苦甘하고 肺, 腎, 胃로 들어가 清熱瀉火, 生津潤燥, 潤腸通便하는 효능을 지녀 肺熱燥咳, 骨蒸潮熱, 內熱消渴, 高熱煩渴 등에 두루 사용하였으므로<sup>7)</sup> 臟腑의 熱을 제거할 것으로 기대할 수 있다. 또한 肉桂(*Cinnamomum cassia*, *Cinnamomi Cortex*)는 성미가 溫, 辛甘하고 腎, 脾, 膀胱으로 들어가 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈하여 命門火衰, 虛陽浮越, 上熱下寒, 腰膝冷痛, 經閉癥瘕 등을 치료하므로<sup>7)</sup> 脾虛, 陽虛, 瘀血 등의 증상을 개선할 것으로 기대할 수 있다.

한약은 君臣佐使의 개념에 따라 여러 약재를 조합하는 것으로 그 효능을 크게 할 수 있으며, 비만증의 병기는 痰飲, 脾虛, 氣虛, 陽虛 등이고<sup>5)</sup> 소갈증은 그 병기가 脾胃의 虛와 陽明燥熱의 太過에 있으므로<sup>8)</sup> 비만에서 소갈로의 전변을 억제하기 위해서는 燥濕健脾하는 약재를 君으로 하여 脾虛를 막고,

清熱瀉火를 臣으로 하여 陽明燥熱을 瀉하며, 補陽暖脾를 佐使로 하여 脾胃陽虛를 개선하면 치료효과를 거둘 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 燥濕健脾하는 蒼朮과 清熱瀉火, 生津潤燥하는 지모 및 補元陽, 暖脾胃하는 육계를 조합하여 복합추출물을 제조하고, 고지방식이로 비만에 의한 제2형 당뇨병이 발생한 마우스 모델에서의 당뇨증상 개선 및 근육대사 조절작용을 평가하여 그 효과를 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 蒼朮, 지모, 육계는 광명당 제약(울산, 한국)으로부터 규격약재를 구입한 뒤 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선하여 추출물 제조에 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM), penicillin/streptomycin(P/S, Corning, NY, USA), Fetal bovine serum(FBS), horse serum(HS) (Merck Millipore, Temecula, CA, USA), Anti-Sirt1, TFAM, NRF1, AMPK, phospho-AMPK, ACC, phospho-ACC(Cell signaling, Danvers, MA, USA), Anti-MHC(Santa Cruz, Dallas, MA, USA), Anti-PGC1 $\alpha$  등이 있으며, 사용된 기기로는 약재추출기(Daihan scientific, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd, Japan), 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea), 혈당측정기(Accu-Check, Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim, Germany), 자동혈액분석기(Automatic clinical biochemistry analyser, FDC7000i, Fujifilm Co, Tokyo, Japan), 자동광광장치(ChemiDoc., Biorad, USA), 광학현미경(LEICA, Wetzlar, Germany), Microtiter plate reader(ASYS, Austria) 등의 기기를 실험에 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 추출물 제조

蒼朮, 지모, 육계는 표1의 구성에 따라 혼합하여 용기에 넣고 정수된 물 1.6L와 함께 95℃에서 3시간동안 1차 추출한 후 같은 비율로 2차 추출을 실시하였다. 추출물은 1호 와트만 거름종이(Whatman paper filter No.1)로 거르고, 회전식 감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 이때 수율은 42.15%였다. 혼합추출물(DM1)은 냉장보관하면서 실험 직전 생리식염수에 적정 농도로 완전 용해시킨 후 동물실험 및 세포실험을 위한 약물로 사용하였다.

Table 1. Composition of DM1

약재명	학명 (Scientific name)	생약명 (Latin name)	비율 (g)	수율 (%)
蒼朮	<i>Atractylodes lancea</i>	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	80	
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	40	42.15
육계	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Cinnamomi Cortex</i>	40	

2) 당뇨병 동물모델 제작

수컷 5주령 C57BL/6계 마우스(18-19 g)를 (주)코아텍 (Pyeongtaek, Korea)로부터 구입하여 1주일 간 순화시킨 후 당뇨병 동물모델 제작에 사용하였다. 모든 실험기간 동안 12 시간 낮과 12시간 밤의 주기와 23±2℃ 온도, 50±10 % 습도가 유지되는 사육시설에서 정수된 물을 급수하였다. 당뇨병 모델을 유발하는 동안 정상군은 일반 고형사료(3.1 kcal 14% protein; Teklad, Envigo, WI, USA)를 공급하였고, 당뇨병 유발군은 고지방사료(5.24 kcal 60% fat, 30% carbohydrate; Teklad, Envigo)를 16주 간 섭취시켰다. 모든 실험동물의 관리 및 처치는 식약처 동물보호법 13조 규정 및 동국대학교 동물 실험윤리위원회로부터 심의(IACUC-2019-3)를 받아 사용하였다.

정상군을 제외한 모든 실험군에 고지방식이(high fat diet, HFD)를 급여한 후 10% 이상 몸무게 증가가 일어난 개체들을 선별하여 당뇨병 유발 대조군(HFD), 대조군에 DM1 추출물을 500 mg/kg/body weight (b.w.)를 투여한 약물군(DM1) 및 항당뇨약인 Metformin을 500 mg/kg 용량으로 투여한 양성 대조군(Met)으로 나누고, 각 군 당 5마리씩 배치하였다. 약물 투여군은 고지방식이 급여를 12주 간 실시한 후 4주 동안 고지방식이를 유지하면서 매일 1회씩 정해진 시간에 경구 투여하였다.

모든 실험 종료 후 실험동물을 12시간 절식시킨 후 의료용 산소 30%, 아산화질소 70% 혼합 이소플루란(isoflurane)을 흡입시켜 마취하여 복대 정맥으로부터 혈액을 수집하였으며, 희생시켜 간과 췌장 조직을 분리하였다.

3) 생리현상 변화 측정

당뇨병 발생에 따른 생리현상 변화를 관찰하기 위해 약물 투여 1주째 및 16주째에 체중 변화를 측정하였다. 섭취량 변화 (food intake)를 측정하기 위해 매 주 모든 동물에게 일정한 양의 사료를 제공하고 남은 잔여량을 측정하였으며, 실험 기간 동안 섭취한 총열량(calorie intake, Kcal)을 계산하였다. 음수량(water intake) 변화는 모든 동물에게 일정한 양의 물을 공급한 후 남은 잔여량을 측정함으로써 계산하였다.

4) 혈액지표 변화 측정

혈당 변화를 확인하기 위해 약물 투여기간 동안 매주 1회 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취, 혈당측정기(Accu-Check, Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 혈당을 측정하였으며, 실험 종료일 전날 12시간 공복 후 경구포도당부하검사(Oral glucose test, OGTT)를 실시하여 내당능장애 발생 정도를 측정하였다.

실험 종료 후 수집한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 포도당 (glucose), 인슐린(insulin), 총 콜레스테롤(total cholesterol), 중성지방(triglyceride), HDL-콜레스테롤 및 간 손상지표인 AST와 ALT의 농도를 자동혈액분석기(Automatic clinical biochemistry analyser) 및 enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) kit를 이용하여 측정하였으며, 각 마커의 표준용액을 이용한 standard curve를 통해 농도를 계산하였다.

