

자구자(*Hovenia dulcis* Thunb) 추출물이 Streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향

김정상^{1†} · 나창수¹ · 은종방²

¹동신대학교 한의과대학

²전남대학교 식품공학과

Effect of *Hovenia dulcis* Thunb Extract on the Hyperglycemic Mice Induced with Streptozotocin

Jeong-Sang Kim^{1†}, Chang-Soo Na¹ and Jong-Bang Eun²

¹College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

This study has been carried out to understand the effect of *Hovenia dulcis* on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin (STZ). Mice in control group were administered with 0.9% saline (2 mL/kg), and experimental groups were administered *Hovenia dulcis* extract (H1 group, 0.01 g/kg; H2 group, 0.04 g/kg) after hyperglycemic state was induced. Blood glucose concentrations of the H1 and H2 groups administered with *Hovenia dulcis* extract for 6 weeks were significantly ($p<0.01$), compared to control group. Blood glucose tolerance was more favorable in H1 and H2 groups than control group. The Langerhan's islet of pancreas was destructed by treatment of STZ in the control group, but pancreatic islet of the experimental groups was partially recovered from damage, and a number of insulin-positive cells were observed. A number of insulin-like growth factor-I and II (IGF-I and IGF-II) positive cells occurred in the acinar cells of H1 and H2 groups. These results suggest that administration of *Hovenia dulcis* extract help mice recover from the damage induced with STZ.

Key words: *Hovenia dulcis*, hyperglycemic mice, insulin, IGF

서 론

제1형 당뇨병의 발생은 체장 β -세포의 기능부전과 관련이 있다. 고혈당이 장기간 지속되면 β -세포의 기능은 점진적으로 나빠져 당-유발 인슐린 분비는 더욱 악화되고 β -세포의 탈파립이 뚜렷해지면서 β -세포의 수가 감소되기도 한다(1,2). β -세포들이 만성적인 고혈당에 노출되면 인슐린 유전자의 전사 기능이 떨어지게 되고 인슐린의 합성과 분비가 감소하여 혈액내 인슐린의 농도가 급격히 떨어진다(3,4). β -세포의 재생능은 나이가 많을수록 떨어지지만(5), Langerhan's islet (체장섬)에서 β -세포의 복제와 체장관내의 미분화된 β -세포 전구체의 성숙에 의하여 세포집단의 크기가 증가한다(6-9).

인슐린 양 성장인자(insulin-like growth factor, IGF)는 β -세포의 세포사(apoptosis)를 방지하는 생존인자로써 작용할 수 있으며, 여러 세포들에서 유사한 작용을 한다(10,11). IGF는 β -세포의 성장, 성숙, 및 생존하는 동안 세포의 기능에 관여한다. IGF-II의 mRNA는 태아기에 증가하다가 출

산 후 급격히 감소하지만, IGF-I의 mRNA 발현은 태아기에는 낮게 나타나다가 출산 후 점을 떼면서 증가한다(12). 즉, IGF-I과 II는 상호작용하여 성숙한 흰쥐의 인슐린 분비를 빠르게 조정한다(13). 최근에는 배자와 성체의 줄기세포로부터 인슐린을 생산하는 세포의 분화와 체장 줄기세포를 이용한 인슐린의 존성 당뇨병의 치료방법들이 연구되고 있다(14-16).

민간에서 건강기능성 식품으로 잘 알려져 있는 지구자나무(*Hovenia dulcis* Thunb)는 헛개나무라고도 불리우며 그 열매를 지구자라 한다. 이들은 숙취해소, 구갈, 구토, 사지마비 등의 치료에 유용한 것으로 알려져 있다(17). 현재까지 지구자에 관한 연구로는 해독 효능(18)과 간독소를 제거하는 물질에 관한 연구(19) 등이 이루어졌는데, 특히 Yoshikawa 등(20)은 지구자 잎에서 천연 항당물질(antisweet products)인 다섯 종류의 hodulosides을 밝힌 바 있다. 그러나 지구자가 β -세포가 파괴된 제1형 당뇨병에 미치는 영향에 관한 연구는 수행되어 있지 않다.

