

Original Article / 원저

加減生血潤膚飲의 당뇨병 치료효과 확인을 위한 생리활성성분 분석과 경구포도당부하 연구

인정도¹, 임대식², 김원일^{1*}

¹동의대학교 한의학과 비계내과학교실

²순천향대학교 자연과학대학 화학과

Studies about the bioactive component analysis and an oral glucose tolerance test of Add-Omit-Saenghyeoryunbu-eum(AO-SHU) for confirmation of diabetes therapy

Jeongdo In¹, Daisig Im², Won-Il Kim^{1*}

¹Department of Oriental Internal Medicine, College of Korean Medicine,
Dong-Eui University

²Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Soonchunhyang
University

ABSTRACT

Objectives : Instrumental chemical analysis was utilized to investigate the effect of Add-Omit-Saenghyeoryunbu-eum(AO-SHU) on diabetic treatment. One of the most exciting, yet also controversial, arguments is the safety and biological mechanisms of the natural medicine on human body. Therefore, the aim of this study is to provide a better understanding on bioactive chemical components, hazards of heavy metal contamination and biological mechanism of the diabetic medicine composed of 12 different natural herbs.

Methods : To study bioactive compound and metallic component in the diabetic medicine in detail, LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass/Mass), GC (Gas Chromatography) and ICP (Inductively Coupled Plasma) were utilized to characterize the extract of the diabetic medicine and the result was compared with 18 marker substances selected from literature survey. In addition, *in vitro* assay experiments including GPR 119 activity and human DGAT-1 inhibition, and OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) were performed to verify the effectiveness of this medicine on diabetic treatment.

© 2016 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Results : Out of 18 marker substances, 9 bioactive compounds were identified from LC-MS/MS analysis which include Citrulline, Catalpol, Berberine, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rg1, Oleanolic acid, β -Sitosterol, Mangiferin, and Schizandrin. ICP study on 245 residual pesticides revealed that 239 species were not detected but 6 species, Dimethomorph, Trifloxystrobin, Pyraclostrobin, Isoprocarb, Carbaryl and Flubendiamide, while the amounts are trace levels, below permitted concentrations. The biological activity was observed *in vitro* assay and Oral Glucose Tolerance Test(OGTT), which are consistent with a preliminary clinical test result, a drop in blood sugar level after taking this herbal medicine.

Conclusions : Instrumental chemical analysis using LC-MS/MS, GC, and ICP was conducted successfully to identify bioactive compounds in AO-SHU for the treatment of diabetes, finding 9 bioactive compounds. Furthermore, *in vitro* assay experiments and OGTT show that AO-SHU has its biological activities, which imply that it can be a candidate for the future diabetes remedy.

Key words : Add-Omit-Saenghyeoryunbu-eum(AO-SHU), Diabetes Therapy, Pharmacological active ingredient, Instrumental analysis, OGTT

I. 서론

당뇨병은 혈당조절에 필요한 인슐린의 절대적 혹은 상대적 결핍 및 조직에서의 인슐린 작용성 저하에 기인한 고혈당과 그에 수반되는 대사 장애로 정의된다¹. 당뇨병은 발병원인 및 증상의 치료에 따라 제 1형과 제 2형 당뇨병으로 분류되며, 제 1형 당뇨병은 베타 세포의 파괴에 의해 발생하는 면역 매개성과 원인불명의 특발성으로 구분된다. 제 2형 당뇨병은 인슐린 저항성과 인슐린 결핍이 복합적으로 작용한다^{1,2}.

당뇨병은 많은 합병증을 유발하는 만성 대사성 질환으로 당뇨병에 의한 사망률이 차지하는 비율이 점차 증가하고 있다². 우리나라에서도 2012년 사망원인 중 당뇨병의 순위가 5위까지 상승하였으며³, 국제당뇨병연맹은 전 세계적으로 당뇨병은 10초마다 3명이 새로 발생되고 있으며, 2035년까지 약 5억 9,200만 명으로 증가할 것이며, 향후 산업화된 국가의 경우 당뇨병환자가 인구의 10%에 이를 것으로 추정되고 있다. 특히 제 2형 당뇨병은 전체 당뇨병환자의 90%를 차지하며 유전적 요인에 비만, 흡주, 흡연, 좌식생활 등과 같은 환경적인 요인이 더해져 점진적으로 증가하는 추세로, 양의학에서 현재 합성, 바이오 치료제로 다양한 약물들이 개발되었으나 여러 부작용과 한계점을 가지고 있다⁴.

한의학에서는 당뇨병과 유사한 상태를 消渴이라고 하고 크게 上消, 中消, 下消 등으로 구분하여 한의서에 기술하였으며, 후대로 내려올수록 그 치료방법 또한 세분화되어 발전되었고⁵, 최근에는 처방에 대한 과학적 분석과 실험을 통한 효과를 입증하는 연구들이 진행되고 있는데, 단미제나 처방의 *in vivo*, *in vitro* 실험을 통한 연구와 개별 약제의 화학적 분석이며 複方의 임상 약리-화학적 분석은 아직은 초보적 단계에 머무르고 있다⁵.

따라서 單方에 비해 임상적으로 유효성이 확인되고 있는 複방의 효능을 지표물질의 확인을 통해 과학적으로 입증하기가 어려운 경우가 대부분이고 문헌에 근거한 효과를 설명할 뿐 객관적 근거를 제시하지 못하여 경우가 많다.

저자는 『東醫寶鑑』⁶의 生血潤膚飲을 임상경험에 근거, 가감하여 당뇨병환자의 혈당조절에 유효함을 인지하고 가칭 당뇨병환이라 하여 임상에 다용해왔으며, 효능에 대한 실험적 검증의 필요성을 느껴 선행연구⁷를 통해 유효성분을 확인한바 있다. 그러나 가감생혈윤부음이 複합처방이므로 개별 약제의 화학적 분석과 複합처방의 비교분석을 통해서 약효에 있어 개별약제가 어떠한 기전의 약리작용으로 더 높은 기여도를 발휘하는지 추가적인 연구가 필요하였다.

이에 저자는 화학적 분석에 따른 효과를 입증할

*Corresponding Author : Won-Il Kim, Department of Oriental Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 62, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.
Tel : +82-51-850-8630, Fax : +82-51-867-5162, E-mail : omdstar@deu.ac.kr

•Received : March 9, 2016 / Revised : May 9, 2016 / Accepted : May 12, 2016

목적으로 가감생혈윤부음을 구성하는 각 생약성분들을 문헌고찰⁸⁻²⁴⁾ 하고 당뇨치료 약리물질의 표준품을 대조물질로 하여 HPLC-MS/MS를 통해 당뇨병 치료에 유용한 성분들에 대한 정성 및 정량분석을 실시하였으며, 잔류농약 시험을 추가로 실시하였다. 이어서 생약별 유효물질들을 포함한 각 추출물에 대하여 몇 가지 지표(DGAT-1, GPR-119)에 대한 *in vitro* 실험을 수행하였다. 이후 가감생혈윤부음의 *in vivo* 실험으로 c57bl/6 mice에 경구 포도당 부하시험(Oral glucose tolerance test, 이하 OGTT)을 수행하여 당뇨치료 효과에 대한 의미있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

생약 표준품으로 사용한 물질인 Citrullin, Cucurbitacin E, Bryonolic acid, Catalpol, Loganin(Iridoid glycoside), Conjugated linoleic acid(CLA), Sesamin, Kaempferol, Berberine chloride, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rg1, Oleanolic acid, β -Sitosterol, Ferulic acid, Betulinic acid, Mangiferin, Schizandrin, Tolbutamide는 Sigma-Aldrich 및 Fluka사 한국지사에서 구입하였고, 세포 및 동물실험용 대조약물인 GSK263은 ChemieTek (영국)에 합성 주문하여 구입하였다. 실험동물인 C57BL/6(standard abbreviation: B6) mice는 9-11 주령의 수컷으로 군당 5마리씩 나누었으며 순천향대학교 IACUC 규정을 준수하여 다물사이언스(한국)에서 구입하여 사용하였고, 실험실동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다.

2. 시료의 준비

본 처방은 『東醫寶鑑』⁶⁾의 생혈윤부음을 근간으로 저자의 임상경험에 따라 당뇨병에 치료효과가 있는 약재를 가감하여 장복을 위해 환제로 처방하며, 가감생혈윤부음(加減生血潤膚飲, Add-Omit-Saenghyeoryunbu-eum, AO-SHU)으로 명명하였고 전체 조성은 Table 1과 같다. 약재들은 울산한약품(한국)에서 규격품을 구입, 정선하여 각 생약별로 분쇄기를 사용하여 분말(100mesh, 약 0.245mm)로 하고 분량대로 잘 섞어서 찹쌀풀로 직경 5mm의 환

으로 제환 후 건조기를 이용하여 50°C에서 12시간 건조하여 완성하였다.

Table 1. Composition of Add-Omit-Saenghyeoryunbu-eum(AO-SHU)

Herbal name	Drug name	Produce Region	Dosage(g)
天花粉	<i>Trichosanthis Root</i>	Korea	10.5
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	China	7.5
白僵蠶	<i>Bombycis Corpus</i>	China	7.5
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	Korea	7.5
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	Korea	4.5
五加皮	<i>Acanthopanax Cortex</i>	Korea	4.5
茯苓	<i>Hoelen</i>	Korea	4.5
白扁豆	<i>Dolichoris Semen</i>	China	4.5
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	China	3.0
知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	China	3.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	Korea	3.0
蓮子肉	<i>Nelumbinis Semen</i>	China	3.0
Total amount(g)			63.0

3. 가감생혈윤부음의 생리활성 성분분석용 시료 및 추출 수율

추출용매 및 시간에 따른 가감생혈윤부음의 생리활성 성분분석을 위하여 아래의 Table 2에서와 같이 분말 형태로 하여 각 시간동안 침적한 후 여과 직전에 진탕기(sonicator)로 30분간 진탕하고, 0.2 μ m 마이크로 필터로 여과한 후, rotary evaporator로 감압 농축하여 시료를 준비하였다. 추출물은 -20°C에 보관하였다가 분석실험 직전 메탄올에 녹여 사용하였다.

