

민들레와 두종의 엉겅퀴의 Rat lens aldose reductase 억제활성

정미정 · 허성일 · 왕명현*

강원대학교 생명공학부

Rat Lens Aldose Reductase inhibitory of *Taraxacum mongolicum* and two *Cirsium* species

Mee Jung Jung, Seong-II Heo, and Myeong-Hyeon Wang*

School of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

Received October 27, 2008; Accepted December 10, 2008

To evaluated active principles for diabetic complications from the *Taraxacum mongolicum* (*T. mongolicum*), *Cirsium japonicum* (*C. japonicum*), and *Cirsium setidens* (*C. setidens*) and its constituents, as well as silymarin tested for their effect on rat lens aldose reductase. As a result, the MeOH extract of *T. mongolicum* (IC₅₀ 8.71 µg/mL) have strong lens aldose reductase inhibition abilities. Also, Aldose reductase inhibitory showed an isolated luteolin (IC₅₀ 20 µM) from the *T. mongolicum* and silymarin (IC₅₀ 13 µM).

Key words: Aldose reductase, *Cirsium japonicum*, *Cirsium setidens*, Silymarin, *Taraxacum mongolicum*

만성 소모성 질환의 하나인 당뇨병은 대표적인 성인병의 하나로서 전세계적으로 급증하고 있고 우리 나라에서도 그 환자는 증가 일로에 있다. 또한 당뇨병은 그 자체보다는 합병증이 더 무서운데, 당뇨병성 합병증의 형태는 말초 신경 장애, 망막증, 신증 및 백내장 등으로 나타난다[Beyer-Mears *et al.*, 1986; Kador *et al.*, 1985a; Kador *et al.*, 1985b; Robinson Jr *et al.*, 1983; Uede *et al.*, 2004; Van-Heyningen, 1959]. 당뇨병 치료에 있어서 최대목표 중의 하나는 당뇨병 합병증의 유발이나 진전을 억제하는데 있다. 당뇨병 조절과 합병증과의 관계연구에 의하면 강화된 insulin 치료로 혈당을 정상화 시키면 당뇨병 합병증을 크게 감소시킬 수 있었다[Lee *et al.*, 2004; Seaquist *et al.*, 1989].

Aldose reductase(EC 1.1.1.21)는 하나의 aldo-keto reductase로 당뇨병 합병증 발증에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 glucose 대사경로인 polyol pathway의 촉매 효소로서, NADPH를 조효소로 이용한다[Lee *et al.*, 2005; Maccari *et al.*, 2005]. 당뇨병에 있어서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway의 이상, oxidative stress, myo-inositol의 감소와 Na⁺, K⁺-ATPase 활성의 감소 등이 보고되어 있다[Greene *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993; Sato and Rifkin(1979)]. 정상

상태에서의 glucose는 생명을 유지하기 위한 중요한 에너지원으로 insulin에 의해 세포 내로 유입된 후 대부분이 해당계에서 대사되므로 polyol pathway를 통하여 대사되는 것은 약 3%에 불과하다[Greene *et al.*, 1987]. 그러나 신장세포, 신경세포, 수정체, 망막세포와 적혈구 등은 glucose 유입에 있어 insulin에 의존하지 않고 확산에 의해 유입되므로, 당뇨병에 의해 고혈당이 유발되면 이러한 세포 내 glucose에 의해 ROS가 생성되고, 이는 toxic aldehyde의 생성을 촉진시키고 또한 aldose reductase를 활성화시켜 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성된다[Malone *et al.*, 1980; Travis *et al.*, 1974]. 축적된 sorbitol은 세포 내 삼투압과 세포 투과성을 초래하여 생체내 대사장애, 즉 당뇨병 합병증을 가져오게 된다. 따라서, aldose reductase 활성을 저해시키는 것은 glucose가 sorbitol로 진행되는 과정을 차단시켜 당뇨병 합병증을 예방하고 치료하는 것이다.

