



Original Article / 원저

침향 추출물의 면역조절 및 생리활성 분석

황유림^{1†}, 김광연^{2†}, 유선녕¹, 박광일^{3*}, 안순철^{1*}

¹부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실,

²한국한의학연구원 한의기술응용센터, ³경상대학교 수의과대학 수의생리학

Evaluation of Immunomodulatory and Biological Effects of *Aquilaria crassna* Extracts

You-Lim Hwang^{1†}, Kwang-Youn Kim^{2†}, Sun Nyoung Yu¹, Kwang-Il Park^{3*}
and Soon-Cheol Ahn^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University
School of Medicine

²Korean Medicine Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine

³Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objectives : *Aquilaria crassna* is a traditional herbal medicine, which is used to treat allergies, diabetes, neurological diseases. Recently, *Aquilaria crassna* extracts have been reported in anti-bacterial and anti-inflammatory activities. In this study, various solvents fraction of *Aquilaria crassna* were investigated on various physiological activities.

Methods : According to the polarity, the solvents fraction of *Aquilaria crassna* were confirmed through TLC, and the activities of the extracts were confirmed in anti-diabetes, anti-obesity, whitening, anti-gout, and anti-inflammation.

Results : TLC results showed that ACM and ACM/E have similar patterns and most of the components were transferred to ACM/E. Treatment with ACM and ACM/E fraction were significantly decreased the generation of NO in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophage cells. Analysis of biological activities such as α -glucosidase, protein tyrosine phosphatase (PTP1B), tyrosinase, xanthine oxidase (XO) and pancreatic lipase inhibition, showed that ACM and ACM/E have more inhibitory effects than other fractions.

Conclusions : Therefore, the results of the present study clearly demonstrate that *Aquilaria crassna* and its constituents might be beneficial in the prevention or treatment of immune-regulating effects.

Key words : *Aquilaria crassna*, Biological activity, immunomodulatory activity.

I. 서론

현재 수명의 증가와 사회, 경제적인 발전, 서구화된 생활 등에 의해서, 전 세계적으로 비만 인구가 증가하고 있으며, 비만의 심각성에 대한 관심도 높아지고 있다¹⁾. World Health Organization (WHO)은 비만을 고혈압, 당뇨병 등과 같이 만성 질환으로 규정하고, 하나의 질병으로 접근하는 인식체계의 전환을 요구하고 있다^{2,3)}. 더불어, 외부환경에 대한 생체 방어 기능으로 면역력 증진에 많은 관심이 쏟아지고 있으며, 이에 많은 연구가 다양한 생리활성 및 면역조절을 통한 다양한 효능이 입증된 소재 발굴의 연구로 이어지고 있다⁴⁾.

바이러스, 박테리아, 기생충과 같은 병원체에 감염된 비정상세포를 제거하거나 복구하기 위한 가장 중요한 면역반응은 대식세포 (macrophage), 자연 살해 세포 (natural killer cells) 및 림프구 (lymphocytes) 등과 같은 면역 세포의 활성화가 필수적이다^{5,6)}. 특히, 대식세포는 식작용 (phagocytosis)을 강화하고, 산화질소 (nitric oxide, NO) 및 다양한 염증성 cytokine을 생성하여 면역반응을 활성화에 중요한 역할을 한다^{7,8)}. 또한 당뇨병 증상 완화와 관련하여 인슐린 저항성에 관련된 α -glucosidase와 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)가 세포 내 신호와 신진대사에 있어 중요한 신호전달 조절인자로 알려져 있다⁹⁻¹¹⁾.