5) 조직병리 변화 관찰

실험 종료 후 간(Liver)과 췌장(pancreas) 조직을 분리하여 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 이상 고정시킨 후 10~30% sucrose 용액으로 가라앉히고, 자동조직과정 처리기를 통해 탈수, 투명, 침투화 하였다. 이를 파라핀으로 포매한 후 조직절편기(microtome)를 이용하여 4~6 um 두께 절편으로 제작하였다. 조직절편을 슬라이드에 부착시킨 후 각 조직의 H&E 염색을 위하여 xylene으로 먼저 포매된 파라핀을 제거하고, hematoxylin 용액으로 6분간 염색, 이를 0.1~1% HCl이 각각 포함된 75% alcohol로 수세한 후 eosin 용액으로 3분 간 대조 염색을 실시하였다. 염색된 슬라이드는 95~100% 알코올로 탈수와 투명과정을 거친 후 permount로 봉입하고 구조적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 세포배양

실험에 사용된 세포는 마우스의 골격근세포주(mouse skeletal muscle cell line)로 미분화상태의 근아세포인 C2C12 세포를 ATCC사(CRL-1772™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (P/S)이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% Horse serum(HS)와 1% P/S이 함유된 DMEM을 매일 1회씩 총 5일간 교체함으로써 미분화상태의 근아세포(myoblasts)를 근관세포(myotubes)로 분화시켜주었으며, 분화 4일과 5일차에 DM1 복합추출물을 0.5, 1, 2 mg/ml 또는 대조약물로서 항당뇨약인 메트포민(Metformin)을 2.5 mM/ml 처리하였다.

7) 세포독성평가

C2C12 세포에서 DM1 복합추출물의 독성 농도를 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 즉, C2C12 myoblasts (2×10<sup>4</sup> cells/well)를 96-well culture plate에 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 하루 동안 배양한 후 DM1 복합추출물을 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 각 well 당 MTT 용액을 10 μl 씩 넣어 2 시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였다. 이후 발색정도를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성정도는 세포만 배양한 대조군에서의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability)를 계산하였다.

8) Western Blot

C2C12 세포에서 발현되는 근육분화(Myogenin, MHC), 에너지대사(PGC1α, Sirt1, NRF1, TFAM), 에너지 항상성 유지(ACC, AMPK)의 단백질에 대한 DM1 복합추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 즉, C2C12 세포를 60 mm culture dish에서 하룻밤 배양한 다음 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% HS와 1% P/S이 함유된 DMEM을 매일 1회씩 총 5일간 교체함으로써 미분화상태의 근아세포를 근관세포로 분화시켜주었으며 분화 4일과 5일차에 서로 다른 농도의 DM1 복합추출물(0.5, 1, 2 mg/ml) 및 대조약물인 Metformin(2.5mM/ml)을 처리해주었다. 각

세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 RIPA buffer를 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄한 후 4℃, 14,000rpm에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 수집하여 Bradford's assay 용액으로 단백질의 농도를 측정 한 후 30 µg 단백질을 SDS-PAGE 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 5% skim milk에 담겨 상온에서 3시간 동안 blocking 하였다. 여기에 5% skim milk에 희석 한 각 단백질의 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 반응시켰으며, 1x TBST buffer(Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20, pH 7.5)를 이용하여 15분씩 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체와 실온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 1x TBST로 3회 세척한 후 ECL 용액으로 염색하고 자동감광 장치(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용해서 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 각 단백질의 밴드를 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 β-actin의 발현 정도와 비교한 발현 비율로 계산하여 histogram으로 나타내었다.

9) 통계분석

실험결과는 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용해 histogram으로 나타내었고 유의성을 one-way ANOVA와 Turkey's test를 통해 검정하여 95% confidence interval 이상인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 당뇨병 동물모델에서의 개선 효과

1) 생리변화에 대한 효과

DM1이 체중과 칼로리 변화 및 수분 섭취에 미치는 영향을 확인한 결과, 체중변화에서는 정상군에 비해 고지방식이 16주 실시한 당뇨병 유발 대조군(HFD)에서 유의한( $p < 0.001$ ) 체중 증가가 관찰되었으며, 4주 간 DM1을 투여한 군(DM1 500 mg/kg)에서는 대조군에 비해 유의한 감소가 관찰되지 않았고, 대조약물인 메트포민 투여군(Met 500 mg/kg)에서는 유의한( $p < 0.001$ ) 체중 감소가 확인되었다(Fig. 1A). 칼로리 섭취량(calories intake) 변화에서는 정상군에 비해 당뇨병 유발 대조군에서 유의적인( $p < 0.01$ ) 증가가 나타났고, 이는 DM1( $p < 0.05$ )과 메트포민( $p < 0.001$ ) 투여에 의해 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 또한 수분 섭취량(water intake) 변화에서는 대조군에서 정상군 대비 유의적인( $p < 0.001$ ) 감소가 관찰되었고, 대조군에서의 수분 섭취량 감소는 DM1( $p < 0.05$ )과 메트포민( $p < 0.01$ ) 투여에 의해 유의적으로 증가하였다(Fig. 1C). 따라서 고지방식으로 당뇨병이 유발된 마우스에 DM1의 투여는 비만에 의한 칼로리 증가를 감소시키고, 수분 섭취 증가 변화를 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

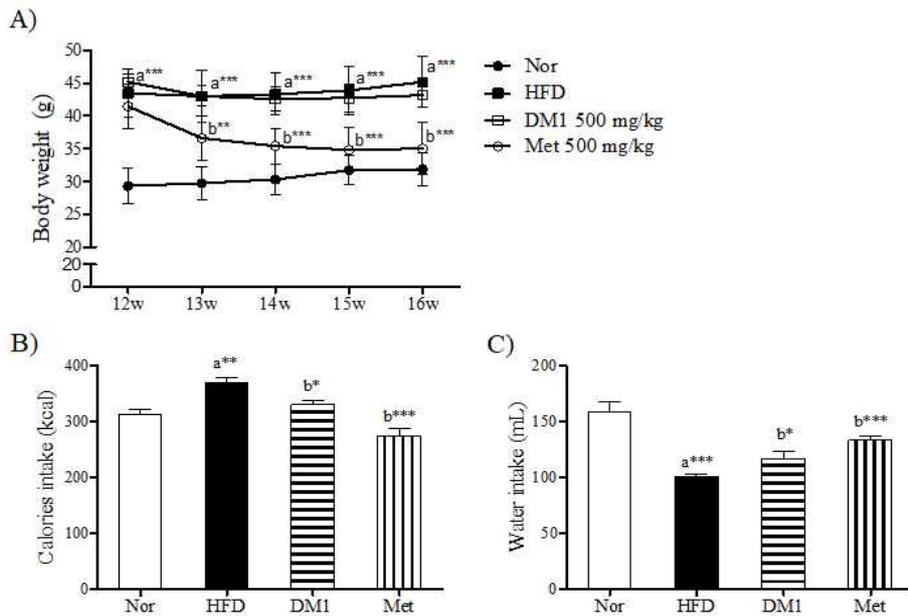


Fig. 1. Effects of DM1 extract on the physiological changes in HFD-induced diabetic mice. Mice were HFD for 12 weeks and then administrated DM1 extract at 500 mg/kg or metformin at 500 mg/kg for 4 weeks. (A) the body weight was measured in mice once a week. (B) Calorie intake and (C) water intake were measured in mice at 16 week. Data were presented as mean±SD (n=5 per a group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. normal (a) or diabetic control group (b).