*Corresponding author. E-mail: jskim@dsu.ac.kr
Phone: 82-61-330-3512. Fax: 82-61-330-2900

제1형 당뇨병은 소아에서 흔히 발생하고 인슐린 분비기능이 거의 없다. 췌장의 β -세포들이 자가면역기전에 의해 점진적으로 파괴되기 때문에 증상이 없는 기간이 수년간 지속된다(21). 한의학에서 지구자는 그 성미가 맛은 달고 시며 성질은 평하다고 하였으며, 주로 주취, 번열, 구갈 등의 치료에 사용하였다(22). 본 연구는 지구자가 손상된 세포의 재생과 혈당조절에 미치는 영향을 규명하고자 streptozotocin(STZ)으로 유발된 고혈당 생쥐에 지구자 추출물을 6주 동안 투여한 후 체중, 혈당, 당내성 검사, 인슐린과 IGF의 면역조직화학을 실시하여 췌장섬 β -세포의 재생 및 인슐린의 존성 당뇨병에 미치는 효능을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 고혈당 유발

체중 25 ± 1 g의 8주령 웅성 생쥐(ICR strain)를 다물사이언스(주, 대전, 대한민국)로부터 구입하여 동물사육실에서 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다. 당뇨 유발은 12시간 동안 절식시킨 다음 각각의 생쥐에 STZ(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 50 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 복강 투여한 다음 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 1회 복강 투여하여 고혈당 생쥐를 유발하였다. 공복 시 정상 생쥐의 혈당이 70 mg/dL에서 유발 후 약 100 mg/dL인 것을 실험군으로 사용하였다.

약물 추출 및 실험군 분류

지구자 40 g를 중류수 600 mL에 넣고 중탕기에서 약 3시간 동안 끊임 후 농축기를 사용하여 100 mL로 농축하였다. 농축 후 동결 건조하여 2.3 g를 얻었다. 대조군(Con군)은 생리식염수 2 mL/kg를, 실험군은 지구자 건조분말 0.01 g/kg(H1군)과 0.04 g/kg(H2군)를 STZ를 마지막 투여한 24시간 후부터 매일 1회씩 6주간 구강 투여하였다.

체중과 혈당 측정 및 당내성 검사

매주 1회씩 6주 동안 실시하였으며, 12시간 동안 절식시킨 다음 체중을 측정하였다. 혈당측정은 매주 1회 6주 동안 실시하였으며, 측정 15시간 전에 금식을 시키고 다음날 9시에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 Glucometer 4(Bayer Co., USA)로 측정하였다. 42일째의 Con군과 실험군 생쥐를 대상으로 실시하였다. 당내성 검사를 시행하기 12시간 전에 모든 생쥐를 금식한 후 포도당(1.0 g/kg body weight)을 복강 주사하였다. 그 이후 30, 60, 120분에 각각 꼬리 정맥을 통하여 혈액을 채취한 다음 혈당을 측정하였다.

췌장섬과 β -세포의 계수

췌장섬의 수는 인슐린 면역조직화학 염색을 시행한 Con군과 실험군 각각의 췌장 조직 절편 30개를 계수하여 통계처리하였으며, 췌장섬의 크기는 고려하지 않았다. β -세포의 수는 췌장섬 30개에서 인슐린 면역반응성을 나타내는 세포의 핵을 중심으로 계수하여 통계처리하였다.

면역조직화학

생쥐의 췌장 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 파라핀으로 포매한 후 microtome을 사용하여 5 μ M 두께로 절편을 제작하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 xylene으로 파라핀을 제거한 다음 ethanol 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 함수과정을 거치게 하였다. 0.1 M의 phosphate buffer saline(PBS, 0.9% NaCl, pH 7.2) 용액에 12시간 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 인슐린(Novo castra, Newcastle, UK), IGF-I, GF-II(H-103, Santa Curz Biotechnology)를 각각 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 그리고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) regent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS 용액에서 15분간 세척하였다. 3,3'-diamino-benzidine(DAB, Sigma) 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20초간 대조 염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 카메라 부착 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진 촬영을 하였다.