침향 (沈香)은 팔꽃나무과 (Thymelaeaceae)에 속하는 침향나무 (*Aquilaria* spp.)의 수지가 심재 부위에 침착하여 형성된 방향성 수지질의 상록성 교목으로 인도, 베트남, 라오스, 중국 등의 동남아시아 지역에 분포한다¹²⁾. 침향은 나무의 물리적 손상 또는 미생물 감염에 대한 방어 기전으로 자연적으로 생성되며, 한국, 중국, 일본 등에서는 예로부터 피부 소양, 복통, 천식 등의 치료

에 사용되어 왔으며, 진정, 건위, 소화불량, 식욕부진 등에 전통 약재로 사용되고 있다^{13,14)}. 최근 연구들에서 침향 추출물 또는 구성 성분들은 항산화, 항염증, 항암, 항허열, 항진균, 항박테리아, 항당뇨, 간 기능 개선 등과 같은 약리학적 효능이 있음이 추가로 보고되고 있다¹⁵⁻²⁰⁾. 많은 선행 연구에서 침향이 면역계 관련 질환에 대한 개선 효과가 보고된 바 있으나, 면역 증진 및 다른 생리 활성에 대한 연구는 여전히 미비한 실정이다 이에 본 연구에서는 침향의 약리학적 효능의 재평가와 기전 연구의 연속적인 수행을 위하여 침향 추출물의 기능성 평가를 실험하였다. Murine macrophage RAW 264.7 cell line을 대상으로 세포 생존율, NO 생성능, NO 생성 억제능을 분석하였다. 또한 침향 추출물의 일반적인 생리활성 기능 평가를 위해, α -glucosidase, protein tyrosine phosphatase, tyrosinase, xanthine oxidase, pancreatic lipase의 억제능을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 침향의 추출물 제조

건조된 145g의 침향 (*Aquilaria crassna*)을 잘게 분쇄한 후, 100% methanol (MeOH) 1.5 L로 실온에서 24 시간 동안 3회 추출하였다. 추출한 MeOH 추출물을 EYELA N-1110 회전 증발기 (Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)를 사용하여 55°C에서 감압 농축하였다. 증류수에 완전히 현탁한 건조된 추출물을 유기 용매의 극성차를 이용하여 ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH)로 순차적으로 분획하여 분리하였다 (Fig. 1).

2. Thin layer chromatography (TLC)

[†] These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author: Kwang Il Park, Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.

Tel : +82-55-772-2342, Fax : +82-55-772-2349, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

*Corresponding author: Soon-Cheol Ahn, Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, 49 Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea.

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090, E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

•Received : October 12, 2022 / Revised : November 8, 2022 / Accepted : November 9, 2022

TLC는 normal phase 방법으로 고정상은 실리카겔 60G F254를 사용하였으며, 용매 혼합물은 이동상으로 chloroform/methanol/water (4:2:1, v/v/v, 하위 상)을 사용하였다. 10 mg/ml의 각각의 분획물을 TLC plate에 spotting하고 TLC chamber에서 준비된 용매 혼합물을 사용하여 분리했습니다. 분리된 화합물은 anisaldehyde sulphuric acid 시약을 분사한 후 가열하여 가시화하였다.

3. 세포 배양

Murine macrophage Raw 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입 하였고 세포는 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicilin/streptomycin (Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4. Nitric oxide (NO) production 측정

RAW 264.7 세포는 1×10⁵ cells/well로 분주하여 세포 배양용 96-Well plate를 이용하여 24시간 동안 안정화 시킨 후, phenol red free DMEM (Gibco) 배지로 교환하였다. 상기 추출물을 3, 10, 30 µg/ml 농도로 24시간 처리한 후의 상등액을 취하여, Griess 시약을 이용해 세포 배양 상등액의 NO 함량을 측정하였다. 100 µl 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilic acid, 0.1% N-naphthyl ethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 배양 상등액에 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켜 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices, Toronto, Canada)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control은 추출물 대신 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 로 처리하여 얻은 상등액을 측정하였다. 또한, 면역 억제능을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 분주한 후 phenol red free DMEM 배지에 1 µg/ml LPS를 처리하고 동시에 상기 추출물을 처리하여 NO 생성 억제능을 확인하였다. 억제능은 LPS만 처리한 control을 기준으로 100%로 환산하고 이를 100에서의 차를 구하여 표시하였다

5. 세포생존율(cell viability) 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Duchefa, Haarlem, Netherlands)를