2) 혈당변화에 대한 효과

고지방식이 유도 당뇨병 마우스에서 DM1의 혈당 증가 변화에 대한 효과를 확인하기 위하여 공복혈당검사 및 경구당부하 검사(OGTT)를 실시하였다. 먼저 공복혈당검사(fasting blood glucose, FBG)에서는 정상군에 비해 당뇨병 유발 대조군에서 유의적으로( $p < 0.001$ ) 증가하였으며, 이러한 증가는 DM1

및 메트포민 투여에 의해 감소하였으나 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 그러나 OGTT에서는 대조군에 비해 DM1 투여 15분( $p < 0.01$ ), 30분( $p < 0.001$ ), 60분( $p < 0.01$ )에 유의적인 혈당 감소가 관찰되어(Fig. 2B) DM1의 투여가 내당능장애를 개선시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

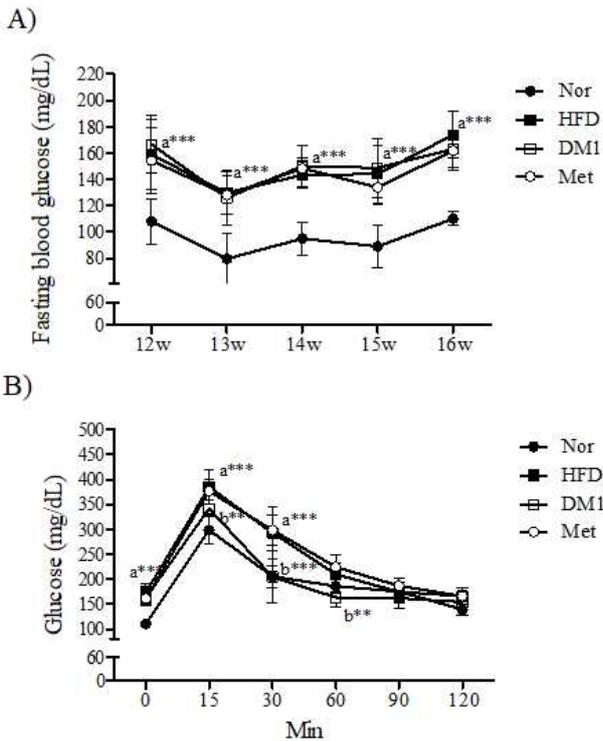


Fig. 2. Effects of DM1 extract on the change of blood glucose in HFD-induced diabetic mice. Mice were HFD for 12 weeks and then administrated DM1 extract at 500 mg/kg or metformin at 500 mg/kg for 4 weeks. (A) the levels of fasting blood glucose were measured in whole blood of mice once a week during administration for 4 weeks. (B) the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in mice at 16 week Data were presented as mean±SD (n=5 per a group). \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. normal (a) or diabetic control group (b).

### 3) 혈액지표 변화에 대한 효과

고지방식이 유도 당뇨병 마우스에서 DM1의 혈액지표 변화에 미치는 효과를 확인하기 위해 혈청으로부터 포도당(glucose), 인슐린(insulin), 중성지방(triglyceride), 고밀도 지질단백질(HDL-cholesterol) 및 간 손상지표인 아스파테이트 아미노전이효소(aspartate amino-transferase, AST), 알라닌 아미노전이효소(alanine amino-transferase, ALT) 수치를 측정하였다. 그 결과, 정상군에 비해 당뇨병 유발 대조군에서 포도당, 인슐린, 중성지방, 고밀도 지질단백질, AST 및 ALT의 유의적인( $p < 0.001$ ) 증가가 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 혈액지표들의 변화는 DM1 투여에 의해 유의적인 혈당 감소( $p < 0.01$ , Fig. 3A), 중성지방 감소( $p < 0.01$ , Fig. 3C) 및 AST( $p < 0.01$ , Fig. 3E), ALT( $p < 0.05$ , Fig. 3F)의 감소 및 인슐린 분비 증가( $p < 0.05$ , Fig. 3B)와 고밀도 지질단백질 수치의 증가( $p < 0.05$ , Fig. 3D)를 유도하였다. 또한 메트포민 투여군에서도 유의적인 혈당감소, 인슐린 감소, AST와 ALT의 감소를 나타내었다. 따라서 고지방식이로 당뇨병이 유발된 마우스에 DM1의 투여는 혈당과 중성지방 증가를 감소시키고 인슐린과 고밀도 지질단백질 분비를 증가시킴으로써 혈당장애를 개선시킬 수 있으며 간 손상을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

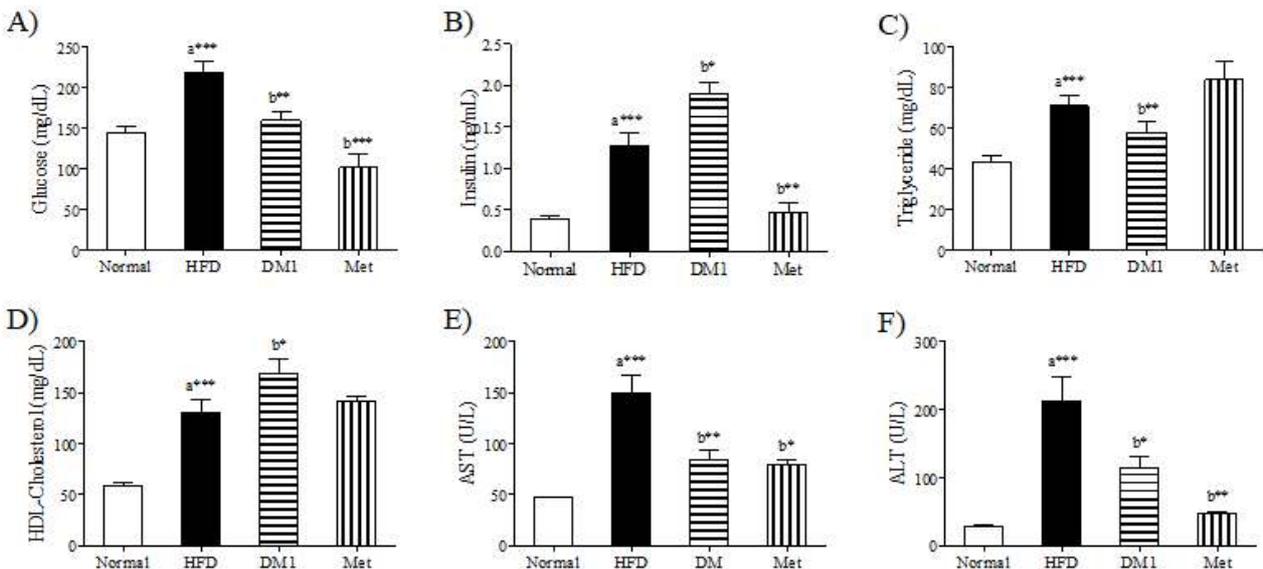


Fig. 3. Effects of DM1 extract on the change of serological markers in HFD-induced diabetic mice. Mice were HFD for 12 weeks and then administrated DM1 extract at 500 mg/kg or metformin at 500 mg/kg for 4 weeks. The levels of glucose (A), insulin (B), triglyceride (C), HDL-cholesterol (D), AST (E), and ALT (F) were measured in the sera of mice at 16 week. Data were presented as mean±SD (n=5 per a group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs. normal (a) or diabetic control group (b).