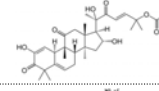
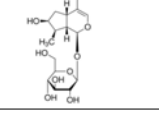
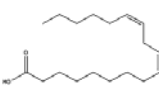
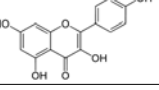
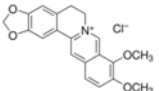
Table 2. The extraction yield of AO-SHU

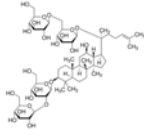
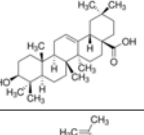
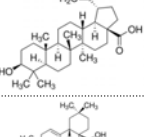
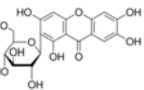
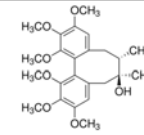
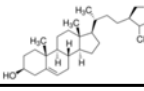
Sample	Amount (g)	Solvent / Amount(ml)	Extraction time (days)	Extracts (g)	Extraction yield (%)
analyzing sample-1	15	MeOH:EtOH:H ₂ O (4/4/2, v/v/v) 150	1	4.24	28.3
analyzing sample-2	15	MeOH 150	1	1.43	9.53
analyzing sample-3	8	MeOH 80	10	0.932	11.7
analyzing sample-4	8	MeOH 80	40	1.54	19.3

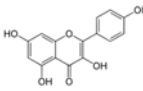
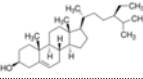
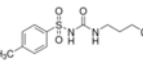
4. 가감생혈윤부음 구성 생약별 당뇨치료효과 예측 성분(지표성분, Marker Substances)의 조사 및 메탄올 용매 추출 수율

Table 3에서와 같이 가감생혈윤부음을 구성하고 있는 개별 생약에 대한 문헌연구⁸⁻²⁴⁾를 통해 당뇨병 치료효과를 나타내는 지표성분(Marker Substances)들을 조사하고, 각 생약별로 분말 8g씩을 취하여 메탄올 80ml에 24시간 침적한 후, 여과 직전에 진탕기 (sonicator)로 30분간 진탕하고, 0.2 μ m 마이크로 필터로 여과한 후, rotary evaporator로 감압 농축하여 시료를 준비하였다. 추출물은 -20°C에 보관하였다가 분석실험 직전 메탄올에 녹여 사용하였다.

Table 3. The ingredients and extraction yield of each crude drugs

Crude drug	Structure	Marker Substance	Extracts (g)	Extraction yield (%)
天花粉		Citrullin C6H13N3O3 Mw. 175.19	0.452	5.65
		Cucurbitacin E C32H44O8 Mw. 556.69		
生地黄		Bryonic acid C30H48O3 Mw. 456.70	N.A.	N.A.
		Catalpol C15H22O10, Mw. 362.33		
白僵蠶		Loganin (Iridoid glycoside) C17H26O10, Mw. 390.38	0.940	11.8
		Conjugated linoleic acid (CLA) Linoleic acid (Telfairic acid) C18H32O2, Mw 280.45		
五加皮		Sesamin C20H18O6, Mw. 354.36	1.364	17.1
		Kaempferol C15H10O6, Mw. 286.23		
黄连		Berberine chloride C20H18ClNO4, Mw. 371.81	1.688	21.1

Crude drug	Structure	Marker Substance	Extracts (g)	Extraction yield (%)
人蔘		Ginsenoside Rb1 C54H92O23, Mw. 1109.29	0.972	12.2
		Ginsenoside Rg1 C42H72O14, Mw. 801.01		
		Oleanolic acid C30H48O3, Mw. 456.70		
		Kaempferol C15H10O6, Mw. 286.23		
		β -Sitosterol C29H50O, Mw. 414.71		
		Ferulic acid C10H10O4, Mw. 194.18		
麥門冬		β -Sitosterol C29H50O, Mw. 414.71	2.528	31.6
		Oleanolic acid C30H48O3, Mw. 456.70		
茯苓		Betulinic acid C30H48O3, Mw. 456.70	0.156	1.95
		Oleanolic acid C30H48O3, Mw. 456.70		
知母		Mangiferin C19H18O11, Mw. 422.34	2.552	31.9
五味子		Citrullin C6H13N3O3, Mw. 175.19	3.988	49.9
		Schizandrin C24H32O7, Mw. 432.51		
		β -Sitosterol C29H50O, Mw. 414.71		

Crude drug	Structure	Marker Substance	Extracts (g)	Extraction yield (%)
蓮子肉		Kaempferol C ₁₅ H ₁₀ O ₆ , Mw. 286.23	1.252	15.7
		β -Sitosterol C ₂₉ H ₅₀ O, Mw. 414.71		
		Tolbutamide C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S, Mw. 270.35		
白扁豆	—	—	0.632	7.90
N.A.: not available				

5. 가감생혈윤부음의 지표성분에 대한 LC-MS/MS를 이용한 정성/정량분석

• HPLC-MS/MS의 기기분석은 Thermo사 분석기기를 이용하여 컬럼으로 Capcell PAK MGII (3 μ m, 2 x 100mm)를 사용하여 각 지표성분들에 대한 정성 및 정량분석을 실시하였다. 분석에 사용한 용매

등 시약은 Merk 사의 HPLC용 분석시약과 3차 증류수를 각각 사용하였고 분석용 검액의 조제는 가감생혈윤부음 분말 및 각 생약별 분말을 사용하여 준비한 추출물 1mg를 메탄올로 녹여 ppb(ng/mL [ng/g]) 단위로 희석하여 마이크로필터로 여과한 후, 분석에 사용하였다.

6. 가감생혈윤부음의 약리성분에 영향을 줄 수 있는 살충제 등을 측정하기 위한 잔류농약 분석시험

• 가감생혈윤부음의 약리시험에 영향을 줄 수 있는 물질의 존재와 양을 판단하기 위하여 아래 Table 4과 같은 국립농산물품질관리원에 등재되어 있는 농약 245종에 대한 함량시험을 식품의약품안전처 고시를 참조하여, 순천향대학교 고부가생물소재산업화지원 지역혁신센터의 도움을 얻어 다음과 같은 방법과 시료 전처리 후 GC 및 HPLC를 사용하여 분석하였다.

Table 4. Pesticide listed in National Agricultural Products Quality Management Service

Anilofos	Endosulfan(α)	Iprodione	Thiobencarb	Terbufos	Dimethomorph	Benthiavalcab-isopropyl
Bromopropylate	Endosulfan(β)	Isoprothiolane	Tralomeftrin	Thiazopyr	Dimethylvinphos(Z)	Benzoximate
Carbophenothion	Endosulfan(sulfate)	Kresoxim-methyl	Triadimefon	Chlorpyrifos-methyl	Fenimzone	Carbendazim
Chlorfenvinphos	Flucyathinate	Mefenacet	Vinloczolin	Diazinon	Fumioxazin	Chloranilprole
Chlorfiazuron	Imazail	Metolachlor	Dichlorvos(DDVP)	Dimepiperate	Hexaflumuron	Ethaboxam
Chlorobenzilate	Indanofan	Nuarimol	Methabenzthiazuron	Diphenylamine	Mepanipyrim	Etofenprox
Cyflufenamid	Metobromuron	Piperophos	Terbutylazine	Fenbuconazole	Metamitop	Flubendiamide
Cyhalothrin(lambda)	Metribuzin	Pyridalyl	Iprobenfos	Fenothiocarb	Novaluron	Flupicolid
Deltamethrin	Mevinphos	Pentachloroaniline	Simetryn	Fenthion(MPP)	Pirimicarb	Hexythiazox
Dicloran	Penconazole	Qintozene	Metalaxyl	Fusilazole	Pyributicarb	Mandioproamid
Dicofol	Probenazole	Tolyfluanid	Terbutryn	Fosthiazate	Pyriproxyfen	Methoxyfenozide
Dimethenamid	Prochloraz	Triadimenol	Malathion	Metconazole	Quinoclamine	Oxaziclomefone
Disulfoton	Procyimidone	Alachlor	Parathion	Phorate	Pencyuron	Pencyuron
Etrinfos	Prometryn	Bifenox	Pendimethalin	Phosalone	Tebufenozide	Silaflofen
Fenpropathrin	Simazine	Chinomethionat	Trifluzole	Pirimiphos-methyl	Thiabendazole	Spiromesifen
Fenvalerate	Simeconazole	Chlordane(cis)	Hexaconazole	Profenofos	Thiacloprid	Thiophanate-methyl
Flutolanil	Tefluthrin	Chlordane(trans)	Myclobutanil	Pyriminobac-methyl(Z)	Trifloxystrobin	Tiadinil
Folpet	Tetraconazole	Chlorothalonil	Cyproconazole	Pyriminobac-methyl(E)	Acetamiprid	Tricyclazole
Hallefenprox	Tetradifon	Cypermethrin	Edifenphos	Tebuconazole	Boscalid	Carbaryl
Heptachlor	Thifluzamide	4,4-DDT	Etoazole	Chlorpyrifos	Cyazofamid	Carbofuran
(Heptachlor epoxide)	Zoxamide	2,4-DDT	Pyraclufos	Cyprodinil	Cymoxanil	Fluquinconazole
Lufenuron	Acrinathrin	Diclofop-methyl	Furathiocarb	Dimethoate	Diethofencarb	Isoprocarb
Oxadiazon	BHC(α)	Endrin	Azinphos-methyl	EPN	Diflubenzuron	Methiocarb
Oxyfluorfen	BHC(β)	Ethalfuralin	Bitertanol	Esprocarb	Diuron	Methomyl
Paclobutrazole	BHC(δ)	Etridiazole	Buprofezin	Ethoprophos	E-Fenpyroximate	Thiodicarb
Parathion-methyl	BHC(γ)	Fenarimol	Cadusafos	Fenazaquin	Forchlorfenuron	Aldicarb
Permethrin	Bromobutide	Flufenoxuron	Chlorpropham	Fludioxonil	Imibenconazole	Ethiofencarb
Propiconazole	Butachlor	Mecarbam	Diniconazole	Mepronil	Imidaclopid	Fenobucarb
Triflumuron	Cyfluthrin	Methoxychlor	Diphenamid	Napropamide	Pentoxazone	Metolcarb
Trifluralin	Dichlofluanid	Methyl-pentachlorophenyl sulfide	Fenamiphos	Phenthoate	Pyraclostrobin	Oxamyl
Aldrin	Dithiopyr	Ethion	Fenitrothion(MEP)	Pyrazophos	Pyribenzoxim	Propoxur
Azoxystrobin	Ethion	Oturance	Iprovalicarb	Tebupirimfos	Pyrimethanil	Thiamethoxam
Bifenthrin	Fenamidone	Pirimiphos-ethyl	Isofenphos	Tolclofos-methyl	Pyroquilon	
Captan	Fenoxanil	Propanil	Methodathion	Triazophos	Spirodiclofen	
Chlorfenapyr	Fipronil	Pyridaben	Molinate	Benomyl	Teflubenzuron	
Clofentezine	Fthalide	Pyridaphenthion	Prothiophos	Chromafenozide	Amisulbrom	
Dieldrin	Indoxacarb	Pyrimidifen	Tebuconazole	Clothianidin	Bendiocarb	
Difenoconazole			Tebuconazole	Cyhalofop-butyl		