국화과(Asteraceae or Compositae)는 국화목(Asterales)에 속하는 식물로 전세계적으로 걸쳐 자라고 있다. 우리나라에서는 민들레속(*Taraxacum*), 돼기풀속(*Ambrosia*), 지느러미엉겅퀴속(*Carduus*), 엉겅퀴속(*Cirsium*), 잇꽃속(*Carthamus*) 등이 국화과에 속하는데, 이들 식물속 중 민들레(*Taraxacum mongolicum*), 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)는 대표적인 식물로서 식용 혹은 약용으로 널리 이용되고 있다[Han, 2002; Heo and Wang, 2008; Lee *et al.*, 2003]. 또한 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens*)는 강원도 지역에서 자생하는 식물로서 곧드레라고 불리우며 식용으로 사용되고 있다[Lee *et al.*, 2006]. 이들 민들레, 엉겅퀴, 그리고 고

*Corresponding author

Phone: +82-250-6486; Fax: +82-241-6480

E-mail: mhwang@kangwon.ac.kr

러 엉겅퀴에 관한 생리활성에 관한 연구는 많이 진행되어 왔으나 당뇨병 합병증과 관련된 aldose reductase 저해에 관한 연구는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 본 실험에서는 이들 세 식물의 부위별 메탄올(MeOH) 및 물(H₂O)추출물을 대상으로 aldose reductase 저해 활성을 살펴보고, 이들 식물에서 분리된 화합물인 luteolin과 syringin 그리고 국화과 식물에서 추출된 혼합물로서 상업적으로 널리 시판되고 있는 silymarin(Fig. 1)과 비교하여 결과를 도출하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에서 사용한 재료들은 2007년도에 강원도 춘천시에서 채집하였으며 분쇄 후 사용하였다. 시료의 감별은 강원대학교 분자생명공학과 식물분자생명공학실 왕명현 교수에 의해 감별 하였으며, 시료의 표본 또한 강원대학교 분자의생명공학과 식물분자생명공학실에 보관하였다(No.20070411). 민들레, 엉겅퀴, 그리고 고려엉겅퀴 각 부위별 분말 100 g씩을 100% 메탄올 및 증류수로 70°C 온도에서 환류 냉각기를 사용하여 3시간 동안 추출하여 여과하였다 그 후에 rotary evaporator로 감압 농축하여 각각의 식물들의 부위별 메탄올 추출물 및 물 추출물을 얻어 활성 측정 시료로 사용하였다.

기구 및 시약. 기구로 선광도를 측정하는 Polarimeter는 Perkin-Elmer 341를 사용하였으며, UV spectra는 Varian Carry UV-visible spectrophotometer를 이용하였다. FAB-MS는 Autospec. M363 series mass spectrometer를 이용하여 측정하였으며, ¹H and ¹³C NMR spectra는 Bruker DPX 400(400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C) spectrometer로 측정하였다. 화학적 이동치(chemical shifts)는 용매 peak(δ_H 2.50 and δ_C 39.5 for DMSO-*d*₆)를 기준으로 하여 결정하였으며 DEPT, HMQC, 그리고 HMBC spectra 또한 Bruker DPX 400을 이용하여 측정하였다. Column chromatography를 시행하기 위해 Si gel[Fuji silysia chemical Ltd., BW-820MH(S)], Sephadex LH-20(GE Healthcare Bio-Sciences, 25-100 mm), MCI gel (Supelco, CHP20P) 그리고 RP-18 gel(YMC Co. LTD., 12 nm S-75 mm)을 사용하였다. TLC판은 Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ plate(0.25 mm)을 이용하였으며, 발색제로 50% 황산(H₂SO₄)을 사용하였다. NADPH, dl-glyceraldehyde는 Sigma Co. (USA), sodium phosphate(monobasic, dibasic), potassium phosphate(monobasic, dibasic)은 Shinyo Pure Chem. Co. (Japan)에서 수입하여 사용하였고, 유기용매는 시판되는 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