이용하여 RAW 264.7 세포에서 세포 생존율을 측정하였다. MTT 시약을 0.5 mg/ml의 농도로 첨가하고 37°C에서 3시간 반응시킨 후, 상층액을 제거하고 생성된 formazan complex를 Dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. α-Glucosidase 억제능 측정

기질인 2.5 mM para-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (pNPG, Sigma) 및 0.25 unit α-glucosidase (Sigma)에 다양한 농도의 추출물을 넣고 37°C에서 30분간 반응한 후, 이를 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 15, 62.5, 250 µg/ml의 acarbose (Sigma)를 이용하였으며, 억제능은 시료를 녹인 vehicle을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

7. Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) 억제능 측정

기질인 100 mM p-nitrophenyl phosphate (Sigma)에 PTP1B와 다양한 농도의 추출물을 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 이를 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 0.1, 0.8, 1.6 mM ursolic acid를 이용하였으며, 이때 억제능은 시료를 녹인 vehicle을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

8. Tyrosinase 억제능 측정

기질인 100 mM L-tyrosine (Sigma)에 다양한 농도의 추출물 및 200 unit tyrosinase (Sigma)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 이를 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 6.25, 12.5, 25 µg/ml kojic acid를 이용하였으며, 이 때 억제능은 시료를 녹인 vehicle을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서 뺀 차를 계산하였다.

9. Xanthine oxidase (XO) 억제능 측정

Black 96-well plate (SPL, Pocheon, Korea)에 기질인 0.4 M pterin에 다양한 농도의 추출물 및 xanthine oxidase를 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후, 1 N

HCl로 반응을 정지 시키고 이를 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 excitation 340 nm, emission 410 nm에서 형광값을 측정하였다. 양성 대조군은 0.25, 1, 4 μ g/ml allopurinol을 사용하였으며, 이 때 억제능은 시료는 녹인 vehicle을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

10. Pancreatic lipase 억제능 측정

기질인 2 mM p-nitrophenyl palmitate (pNPP, Sigma)와 다양한 농도의 추출물을 100mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.5)에서 혼합하고 porcine pancreas lipase (Sigma)와 함께 37°C에서 30분 동안 반응한 후 pNPP에서 분해된 p-nitrophenol을 검출하여 이를 VERSAMAX microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 25, 50 및 100 μ g/ml Orlistat (Sigma)을 이용하였으며, 이때 억제능은 시료를 녹인 vehicle을 기준으로 100% 환산하여 이를 100에서의 차를 계산하였다.

11. 통계처리

모든 실험값은 3회 이상 반복 실험한 결과를 기준으로 하였으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 ANOVA로 분석을 실시하여 검증하였다. P-value<0.05

를 유의 수준으로 간주하였으며, mean \pm SD 값으로 표기하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 침향에서 활성 화합물의 용매 추출

침향에서 활성 화합물의 추출 과정은 메탄올 (MeOH)로 추출한 시료를 ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH)로 순차적으로 분획하였으며, 추출 수율은 ACM (MeOH 추출물): 20.4g (14.0%), ACM/E (EtOAc 분획물): 13.4g (65.7%), ACM/b (ACM의 BuOH 분획물): 5.0g (24.5%) ACM/W (ACM의 DW 분획물): 0.6g (2.9%) 이었다 (Fig. 1A). TLC를 수행한 결과, 254 nm UV light에 흡수된 물질은 Fig. 1B에 나타내었고, 이들에 anisaldehyde sulphuric acid를 분무하고 가열한 결과를 Fig. 1C에 나타내었다. ACM (레인 1), ACM/E (레인 2) 및 ACM/b (레인 3)의 분별 추출물은 전개 용매에 의해 이동되었으나, ACM/W (Lane 4)는 높은 극성으로 인해 실리카에 흡착되었다 (Fig. 1C). 대부분의 화합물은 EtOAc층으로 분획되는 것으로 확인함으로 침향의 주요 활성 추출물은 EtOAc 층에 포함되어 있을 것으로 사료된다.