•가감생혈윤부음 시료 전처리방법

- 1) 시료 칭량 : 시료 50 g을 polyethylene bottle 에 칭량(곡류인 경우 시료무게의 1.5~2배의 증류수를 첨가 후 1시간이상 정치)
- 2) 균질화 : Acetonitrile 100 mL 첨가 후 균질기에서 5,000 rpm으로 3분간 마쇄, 추출한 다음 Acetonitrile 100 mL 첨가 후 210~230 rpm으로 30분간 진탕 추출하였다.
- 3) 원심분리 : NaCl 25 g을 추가한 후 진탕기에 30분간 진탕 후 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다.
- 4) 농축 : GC분석용 시료는 상등액 10 mL를 취한 후 N₂ gas로 미세농축 후 아세톤:헥산 (20:80 v/v) 1 mL로 재용해하여 사용하고, HPLC 분석용 시료는 상등액 10 mL를 취한 후 N₂ gas로 미세농축 후 methylene chloride 2 mL로 재용해하여 사용하였다.
- 5) 정제 후 분석 : GC분석용 시료는 SPE 카트리지 (Florisil 1 g)에 헥산 5 mL, 아세톤:헥산 (20:80 v/v) 5 mL로 순차적으로 conditioning 후 시료액을 loading하고 아세톤:헥산 (20:80 v/v) 6 mL로 용출한 후, N₂ gas로 미세농축 후 acetone 1 mL에 재용해하여 기기분석 (ECD, NPD)하였다. HPLC 분석용 시료는 SPE 카트리지 (Amino-propyl 1 g)에 methylene chloride 5 mL으로 conditioning 후 시료액을 loading하고 5% MeOH 함유 methylene chloride 6 mL로 용출한 후, N₂ gas로 미세농축 후 acetonitrile 1 mL에 재용해하여 기기분석(UVD, FLD) 하였다.

7. 가감생혈윤부음 추출물 및 각 성분 생약추출물의 당뇨병 질환 타깃 GPR119에 대한 *in vitro* 효력 비교실험

- 가감생혈윤부음의 당뇨병 치료에 대한 *in vitro* 효력 비교실험을 위하여 현재 당뇨 및 비만을 타깃으로 치료제 개발을 하고 있는 GPR119 (G protein-coupled receptor)²⁵⁾ 효현제 (activator)와의 비교 실험을 한국화학연구원 대사증후군치료제연구센터의 도움을 받아 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- 세포주는 functional assay system을 확립하여 stable cell line을 확보하고 있는 한국화학연구원

대사증후군치료제연구센터에서 보유하고 있는 HEK293 세포주를 사용하여 발광효소분석을 수행하였다.

- HEK293는 DNA 트랜스팩션이 잘되는 세포로서 단백질 과발현(overexpression) 목적으로 흔히 사용된다. 원래 293 세포는 유산된 태아(fetus)의 신장(kidney)로부터 적출한 세포에 Ad5 DNA fragment를 트랜스팩션하여 형질전환시킨 세포주 (cell line)이다.
- In vitro* 시험용 약제는 가감생혈윤부음 분말 및 각 생약별 분말을 사용하여 준비한 추출물을 DMSO에 일정량 용해하여 효과 시험을 수행하여 결과를 얻었다.
- Glucose-Dependent Insulinotropic Receptor (GDIR, GPR119) Agonists는 현재까지 약으로 시판되는 것이 없는 타깃 약물이며 세포외부의 신호 물질 (hormones, neurotransmitters 등)에 반응하여 신호전달을 일으키는 단백질로써 transmembrane receptor이다. 특히 GPCR 계열 receptor 중 에너지 대사와 관련된 단백질은 cannabinoid receptor, melanocortin-4 receptor, melanin-concentrating hormone receptor, beta-3 Adrenergic receptor, GPR35, GPR55, GPR119 등이 있음. GPCR의 일종인 orphan receptor GPR119는 pancreas, gastrointestinal tract, rodent brain에 많이 발현되어 있으며, 당뇨 및 비만치료제 target²⁶⁾으로 밝혀져 있다. 체내 lipid signaling agent인 oleoylethanolamide (OEA)는 GPR119의 ligand로 알려져 있으며 동물(쥐)에 투여시 음식물 섭취 및 체중감소 현상을 나타내었다. 또한 Prosidion사에서 연구하는 GPR119의 synthetic ligand인 PSN-632405를 high fat diet를 시키는 쥐에 투여 시 음식물 섭취, 체중감소 및 WAT 감소를 확인되었다.
- GPR119에 대한 assay 방법²⁷⁾: GPR119 발현벡터는 우선 Caco-2 세포에서 RNA 추출용액(Invitrogen, USA)을 이용하여 전 RNA를 추출하고 cDNA 합성 키트(Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 프라이머(정방향: GTAAGTGAAGTCCTGCCACTTCG, 역방향: TGAAATTCCTCG CCCTTACCG)를 이용하여 PCR를 수행하고 pTARGET(Promega, USA)벡터에 클로닝하였다. GPR119의 효과를 보기 위해 CRE 리포터 벡터(Promega, USA)와 pTARGET GPR119 벡터를

CHO-K1에 리포펙트아민(lipofectamine, Invitrogen, USA)을 이용하여 도입하였다. 두 벡터를 도입한 후 50 µg/ml G418(USB, USA), 200 µg/ml 하이그로마이신 B(Hygromycine B, Invitrogen, USA)로 선별하여 살아남은 세포 중에 AR231453에 활성을 잘 나타내는 C2-C5클론 세포를 획득했다. CHO-K1-GPR119-C2-C5세포(이하 클론세포)를 이용하여 GPR119 작용제(agonist)를 선별하고 작용제의 EC₅₀를 구하였다. 클론세포는 RPMI(Gibco, USA), 10% FBS(Gibco, USA), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, USA)배양에서 유지하였다. 먼저 클론세포를 웰당 30,000개를 96 웰 플레이트에 넣은 다음 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 클론세포에 본 발명의 화합물을 처리하고 6시간 후 배지를 버리고 레프로터 라이시스 버퍼(reproter lysis buffer, Promega, USA)를 처리한 다음 -70 °C에 30분간 보관하였다. 보관 후 실온에서 해동한 다음 루시페라제 어레이키트(luciferase assay kit)를 이용하여 GPR 119 작용제의 활성을 루미노스칸 기기(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다. 화합물의 활성 농도를 넣어 프리즘 4(GraphPad Inc. USA)프로그램을 사용하여 EC₅₀ 값을 구하였다.

8. 가감생혈운부음 추출물 및 각 성분 생약추출물의 당뇨병 질환 타깃 DGAT-1에 대한 *in vitro* 효력 비교실험

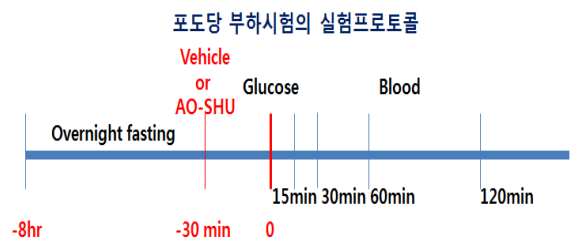
- 가감생혈운부음의 당뇨치료에 대한 *in vitro* 효력 비교실험을 위하여 현재 당뇨 및 비만 타깃으로 치료제 개발을 하고 있는 DGAT-1 (Diacylglycerol acyltransferase-1)²⁸⁾ 저해제(inhibitor)와의 비교 실험을 한국화학연구원 대사증후군치료제연구센터의 도움을 받아 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- DGAT-1은 TG 생성에 관여하는 효소로서 DGAT-1을 억제하면 당뇨를 포함한 대사증후군의 예방 및 치료효과를 나타낸다²⁹⁾. 현재 DGAT 1 inhibitor의 연구는 현재 가장 앞선 화합물이 임상 2상의 화합물이 있다.
- 음식섭취를 통하여 취득한 영양분은 대사물 분해 효소들 (lipase 등)에 의해 분해되어 대부분 장에서 흡수된다. 따라서 영양분의 흡수를 조절함으로써 체내의 에너지 유입의 정도를 조절할 수 있다. 장에서 지방 분해를 억제하여 지방 흡수를 방지하

는 Orlistat (Xenica, Roche)은 영양분 흡수 조절을 통한 비만 치료제 개발의 대표적 사례이다. 또한 지방산 합성에 필요한 효소들 (MGAT, DGAT, AGPAT, FAS, ACC, SCD 등)과 지방산 분해에 관련된 효소들 (AMPK, ACO 등)의 발현 및 활성 조절을 통하여 과잉 에너지원이 지방 조직에 축적되는 것을 막을 수 있기에 비만 치료제 개발의 중요 작용기점으로 고려되고 있다.

- DGAT-1에 대한 assay 방법: 200 uM dioleoylglycerol, 100 mM MgCl₂, 200 ug BSA, 2.76 uM [14C]oleaoly-CoA, 175 mM Tris HCl (pH 8.0), 3 mg/ml human 혹은 rat microsome 그리고 약물을 넣어 25°C water bath에서 30분간 incubation하였다. 1.5 ml stop solution (2-propanol 80:heptane20:DW2)을 넣고 섞은 뒤 1 ml heptane과 0.5 ml DW 넣고 다시 잘 섞어주었다. 다음 상층액 1.2 ml을 새 tube로 옮기고 2 ml Alkaline ethanol 용액 (Ethanol 50 : 0.5N NaOH 10 : DW 40)을 넣고 잘 섞은 뒤 상층액 700 ul를 scintillation vial로 옮긴 뒤 2 ml LSC cocktail solution을 넣은 뒤 scintillation reader를 이용해 측정하였다.

9. 가감생혈운부음 제환분말과 MeOH 추출물의 *in vitro* 효력 비교실험

- 가감생혈운부음의 당뇨치료에 대한 *in vivo* 효력 비교실험은 동물실험으로 쥐를 이용하였으며 경구 포도당부하시험(Oral glucose tolerance test, OGTT)을 아래의 실험 프로토콜을 설정하여 실시하였다.



1. Overnight fasting
2. 가감생혈운부음 제환 분말, MeOH 추출물(100 mpk) 및 GSK263(30mpk) 경구 투여
3. 30분 후 Glucose (2g/kg) 투여
4. 15min, 30min, 60min 및 120min 간격으로 채혈

- 동물시험 시료: 가감생혈운부음 제환분말(AO-SHU-1) 및 가감생혈운부음 제환분말 10g을 메탄올 100ml

를 넣어 3시간 환류한 후 여과하고 감압농축하여 얻은 추출물(AO-SHU-2)을 vehicle에 녹여 100mpk 로 경구 투여하였다.