### 4) 간과 췌장 조직의 구조적 변화에 대한 효과

고지방식이 유도 당뇨병 마우스에서 DM1이 당뇨병으로 인한 간과 췌장 조직 손상을 개선시킬 수 있는지 확인하기 위하여

각 조직을 분리한 후 H&E 염색을 실시하였다. 결과, 정상군에 비해 대조군의 간에서 많은 지방 축적(lipid droplets)이 관찰되었으며 이는 DM1과 메트포민 투여에 의해 감소되는 것을

관찰하였다(Fig. 4A). 또한 췌장조직에서는 정상군에 비해 대조군에서 랑게르한스섬의 크기가 증가하는 것으로 관찰되었고, DM1의 투여는 대조군과 유사한 형태를 나타내었으며 메트포민의 투여는 다소 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4B). 이러한 결과는 혈청 내 인슐린 분비 변화(Fig. 3B)에서의 결과와

유사한 것을 알 수 있었다. 따라서 고지방식으로 당뇨병이 유발된 마우스에 DM1의 투여는 지방간 변화를 개선시키고, 췌장 랑게르한스섬에서의 인슐린 분비를 자극할 수 있는 것으로 나타났다.

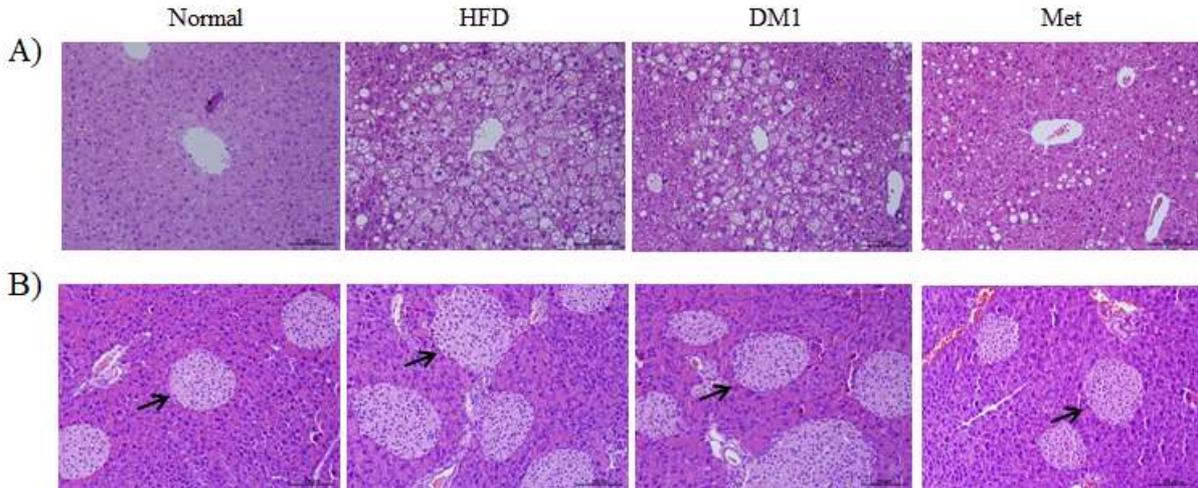


Fig. 4. Effects of DM1 extract on the histological change of liver and pancreas in HFD-induced diabetic mice. Mice were HFD for 12 weeks and then administrated DM1 extract at 500 mg/kg or metformin at 500 mg/kg for 4 weeks. The histological changes of liver (A) and pancreas (B) were observed under microscope after H&E staining (x200). Arrows present Langerhans' islets (B).

## 2. 근육세포에서의 조절 기전

### 1) 세포독성에 대한 영향

마우스의 골격근세포인 C2C12 myoblasts에서 DM1 복합 추출물에 의한 독성정도를 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 DM1 복합추출물을 2 mg/ml 농도까지 처리하였을 때 세포생존도의 감소가 관찰되지 않았으며, 3 mg/ml 농도 처리군에서 무처리군에 비해 유의적인( $p < 0.01$ ) 세포생존도 감소가 관찰되었다(Fig. 5). 따라서 이후 실험에서는 독성이 없는 농도범위(0.5, 1, 2 mg/ml)에서 수행하였다(Fig. 5).

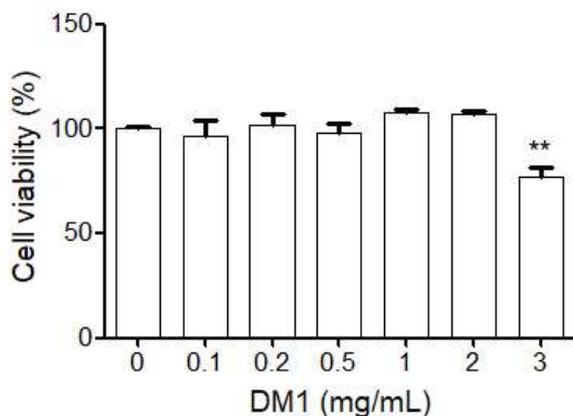


Fig. 5. Effect of DM1 extract on cell viability in C2C12 myoblasts. Cells were treated with DM1 extract at 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 and 3 mg/ml for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Data represents mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  vs. non-treated cells.

### 2) 근육 분화 및 미토콘드리아-매개 에너지대사 조절 단백질 발현에 대한 효과

골격근세포에서 DM1 복합추출물의 근 분화유도 효과를 확인하기 위해 C2C12 myoblasts를 myotubes로 분화시킨 후 성숙한 근육세포에서 발현되는 MyHC 단백질의 발현을 western blot 방법으로 확인하였다. 그 결과, MyHC의 발현은 DM1 복합추출물을 처리하지 않은 세포에 비해 DM1 복합추출물 0.5 mg/ml( $p < 0.05$ ), 1 mg/ml( $p < 0.05$ ), 2 mg/ml( $p < 0.01$ ) 처리에 의해 유의적인 발현 증가를 나타내었다(Fig. 6A). 한편, 미토콘드리아-매개 에너지대사 조절 단백질인 PGC1 $\alpha$ , Sirt-1, NRF-1의 발현에서는 DM1 복합추출물 처리 농도에 의존적으로 이들의 발현이 증가하였으며, 대조약물인 메트포민 처리군에서도 이들 단백질의 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 6B). 또한 에너지대사 조절 신호전달분자인 AMPK의 인산화 발현 변화에서도 DM1 복합추출물의 처리는 약물을 처리하지 않은 군에 비해 인산화 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6C). 따라서 DM1 복합추출물은 근육세포에서 근 분화를 촉진할 수 있으며, 미토콘드리아-매개 에너지조절 단백질들의 발현 증가를 유도함으로써 근육 기능 증진에 도움을 줄 수 있는 것으로 나타났다.