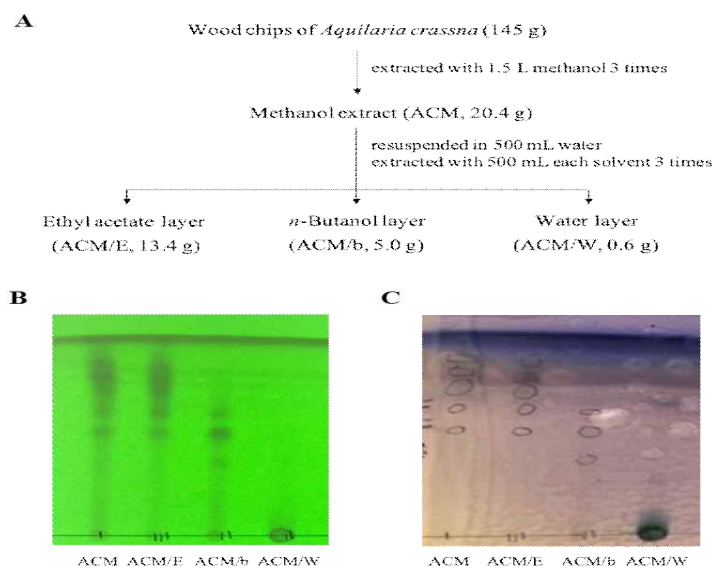


Fig. 1. Solvent extraction of active compounds from *Aquilaria crassna*. (A) Schematic procedure for preparation. (B) Thin layer chromatography (TLC) of solvent fractions from *Aquilaria crassna* under UV light. (C) After colorization with anisaldehyde sulphuric acid reagent. Solvent fractions were loaded on a base line of a silica gel normal-phase TLC plate. Chloroform/methanol/water(4:2:1, v/v/v) was used as the

development solvent for normal-phase TLC. ACM; methanol extract from *A. crassna*, ACM/E; ethyl acetate layer of ACM, ACM/b; n-butanol layer of ACM, ACM/W; water layer of ACM.

2. 침향의 용매 추출 분획물의 세포독성과 nitric oxide (NO) 생성 및 억제능

면역 활성을 측정하기 위하여 murine macrophage RAW 264.7 세포에 침향의 용매 추출 분획물을 24시간 동안 처리한 결과, 모든 용매 추출 분획물에서 양성 대조군인 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS)를 처리한 군에 비하여 NO의 생산능이 없는 것을 확인하였으며 (Fig. 2A), 모든 용매 추출 분획물을 단독으로 세포에 처리하였을 때 세포독성을 또한 나타나지 않았다 (Fig. 2B). 침향의 용매 추출 분획물의 면역억제 기능을 측정하기 위해 LPS와 함께 각각의 추출물을 24시간 동안

RAW 264.7 cell에 각각 처리한 결과, MeOH 추출물인 ACM과 EtOAc 분획물인 ACM/E에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 2C). 그러나, BuOH 및 DW 분획물에서는 NO 생성이 억제되지 않은 것으로 확인하여, 면역 억제 활성물질이 EtOAc 분획물에 존재하는 것으로 사료된다 (Fig. 2C). 침향의 용매 추출 분획물의 세포 생존율을 확인한 결과, 세포 독성은 나타나지 않았다 (Fig 2D). 이상의 NO 생성 및 억제능 평가 결과를 고려할 때 침향의 MeOH 추출물과 EtOAc 분획에서 활성물질의 추가적인 동정이 필요하다고 사료된다.