민들레 추출물로부터 화합물 1의 분리. 민들레 지상부 3 kg

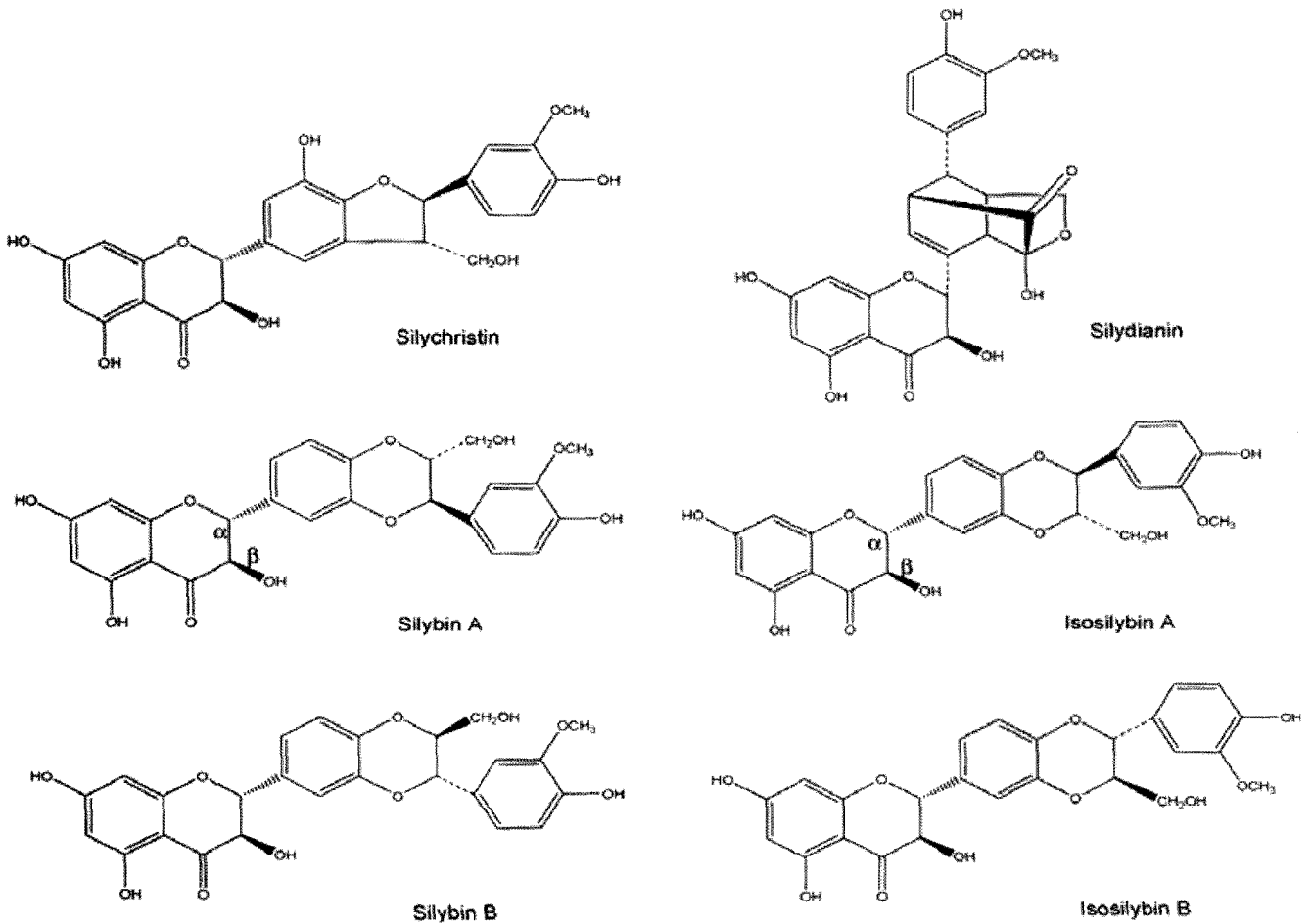


Fig. 1. The main bioactive constituents in silymarin.