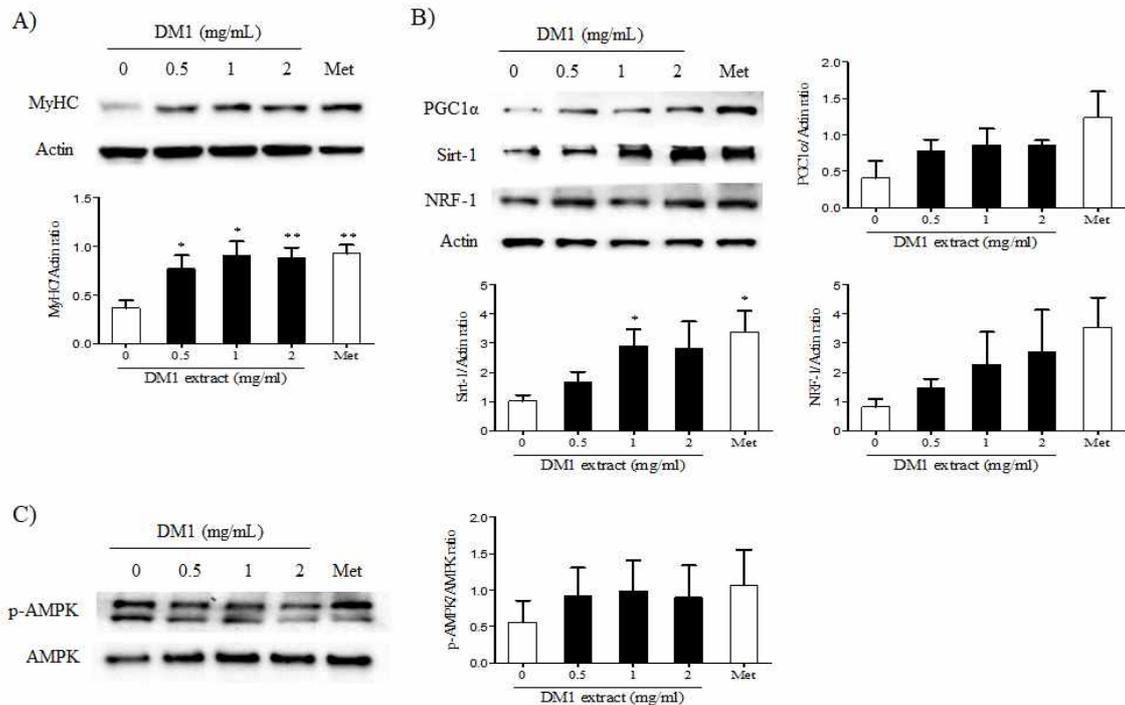


Fig. 6. Effects of DM1 extract on the expression of MyHC, PGC1 $\alpha$ , Sirt-1 and NRF-1 and the AMPK phosphorylation in C2C12 myotubes. Cells were treated with DM1 (0.5, 1, and 2 mg/ml) or metformin (2.5 mM/ml) for 24 hr. The expressions of MyHC (A), PGC1 $\alpha$ , Sirt-1 and NRF-1 (B), and the phosphorylation of AMPK (C) were determined by western blotting by western blotting, respectively. All data were presented as the means  $\pm$ SD of three independent experiments, M, metformin-treated cells. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 vs. non-treated cells.

## IV. 고 찰

제2형 당뇨병은 일반적으로 인체 조직에서 인슐린 저항성이 유발되는 가운데 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비가 감소할 때 발생된다고 알려져 있으며 비만과 연관성이 높은 것으로 보고 있다<sup>2)</sup>. 따라서 비만에서 당뇨병으로 이어지는 병리기전의 차단은 당뇨 예방과 치료에 있어 중요한 목표가 되고 있다. 특히 비만 환자에서의 과도한 지방 유입은 각종 조직(세포)에서의 미토콘드리아 과활성화와 이에 의한 활성산소종(ROS) 증가를 통한 미토콘드리아 기능 저하 및 세포 염증, AMPK 수준 감소 등을 통해 인슐린 저항성으로 이어지게 된다<sup>9)</sup>. 그러므로 산화 스트레스와 염증 감소, 조직에서의 대사기능 회복을 통한 인슐린 저항성 개선이 비만에서 당뇨병으로 이환되는 것을 억제하는 중요 방법이 될 수 있다. 현재 비만의 가장 중요한 원인으로 제시하고 있는 포화지방의 과도한 섭취는 췌장 랑게르한스 섬에서의 지방 축적으로 인한 독성 작용을 나타내고<sup>10)</sup>, 베타세포 손상은 당뇨병 이환에 결정적인 요소로 작용할 수 있다<sup>11)</sup>.

한의학에서 현대의 고지방 섭취와 과량의 식이방식은 食積에 해당한다고 볼 수 있으며, 식적은 비를 손상하게 된다(食積傷脾)<sup>12)</sup>. 현대 당뇨병에 대해서는 東醫寶鑑 消渴門에서는 다양한 소갈 병증으로 설명하고 있으며, 소갈에는 上消, 中消, 下消의 3가지 유형이 있어 각각 ‘上消者, 舌上赤裂, 大渴引飲, 膈消是也.’, ‘中消者, 善食而瘦, 自汗, 大便硬, 小便數, 所謂脾成爲消中者, 是也.’, ‘下消者, 煩燥引飲, 耳輪焦乾, 小便如膏, 腿膝枯細, 所謂焦煩水易虧者, 是也’라 하여 구분하고 있다. 한편 소갈의 치료 방법에 있어서는 ‘養肺降火生血爲主’, ‘肺爲

五藏華蓋, 若下有煖氣蒸則肺潤... 火力者, 腰腎強盛, 常須煖補腎氣’라 하여, 補肺, 清熱, 生血, 補腎陽을 중요시하고 있다<sup>6)</sup>. 한편 [黃帝內經 素問 氣厥論]에서 나타나는 熱病의 전변과정은 ‘脾移熱於肝則爲驚衄, 肝移熱於心則死, 心移熱於肺傳爲鬲消, 肺移熱於腎傳爲柔瘕, 腎移熱於脾傳爲虛腸澼, 死不可治’라 하여 脾, 肝, 心, 肺, 腎의 순서를 따른다고 하였다<sup>13)</sup>. 이와 같이 한의학에서 소갈은 열병의 범주로 열병의 시작이 脾에서 시작하므로 그 치료에는 반드시 補脾가 포함되어야 함을 생각해 볼 수 있다.

본 연구에서는 12주의 고지방 식이를 통해 비만형 당뇨병을 유발시킨 마우스에 창출, 지모, 육계를 혼합, 추출한 복합약물(DM1)을 4주 간 투여하여 DM1의 항당뇨 효과 및 약리기전을 확인하였다. 본 연구에서 DM1은 섭취에 의한 칼로리와 음수량의 증가, 혈당과 당 내성 증가를 감소시켰으며, 혈액지표에서 포도당과 중성지방 수치를 낮추고, 인슐린 및 고밀도 지질단백질의 분비를 증가시킴으로써 혈당조절 효과를 나타내었다. 또한 H&E 염색을 통한 간과 췌장 조직의 구조적 변화 관찰에서 DM1 투여는 간 조직에서의 지방방울(lipid droplet) 축적 감소를 통한 지방간 형성 억제효과를 확인할 수 있었으며, 췌장 조직에서는 랑게르한스섬의 크기가 정상군에 비해 16주 간 고지방식이를 실시한 대조군에서 증가하며 이는 대조약물인 메트포르민 투여에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 특히 DM1 투여군의 랑게르한스섬 크기는 대조군과 큰 차이가 관찰되지 않았는데 이는 혈청 내 인슐린 수치가 정상군에 비해 대조군에서 크게 증가하였고, DM1 투여에 의해 대조군 대비 유의적인 증가를 나타낸 결과와 일치한다. 비만은 내당능장애를 발생시