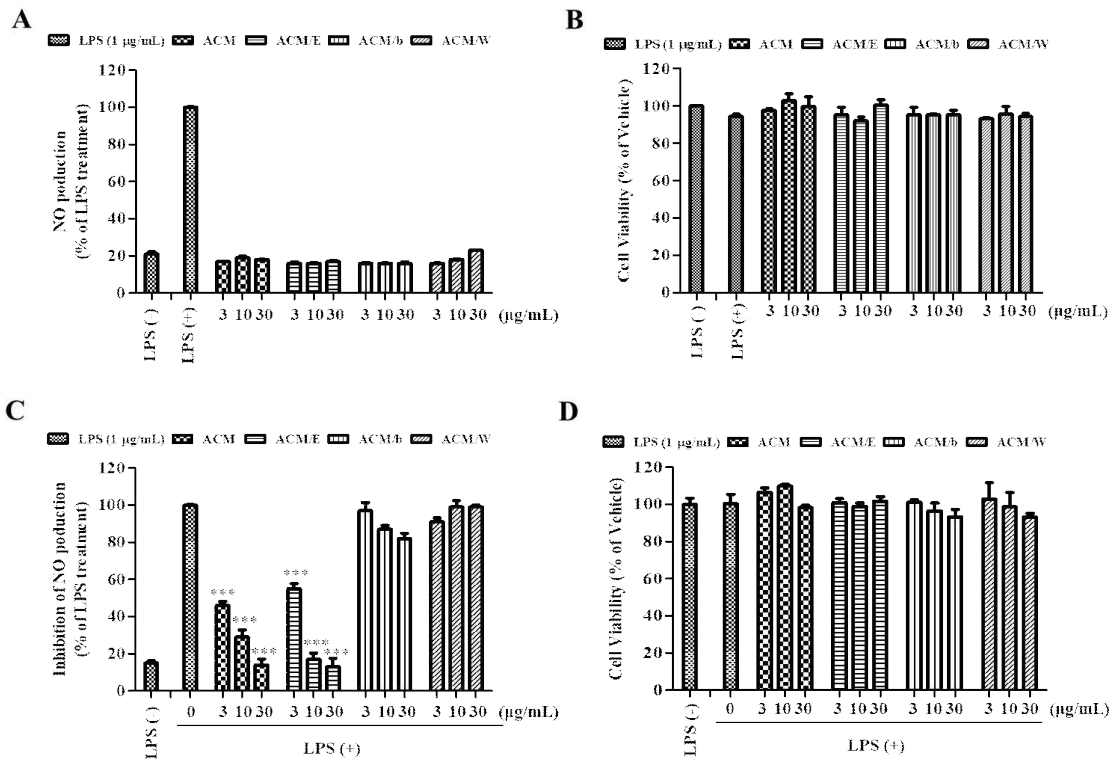


Fig. 2. Effects of Solvent extraction of active compounds from *Aquilaria crassna* on nitric oxide (NO) production and inhibition in RAW 264.7 cells. (A) Production of NO treated with extracts for 24 h. (B) Cell viability treated with extracts alone for 24 h. (C) Inhibition effects of NO treated with extracts for 24 h. (D) Cell viability co-treated with extracts and LPS for 24 hr. LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) was used as a positive. Data are represented the mean \pm SD (n=3 in each group) from three separate experiments. ***p<0.001, compared with negative control. ACM, methanol extract from *A. crassna*; ACM/E, ethyl acetate layer of ACM; ACM/b, n-butanol layer of ACM; ACM/W, water layer of ACM.

3. 침향의 용매 추출 분획물의 PTP1B와 α -Glucosidase 억제활성

침향의 용매 추출 분획물의 α -glucosidase 및 protein tyrosine phosphatase (PTP1B) 에 대한 저해 활성을 측정하였다. α -glucosidase 효소는 소장 점막 용모내에 존재하는 소화효소로, 증가된 작용으로 인해 분해된 포도당이 증가하게 되어 당뇨병 증상 중의 하나인 고혈당 상태를 야기한다^{21,22}. PTP1B는 비만과 당뇨병자를 포함하여 인슐린 저항성이 높은 경우에 과발현이 관찰된 바 있으며, 세포 내 신호와 신진대사에 중요한 역할을 하고, insulin receptor signaling을 조절한다^{23,24}. 침향의

용매 추출 분획물의 α -Glucosidase 저해 활성을 측정 한 결과, ACM과 ACM/E가 농도 의존적으로 활성 억제능이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 3A). 또한, PTP1B의 활성 억제능을 확인한 결과, α -Glucosidase 와 마찬가지로 ACM과 ACM/E 분획물에서 농도 의존적으로 활성 억제능이 증가하는 것을 확인하였다. 이상의 침향의 MeOH 추출물과 EtOAc 분획에서 PTP1B와 α -Glucosidase 억제활성을 나타내는 것으로 보아, 침향이 인슐린 저항성을 조절함으로써 당뇨병을 포함한 비만을 치료하는데 사용할 수 있을 것으로 사료되며, 추후 활성물질을 분리동정함으로써 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