- 경구포도당부하시험의 대조약물: in vitro 대조약물로 사용했던 GSK사의 GPR119 효현제 후보물질(현재 임상 2상 시험약물)을 vehicle에 녹여 30mpk로 경구 투여하였다.
- 경구포도당부하시험 방법
 - 1) 8시간 정도 밤새 굶긴 c57bl/6 mice을 대상으로 가감생혈운부음 제환분말(AO-SHU-1)과 가감생혈운부음 메탄올추출물(AO-SHU-2)을 100mpk로, 대조약물(GSK263)와 8종류의 개발 중인 단분자 화합물(SH-201401~SH-201408)을 30mpk로 vehicle에 녹이거나 현탁액으로 하여 경구 투여하였다.
 - 2) 30분 후, 체중 kg당 2g의 글루코오스를 녹여 경구 투여하였다.
 - 3) 글루코오스 투여시점을 0으로 하여 미리 설치

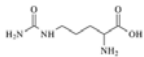
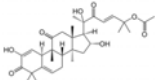
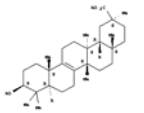
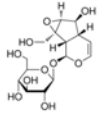
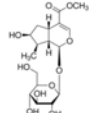
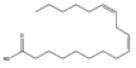
한 혈관튜브(retro-orbital plexus using heparin-coated capillary tubes)를 통해 0, 15, 30, 60 및 120분 간격으로 혈액을 채취, 분석하여 혈중 Glucose농도 및 AUC(Area Under the Curve, 혈중농도-시간곡선하면적)를 얻었다.

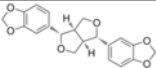
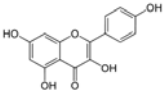
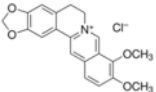
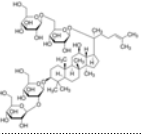
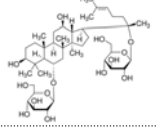
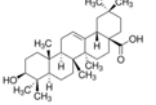
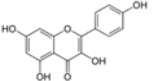
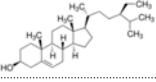
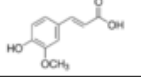
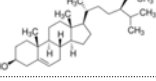
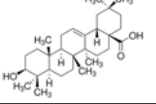
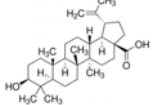
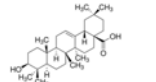
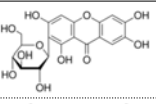
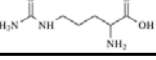
III. 결과

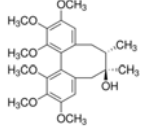
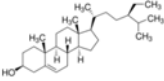
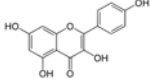
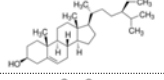
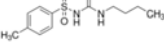
1. 가감생혈운부음 구성 생약별 당뇨치료효과 예측 성분(지표성분, Marker Substances)의 조사 및 함량 분석

- 가감생혈운부음의 구성 생약 12가지에 대한 대한 약전, 대한약전의 한약(생약)규격집, 중국약전 및 Sci-Finder 등 여러 문헌조사를 통하여 당뇨치료 효과를 나타내는 성분을 조사⁷⁻²³⁾하여 Table 5에 수록하였고, 이를 지표성분으로 하여 함량시험을 수행하였다.

Table 5. The components representing the diabetes therapy for crude drug included in AO-SHU and the result of quantitative analysis

Crude drug	Predicted pharmacological active ingredients	Structure	Pharmacological activity	Content (mg/g)
	Citruline		urination, promote lipolysis, improve immunity, relieve swelling	4.107
天花粉	Cucurbitacin E		hypoglycemic, analgesic, antiviral, mutation suppression	nd
	Bryonolic acid		antidiabetic, anti-allergy	nd
生地黃	Catalpol		hypoglycemic, urination, improve immunity, relieve pain	N.A.
	Loganin (Iridoid glycoside)		antidiabetic, aphrodisiac, analgesic	N.A.
白僵蠶	Conjugated linoleic acid (CLA)		body fat reduction, anticancer, promote growth, prevent atherosclerosis, reduce cholesterol, antidiabetic	nd

Crude drug	Predicted pharmacological active ingredients	Structure	Pharmacological activity	Content (mg/g)
五加皮	Sesamin		prevent diabetic complications, antidiabetic, improve liver function, prevent hypertension	nd
	Kaempferol		urination, antioxidant	nd
黃蓮	Berberine chloride		antidiabetic, hypoglycemic, reduce cholesterol, improve cardiovascular disease	14.87
人參	Ginsenoside Rb1		reduce triglyceride, tranquilizer, analgesic, antipyretic, anti stress, anti stress,	1.695
	Ginsenoside Rg1		reduce triglyceride, stimulate CNS, anti stress, anti-fatigue, improve immunity, antioxidant	1.377
	Oleanolic acid		antidiabetic, hypoglycemic, anticancer, mutation suppression	0.019
麥門冬	Kaempferol		urination, antioxidant	nd
	β -Sitosterol		antidiabetic, antioxidant, treat hyperplasia, prostatic	nd
	Ferulic acid		antidiabetic, anti-inflammatory, hypotensive	nd
	β -Sitosterol		antidiabetic, antioxidant, treat hyperplasia, prostatic	0.458
茯苓	Oleanolic acid		antidiabetic, hypoglycemic, anticancer, mutation suppression	0.051
	Betulinic acid		antidiabetic, anticancer, anti-HIV, sedative, anti-aging	nd
知母	Oleanolic acid		antidiabetic, hypoglycemic, anticancer, mutation suppression	nd
	Mangiferin		antidiabetic, antioxidant, anticancer	5.273
	Citrullin		urination, reduce cholesterol, immunity, relieve swelling	2.571

Crude drug	Predicted pharmacological active ingredients	Structure	Pharmacological activity	Content (mg/g)
五味子	Schizandrin		antidiabetic, improve liver function, treat erectile dysfunction	1.356
	β -Sitosterol		antidiabetic, antioxidant, treat hyperplasia prostatic	0.758
	Kaempferol		urination, antioxidant	nd
蓮子肉	β -Sitosterol		antidiabetic, antioxidant, treat hyperplasia prostatic	0.110
	Tolbutamide		urination, early stage diabetes treatment	nd
白扁豆	-	-	-	N.A.

nd: no detected, N.A.: not available

•가감생혈윤부음의 구성 생약 12가지 생약에 있는 항당뇨성분으로 Citrulline, Cucurbitacin E, Bryonolic acid, Catalpol, Loganin(Iridoid glycoside), Conjugated linoleic acid(CLA), Sesamin, Kaempferol, Berberine, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rg1, Oleanolic acid, β -Sitosterol, Ferulic acid,

Betulinic acid, Mangiferin, Schizandrin 및 Tolbutamide 등 18가지 성분을 가감생혈윤부음의 지표성분으로 설정하였으며, 각 생약별로 메탄올 용매 추출하여 LC-MS/MS로 함량 분석한 결과를 생약 g당 mg으로 표시하였다(Table 6).

Table 6. The results of LC-MS/MS analysis for the extracts of AO-SHU

Predicted pharmacological active ingredients(18)	Contents (mg/g)			
	Sample-1 Extracts with MeOH/EtOH/ H ₂ O(4:4:2 v/v/v) (1day)	Sample-2 Extracts with MeOH (1day)	Sample-3 Extracts with MeOH (10days)	Sample-4 Extracts with MeOH (40days)
1 Citrullin	2.124	0.873	0.920	0.873
2 Cucurbitacin E	nd	nd	nd	nd
3 Bryonolic acid	nd	nd	nd	nd
4 Catalpol	nd	0.622	0.436	0.224
5 Loganin (Iridoid glycoside)	nd	nd	nd	nd
6 CLA	nd	nd	nd	nd
7 Sesamin	nd	nd	nd	nd
8 Kaempferol	nd	nd	nd	nd
9 Berberine chloride	2.164	0.877	1.847	1.461
10 Ginsenoside Rb1	0.167	0.036	0.107	0.149
11 Ginsenoside Rg1	0.158	0.011	0.125	0.094
12 Oleanolic acid	5.412	1.745	nd	nd
13 β -Sitosterol	0.952	0.680	0.096	0.227
14 Ferulic acid	nd	nd	nd	nd
15 Betulinic acid	nd	nd	nd	nd
16 Mangiferin	0.554	0.169	0.341	0.341
17 Schizandrin	0.638	0.489	0.418	0.431
18 Tolbutamide	nd	nd	nd	nd

2. 가감생혈윤투부음 지표성분에 대한 정성 및 정량분석

가감생혈윤투부음에 대한 메탄올 단일용매 추출에 대한 시간(1일, 10일 및 40일) 과의 관계를 도표로 나타내면 Fig. 1과 같다. 추출용매로 메탄올을 사용할 경우에 대부분의 지표 유효성분들은 장시간의

침적조건에서 분해되어 함량이 줄어드는 경향을 보였다. 추출 시험 결과 혼합 분말의 경우는 용매 추출시간을 10일을 넘어서지 않는 것이 좋을 것으로 사료된다.

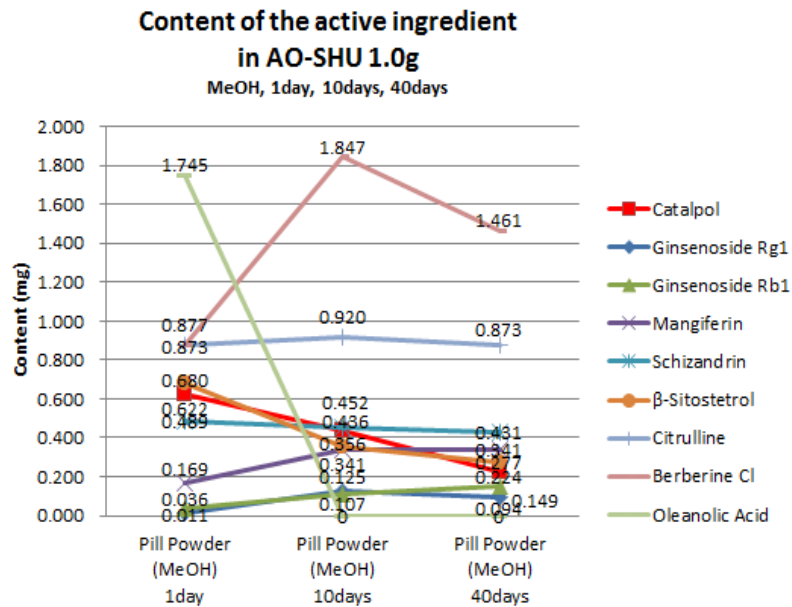


Fig. 1. Comparing the content of the active ingredient according to the extracted time (MeOH solvent)

3. 가감생혈윤투부음의 잔류농약 분석시험

가감생혈윤투부음의 약리시험에 영향을 줄 수 있는 물질의 존재와 양을 판단하기 위하여 국립농산물품질관리원에 등재되어 있는 농약 245종에 대한 잔류농약 검사시험을 한 결과, 239종은 불검출되었고, Table 7과 Fig. 2에서와 같은 6종의 농약이 검출되었으나 약간 높게 나온 Isoprocarb (살충제)의 경우 쌀 기준 0.3ppm 이하, Carbaryl (살충제, 성장조절제)의 경우 옥류 5.0ppm, 농산물 2.0ppm 이하의 허용 기준에 미달하였고, 본 실험에서 실시할 약리시험에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 확인하였다.