키며 흔히 인슐린 저항성이 동반하는데 이는 췌장 베타세포에서의 인슐린 분비능의 보상적 증가를 유도함으로써 혈당을 조절하게 된다. 그러나 이러한 조절작용에도 인슐린 저항성을 극복할 수 없는 시점이 되면 혈당 상승과 함께 제2형 당뇨병이 발생하게 된다. 따라서 DM1은 고지방식이로 내당능장애가 발생함에 따라 요구되는 인슐린의 보상적 증가를 촉진함으로써 인슐린 저항성 개선을 통해 정상적 혈당유지에 도움을 줄 수 있으며, 이는 DM1이 현재 치료제로 사용되고 있는 췌장 베타세포에 직접 작용하는 설펜요소제(sulfonylurea) 혈당강하제들(glibenclimide, gliclazide)과 유사한 효과를 나타낼 수 있음을 의미하지만 이에 대한 약리기전 연구는 좀 더 구체적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 근육세포실험에서는 DM1이 근세포 분화마커인 MyHC의 발현을 증가시킴으로써 근분화를 촉진할 수 있음을 확인하였고, 근육 내 에너지대사를 조절하는 미토콘드리아-매개 조절단백질인 PGC1 $\alpha$ , Sirt-1, NRF-1 및 AMPK 발현 증가를 통해 당대사를 촉진함으로써 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 그러나 DM1의 구체적 에너지대사 조절작용 확인을 위해서는 근육세포에서의 다양한 근 분화조절인자들(myogenic regulatory factors, MRFs)인 Myogenin, MyoD, Myf5, MRF4 등에 대한 조절 작용과 미토콘드리아-매개 에너지조절인자들(mitochondrial biogenesis markers)인 PGC1 $\alpha$ , Sirt-1, NRF-1, TFAM 등의 단백질 발현 변화 외 실제적 에너지 양(ATP)의 증가와 포도당 수송체들(glucose transporters)의 발현 변화 등에 대한 추가 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 그러나 본 연구를 통해 DM1이 당뇨병 유발 시 동반될 수 있는 근육량 감소나 기능 저하에서 근 분화를 촉진시키거나 에너지대사 증진을 통한 인슐린 저항성 개선에 도움을 주어 비만이나 당뇨병성 근감소증 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.

DM1의 구성약물 중 창출은 전통적으로 燥濕健脾, 祛風散寒하는 효과가 있다고 알려져 있으며<sup>7)</sup>, 최근 현대약리 연구를 통해 항암작용, 무산소증에 대한 보호효과, 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor) 억제 효과, 항고혈압 작용, 콜라겐 유도 경로에 대한 항혈소판 효과, 위비움 억제 및 소장 운동 증가 효과, 위염 억제작용, 항염증, 살균, 해열 효과 등 다양하게 보고되고 있다<sup>14)</sup>. 특히 주요 성분 중 하나인 stigmasterol은 근육과 백색지방 세포에서 GLUT4의 발현을 증가시키고, KK-Ay 비만형 당뇨병 마우스에서 인슐린 저항성과 경구 당 부하 억제, 공복혈당 및 혈중 중성지방, 콜레스테롤 수치를 감소시키는 것이 확인되어 당뇨병 치료에 효과적인 성분으로 알려져 있다<sup>15,16)</sup>. 이 외에  $\beta$ -Eudesmol은 위 장관에서의 도파민 D2 및 5-HT3 수용체 억제를 통한 위 장관 운동 조절효과<sup>17)</sup> 및 atractylenolide III 성분과 함께 뇌에서 5-HT2A 수용체 억제를 통한 뇌신경보호효과가 보고된 바 있다<sup>18)</sup>. 이러한 창출의 다양한 효과는 지방간 생성과 염증 억제 및 갈색지방에서의 에너지생성 증가, 지방합성 억제 및 adiponectin 분비 증가 등 다양한 약리작용을 통해 항비만, 항당뇨 효과를 나타낼 수 있음을 의미한다<sup>19)</sup>. 지모는 전통적으로 淸熱瀉火, 生津潤燥, 潤腸通便하는 효능을 지닌 약물로 알려져 있으며<sup>7)</sup>, 최근 연구에서 항염증<sup>16,21,22-24)</sup>, 인슐린 저항성 개선<sup>23,25,26)</sup>, 인슐린 분비 촉진<sup>27)</sup>, 간에서의 당대사 활성

화 및 지방 생성 억제<sup>28)</sup>, 당뇨병성 안구병증 억제<sup>29)</sup>, 당뇨병성 혈관손상 억제<sup>30)</sup>, 항혈소판, 항혈전<sup>31)</sup> 및 뇌경색에서의 신경보호<sup>32)</sup>, 파골세포 분화억제<sup>33)</sup>, 항우울<sup>34)</sup> 효과 등 다양하게 보고되고 있다. 또한 지모의 항염증과 항당뇨 효과는 NF- $\kappa$ B 경로<sup>16,21,22,24,25,33)</sup>와 p38 MAPK<sup>16,21,25)</sup>, PI3K/AKT 신호전달 경로 억제<sup>22,24)</sup> 및 AMPK 활성화<sup>23,30)</sup> 작용과 연관되는 것으로 알려져 있고, 특히 AMPK의 활성화는 일반적으로 NF- $\kappa$ B와 p38 MAPK의 경로 억제로 이어지므로<sup>35)</sup> 지모의 주된 약리작용은 AMPK 활성화에 있는 것으로 보이며 이는 근육세포에서의 Sirt-1/PGC1 $\alpha$  경로 활성화로 연결되어 생체 에너지대사 증진을 통한 인슐린 저항성 개선과 항당뇨 효과를 나타낼 것으로 보인다. 최근 연구에서는 지모추출물의 인슐린 분비 촉진 효과가 pertussis toxin(PTX)-sensitive Gi-protein 또는 Ge-protein과 관련되어 있으며<sup>27)</sup>, 항우울증 효과는 뇌 조직에서의 monoamine oxidase(MAO) 활성 저해와 관련이 있다고 보고되고 있다<sup>34)</sup>. 한편 육계(C. cassia)는 전통적으로 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈하는 효능을 가진 것으로 알려져 있고<sup>7)</sup>, 근래에는 항암, 항염증, 진통, 항비만 및 항당뇨, 항균 및 항바이러스, 심혈관 보호, 화학적 조직손상 억제, 신경보호, 면역 조절, tyrosinase 억제, xanthine 억제, 성기능 보호 등 광범위한 효과가 보고되고 있다<sup>36)</sup>. 특히 항암 효과 측면에서는 insulin-like growth factor-1 경로 차단에 의한 PI3K/Akt 경로 활성 억제 및 MMP-2 발현 억제<sup>37)</sup>와 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도 상승에 의한 세포자멸사 유도 등이 보고되고 있고<sup>38)</sup>, TNF- $\alpha$ , IL-1 등과 관련된 관절 염증 억제 효과가 보고되고 있으며<sup>36,39)</sup>, NF- $\kappa$ B 경로 억제에 의한 골관절염 억제<sup>40)</sup>, 동맥경화 억제<sup>41)</sup> 및 신경염증 억제<sup>42,43)</sup>, 췌장세포 보호<sup>44)</sup> 등도 보고된 바 있다. 또한 육계 추출물은 지방 세포의 분화과정에서 갈색 지방의 분화를 촉진시키고<sup>45)</sup>, AMPK 경로를 통해 지방 및 근육 조직의 에너지 대사를 활성화시키는 것으로 조사되었다<sup>45,46)</sup>. 한편 육계는 육계추출물의 5-HT1A 수용체 자극<sup>47,48)</sup> 및 세로토닌 재흡수<sup>49)</sup>를 통한 항우울효과와 INS-1 베타세포에서의 인슐린 분비 촉진을 통한 제2형 당뇨병 개선 효과<sup>50)</sup>이 보고되었으며, 혈소판 응집 억제 효과<sup>51)</sup>이 보고되었다. 이러한 DM1 구성약물의 효능연구들을 바탕으로 DM1의 항당뇨 효과를 유추해볼 수 있으며, 본 연구를 통해 장기간의 고지방식이로 비만과 당뇨병이 유발된 마우스에서의 혈당조절과 인슐린 저항성 개선 효능 및 근 기능조절작용을 확인하였다. 따라서 DM1은 비만으로부터 당뇨로의 이환을 억제하는 약물로 활용되어질 수 있을 것으로 보인다.