에 100% 메탄올을 첨가한 다음 70°C 온도에서 환류 냉각기를 사용하여 3시간 동안 추출하여 여과하였다. 그 후에 rotary evaporator로 감압 농축하여 이를 메탄올 추출물로 하였다. 얻어진 메탄올 추출물(370.8 g)을 이동상 용매 디클로로메탄(dichloromethane, CH₂Cl₂)-메탄올(MeOH)[CH₂Cl₂:MeOH(100:0-0:100% gradient, v/v)]을 사용하여 Si-gel column chromatography를 시행하여 총 29개의 분획물을 얻었다. 이 중 19번 분획물(0.14 g)을 이동상 용매 물-메탄올[MeOH:H₂O(100:0-0:100% gradient, v/v)]을 사용하여 RP-18 gel column chromatography를 시행하여 화합물 1(luteolin, 20 mg)을 얻었다. 화합물의 구조 동정은 시판되는 표준품과의 직접 비교 및 분광학적 분석 그리고 참고 문헌[Jung *et al.*, 2004]을 토대로 결정하였다

Compound 1: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: Amorphous yellow powder; m.p. >320° (*c* 0.20, MeOH); EIMS (positive ion mode) *m/z* 286[M]⁺; 12.97 (1H, s, OH-5), 10.80 (1H, s, OH-7), 9.90 (1H, s, OH-4), 9.39 (1H, s, OH-3'), 7.41 (1H, dd, *J*=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 7.39 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.66 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 181.6 (C-4), 164.1 (C-7), 163.9 (C-2), 161.5 (C-5), 157.3 (C-9), 149.7 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.5 (C-1'), 119.0 (C-6'), 116.0 (C-5'), 113.4 (C-2'), 103.7 (C-3), 102.9 (C-10), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8).

고려엉겅퀴 추출물로부터 화합물 2의 분리. 고려엉겅퀴 뿌리 분말(2.2 kg)을 메탄올로 80°C에서 3시간 추출하였다. 이 추출물은 여과한 후 40°C에서 감압 농축하여 메탄올 추출물(225.7 g)을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 이동상 용매 메탄올/물(0:100, 40:60, 60:40, 100:0, v/v)을 이용하여 MCI gel column chromatography를 시행하여 총 4개의 분획물을 얻었다. 이 중 분획물 2번을(3.26 g)을 대상으로 Sephadex LH20(MeOH) column chromatography를 시행하여 화합물 2(syringin, 113 mg)을 얻었다. 화합물의 구조 동정은 시판되는 표준품과의 직접 비교 및 분광학적 분석 그리고 참고 문헌[Lee *et al.*, 2004]을 토대로 결정하였다.

Compound 2: Pale yellow-white amorphous powder; m.p. 185.8-186.0; [α]_D²⁰ -16.9° (*c* 0.23, MeOH); LR-FABMS (positive ion mode) *m/z* 395 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.75 (2H, s, H-3,5), 6.54 (1H, brd, *J*=15.9 Hz, H-7), 6.32 (1H, dt, *J*=5.6, 15.9 Hz, H-8), 4.85 (1H, d, *J*=7.8 Hz, Glc-1), 4.23 (2H, dd, *J*=1.3, 5.6 Hz, H-9), 3.85 (6H, s, OCH₃), 3.77 (1H, dd, *J*=2.3, 12.0 Hz, Glc-6a), 3.67 (1H, dd, *J*=5.0, 12.0 Hz, Glc-6b), 3.48 (1H, ddd, *J*=2.7, 7.1 Hz, Glc-2), 3.42 (1H, d, *J*=2.3 Hz, Glc-4), 3.41 (1H, d, *J*=2.3 Hz, Glc-5), 3.20 (1H, m, Glc-3); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 153.3 (C-2, 6), 134.8 (C-1), 134.3 (C-4), 130.2 (C-7), 129.1 (C-8), 104.4 (C-3,5), 104.3 (Glc-1), 77.3 (Glc-3), 76.8 (Glc-5), 74.7 (Glc-2), 70.2 (Glc-4), 62.6 (C-9), 61.4 (Glc-6), 56.0 (OCH₃).