Table 7. The results of pesticide residue test of AO-SHU

Pesticide detection	content (ppm)
Dimethomorph	0.0005
Trifloxystrobin	0.0005
Pyraclostrobin	0.0029
Isoprocarb	0.1964
Carbaryl	0.2223
Flubendiamide	0.0006
239 others	no detected

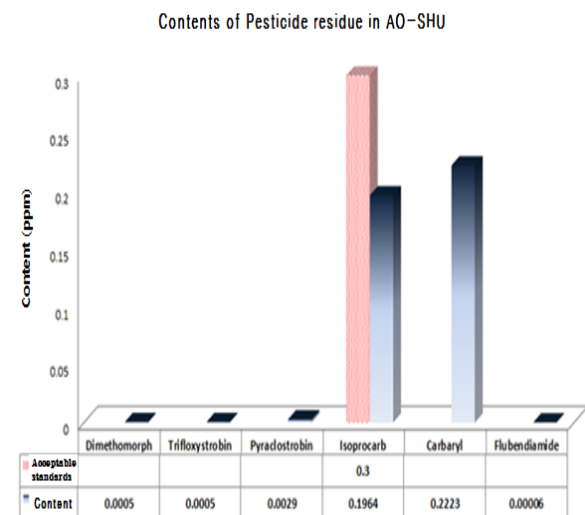


Fig. 2. Diagram of Pesticide residue

4. 당뇨병 질환 타깃 GPR119 및 DGAT-1에 대한 *in vitro* 효력

• 당뇨병 타깃인 GPR119 및 DGAT-1에 대한 *in vitro* assay 결과를 Table 8에 수록하였다. GPR119 agonist로서의 활성도는 1 μ M 농도에서 모두 50% 이하로 조사되어 유효농도 (EC₅₀)를 구하지는 못하였으나, 어느 정도의 활성을 보이는 것으로 나타났으며, DGAT-1 저해제로서의 활성도는 물질의 구조 특성상 타깃에 활성을 보이지 않는 것으로 보인다. 일반적으로 DGAT-1 저해제는 실제 지방산과 비슷한 구조를 가지는 긴 사슬 또는 그와 유사한 구조에 대해 활성도를 가진다.

Table 8. The result of *in vitro* assay for AO-SHU extracts and each ingredients

AO-SHU & Predicted pharmacological active ingredients(18)	<i>in vitro</i> assay	
	% GPR119 activity (1 μ M)	% human DGAT-1 inhibition (10 μ M)
AO-SHU powder(AO-SHU-1)	48.4	15.1
AO-SHU MeOH extract(AO-SHU-2)	46.9	11.8
1 Citrullin	44.8	6.1
2 Cucurbitacin E	21.3	2.5
3 Bryonolic acid	35.9	3.4
4 Catalpol	38.0	0.0
5 Loganin (Iridoid glycoside)	39.0	0.0
6 Conjugated linoleic acid(CLA)	N.A.	N.A.
7 Sesamin	42.3	0.0
8 Kaempferol	45.0	8.1
9 Berberine chloride	41.8	0.0
10 Ginsenoside Rb1	39.7	0.0
11 Ginsenoside Rg1	39.6	9.0
12 Oleanolic acid	38.5	12.3
13 β -Sitosterol	39.3	15.8
14 Ferulic acid	N.A.	N.A.
15 Betulinic acid	39.6	30.2
16 Mangiferin	50.9	12.3
17 Schizandrin	45.4	2.6
18 Tolbutamide	43.2	-3.8
Ref GSK263	EC ₅₀ =13nM	

N.A.: not available

5. C57BL/6 mice를 이용한 경구포도당부하시험

정상 쥐를 밤새 금식을 시킨 뒤 체중 1kg 당 100mg으로 가감생혈운부음 제환분말(AO-SHU-1) 및 메탄올 추출물(AO-SHU-2)을 각각 경구로 투여

하고 30분 뒤에 경구 포도당 부하 검사를 실시하였고 약물을 투여하지 않은 대조군(5마리, 평균 체중 21.56g)에서는 포도당 투여 전후 혈당을 비교, 분석하였다. 비교 약물은 현재 GPR119 저해제로서 임상 시험 중에 있는 글락소스미스클라인 사의 GSK263 화합물과 전임상 후보물질을 개발 중인 순천향대학교 화학과에서 합성한 8종류 단분자 화합물(SH-201401~SH-201408)을 30mpk로 vehicle에 녹이거나 현탁액으로 하여 경구 투여하여 아래와 같은 비교시험결과를 얻었다.

1) 가감생혈운부음 제환분말(AO-SHU-1)의 경구 포도당부하시험

가감생혈운부음 제환분말(AO-SHU-1)에 대한 단회 투여 경구포도당부하시험은 쥐 5마리를 대상으로 100mpk로, 대조약물인 GSK263과 4 종류의 단분자 화합물(SH-201401~SH-201404)을 30mpk를 투여하여 비교 실험하였으며 결과를 Table 9와 같다.

Table 9. The result of OGTT for AO-SHU pill(AO-SHU-1)

Sample	Average BW	Concentration of glucose (mg/dl)					AUC (mg/dl, 120min)
		0	15min	30min	60min	120min	
Control	21.56	100.0	457.4	384.4	331.0	209.0	37,424.8
AO-SHU-1	21.75	100.6	504.6	470.2	331.2	229.8	40,700.6
GSK263	21.65	100.0	405.8	341.0	251.4	187.2	31,438.2
SH-201401	21.68	100.2	393.8	384.8	292.6	192.8	34,267.4
SH-201402	21.80	100.2	449.6	392.2	328.8	198.4	37,068.0
SH-201403	21.42	100.2	449.6	354.4	263.6	221.4	33,973.2
SH-201404	21.92	100.2	467.4	451.0	342.8	208.6	39,593.6

AO-SHU-1을 사용한 실험결과는 Fig. 3에서와 같이 약물을 투여하지 않은 군(control)과 거의 유사하게 초기 혈당은 100.6 mg/dl에서 포도당 투여 15분에 504.6 mg/dl로 급상승하였다가 30분에 470.2 mg/dl, 60분에 331.0 mg/dl 및 120분에는 229.8 mg/dl로 감소하였으나 혈당강하 측면에서 큰 효과를 나타내지 않는 것으로 보였다. 이는 단회의 환제에 포함된 약리물질의 함량이 낮은 이유로 생각되며, 반복적인 섭취에 의해 혈당강하는 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

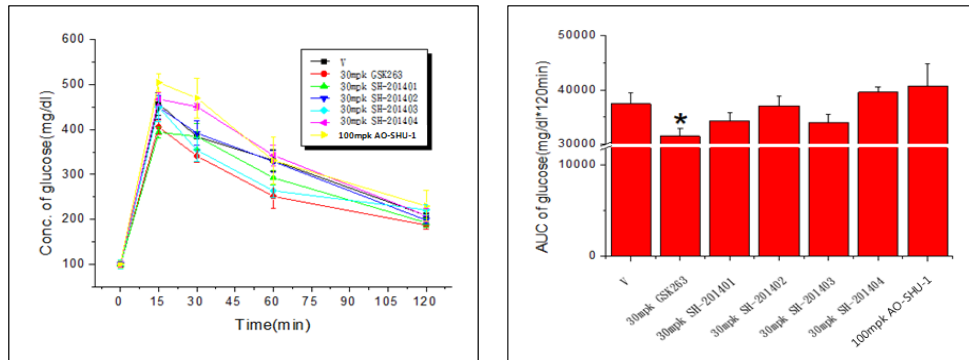


Fig. 3. The diagram of concentration and AUC of glucose for AO-SHU pill

2) 가감생혈윤부음 제한분말의 MeOH 추출물 (AO-SHU-2) 경구포도당부하시험
가감생혈윤부음 제한분말의 MeOH 추출물 (AO-SHU-2)에 대한 단회 투여 경구포도당부하시험은 쥐 5마리를 대상으로 100mpk로, 대조약물인 GSK263과 4종류의 단분자 화합물 (SH-201405~SH-201408)을 30mpk를 투여하여 비교 실험하였으며 결과를 Table 10과 같다.

Table 10. The result of OGTT for the MeOH extract of AO-SHU pill(AO-SHU-2)

Sample	Average BW	Concentration of glucose (mg/dl)					AUC (mg/dl, 120min)
		0	15min	30min	60min	120min	
Control	22.38	97.8	442.4	329.6	254.0	173.2	31,411.2
AO-SHU-2	22.95	97.4	490.6	370.8	253.4	180.4	33,247.2
GSK263	22.61	97.4	371.4	294.8	195.6	161.0	26,566.2
SH-201405	22.68	97.6	452.2	426.6	302.0	190.0	36,403.2
SH-201406	22.72	97.0	512.0	459.8	321.8	200.4	39,245.8
SH-201407	22.84	97.8	511.6	450.0	329.8	249.2	40,849.4
SH-201408	22.94	97.2	467.0	440.4	270.6	208.0	36,059.8

AO-SHU-2를 사용한 실험결과는 Fig. 4에서와 같이 약물을 투여하지 않은 군(control)과 거의 유사하게 초기 혈당은 97.4 mg/dl에서 포도당 투여 15분에 490.6 mg/dl로 급상승하였다가 30분에 370.8 mg/dl, 60분에 253.4 mg/dl 및 120분에는 180.4 mg/dl로 감소하였는데, 이는 앞서 실험한 AO-SHU-1의 결과보다는 혈당강하 측면에서 큰 효과를 나타내는 것으로 보였다. 또한 포도당의 AUC(area under the curve, 곡선하 면적) 측면에서도 AO-SHU-1보다 상대적으로 낮은 것으로 나와 포도당 분해에 더 효과를 보임을 알 수 있었으며, 이는 MeOH 추출에 의한 유효성분의 효율적인 추출에 기인된 것으로 해석할 수 있었다. 처방에 포함된 약리물질의 함량이 증가하여 생기는 효과는 처방에 의한 반복적인 섭취에 의한 효과와 동일하므로 장기간의 투여로 인해 혈당강하를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