## V. 결 론

본 연구에서는 고지방식이 유도 비만형 당뇨병 마우스에 창출·지모·육계 혼합추출물(DM1)의 당뇨증상개선 및 C2C12 근세포에서의 조절기전을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 당뇨병 마우스에서 4주 간 DM1 500 mg/kg을 투여하였을 때 비만에 의한 칼로리 섭취 증가를 유의적으로 감소시키고, 음수량 감소를 유의적으로 증가시켰다.

2. 당뇨병 마우스에서 DM1의 투여는 경구당부하검사에서 내당능장애 발생을 유의적으로 감소시켰으며, 혈장 내 포도당, 중성지방, AST, ALT 수치를 유의적으로 감소시키고, 인슐린, 고밀도 지질단백 수치를 유의적으로 증가시켰다.
3. 당뇨병 마우스에서 DM1의 투여는 간 조직에서 지방방울 증가를 통한 지방간 형성을 억제하였다.
4. C2C12 myotubes에서 DM1 0.5, 1, 2 mg/ml 처리는 근분화단백질인 MyHC의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 미토콘드리아-매개 에너지생합성 조절단백질인 PGC1 $\alpha$ , Sirt-1, NRF-1 및 인산화 AMPK의 발현을 증가시켰다.

본 결과로부터 창출·지모·육계 혼합추출물은 비만으로 인해 발생하는 내당능장애, 인슐린 저항성 및 당뇨증상을 개선시킬 수 있으며, 이는 근육세포에서의 에너지생성기전 조절과 연관이 있음을 알 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 2016년도 미래창조과학부(한국연구재단)의 연구비 지원으로 수행되었습니다(No.2016R1D1A2B01012117).

### References

1. WHO. Obesity and overweight. 2018 February 16. Available from : URL : <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014 ; 7 : 587-91.
3. Beals JW, Burd NA, Moore DR, van Vliet S. Obesity Alters the Muscle Protein Synthetic Response to Nutrition and Exercise. *Front Nutr*. 2019 ; 6 : 87.
4. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. Huaizhu Wu, Christie M. Ballantyne. *J Clin Invest*. 2017 ; 127(1) : 43-54.
5. PARK WH, Cha YY, Song YK, Park TY, Kim HJ, Chung WS, Hwang EH, Shin SW, Jang BH, Ko SG. Review Articles : The Review on the Study of Oriental Obesity Pattern Identification: Focused on Korean Research Papers. *J Kor Med Rehabi*. 2014 ; 24 : 83-93.
6. Korea Institute of Oriental Medicine. Dongui Bogam. Available from : URL : <https://mediclassics.kr/books/8/>
7. The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. The herbal medicine. Seoul

- : Younglimsa, 2016.
8. Kim KS, Kim BS. Study on the Mechanism of Wasting-thirst in Viewpoint of 'Viscera and Bowels' and 'Three Yin and Three Yang'. *Kor J Ori Med Physiol Pathol* 2012 ; 26(3) : 265~272.
9. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013 ; 7(1) : 14-24.
10. Acosta-Montaña P, García-González V. Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis. *Nutrients*. 2018 ; 10(4) : 393.
11. Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia*. 2011 ; 54(10) : 2506-14.
12. Jo HG, Kim BT. Literature Review on the Causes, Stages, and Treatment of Obesity. *J Haehwa Med* 1992 ; 1(2) : 61-71.
13. Kim JH, Jeong CH, Baik YS. A Study on Transmission and Transmutation of Disease in "Hwangjenaegyeong". *J Korean Med Class*. 2010 ; 23(2) : 205-37.
14. Koonrungsomboon N, Na-Bangchang K, Karbwang J. Therapeutic potential and pharmacological activities of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. *Asian Pac J Trop Med*. 2014 ; 7(6) : 421-8.
15. Jun X, Fu P, Lei Y, Cheng P. Pharmacological effects of medicinal components of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. *Chin Med*. 2018 ; 13 : 59.
16. Ji KY, Kim KM, Kim YH, Im AR, Lee JY, Park B, Na M, Chae S. The enhancing immune response and anti-inflammatory effects of *Anemarrhena asphodeloides* extract in RAW 264.7 cells. *Phytomedicine*. 2019 ; 59 : 152789.
17. Wang J, Huang M, Yang J, Ma X, Zheng S, Deng S, Huang Y, Yang X, Zhao P. Anti-diabetic activity of stigmasterol from soybean oil by targeting the GLUT4 glucose transporter. *Food Nutr Res*. 2013 ; 61(1) : 1364117.
18. Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of an *Atractylodes lancea* rhizome extract and a volatile component  $\beta$ -eudesmol on gastrointestinal motility in mice. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 141 : 530-6.
19. Murayama C, Wang CC, Michihara S, Norimoto H. Pharmacological effects of "jutsu" (*Atractylodis* rhizome and *Atractylodis lanceae* rhizome) on 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI)-induced head twitch response in mice (I). *Molecules*. 2014 ; 19(9) : 14979-86.
20. Oh CM, Park S, Kim H. Serotonin as a New