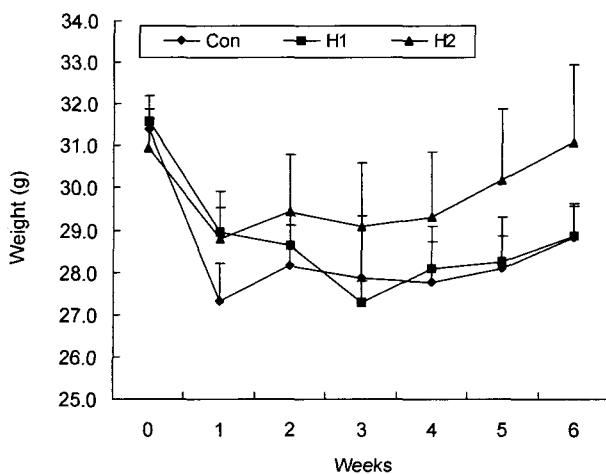
통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SAS(statistical analysis system) program에 의하여 각 실험군별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, 5% 유의수준으로 대조군과 실험군 사이에 t-test를 하였다.

결과 및 고찰

체중의 변화

제1형 당뇨병 환자들 대부분은 비만이지만 병이 만성적이거나 병증이 심하면 체중 감소현상이 나타나며(23), STZ로 유발된 당뇨병 쥐는 시간이 경과함에 따라 점차적으로 체중이 감소하는 것으로 알려져 있다(24). 본 실험에서 Con군과 지구자 추출물 0.01 g/kg을 매일 구강 투여한 H1군의 체중은 3주까지 급격히 감소하다가 6주까지 조금씩 증가하는 경향성을 보여주었다. 그러나 0.04 g/kg을 매일 구강 투여한 H2군은 1주째까지 급격히 감소하다가 2주째부터 조금씩 증가하여 3주째부터는 Con군이나 H1군에 비하여 높았으며, 6주째에는 유발전의 체중으로 회복되었다(Fig. 1). 이와 같은 결과로 보아 지구자 추출물이 STZ로 유발된 고혈당 생쥐의 체중 증가와 관계가 있는 것으로 사료되었다.

**Fig. 1. The changes of body weight.**

Con, group of treated with STZ; H1, *Hovenia dulcis* extract (0.01 g/kg/day) feeding group; H2, *Hovenia dulcis* extract (0.04 g/kg/day) feeding group.

혈당의 변화

STZ를 투여하여 β -세포를 선택적으로 파괴시킨 생쥐에서는 점차적으로 인슐린 분비는 감소하고 혈당은 상승한다 (1,24,25). 본 실험에서도 생쥐에 저용량의 STZ(50 mg/kg)를 24시간 간격으로 2회 투여한 다음 3일 후에 고용량의 STZ(100 mg/kg)를 투여하여 당뇨병 모델을 구축하였다. 혈당측정은 15시간 전에 급식시키어 다음날 아침 9시에 측정하였으며 매주 동일한 시간에 수행하였다. Con군은 유발 2주 후부터 혈당이 급격히 상승하여 6주에는 약 190 mg/dL이었다. 그러나 저용량의 지구자 추출물을 투여한 H1군은 약물 투여 3주 후부터 Con군에 비하여 낮게 나타나기 시작하였으며 6주 후에는 약 109 mg/dL로 Con군에 비하여 유의하게 ($p<0.05$) 감소하였다. 또한 고용량의 지구자 추출물을 투

여한 H2군의 혈당은 약물 투여 2주 후부터 유의하게 ($p<0.05$) 감소하였으며, 6주 후의 혈당은 약 108 mg/dL로 Con군에 비하여 유의한 ($p<0.01$) 결과를 보여주었다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 보아 지구자 추출물의 투여량이 높을수록 혈당량 감소에 유익한 영향을 미친다고 생각되었다.