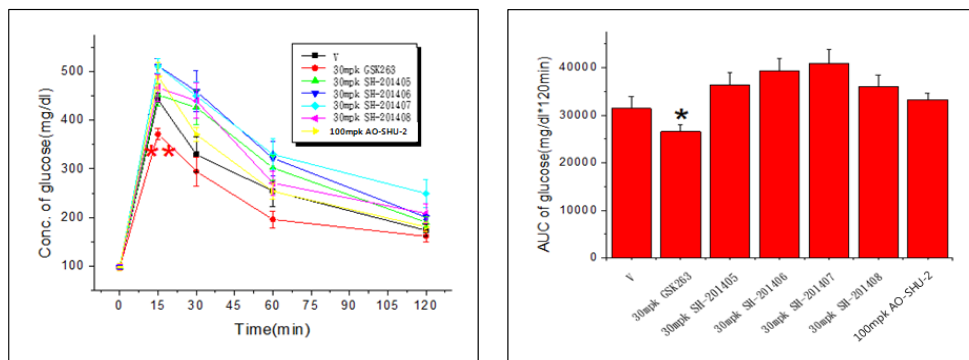


Fig. 4. The diagram of concentration and AUC of glucose for the MeOH extract of AO-SHU pill(AO-SHU-2)

IV. 고찰

산업화와 인구증가에 따라 전 세계적으로 급증하고 있는 당뇨병 환자와 그로 인한 대사성 질환의 발병률은 심각한 보건문제로 떠오르고 있다. 당뇨병은 선천적으로 약한 췌장 기능 등의 유전적, 체질적 요인과 스트레스 등의 환경적 요인에 의해 발병하며 당뇨병은 합병증 유발과 완치의 어려움을 가진 질환 중 하나이다. 특히 당뇨병의 70% 이상을 차지하는 제 2형 당뇨병의 원인은 아직까지 정확히 밝혀지지 않았지만 유전, 비만, 바이러스 감염, 스트레스, 약물남용, 운동부족 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

당뇨병은 일반적으로 완치가 어려운 질병으로 여겨지고 있으며 서양의학적 치료법으로는 경구혈당강하제나 인슐린 주사 등의 약물요법에 의한 혈당 조절 관리에 치중하면서 규칙적인 식사와 운동으로 혈당을 조절, 관리하고 있으며, 한의학에서는 소갈의 범주에 포함시켜 인슐린을 외부에서 일방적으로 공급해주는 방식이 아니라, 인슐린 분비를 촉진하고 인체의 신진대사를 활성화시켜 주는 처방으로 인체의 면역기능과 항상성을 정상화시켜 주는 데 중점을 두는 치료법을 택하고 있다.

특히 초기 당뇨병 환자들의 경우 양방에서는 별다른 처치방안이 없는 반면 임상한의학에서는 오히려 치료의 최적이므로 보고 변증에 따른 다양한 방법으로 치료를 시행하여 완치율을 높이려하고 있다. 이는 췌장의 기능을 향상시키고, 면역력을 증강시켜 우리 몸 스스로가 혈당을 조절할 수 있는 힘을 길러주는 방식이기 때문이다.

또한 한약 및 침구요법 이외에도 정신, 식이, 운동요법 등 환자가 직접 시행해야 하는 것도 관리 차원에서 매우 중요하며, 이러한 관리법은 사실상 한의학적 양생요법의 일부인 만큼 한의학을 활용한 당뇨병 치료는 충분한 경쟁력을 갖추고 있다^{5,8)}. 따라서 순수 한의학적 당뇨치료는 물론이고 한의학적 관을 응용한 현대 의료기기 활용방안이 포함된 한양방 협진을 통해서 새로운 치료기술의 창출이 국민건강 증진에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

한의학에서는 당뇨병을 消渴이라 하여 上消, 中消, 下消로 구분하여 上消는 煩渴多食, 口乾舌燥, 大便如常, 小便頻多 등의 증상으로 清熱瀉火, 生津止渴의 처방을, 中消는 多食善飢, 形體消瘦, 大便秘

結의 증상으로 清胃瀉火, 陽陰增液의 처방을, 下消는 陰虛形과 陰陽兩虛로 구분하여 陰虛형은 小便頻數量多, 尿如脂膏 혹은 尿聒, 并伴有頭昏耳鳴 腰膝酸軟 多夢遺精 多飲口乾 등의 증상으로 滋陰固腎, 補益精血, 潤腸止渴의 처방을, 陰陽兩虛는 小便頻多, 混濁如膏, 甚則 飲一溲一, 五心煩熱, 咽乾口燥, 面色憔悴 耳輪焦枯, 腰膝酸軟, 四肢乏力, 畏寒怕冷, 陽事不舉 등의 증상으로 溫陽滋腎의 처방을 사용하였다¹⁾.

『東醫寶鑑』⁶⁾의 생혈운부음은 “음혈부족(陰血不足)으로 생긴 조증(燥證)으로 피부가 마르고 트며 굵으면 비듬이 일고 피가 나오면서 몹시 아프며 또한 손발톱이 마르는 데 쓴다”고 하였으나, 저자는 다년간의 임상에서 혈당조절에 의미가 있는 몇 가지 약재를 가감한 가감생혈운부음을 당뇨병환자에게 활용하는데, 혈당강하뿐 아니라 노역, 과민증 및 스트레스 등으로 흐트러진 몸의 상태를 회복하고 여러 요인으로 소모된 진액을 돋우며 원기를 회복시킬 목적으로 처방하고 있으며 원방과 다른 구성은 Table 11과 같다.

Table 11. A comparison of the composition in original SHU and AO-SHU

Saenghyeoryunbu-eum (SHU)		Add-Omit-Saenghyeoryunbu-eum (AO-SHU)	
Herbal name	Dosage (g)	Herbal name	Dosage (g)
天門冬 <i>Asparagi Radix</i>	6.0	天花粉 <i>Trichosanthis Root</i>	10.5
熟地黃 <i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	4.0	生地黃 <i>Rehmanniae Radix</i>	7.5
黃芪 <i>Astragali Radix</i>	4.0	白殭蠶 <i>Bombycis Corpus</i>	7.5
麥門冬 <i>Liriois Tuber</i>	4.0	麥門冬 <i>Liriois Tuber</i>	7.5
當歸 <i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.0	人蔘 <i>Ginseng Radix</i>	4.5
生地黃 <i>Rehmanniae Radix</i>	7.5	五加皮 <i>Acanthopanax Cortex</i>	4.5
瓜蒌仁 <i>Trichosanthis Semen</i>	2.0	茯苓 <i>Hoelen</i>	4.5
黃芩 <i>Scutellariae Radix</i>	2.0	白扁豆 <i>Dolichoris Semen</i>	4.5
桃仁 <i>Persicae Semen</i>	2.0	黃連 <i>Coptidis Rhizoma</i>	3.0
升麻 <i>Cimicifugae Rhizoma</i>	0.8	知母 <i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	3.0
紅花 <i>Carthami Flos</i>	0.4	五味子 <i>Schizandrae Fructus</i>	3.0
五味子 <i>Schizandrae Fructus</i>	~1.5 (9알)	蓮子肉 <i>Nelumbinis Semen</i>	3.0
Total amount(g)	38.2	Total amount(g)	63.0

한약처방이 임상에서 당뇨병에 효과가 있더라도 정확하게 어떤 기전으로 효과가 나타나는지에 대한 과학적 입증이 쉽지않아 문헌에 근거한 효능만을 설명할 뿐 객관적 근거를 제시하지 못하는 경우가 대부분이었다. 따라서 저자는 임상경험상 효과를 보이는 가감생혈윤부음이 어떠한 기전에 의해 당뇨병을 치료할 수 있는지 확인할 필요가 있었고, 처방 각각 약제의 화학적 분석과 개개 약물의 처방효과 발현에 대한 약리기전 분석을 통해 치료 기여도와 과학적인 효능입증을 함으로써 한약에 대한 신뢰도를 향상시키고자 하는 목적으로 본 연구를 수행하였고, 다음과 같은 결과들을 도출하였다.

가감생혈윤부음 구성 한약재 12종 각각의 생약에 함유되어 있는 알려진 항당뇨 성분을 검사하기 위해 Citruline, Cucurbitacin E, Bryonolic acid, Catalpol, Loganin(Iridoid glycoside), Conjugated linoleic acid (CLA), Sesamin, Kaempferol, Berberine chloride, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rg1, Oleanolic acid, β -Sitosterol, Ferulic acid, Betulinic acid, Mangiferin, Schizandrin 및 Tolbutamide 등 18가지 지표성분에 대한 복방 및 각 생약별로 메탄올 용매추출을 하여 LC-MS/MS로 함량 분석한 결과, 문헌조사로부터 설정된 지표물질 중 Oleanolic acid, Berberine, Citruline, β -Sitosterol, Catalpol, Schizandrin, Mangiferin, Ginsenoside Rb1 및 Ginsenoside Rg1 등의 순으로 9가지 성분이 검출되었으며, 나머지는 검출되지 않았다. 검출되지 않은 성분들은 추출용매에 따른 미추출 또는 기원에 따른 성분 미포함으로 보인다.

Oleanolic acid는 화학식 $C_{30}H_{48}O_3$, 분자량 456.71, 녹는점 $310^{\circ}C$. 비선광도 $+83.8^{\circ}(c=0.6, \text{클로로포름})$ 를 갖는 무색 침상정(針狀晶)이다³¹⁾.

Berberine은 황련(*Coptis japonica*) 뿌리, 황벽나무(*Phellodendron amurense*) 수피, 매발톱나무의 일종(*Berberis vulgaris*)의 뿌리, 애기똥풀, 피나무, 매자나무, 갯쟁이풀 등의 뿌리 등에서 얻는 아이소퀴놀린알칼로이드의 한 종류로 수화물($C_{20}H_{19}NO_5 \cdot 5H_2O$) 및 염화수화물($C_{20}H_{18}ClNO_4 \cdot 2H_2O$)로 존재하며, 황색 바늘 모양 결정(에테르에서 재결정), 녹는점 $145^{\circ}C$ 의 노란색 바늘 모양 결정이며 뜨거운 물이나 에탄올에는 녹고, 클로로폼·벤젠에는 잘 녹지 않으며 에테르에는 녹지 않는다. 베르베린은 4

급 염기형과 의염기형(擬鹽基型)의 평형으로 존재하며 아세톤 첨가제 8-아세트닐다이하이드로베르베린 형성 등 여러 반응이 토토펴리현상(tautomerism:互變異性)으로 설명된다. 황색 천연염료로써 유럽에서는 일찍이 상당히 널리 이용되어 양모, 비단, 피혁을 약한 산성 중탕에서 황색으로 물들이는 천연 염료 중 유일한 염기성 염료이다. 쓴맛이 나므로 한의서에서 황련과 황벽나무는 고미건위약(苦味健胃藥) 및 강장제로 쓰인다. 또한 berberine는 강압 작용이 있으며 혈관을 직접 확장하여 혈압강하 효과³²⁾를 보이는 물질로 많은 연구대상이 되고 있다. 이담작용이 있어 담즙의 형성을 증가 하여 담즙을 묽게 하고 혈청 콜레스테롤을 낮추는 작용³³⁾을 한다. 또한 위액 분비를 억제하는 작용이 있으므로 스트레스성 위궤양 완화제의 용도³⁴⁾도 있다. 베르베린은 심장 혈관 시스템에 대한 중요한 역할뿐 아니라 항염증³⁵⁾과 함께 당뇨 치료에 대한 연구³⁵⁻³⁹⁾가 활발히 진행되어 이와 관련한 많은 논문을 찾아볼 수 있다.