실험동물. 실험동물은 계대 사육한 순계 Sprague-Dawley(SD) 계 웅성 흰쥐를 이용하였다.

Aldose Reductase 억제활성 측정. Aldose reductase 억제효과를 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hyman과 Kinoshita[1965]가 사용한 방법을 수정하여 실시하였다. SD계 흰쥐의 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량의 phosphate buffer를 가하여 균질화하였다. 이를 4°C에서 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 ammonium sulfate로 40%까지 포화시키고 원심분리한 상등액을 취하여 다시 70%가 되도록 ammonium sulfate를 첨가하였다. 원심 분리하여 얻어진 pellet을 최소량의 buffer에 현탁하여 투석을 1일정도 한 다음, 효소원으로 하였다. 위에서 조제한 효소원과 dl-glyceraldehyde를 기질로 하여 반응시키고 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다.

결과 및 고찰

민들레와 두종의 엉겅퀴류인 엉겅퀴와 고려엉겅퀴 부위별 각 용매 추출물들의 항당뇨 활성을 검색하기 위해 흰쥐 수정체 aldose reductase 활성을 측정하여 그 결과를 나타내었다(Table 1). 각각 용매에 따른 식물들의 aldose reductase 억제 활성과 용매별로 따른 aldose reductase 억제활성을 살펴보면 모든 식물에 있어서 메탄올 추출물이 물 추출물에 비해 뛰어난 억제 활성을 보였으며, 추출물의 억제 활성 순서를 보면 민들레 지상부 메탄올 추출물>엉겅퀴 뿌리 메탄올 추출물>민들레 뿌리 메탄올 추출물>고려엉겅퀴 뿌리 메탄올 추출물>엉겅퀴 뿌리 물 추출

Table 1. Inhibitory effects of *Taraxacum mongolicum* and two *Cirsium* species on aldose reductase activity

| Samples | | Concentration (μg/mL) | Inhibition (%) | IC ₅₀ (μg/mL) |
|-----------------------|-------|-----------------------|----------------|--------------------------|
| <i>T. mongolicum</i> | | | | |
| MeOH ext. | upper | 100 | 97.56 | 8.71 |
| | | 10 | 58.54 | |
| | 5 | 26.83 | | |
| | root | 100 | 88.89 | |
| 10 | | 11.11 | | |
| H ₂ O ext. | upper | 100 | 72.77 | 60.00 |
| | | 10 | 22.22 | |
| | root | 100 | NA* | |
| <i>C. japonicum</i> | | | | |
| MeOH ext. | upper | 100 | 75.70 | 59.14 |
| | | 10 | 18.90 | |
| | root | 100 | 82.93 | |
| | | 10 | 41.46 | |
| H ₂ O ext. | upper | 100 | 46.34 | - |
| | | 100 | 56.10 | |
| | root | 100 | 26.83 | |
| <i>C. setidens</i> | | | | |
| MeOH ext. | leaf | 100 | 57.30 | 81.63 |
| | | 10 | 21.35 | |
| | root | 100 | 64.04 | |
| | | 10 | 21.35 | |
| H ₂ O ext. | leaf | 100 | NA* | - |
| | root | 100 | 13.48 | |

*NA=not active.

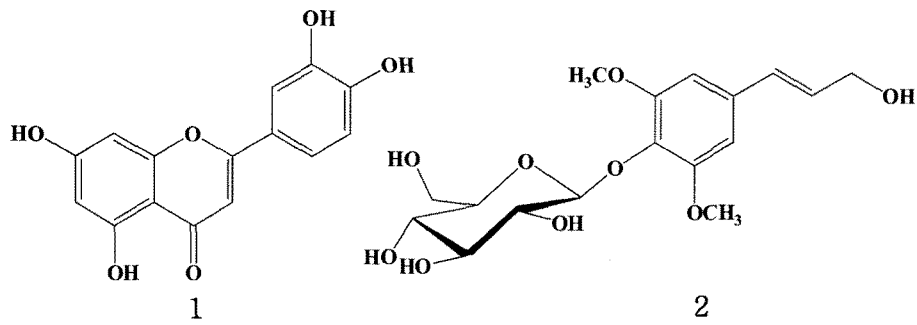


Fig. 2. Structure of isolated compounds 1 and 2.