당내성검사

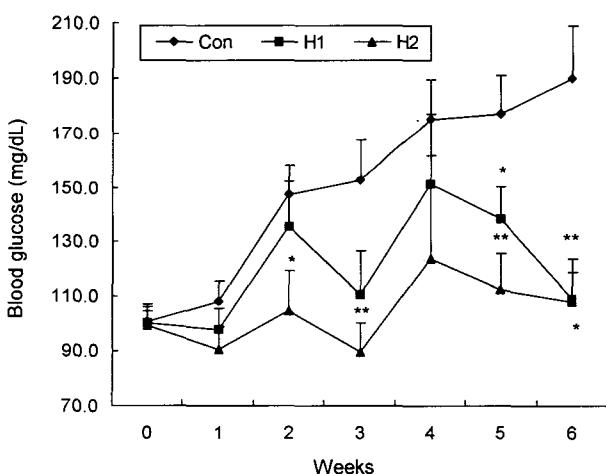
β -세포의 기능 평가를 위한 역학적 연구의 주요 지표를 얻고자 할 때 당내성 검사를 시행한다(26). 본 연구에서 포도당(1.0 g/kg body weight)을 복강 투여한 30분 후 각각의 혈당치를 측정한 결과 Con군은 실험군에 비하여 가장 높게 나타났으며, 60, 90, 120분에서도 전반적으로 Con군은 실험군에 비하여 높은 혈당치를 보여주었다. Fig. 3에서 보여주듯이 전반적으로 실험군인 H1과 H2가 Con군에 비하여 우수한 당내성 결과를 보여주었다.

췌장섬의 수

STZ은 췌장의 췌장섬 종양세포를 치료하는 치료제로 사용되지만 과량 투여 시에는 β -cell에 세포독성을 일으켜 오히려 고혈당을 유발시키게 된다(27). 본 연구에서도 STZ이 췌장섬에 미치는 독성과 지구자 추출물이 손상된 췌장섬 β -세포의 회복 또는 재생을 확인하기 위하여 30개의 췌장 조직 표본을 검색하였다. 그 결과 Con군 췌장에서는 약 6개의 췌장섬이 관찰되었으나 H1군에서는 약 9개 H2군에서는 약 12개의 췌장섬이 각각 관찰되었는데 췌장섬의 형태도 Con군에 비하여 실험군에서 뚜렷하고 크게 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과로 보아 지구자 추출물의 투여가 STZ로 손상된 췌장섬 β -세포의 회복 또는 재생에 관여할 것으로 생각되며, 투여 농도가 높을수록 효과 또한 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

췌장섬 β -세포의 비교

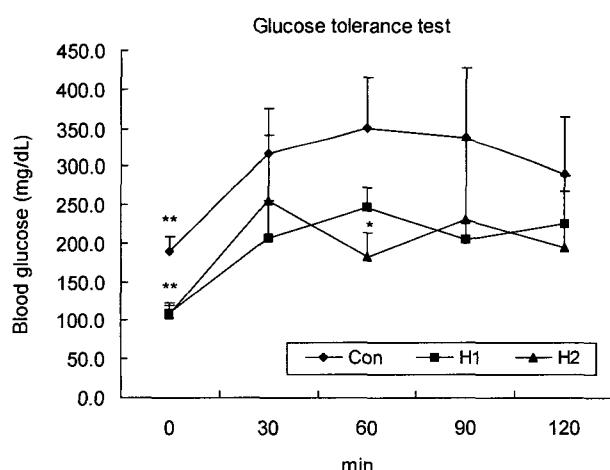
지구자 추출물의 유용한 효능을 검증하기 위하여 각 실험

**Fig. 2. Change in blood glucose concentrations (mg/dL) during six weeks of experimental period.**

Groups are the same as Fig. 1.

Results are shown as mean \pm SE.

* $p<0.05$; ** $p<0.01$ compared with control group.

**Fig. 3. Blood glucose tolerance test on the 42nd day from STZ treatment.**

Groups are the same as Fig. 1.

Results are shown as mean \pm SE.

* $p<0.05$; ** $p<0.01$ compared with control group.

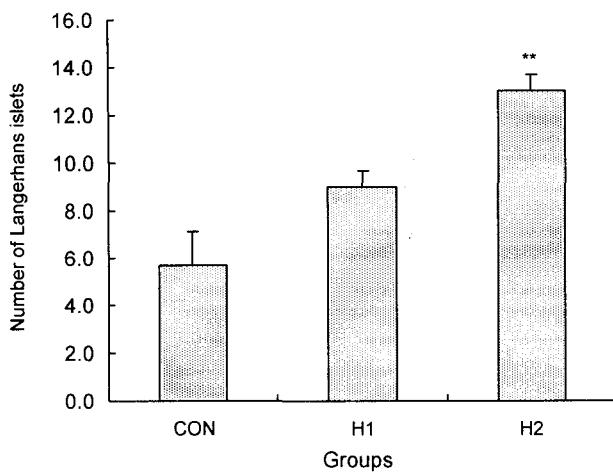


Fig. 4. The number of pancreatic islet on the 42nd day from STZ treatment.