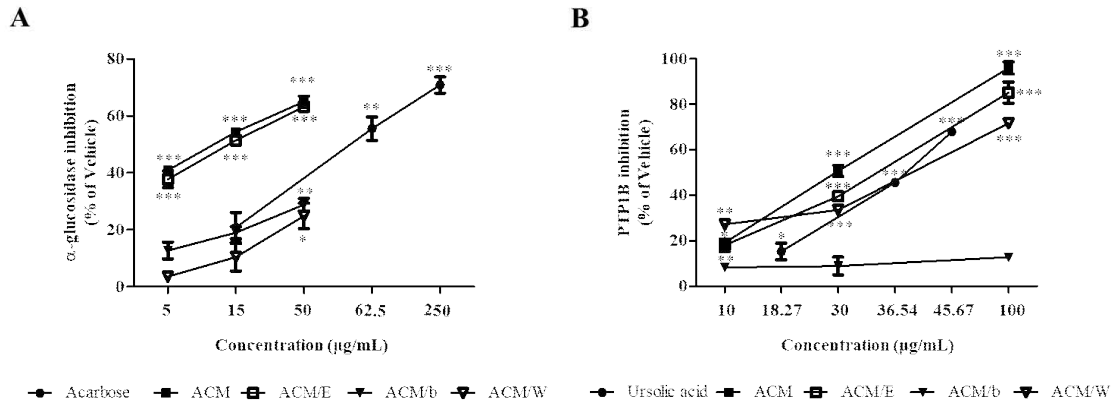


Fig. 3. Effects of Solvent extraction of active compounds from *Aquilaria crassna* on α -Glucosidase and PTP1B inhibition. (A) α -Glucosidase inhibitory activity, (B) PTP1B inhibitory activity, Data are represented the mean \pm SD (n=3 in each group) from three separate experiments. **p<0.01, and ***p<0.001, compared with negative control. ACM, methanol extract from *A. crassna*; ACM/E, ethyl acetate layer of ACM; ACM/b, n-butanol layer of ACM; ACM/W, water layer of ACM. Acarbose and ursolic acid were used as a positive control for each assay, respectively.

4. 침향의 용매 추출 분획물의 일반 생리활성

침향의 용매 추출 분획물의 다양한 생리활성을 확인 하기 위하여, tyrosinase, xanthine oxidase (XO), pancreatic lipase에 대한 저해 활성을 측정하였다. 먼저, melain 합성의 주요 기질로 사용하는 L-tyrosine과 melanin 생성조절 효소인 tyrosinase의 억제능을 확인한 결과, ACM, ACM/E 및 ACM/b 분획물에서 농도 의존적으로 억제 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A). 이후, 체내 uric acid의 혈액 내 축적으로 관절의 윤활막 및 연골에 침착하여 염증과 통증을 유발하는

XO 억제 활성을 확인한 결과, ACM/E 분획물에서 가장 높은 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 4B). 마지막으로 지방질 가수분해 효소로 지방의 소화 및 흡수에 중요한 역할을 하는 pancreatic lipase의 저해 활성을 측정 한 결과, ACM 및 ACM/E 분획물에서 높은 저해능을 확인하였다 (Fig. 4C). 침향의 MeOH 추출물과 EtOAc 분획에서 확인한 생리활성의 결과로 비추어 보아, 침향 추출물의 면역 증진 가능성을 보는 줄 수 있는 근거로서 활용이 될 수 있으며, 추후 정확한 기전 연구의 수행을 위한 각 침향 추출물 및 분획에서 생리활성 성분

분석과 세포 및 동물 모델에서의 효능 검증이 이루어져야 할 것이다.