Table 2. Inhibitory effects of silymarin and isolated compounds (1 and 2) from the *T. mongolicum* and *C. setidens*, respectively

| Samples (Mw) | Concentration (µg/mL) | Inhibition (%) | IC ₅₀ | |
|-----------------|-----------------------|----------------|------------------|------|
| | | | (µg/mL) | (µM) |
| Luteolin (286) | 10 | 83.15±0.02 | 5.51 | 20 |
| | 5 | 46.07±0.04 | | |
| Syringin (327) | 100 | 19.78±0.05 | - | - |
| Silymarin (482) | 100 | 71.30±0.07 | 6.55 | 13 |
| | 10 | 62.20±0.10 | | |
| Quercetin (302) | 5 | 44.34±0.08 | 2.94 | 10 |
| | 10 | 83.80±0.03 | | |
| | 1 | 32.40±0.07 | | |

Data are means±SD (n=3)

초 록

국화과 식물인 민들레, 엉겅퀴, 그리고 고려엉겅퀴를 대상으로 항당뇨 활성 측정 방법 중 하나인 흰쥐 수정체 aldose reductase 저해 활성을 측정하였다. 여러 부위별 추출물 중 민들레 지상부 메탄올 추출물이 IC₅₀ 8.71 µg/mL로서 뛰어난 저해 활성을 보였다. 국화과 식물에서 분리된 대표적인 화합물인 silymarin과 민들레에서 분리한 luteolin(1) 그리고 고려 엉겅퀴에서 분리된 syringin(2)을 대상으로 aldose reductase 저해 활성을 측정한 결과 silymarin과 luteolin은 뛰어난 aldose reductase 저해 활성을 보였다.

Key words: Aldose reductase, *Cirsium japonicum*, *Cirsium setidens*, Silymarin, *Taraxacum mongolicum*

참고문헌

Beyer-Mears A, Cruz E, Edelist T, and Varagiannis E (1986) Diminished proteinuria in diabetes mellitus by sorbinil an aldose reductase inhibitor. *Pharmacology* **32**, 52-60.

Greene DA, Lattimer SA, and Sima AF (1987) Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complication. *New Eng J Med* **316**, 599-606.

Han YB (2002) Korea natural plant food source. Korea University Press, Seoul, Korea.

Hayman S and Kinoshita JH (1965) Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem* **240**, 877-882.

Heo SI and Wang MH (2008) Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor J Pharmacogn* **39**, 255-259.

Jung MJ, Kang SS, Jung HA, Kim GJ, and Choi JS (2004) Isolation of flavonoids and cerebroside from the stem bark of *Albizia julibrission*. *Arch Pharm Res* **27**, 593-599.

Kador PF, Kinoshita JH, and Sharpless NE (1985) Aldose reductase inhibitors: a potential new class of agents for the pharmacological control of certain diabetic complications. *J Med Chem* **28**, 841-849.

Kador PF, Robinson Jr WG, and Kinoshita JH (1985) The pharmacology of aldose reductase inhibitors. *Ann Rev*

물>고려엉겅퀴 잎 메탄올 추출물 순서였다.

민들레 지상부의 메탄올 추출물 및 고려엉겅퀴 뿌리 메탄올 추출물을 반복적인 Si gel, Sephadex LH-20, MCI gel, 그리고 RP-18 gel 등의 chromatography를 이용하여 각각의 추출물에서 화합물 1(luteolin)과 2(syringin)을 분리하였다. 이들 화합물들은 1D(¹H- 및 ¹³C-NMR)와 2D-NMR(HMQC 및 HMBC) 데이터를 통해 구조를 밝혔다(Fig. 2).