Groups are the same as Fig. 1.

Results are shown as mean \pm SE.

** $p<0.01$ compared with control group.

군 체장섬 30개에서 β -세포를 계수하여 통계처리하였다. 그 결과 STZ를 투여하여 당뇨병이 유발된 Con군 생쥐에서는 Ahmed 등(24)의 실험 결과처럼 인슐린 양성 β -세포가 소수 관찰되었다. 약물을 6주 동안 투여한 H1군에서는 β -세포의 수가 다소 증가하였으나 유의성은 없었으며, H2군에서는 유의하게($p<0.01$) 증가하였다(Fig. 5). 이와 같은 결과로 보아 자구자 추출물은 STZ로 파괴된 생쥐 체장섬 β -세포의 재생 및 인슐린 분비기능에 관여하는 것으로 사료되었다.

인슐린 면역조직화학

고혈당이 오랫동안 지속되면 β -세포의 인슐린 유전자의 전사와 인슐린의 합성기능이 손상되어 혈액내 인슐린 농도가 감소한다(3,4). 체장섬 세포집단의 크기는 β -세포의 복제와 체장관내의 미분화된 β -세포 전구체에 의하여 증가한다(7)고 하였다. 본 실험에서는 Con군과 실험군 β -세포의 인슐린 분비활성을 비교 검색하기 위하여 42일 째 도살한 실험동물의 체장을 인슐린-면역조직화학 검색을 하였다. 그 결과

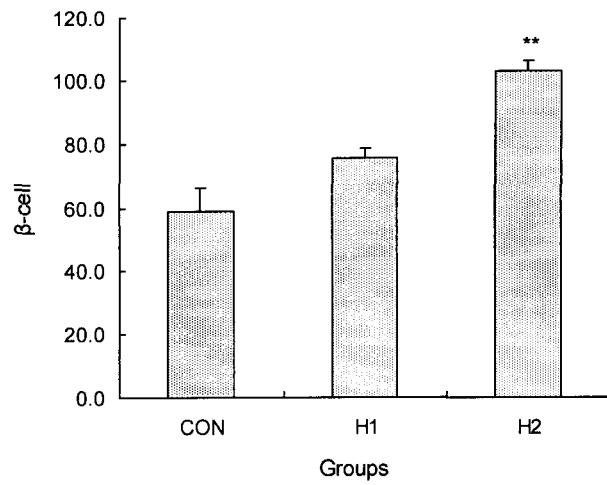


Fig. 5. The number of β -cells in the pancreatic islet on the 42nd day from STZ treatment.

Groups are the same as Fig. 1.

Results are shown as mean \pm SE.

** $p<0.01$ compared with control group.

Con군에서는 소수의 체장섬이 관찰되었을 뿐만 아니라 인슐린 면역반응을 보이는 세포 수가 소수에 불과하였다(Fig. 6A). 그러나 H1군은 Con군에 비하여 인슐린 면역반응성이 높게 나타났으며(Fig. 6B), H2군에서는 Con군이나 H1군에 비하여 인슐린 면역반응성이 가장 높게 나타났다(Fig. 6C). 이와 같은 결과로 보아 자구자 추출물이 인슐린의 합성에 유효한 영향을 미치었을 것으로 사료되었다.

IGF 면역조직화학

인슐린과 유사한 생물학적 활성을 지닌 IGF는 IGF-I과 IGF-II가 있으며 주로 간에서 합성되어 순환되지만 체장과 같은 대부분의 조직에서도 국소적으로 생산된다(9,28). IGF-I은 체장조직의 성장과 재생에 관여한다(29)고 하였다. 본 연구에서는 체장 샘포세포의 전반적인 재생 정도를 검색하기 위하여 IGF-I의 활성을 검색하였다. 그 결과 Con군(Fig. 7A)에서는 소수의 샘포세포가 미약한 면역반응성을 보여주었으나, 실험군인 H1군(Fig. 7B)에서는 Con군에 비하여 면