Citruline는 화학식 $C_6H_{13}N_3O_3$, 분자량 175.19를 갖는 아미노산의 전구물질로, 체내에서 L-arginine으로 대사된다⁴⁰⁾.

β -Sitosterol은 화학식 $C_{29}H_{50}O$, 분자량 414.72, 융점 $140^{\circ}C$, 비선광도($[\alpha]_D$) $-37^{\circ}(CHCl_3)$ 를 갖는 식물성 스테롤(Phytosterol)로서 cholesterol이 동물성 스테롤로서 동물 세포막의 구성성분인듯 식물세포막의 구성성분이다. 대표적인 피토스테롤은 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 베타-시토스타놀(β -sitostanol), 캄페스테롤(campesterol), 스티그마스테롤(stigmasterol) 등이 있으며, 옥수수, 대두, 식물유나 씨앗 등에 함유되어 있다. stanol은 sterol이 포화된 형태이다. 콜레스테롤 저하기전은 불명확하지만 소장에서 흡수될 때 경쟁적으로 작용하는 것으로 보인다⁴¹⁾. 스테롤은 콜레스테롤보다 담즙염 마이셀 상과 결합하는 능력이 높기 때문에 담즙염 마이셀에 콜레스테롤이 용해되는 것을 감소시켜 소장의 콜레스테롤 흡수를 방해한다. 다른 기전으로는 간 혹은 소장의 콜레스테롤 대사에도 영향을 준다. 간에서 일어나는 콜레스테롤 생합성 과정은 장의 콜레스테롤 흡수에 영향을 받는다. 스테롤에 의해 장의 콜레스테롤 흡수가 억제되면 항성성 유지를 위해 간의 콜레스테롤 생합성 과정이 증가

되고 여기서 만들어진 콜레스테롤 분비가 상승하게 되는 것이다. 콜레스테롤 축적에 의한 동맥경화증, 협심증, 심근경색, 뇌혈관성 질환 치료와 항염증, 저혈당 효과 등으로 당뇨병 치료⁴²⁻⁴⁴⁾에 쓰이고 있다. 혈관신생을 촉진시켜 혈액이 원활하게 공급이 되며 다른 약물의 흡수를 도와주어 치료효과를 나타내는 것으로 생각된다. 또한 초기 삼출현상 또는 염증반응, 새로운 조직의 형성 및 세포주변 기질 및 세포들의 재배열에 관여하여 상처치유에도 효과가 있다. 스테롤 핵을 가진 물질들은 부신피질 호르몬과 같은 소염작용이 있어 전립선 질환에 효과⁴⁵⁾가 있다.

Catalpol은 화학식 $C_{15}H_{22}O_{10}$, 분자량 362.33, 융점 $210-211^{\circ}C$ 및 비선광도($[\alpha]_D$) -102.2° (c 0.85, MeOH)를 갖는 monoterpenoid로서, iridoids류의 대표 물질⁴⁶⁾로 혈당강하와 이노작용이외에 완전한 사하작용이 있어 하리의 원인이 되기도 하고 변비를 경감시키기도 한다⁴⁷⁾. 최근에는 면역 효과, 치매 치료 효과, 허혈 치료효과, 항염, 통증치료 등에 대한 연구결과도 보고^{48,49)}된 바 있다.

Schizandrin은 화학식 $C_{24}H_{32}O_7$, 분자량 432.51, 융점 $128-129^{\circ}C$, 비선광도($[\alpha]_D$) $+91.5^{\circ}$ (c 0.1, EtOH)를 갖는 Lignin계열 약리물질이다. Mangiferin은 화학식 $C_{19}H_{18}O_{11}$, 분자량 422.34, 융점 $270-272^{\circ}C$, 비선광도($[\alpha]_D$) $+32^{\circ}$ (EtOH aq.)를 갖는 Gamma-Pyrone계열 약리물질로서, 크산톤 유도체의 하나로 황색 미세한 능주상 결정(70% 에탄올에서 재결정)으로 분해점은 재결정 용매에 의해 일정하게 되는데 65~75% 에탄올을 이용할 때 $C_{19}H_{18}O_{11} \cdot 1/3H_2O$ 에 해당하고 재현성이 크다. 페놀 중 요오드화수소산과 가열하면 1,3,6,7-테트라히드록시크산톤을, 묶은 황산과 가압, 가열하면 글루코오스가 얻어진다. 망고잎이나 망기페린을 동물에 주면 소변 중에 오익산틴산이 배출된다. 지모의 대표 지표성분이며 아라비카 커피잎에도 분포한다. 콜레스테롤 수치개선 뿐 아니라 치매와 알츠하이머병 예방 및 type II 5 α -reductase 저해작용으로 탈모 치료에도 효능⁵⁰⁻⁵²⁾이 있다고 한다. 또한 mangiferin은 열대과일 망고에도 높은 함량으로 존재하여 수시로 섭취한 성인 비만환자들의 경우 혈당 수치를 낮추는 데 괄목할 만한 효과⁵³⁻⁵⁶⁾를 보인다고 보고된 바 있고. 면역조절효과, 간보호기능, 유방암 및 대장암

에 대한 항암기능을 보이며, HSV-2 (herpes simple virus-2)의 복제를 차단하는 등의 항바이러스 기능도 있다하여 수시 섭취를 권장하고 있는 실정이다.

Ginsenoside Rb₁은 화학식 $C_{54}H_{92}O_{23}$, 분자량 1109.32, 융점 $197-198^{\circ}C$, 비선광도($[\alpha]_D$) $+12.4^{\circ}$ (c 0.9, CHCl₃)를 갖는 Saponin계열 약리물질로서, 마우스에서 Ginsenoside Rb₁ (0.001~1 mg/kg)은 방사선 조사에 대한 암세포의 감수성을 선택적으로 높여준다는 보고 및 신경돌기의 성장을 촉진한다는 보고도 있다⁵⁷⁾.

Ginsenoside Rg₁은 화학식 $C_{42}H_{72}O_{14}$, 분자량 801.03, 융점 $194-196.5^{\circ}C$, 비선광도($[\alpha]_D$) $+24.8^{\circ}$ (c 0.93, MeOH)를 갖는 Saponin계열 약리물질이다⁵⁸⁾.

이와 같이 약리작용을 가지는 MeOH 추출물에서 분석되어진 9가지의 성분의 복합작용으로 충분한 혈당강하 효과를 기대할 수 있으며, 당뇨병의 경험방인 가감생혈운부음에 대한 개별 약제의 화학적 분석을 통한 당뇨의 치료에 어떤 기전의 약리작용으로 효과를 발현하는지 밝히고 각 약물의 기여도에 대해 객관적 근거를 가지고 처방의 효능을 설명하는데 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

최근 대체의학적 치료법으로 대두되는 것이 인슐린을 만들어 분비하는 췌장의 랑겔한스섬의 베타세포가 지나치게 많은 활성유해산소와 과산화지질로 인해 파괴됨으로써 당뇨병 발생과 관련이 있다고 하여 항산화 천연물, 식품 및 약물 섭취와 필수영양소 공급으로 당뇨병을 치유하는데 효과를 보이고 있다. 실제로 당뇨병 환자에게 SOD(Super Oxide-dismutase, 활성산소 제거)제를 쓰면 효과가 나타나는데 이는 상당수의 당뇨병 환자가 과도한 활성산소로 인하여 발병했거나 악화됨을 보이고 있다는 증거이기도 하다⁵⁹⁾.

가감생혈운부음의 잔류농약시험결과 기준치 이상의 농약은 검출되지 않았으며, 당뇨 타깃인 GPR119 및 DGAT-1에 대한 in vitro assay 결과, GPR119 agonist로서의 활성도는 1 μ M 농도에서 모두 50% 이하로 조사되어 유효농도 (EC₅₀)를 구하지는 못하였으나, 어느 정도의 활성을 보이는 것으로 나타났으며, DGAT-1 저해제로서의 활성도는 물질의 구조 특성상 타깃에 활성을 보이지 않았다.

한편 동물실험에서 비록 단회의 경구포도당부하 시험(OGTT)이었고, 컨트롤 대비 포도당의 농도(AUC, area under the curve, 곡선하 면적)는 증가한 것으로 나타났지만 당뇨치료에 대한 의미있는 결과를 얻었다. 가감생혈운부음 제환분말의 경우 100mpk로 투여 120분 경과 후 AUC는 40,700.6mg/dl로 Control(37,424.8mg/dl)대비 8.75% 증가로 나타난 반면에, MeOH 추출물(AO-SHU-2)을 사용한 경구포도당부하 실험결과에서는 AUC가 33,247.2mg/dl로 Control(31,411.2mg/dl)대비 5.85% 증가로 나타나 제환분말 자체(AO-SHU-1)를 실험한 것보다는 상대적으로 약 50% 정도 포도당 분해에 더 효과적임을 알 수 있었다. 특히 MeOH 용매에 의한 유효성분의 효율적인 추출에 기인하여 약리작용이 관측되었으며, 약리 물질의 추출량을 고려한 유효농도를 높여 재실험할 경우 유의성 있는 EC₅₀ 값을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 이는 반복적인 섭취로 인하여 처방에 포함된 약리물질의 함량이 증가하여 생기는 효과로 장기간의 투여로 인해 여러 가지의 약리성분의 혈당강하에 대한 단일 효과와 더불어 여러 성분의 상승효과(synergic effect)가 작용하여 가감생혈운부음이 당뇨병의 예방 및 치료에 대한 효과를 충분히 기대할 수 있으리라 보인다. 향후 이러한 실험적인 효과를 바탕으로 임상시험이 필요하며 이를 통해 혈당강하를 포함한 당뇨치료의 효과가 입증될 수 있을 것으로 생각된다.

아울러 본 연구는 산업화와 인구증가에 따라 전 세계적으로 급증하고 있는 당뇨질환 인구나 그로 인한 대사성 질환의 발병률은 심각한 보건문제를 근본적으로 해소하고, 노령사회로의 진입 및 늘어나는 비만인구(전체 미국성인들의 34% 가량)로 인해 2형 당뇨병이나 대사성 만성질환증후군 등이 발생할 위험성을 우려하는 목소리가 고조되고 있는 상황에서 한의사의 처방들이 과학적이고 객관적으로 검증될 수 있는 기초 자료로 활용을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

가감생혈운부음의 당뇨치료 효과 확인을 위하여 생리활성성분 분석과 in vitro 및 in vivo 시험을

한 결과 다음과 같았다.