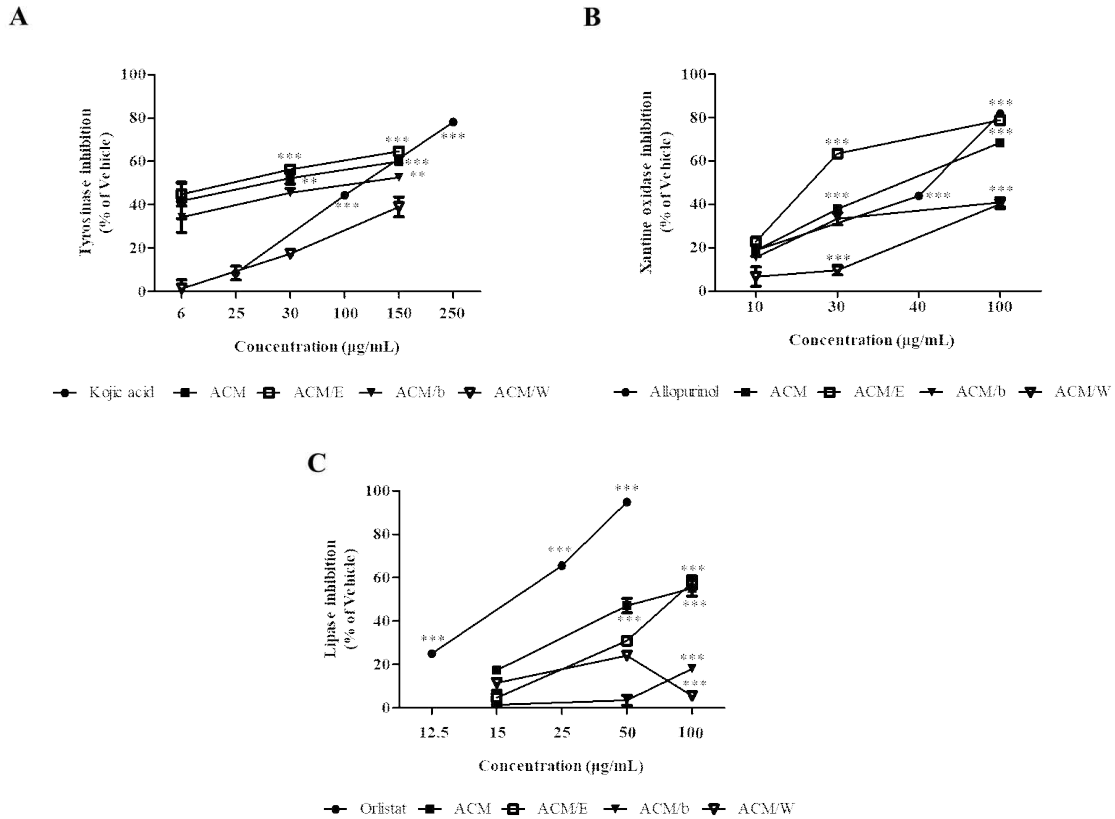


Fig. 4. Various biological activities of Solvent extraction of active compounds from *Aquilaria crassna*. (A) tyrosinase inhibitory activity, (B) xanthine oxidase inhibitory activity, (C) pancreatic lipase inhibitory activity. Data are represented the mean \pm SD (n=3 in each group) from three separate experiments. ***p<0.001, compared with negative control. ACM, methanol extract from *A. crassna*; ACM/E, ethyl acetate layer of ACM; ACM/b, n-butanol layer of ACM; ACM/W, water layer of ACM. Acarbose, ursolic acid, orlistat, kojic acid, and allopurinol were used as a positive control for each assay, respectively.

IV. 결론

침향을 MeOH을 포함한 다양한 용매로 분획하여 얻어진 분획물을 항염증, 항당뇨 및 항비만을 포함한 다양한 생리활성을 조사한 결과, 침향의 MeOH 및 EtOAc 분획물에서 높은 생리활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 단일물질로 정제할 경우, 더욱 우수한 효능의 화합물이 존재할 것으로 생각되며, 향후 활성물질을 추적, 분리하는 연구를 통한 효능 물질의 동정 및 활성 기전에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

Acknowledgments

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업 (2년) 및 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3 단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINK 3.0) (No. 202207830001)에 의하여 연구되었다. 또한, 2022년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업의 지원을 받아 연구하였으며, (No. NRF-2022R111A3053818) 이에 감사드립니다.