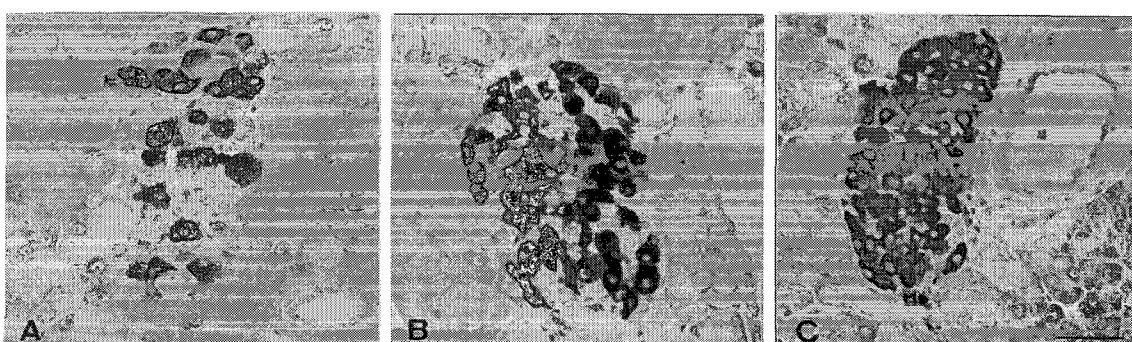


Fig. 6. Insulin-positive cells of pancreatic tissue in the control group (A), H1 group (B) and H2 group (C) were visualized by immunohistochemistry.

A few of insulin-immunoreactive β -cells occurred in the Langerhan's islet from control group. Stronger staining for insulin could be found from H1 group. The most of cells at Langerhan's islet showing insulin-secreting β -cells from H2 group.

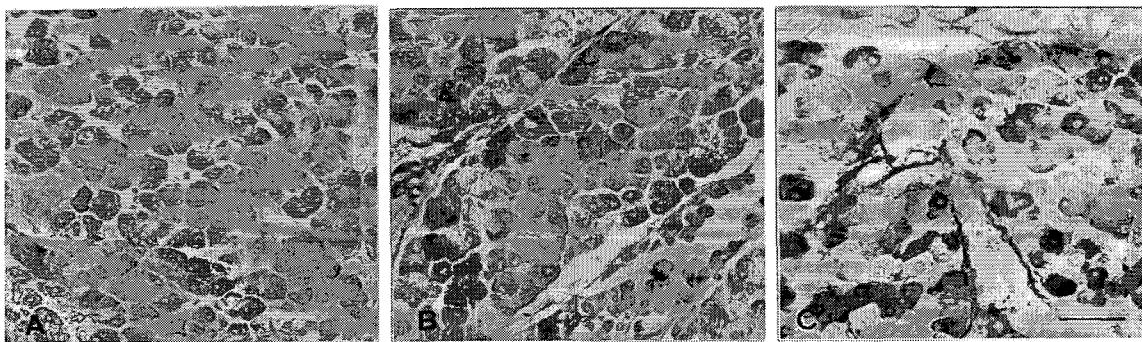


Fig. 7. IGF I -positive cells of pancreatic tissue in the control group (A), H1 group (B) and H2 group (C) were visualized by immunohistochemistry.

A number of IGF- I positive cells are observed in acinar cells of H2 group.

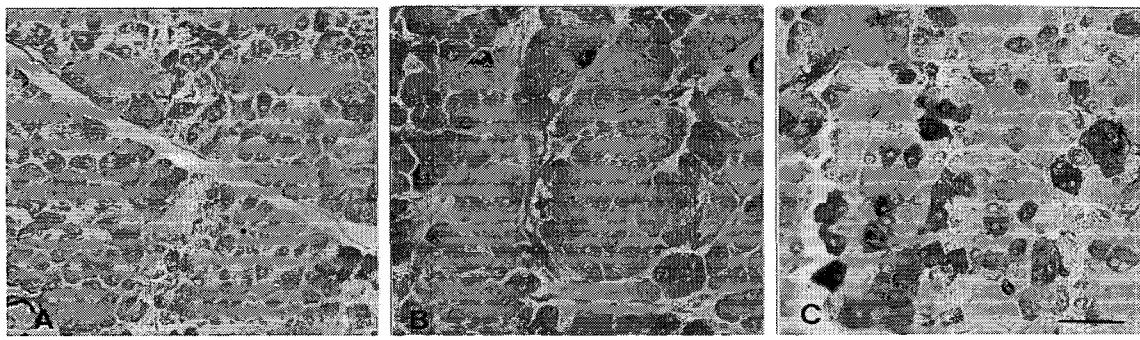


Fig. 8. IGF II-positive cells of pancreatic tissue in the control group (A), H1 group (B) and H2 group (C) were visualized by immunohistochemistry.