- Therapeutic Target for Diabetes Mellitus and Obesity. *Diabetes Metab J*. 2016 ; 40 : 89–98.
21. Kim BR, Cho YC, Le HTT, Vuong HL, Lee S, Cho S. Suppression of inflammation by the rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* via regulation of nuclear factor- $\kappa$ B and p38 signal transduction pathways in macrophages. *Biomed Rep*. 2017 ; 6(6) : 691–7.
  22. Wang Z, Cai J, Fu Q, Cheng L, Wu L, Zhang W, Zhang Y, Jin Y, Zhang C. Anti-Inflammatory Activities of Compounds Isolated from the Rhizome of *Anemarrhena asphodeloides*. *Molecules*. 2018 ; 23(10) : E2631.
  23. Zhao W, Wang M, Shao L, Liao M, Liu K, Huang F, Liu B. The total phenolic fraction of *Anemarrhena asphodeloides* inhibits inflammation and reduces insulin resistance in adipocytes via regulation of AMP-kinase activity. *Planta Med*. 2014 ; 80(2–3) : 146–52.
  24. Yuan YL, Lin BQ, Zhang CF, Cui LL, Ruan SX, Yang ZL, Li F, Ji D. Timosaponin B-II Ameliorates Palmitate-Induced Insulin Resistance and Inflammation via IRS-1/PI3K/Akt and IKK/NF- $\kappa$ B Pathways. *Am J Chin Med*. 2016 ; 44(4) : 755–69.
  25. Kim JY, Shin JS, Ryu JH, Kim SY, Cho YW, Choi JH, Lee KT. Anti-inflammatory effect of anemarsaponin B isolated from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* in LPS-induced RAW 264.7 macrophages is mediated by negative regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B and p38 pathways. *Food Chem Toxicol*. 2009 ; 47(7) : 1610–7.
  26. Miura T, Ichiki H, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Sasaki H, Okada M, Ishida T, Seino Y, Tanigawa K. Antidiabetic activity of the rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside. *Biol Pharm Bull*. 2001 ; 24(9) : 1009–11.
  27. Hoa NK, Phan DV, Thuan ND, Ostenson CG. Insulin secretion is stimulated by ethanol extract of *Anemarrhena asphodeloides* in isolated islet of healthy Wistar and diabetic Goto-Kakizaki Rats. *N. K. Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2004 ; 112(9) : 520–5.
  28. Lim J, Liu Z, Apontes P, Feng D, Pessin JE, Sauve AA, Angeletti RH, Chi Y. Dual mode action of mangiferin in mouse liver under high fat diet. *PLoS One*. 2014 ; 9(3) : e90137.
  29. Li X, Cui X, Wang J, Yang J, Sun X, Li X, Zhu Q, Li W. Rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* counteracts diabetic ophthalmopathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*. 2013 ; 27(8) : 1243–50.
  30. Zhao Q, Sun Y, Ji Y, Xu L, Liu K, Liu B, Huang F. Total polyphenol of *Anemarrhena asphodeloides* ameliorates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction by regulation of AMP-Kinase. *J Diabetes*. 2014 ; 6(4) : 304–15.
  31. Lu WQ, Qiu Y, Li TJ, Tao X, Sun LN, Chen WS. Antiplatelet and antithrombotic activities of timosaponin B-II, an extract of *Anemarrhena asphodeloides*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011 ; 38(7) : 430–4.
  32. Oh JK, Hyun SY, Oh HR, Jung JW, Park C, Lee SY, Park JH, Kim SY, Kim KH, Kim YK, Ryu JH. Effects of *Anemarrhena asphodeloides* on focal ischemic brain injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Biol Pharm Bull*. 2007 ; 30(1) : 38–43.
  33. Lee JS, Kim MH, Lee H, Yang WM. *Anemarrhena asphodeloides* Bunge ameliorates osteoporosis by suppressing osteoclastogenesis. *Int J Mol Med*. 2018 ; 42(6) : 3613–21.
  34. Ren LX, Luo YF, Li X, Zuo DY, Wu YL. Antidepressant-like effects of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae). *Biol Pharm Bull*. 2006 ; 29(13) : 2304–6.
  35. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev*. 2012 ; 11(2) : 230–41.
  36. Zhang C, Fan L, Fan S, Wang J, Luo T, Tang Y, Chen Z, Yu L. *Cinnamomum cassia* Presl: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology. *Molecules*. 2019 ; 24(21) : E3473.
  37. Li J, Teng Y, Liu S, Wang Z, Chen Y, Zhang Y, Xi S, Xu S, Wang R, Zou X. Cinnamaldehyde affects the biological behavior of human colorectal cancer cells and induces apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep*. 2016 ; 35(3) : 1501–10.
  38. Koppikar SJ, Choudhari AS, Suryavanshi SA, Kumari S, Chattopadhyay S, Kaul-Ghanekar R. Aqueous Cinnamon Extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. *BMC Cancer*. 2010 ; 10 : 210.
  39. Sharma H, Chauhan P, Singh S. Evaluation of the anti-arthritis activity of *Cinnamomum cassia* bark extract in experimental models. *Integr Med Res*. 2018 ; 7(4) : 366–73.

40. Xia T, Gao R, Zhou G, Liu J, Li J, Shen J. Trans-Cinnamaldehyde Inhibits IL-1 $\beta$ -Stimulated Inflammation in Chondrocytes by Suppressing NF- $\kappa$ B and p38-JNK Pathways and Exerts Chondrocyte Protective Effects in a Rat Model of Osteoarthritis. *Biomed Res Int*. 2019 ; 2019 : 4039472.
41. Li W, Zhi W, Zhao J, Li W, Zang L, Liu F, Niu X. Cinnamaldehyde attenuates atherosclerosis via targeting the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signaling pathway in high fat diet-induced ApoE-/- mice. *Food Funct*. 2019 ; 10(7) : 4001-9.
42. Zhao Y, Deng H, Li K, Wang L, Wu Y, Dong X, Wang X, Chen Y, Xu Y. Trans-cinnamaldehyde improves neuroinflammation-mediated NMDA receptor dysfunction and memory deficits through blocking NF- $\kappa$ B pathway in presenilin1/2 conditional double knockout mice. *Brain Behav Immun*. 2019 : S0889-1591(21)30105-9.
43. Fu Y, Yang P, Zhao Y, Zhang L, Zhang Z, Dong X, Wu Z, Xu Y, Chen Y. Trans-Cinnamaldehyde Inhibits Microglial Activation and Improves Neuronal Survival against Neuroinflammation in BV2 Microglial Cells with Lipopolysaccharide Stimulation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017 ; 2017 : 4730878.
44. Kwon KB, Kim EK, Jeong ES, Lee YH, Lee YR, Park JW, Ryu DG, Park BH. Cortex cinnamomi extract prevents streptozotocin- and cytokine-induced beta-cell damage by inhibiting NF- $\kappa$ B. *World J Gastroenterol*. 2006 ; 12(29) : 4331-7.
45. Kang NH, Mukherjee S, Yun JW. Trans-Cinnamic Acid Stimulates White Fat Browning and Activates Brown Adipocytes. *Nutrients*. 2019 ; 11(3) : E577.
46. Song MY, Kang SY, Kang A, Hwang JH, Park YK, Jung HW. Cinnamomum cassia Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice through the Increase of Muscle Energy. *Am J Chin Med*. 2017 ; 45(5) : 1017-31.
47. Yu HS, Lee SY, Jang CG. Involvement of 5-HT1A and GABAA receptors in the anxiolytic-like effects of Cinnamomum cassia in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 ; 87(1) : 164-70.
48. Jung YH, Kwon SH, Hong SI, Lee SO, Kim SY, Lee SY, Jang CG. 5-HT1A receptor binding in the dorsal raphe nucleus is implicated in the anxiolytic-like effects of Cinnamomum cassia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 ; 103(2) : 367-72.
49. Zada W, Zeeshan S, Bhatti HA, Mahmood W, Rauf K, Abbas G. Cinnamomum cassia: an implication of serotonin reuptake inhibition in animal models of depression. *Nat Prod Res*. 2016 ; 30(10) : 1212-4.
50. Verspohl EJ, Bauer K, Neddermann E. Antidiabetic effect of Cinnamomum cassia and Cinnamomum zeylanicum in vivo and in vitro. *Phytother Res*. 2005 ; 19(3) : 203-6.
51. Kim SY, Koo YK, Koo JY, Ngoc TM, Kang SS, Bae K, Kim YS, Yun-Choi HS. Platelet anti-aggregation activities of compounds from Cinnamomum cassia. *J Med Food*. 2010 ; 13(5) : 1069-74.