1. 가감생혈운부음을 구성하는 생약들에 대한 문헌 조사로부터 당뇨치료 효과를 기대하는 지표성분들에 대한 LC-MS/MS 분석 결과, 가감생혈운부음 그래프당 밀리그램으로 Oleanolic acid, Berberine, Citruline, β -Sitosterol, Catalpol, Schizandrin, Mangiferin, Ginsenoside Rb1 및 Ginsenoside Rg1 등의 함량 순으로 9가지의 성분이 검출되었으며, 그 중에서 Oleanolic acid의 함량이 가장 높게 측정되었다.
2. 이러한 지표물질들의 항당뇨, 혈당강하, 항산화 및 활성산소 억제 등의 약효에 의하여 당뇨치료 효과가 나타날 것으로 예측할 수 있다.
3. 가감생혈운부음 제환분말의 MeOH 추출물(AO-SHU-2)을 사용한 경구포도당부하 실험결과는 포도당의 농도 및 AUC(area under the curve, 곡선하 면적) 측면에서도 제환분말 자체(AO-SHU-1)를 실험한 것보다는 상대적으로 포도당 분해에 더 효과적임을 알 수 있었다. 이는 MeOH 추출에 의한 약리물질의 증가에 기인된 것으로 해석할 수 있으며, 환제에 포함된 약리물질의 함량이 증가하여 생기는 효과에서 처방의 반복적인 섭취에 의해 혈당강하를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

References

1. Nephrology of Korean Medicine association. Nephrology of Korean Medicine. Seoul: Gunja press; 2011, p. 94-5, 300-9.
2. International Diabetes Federation. "IDF launches WDD 2015 campaign at WHA side event" 2015.
3. Statistical Office. 2012 Cause of Death Statistics. Press release, 2013.
4. M Khattab, YS Khader, A. A. Al-Khawaldeh, and K. Ajlouni. Factors associated with poor glycemic control among patients with type 2 diabetes. Journal of Diabetes and Its Complications. 2010;24(2):84-9.
5. Kim DH, Park SC, Lee JH, Lee HY, Cho MK,

- Choi JY, Kim SY, Park SH. Recent Research Trends in Korean Medicine Treatment of Diabetes Mellitus - Focusing on Domestic Articles from 2008 to 2013. *Journal of Korean Internal Medicine* 2013;34(3):240-55.
6. Huhjun. Dongeuibogam. Seoul: Namsan-Dang; 1990, p. 417, 615, 781-5.
7. In JD, Im DS, Moon SH, Kim WI. Characteristic Effects of Dangnyo-hwan for Diabetes Control Studied Using LC-MS/MS and ICP. *Journal of Korean Internal Medicine* 2015;36(3):217-27.
8. WL Li, HC Zheng, J Bukuru, ND Kimpe. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 2004;92:1-21.
9. JK Grover, S Yadav, V Vats. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 2002;81:81-100.
10. Adolfo AC, Michael H. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;99:325-48.
11. Pulok K. Mukherjee KM, Kakali M, Peter JH. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;106:1-28.
12. Hjrshj H, Miki Y, Yutaka S, Yoshiteru Oa, Chohachi K. Isolation and Hypoglycemic Activity of Trichosans A, B, C, D, and E: Glycans of *Trichosanthes kirilowii* Roots. *Planta Medica* 1989;55:349-50.
13. Lee KH et al. Anti-Microbial and Anti-Wrinkle Effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides isolated from *Hibiscus cannabinus* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci* 2012;20(6):454-60.
14. GY Lee. Cucurbitacin Contents in Cucurbits Influenced by Crops, Organs, and Cultural Practices. Doctorate thesis, Kyunghee Univ, 2010.
15. ZHANG LJ, JIANG HZ. Present State and Prospect of Clinical Application of Trichosanthin. *CJIM* 1996;2(2):157-9.
16. Pushpa N, Nai KM, Phuong BL, Ricky NS. Isolation and characterization of new isoforms of trichosanthin from *Trichosanthes kirilowii*. *Plant Science* 2002;162:79-85.
17. Hwang SJ, Na MS. Optimal Culture Conditions for Transformed Root Growth and Trichosanthin Formation in *Trichosanthes kirilowii* Max. *Korean J. Medicinal Crop Sci* 2007;15(1):46-50.
18. Yoo BR et al. Catalpol Content and Antioxidant Activities in Various Cultivars of *Rehmannia glutinosa*. *Korean Soc Food Sci Nutr* 2011;40(4):481-5.
19. KY Lee et al. Cognitive-enhancing Activity of Loganin Isolated from *Cornus officinalis* in Scopolamine-induced Amnesic Mice. *Arch Pharm Res* 2009;32(5):677-83.
20. Song TJ. Antidiabetic Activities of Betulinic Acid by Activation of AMPK Pathway. Master's thesis, Handong Univ, 2010.
21. Yun MS et al. Antitumor Effect of Schizandrin by Inhibiting Angiogenesis. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2012;26(5):687-92.
22. Sung HJ et al. Antioxidant Effects of Sesamin and Sesamolin in Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus Rat. *J. Fd Hyg. Safety* 2001;16(4):349-54.
23. Kim GS et al. Isolation and HPLC Analysis of Timosaponin A III from Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE. *Korean J. Medicinal Crop Sci* 1999;7(1):45-50.
24. Choi BC. Pharmacokinetic changes of Diltiazem, Tolbutamide and Sulfamethoxazole after oral administration to rabbits with Alloxan-induced diabetes mellitus. Doctorate thesis, Chosun Univ, 2000.
25. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology* 2007;152(5):

- 567-75.
26. Overton HA, Fyfe MC, Reynet C. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *British Journal of Pharmacology* 2008;153:S76-81.
 27. Ann JH et al. Thienopyrimidine derivatives, pharmaceutically acceptable salt thereof preparation method thereof and pharmaceutical composition for prevention or treatment of diabetes-related disease containing the same as an active ingredient. KR patent, 1014014960000, 2012.
 28. Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1998;95(22):13018-23.
 29. Chen HC, Farese RV. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(3):482-6.
 30. A Giaccari, G Sorice, G Muscogiuri. Glucose toxicity: The leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes- mechanisms and potentials for treatment, Nutrition. *Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2009;19(5):365-77.
 31. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:12013-17.
 32. Marin JA, Maciel BC, Secches AL, Gallo JL. Cardiovascular effects of berberine in patients with severe congestive heart failure. *Clinical Cardiology* 1988;11(4):253-60.
 33. Zhou JY, Zhou SW, Zhang KB, Tang JL, Guang LX, Ying Y et al. Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2008;31(6):1169-76.
 34. Gu L, Li N, Gong J, Li Q, Zhu W, Li J. Berberine ameliorates intestinal epithelial tight-junction damage and down-regulates myosin light chain kinase pathways in a mouse model of endotoxemia. *The Journal of infectious diseases* 2011;203(11):1602-12.
 35. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2004;203(2):127-37.
 36. Zhou J, Zhou S, Tang J et al. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009;606:262-8.
 37. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 2008;294:E148-56.
 38. Liu L, Yu YL, Yang JS et al. Berberine suppresses intestinal disaccharidases with beneficial metabolic effects in diabetic states, evidences from in vivo and in vitro study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010;381:371-81.
 39. Pan GY, Huang ZJ, Wang GJ, Fawcett JP, Liu XD, Zhao XC, Sun JG, Xie YY. The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Medica* 2003;69:632-6.
 40. Lee WS. Vegetable of Korea. Daegu: Kyungbuk National University Press; 1994, pp. 189-202.
 41. Rudkowska I, AbuMweis SS, Nicolle C, Jones PJ. Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. *J Am Coll Nutr* 2008;27(5):588-95.

42. Park EH, Kahng JH, Lee SH, Shin KH. An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* 2001;72:288-90.
43. Basnet P, Kadota S, Terashima S, Shimizu M, Namba T. Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1993;41:1238-43.
44. Yu BC, Hung CR, Chen WC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of andrographolide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica* 2003;69:1075-9.
45. Kim TH, Lim HJ, Kim MS, Lee MS. Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: An overview of systematic reviews. *Maturitas* 2012;73(3):180-5.
46. Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2007;55(2): 159-222.
47. Huang WJ, Niu HS, Lin MH, Cheng JT, Hsu FL. Antihyperglycemic effect of catalpol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 2010;73:1170-2.
48. Tian YY, An LJ, Jiang L, Duan YL, Chen J, Jiang B. Catalpol protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in mesencephalic neuron-glia cultures. *Life Sci* 80:193-9.
49. Liu J1, He QJ, Zou W, Wang HX, Bao YM, Liu YX, An LJ. Catalpol increases hippocampal neuroplasticity and up-regulates PKC and BDNF in the aged rats. *Brain Res* 2006;1123(1):68-79.
50. Stoilova I, Gargova S, Stoyanova A, Ho L. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Polyphenol Mangiferin. *Herba Polonica* 2005; 51(1/2):37-44.
51. Wang X, Liao J, Yin D, Zhan F, Dai S, Xie G, Sang X. Establishment of a Novel Model for Studying the Effects of Extracts of Chinese Herb Medicine on Human Type II 5-alpha-Reductase in Vitro. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2010;130(9): 1207-14.
52. Carvalho A, Guedes M, Souza A, Trevisan M, Lima A, Santos F, Rao V. Gastroprotective Effect of Mangiferin, a Xanthonoid from *Mangifera indica*, against Gastric Injury Induced by Ethanol and Indomethacin in Rodents. *Planta Medica* 2007;73(13):1372-6.
53. Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Ishihara E et al. Antidiabetic Activity of a Xanthone Compound, Mangiferin. *Phytomedicine* 2001;8(2):85-7.
54. Ichiki H, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Sasaki H, Okada M et al. Antidiabetic activity of the rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2001;24:1009-11.
55. Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, Iwamoto N, Kato M, Kubo M et al. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine* 2001;8:85-7.
56. Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta S, Gupta PK, Lal J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;97:497-501.
57. SH Lee, JY Hu, EH Lee, SY Kim. Ginsenoside Rb1 modulates level of monoamine neurotransmitters in mice frontal cortex and cerebellum in response to immobilization stress. *Biomolecules&Therapeutics* 2012; 20(5):482-6.
58. Chan RY, Chen WF, Dong A, Guo D, Wong MS. Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from *Panax notoginseng*. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3691-5.
59. Milbury PE, Richer AC. Understanding the Antioxidant Controversy: Scrutinizing the "fountain of Youth". Greenwood Publishing Group; 2008, p. 99.