References

1. Lim YR, Shin JY, Kim H, Baek GH, Yu KW, Jeong HS, et al. Anti-adipogenic effect of fermented coffee with *Monascus ruber* mycelium by solid-state culture of green coffee beans. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2014; 43:624-29.
2. Eckel R. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*. 1997; 96:3248-50.
3. Park JA, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. Antiobesity Activity of *Chrysanthemum zawadskii* Methanol Extract. *Journal of Life Science* 2015;25(3): 299~306.
4. Yu SN, Park BB, Kim JW, Hwang YL, Kim SH, Kim S, et al. Immunomodulatory Effects of *Euglena gracilis* Extracts. *Journal of Life Science* 2021;31(2): 183~91.
5. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clinical Immunology*. 2018;14:49.
6. Nicholson LB. The immune system. *Essays in Biochemistry*. 2016;60: 275-301.
7. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*. 2015;36:161-78.
8. Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125:S3-23.
9. Kwon JH, Chang MJ, Seo HW, Lee JH, Min BS, Na M, et al. Triterpenoids and a sterol from the stem-bark of *Styrax japonica* and their protein tyrosine phosphate 1B inhibitory activities. *Phytotherapy Research*. 2008;22:1303-06.
10. Tonks NK. PTP1B: From the sidelines to the front lines. *FEBS Letters*. 2003;546:140-8.
11. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm G, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100:449-58.
12. Lee HY, Lee IC, Kwak JH, Kim TH. Evaluation of free radical scavenging and pancreatic lipase inhibitory effects of *Aquilaria agallocha* extracts. *Korean Journal of Food Preservation*. 2015;22(3): 437-42.
13. Bhore SJ, Preveena J, Kandasamy KI Isolation and identification of bacterial endophytes from pharmaceutical agarwood-producing *Aquilaria* species. *Pharmacognosy Research*. 2013;5:134-7.
14. Ye W, He X, Wu H, Wang L, Zhang W, Fan Y, et al. Identification and characterization of a novel sesquiterpene synthase from *Aquilaria sinensis*: An important gene for agarwood formation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;108:884-92.
15. Dahham SS, Hassan LE, Ahamed MB, Majid AS, Majid AM, Zulkepli NN. In vivo toxicity and antitumor activity of essential oils extract from agarwood (*Aquilaria crassna*). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16:236.
16. Hashim YZ, Kerr PG, Abbas P, Mohd Salleh H. *Aquilaria* spp. (agarwood) as source of health beneficial compounds: A review of traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;189:331-60.
17. Jermisri P, Kumphune S. Ethylacetate extract of *Aquilaria crassna* preserve actin cytoskeleton on stimulated ischemia induced cardiac cell death. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;21: 4057-62.
18. Kakino M, Sugiyama T, Kunieda H, Tazawa S, Maruyama H. Agarwood (*Aquilaria crassna*) extracts decrease high-protein high-fat diet-induced intestinal putrefaction toxins in mice. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2012;26:1-7.
19. Li W, Chen HQ, Wang H, Mei WL, Dai HF. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: chemistry, biological activities and biosynthesis. *Natural Product Reports*. 2021;38:528-65.



20. Pranakhon R, Pannangpetch P, Aromdee C. Antihyperglycemic activity of agarwood leaf extracts in STZ-induced diabetic rats and glucose uptake enhancement activity in rat adipocytes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2011;33:405-10.
21. Toshiyuki T, Mitsuo M. Potent α -Glucosidase Inhibitors from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed. *Phytotherapy Research*. 2011;26: 722-26.
22. van de Laar FA. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*. 2008;4:1189-95.
23. Byon JC, Kusari AB, Kusari J. Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998;182:101-8.
24. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR. Regulation of the insulin signaling pathway by cellular protein tyrosine phosphatases. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998;182:91-9.