A number of IGF- II positive cells are observed in acinar cells of H2 group.

역반응성이 높은 세포들의 수가 증가하였으며, H2군(Fig. 7C)에서는 Con군과 H1군에 비하여 보다 높은 면역반응성을 보이는 세포들이 샘포세포 전반에 걸쳐 고르게 나타났다.

IGF-II는 IGF-I 과 상호작용하여 인슐린의 분비를 조절 한다(28). IGF-II의 면역반응성을 검색한 결과 IGF I에서 관찰되었던 것처럼 Con군(Fig. 8A)에서는 소수의 체장 샘포세포에서 미약한 면역반응성이 나타났다. 실험군인 H1군(Fig. 8B)에서는 Con군에 비하여 IGF-II에 대한 면역반응성이 매우 높은 세포들의 수가 증가하였으며, H2군(Fig. 8C)에서는 Con군과 H1군에 비하여 보다 높은 면역반응성을 보이는 세포들이 샘포세포 전반에 걸쳐 고르게 나타났다. 이와 같은 결과로 보아 지구자 추출물은 체장섬이 손상된 체장의 샘포세포에서 IGF 발현에 영향을 미치어 인슐린의 합성과 분비에 관여할 것으로 사료되었다. 지구자 추출물의 생리활성에 대한 연구에서 Hong(30)은 항산화효소의 활성과 지질과산화를 억제하는 효과가 있음을 밝힌바 있으며, Lee(31)는 glutathion S-transferase의 측정을 통한 간의 해독작용에 미치는 효능을 검증하였다. Yoshikawa 등(32)은 지구자 추출물이 알코올에 의한 근육이완 억제 및 간 보호 효과가 있음을 밝힌바 있다. 본 연구 결과는 지구자 추출물의 세포독성억제 및 세포 재생 효과에 의한 것으로 생각되나 앞으로 지구자의 성분에 대하여 많은 연구가 이루어져야 할 것이며,

특히 세포의 재생 능력과 관련된 연구가 보다 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 streptozotocin(STZ)을 투여하여 고혈당이 유발된 생쥐에 지구자(*Hovenia dulcis*) 추출물의 투여가 미치는 영향을 구명하기 위하여 수행하였다. 대조군(Con군)은 STZ로 고혈당을 유발한 후 생리식염수 2 mL/kg를 투여하였으며, 실험군은 고혈당이 유발된 생쥐에 지구자 추출물 0.01 g/kg(H1군)과 0.04 g/kg(H2군)를 매일 6주간 구강 투여하였다. 체중은 CG군이나 H1군에 비하여 H2군에서 가장 높았다. 혈당량은 대조군에 비하여 H1군과 H2군 모두에서 전반적으로 유의성 있게 감소하였다. 당내성 검사 결과 대조군에 비하여 H1군과 H2군 모두에서 우수한 소견을 보여주었다. 인슐린 면역조직화학 결과 대조군 체장의 체장섬은 파괴되어 있었으나, H1군과 H2군에서는 인슐린-양성 세포들이 다수 관찰되었다. IGF-I 과 II의 면역조직화학 결과 대조군에서는 소수의 샘포세포에서 양성반응을 보였으나, H2군에서는 다수의 샘포세포에서 아주 높은 면역반응성을 보여 주었다. 이상의 결과로 보아 지구자 추출물은 STZ로 유발된 손상으로부터 β -세포의 회복 또는 재생과 체장 샘포

세포의 IGF발현에 관여하는 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 동신대학교 산업용가속기 이용생물연구센터 지원에 의한 것입니다.