화합물 1(luteolin)과 2(syringin) 그리고 silymarin의 aldose reductase 저해 활성은 Table 2에 나타났다. Silymarin의 경우 aldose reductase 저해 활성이 IC₅₀ 6.55 µg/mL이며 물 농도로 환산하면 13 µM로서 이는 이미 뛰어난 aldose reductase 저해제로 이미 밝혀져 있는 양성 대조군인 quercetin(IC₅₀ 10 µM) [Lim et al., 2006]과 유사한 활성을 보여 aldose reductase 저해 효과로 당뇨병 합병증의 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 화합물 1인 luteolin의 경우 quercetin 보다는 다소 약하나 aldose reductase 저해 효과를 보였다. 그러나 화합물 2(syringin)의 경우 100 µg/mL의 고농도에서도 aldose reductase 저해 활성이 나타나지 않았다. Silymarin의 경우 플라보노이드나 난으로 플라보노이드와 리그난 골격이 결합되어 있다[Woo, 1996]. 또한 luteolin의 경우 플라보노이드 화합물로 잘 알려져 있으며, 플라보노이드 화합물이 뛰어난 aldose reductase 저해 활성을 가진다고 밝혀졌다[Lim et al., 2006]. 그러나 페놀성 화합물인 syringin은 활성을 나타내지 않았다.

- Pharmacol Toxicol* **25**, 691-714.
- Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, and Yu CY (2003) Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Korean J Medicinal Crop Sci* **11**, 53-61.
- Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shin TH, Sa JH, Choi DS, and Wang MH (2006) Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *J Food Sci Technol* **38**, 571-576.
- Lee SH, Son DW, Ryu JY, Lee YS, Jung SH, Kang JG, Lee SY, Kim HS, and Shin KH (2004) Anti-oxidant activities of *Acnthopanax senticosus* stems and their lignan components. *Arch Pharm Res* **27**, 106-110.
- Lee YS, Lee SH, Kim BK, and Shin KH (2004) Screening for aldose reductase inhibitory activity of extracts of the marin plants from Korea. *Algae* **19**, 349-352.
- Lee YS, Lee SH, Lee HS, Kim BK, Ohuchi K, and Shin KH (2005) Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol Pharm Bull* **28**, 916-918.
- Lim SS, Jung YJ, Hyun SK, Lee YS, and Choi JS (2006) Rat lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* Stamens. *Phytother Res* **20**, 825-830.
- Maccari R, Ottaná R, Curinga C, Vigorita MG, Rakowitz D, Steindl T, and Langer T (2005) Structure-activity relationships and molecular modeling of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones active as aldose reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **13**, 2809-2823.
- Malone JI, Knox G, Benford S, and Tedesco TA (1980) Red cell sorbitol. An indicator of diabetic control. *Diabetes* **29**, 861-864.
- Robinson Jr WG, Kador PF, and Kinoshita JH (1983) Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science* **221**, 1177-1179.
- Sato Y and Rifkin DB (1979) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transformation growth factor B1-like molecule by plasmin during coculture. *J Cell Biol* **109**, 309-315.
- Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, and Barbosa J (1989) Familial clustering of diabetic kidney disease: Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *New Eng J Med* **320**, 1161-1165.
- Travis SF, Morrison AD, Clements RS Jr, Winegrad AI, and Oski FA (1974) The role of the polyol pathway in metahemoglobin reduction in human red cells. *Br J Haematol* **27**, 597-605.
- Ueda H, Kuroiwa E, Tachibana Y, Kawanishi K, Ayala F, and Moriyasu M (2004) Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia* (H. B. & K.) McVaugh. *Phytomedicine* **11**, 652-656.
- Van-Heyningen R (1959) Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature* **184**, 194-195.
- Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengard J R, Van Den Enden M, Kilo C, and Tilton RG (1993) Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complication. *Diabetes* **42**, 801-813.
- Woo WS (1996) Research of natural product (2nd ed.) Seoul National University Press, Seoul.