문 헌

1. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. 1992. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368.
2. Vinik A, Pittenger G, Rafaeloff R, Rosenberg L, Duguid W. 1996. Determinants of pancreatic islet cell mass: a balance between neogenesis and senescence/apoptosis. *Diabetes Rev* 4: 235-263.
3. Poitout V, Olson LK, Robertson RP. 1996. Chronic exposure of β TC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest* 97: 1041-1046.
4. Moran A, Zhang HJ, Olson LK, Harmon JS, Poitout V, Robertson RP. 1997. Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15. *J Clin Invest* 99: 534-539.
5. Swenne I. 1983. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic β -cell of the rat. *Diabetes* 32: 14-19.
6. Hellerstrom C, Swenne I. 1991. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic β -cells. *Diabetes* 40: 89-93.
7. Kaung HL. 1994. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 200: 163-175.
8. Rooman I, Schuit F, Biuwens L. 1997. Effects of vascular endothelial growth factor on growth and differentiation of pancreatic ductal epithelium. *Lab Inves* 76: 225-232.
9. Bonner-Weir S. 2000. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302.
10. Le Roith D. 1997. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 336: 633-640.
11. Petrik J, Arany E, McDonald J, Hill J. 1998. Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139: 2994-3004.
12. Hogg J, Hill DJ, Han VKM. 1994. The ontogeny of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein gene expression in the rat pancreas. *J Mol Endocrinol* 13: 49-58.
13. Hill DJ, Sedran RJ, Brenner SL, McDonald TJ. 1997. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) has a dual effect on insulin release from isolated, perfused adult rat islets of Langerhans. *J Endocrinol* 153: 15-25.
14. Ramiya VK. 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6: 278-282.
15. Lechner A. 2004. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes* 5(Suppl 2): 88-93.
16. Kodama S, Faustman DL. 2004. Routes to regenerating islet cells: stem cells and other biological therapies for type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 5(Suppl 2): 38-44.
17. Kim TJ. 1996. *Korean Resources Plants*. Seoul National University press, Seoul, Korea. p 72.
18. Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, Namba T. 1997. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull* 20: 381-385.
19. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomuya K, Murakami N, Matsuda H, Saito M, Fuji W, Tanaka T, Yamahara J. 1999. 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 *Hovenia dulcis* Thunb (Rhamnaceae): Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakukaku Zasshi* 117: 108-118.
20. Yoshikawa K, Nagai Y, Yoshida M, Arihara S. 1993. Anti-sweet natural products. VIII. Structures of hodulosides VI-X from *Hovenia dulcis* Thunb. var. tomentella Makino. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 41: 1722-1725.
21. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM. 2000. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: An epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 136: 664-672.
22. 종약대사전. 1997. 정답, 서울. p 3939.
23. Daniel P Jr., Robert SS, Alain B. 2003. *Ellenberg & Rifkin's diabetes mellitus*. 6th ed. McGraw-Hill press, New York. p 437-439.
24. Ahmed I, Adeghate E, Cummings E, Sharma AK, Singh J. 2004. Beneficial effects and mechanism of action of *Momordica charantia* juice in the treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rat. *Mol Cell Biochem* 261: 63-70.
25. Kim JS. 2004. Effect of Rhemanniae Radix on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1133-1138.
26. Hanson RL, Pratley RE, Bogardus C, Narayan KM, Roumain JM, Imperatore G, Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. 2000. Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 151: 190-198.
27. Like AA, Apple MC, Williams M, Rosini AA. 1978. STZ-induced pancreatic insulitis in mice. *Lab Inverst* 38: 470-486.
28. Smith FE, Rosen KM, Villa-Krmaroff L, Weir GC, Bonner-Weir S. 1991. Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6152-6156.
29. Hayakawa H, Kawarada Y, Mizumoto R, Hibasami H, Tanaka M, Nakashima K. 1996. Induction and involvement of endogenous IGF-I in pancreas regeneration after partial pancreatectomy in the dog. *J Endocrinol* 149: 259-267.
30. Hong YL. 2001. Effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on anti-oxidative activity and the lipid metabolism. *MS Thesis*. Kangwon National University, Gangwon. p 23-34.
31. Lee MK. 2000. Studies on the screening of biological activities of the extracts from *Hovenia dulcis* Thunb. *MS Thesis*. Kangwon National University, Gangwon. p 36-43.
32. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yosizumui S, Ninomiya K, Murakami N, Matsuda H, Saito M, Fujii W, Tanaka T, Yamahara J. 1997. Bioactive constituents of Chinese natural medicines III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, Hovenitins I, II, and III, isolated from *Hoveniae semen seu fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae): Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi* 117: 108-118.