

苦瓜蛋白調整血糖機制及其應用之研究

項千芸^a、侯庭鏞^b、陳兆群^c、羅欣宜^b、吳世祿^a、陳清助^d

^a 中國醫藥大學醫學系

^b 中國醫藥大學中醫所

^c 中國醫藥大學中藥所

^d 中國醫藥大學附設醫院新陳代謝科

摘 要

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 為中草藥，亦是民眾日常食用之蔬果。在現代生物性療效方面，苦瓜具有治療糖尿病及其相關併發症（神經系統的損傷、白內障）的功效，也具有抗菌、抗病毒、抗腫瘤、節育、抗胃潰瘍、抗瘡、治療乾癬、抗發炎和抗氧化等活性，其中以苦瓜萃取物調整血糖或應用在治療糖尿病及其併發症方面最為顯著，但其活性成分，尤其是活性蛋白質與相關作用機轉尚未完全釐清。目前我們已完成苦瓜不同品種萃取製程蛋白萃取液調整血糖之最適化研究，證實苦瓜特定製程蛋白萃取液具有調整血糖功效，也利用區隔性分離方式，驗證調整血糖之最佳分子量區間苦瓜蛋白及可能之活性物質。進一步應用蛋白質體學技術分析具調整血糖功能苦瓜萃取液蛋白質之組成成分，並探究苦瓜萃取液調整血糖機轉，以完成化學組成固定、生物反應明確、無生物安全性顧慮之苦瓜調整血糖保健產品之開發。由本研究的執行，預期可確定苦瓜調整血糖的功效，進一步分析其有效機轉及組成份，未來應可發展為治療或輔助糖尿病治療的中草藥保健食品，甚至是導引糖尿病之新藥開發。

關鍵詞： 苦瓜，調整血糖，保健產品，蛋白質體學

前言

開發具調整血糖活性之中醫藥新藥的系列產品，建立跨國性具產業應用性之智慧財產，是輔助生技產業開發之重要項目。調整血糖製劑在市場規模與範圍之預估方面，根據 WHO 的相關統計顯示，糖尿病病患的人口總數一直呈現驚人的成長，從 1985 年的 3 千萬人、1995 年的 1 億 3 千 5 百萬人，到今日全球糖尿患者總數已超過 1 億 7 千 7 百萬人，而 WHO 更進一步指出，到 2030 年時，全球罹患糖尿病的總人口將爆破 3 億 3 千 6 百萬人。此外，糖尿病相關疾病所造成的死亡人數，已佔全球每年死亡總人數的 5% 左右，而且 WHO 警告若各國再不積極的預防及治療糖尿病及其相關疾病，未來 10 年可預期因糖尿病相關疾病所造成死亡的總人數將再激增一倍 (<http://www.who.int/diabetes/en/>)。在與糖尿病直接相關的醫療費用統計方面，糖尿病的每年醫療費用幾乎佔各國健康衛生相關預算總額的 2.5% 到 15%。反觀國內健保用在糖尿病的醫療費用方面，90 年時約 271 億元，91 年健保糖尿病人醫療費用約 317 億元，年增率約 17%，所以糖尿病在國內亦是影響健保支出的重要因素。如果開發具調整血糖活性之中醫藥新藥的系列產品，一方面可提高台灣中醫之能見度，另一方面可以降低健保的負擔。而且台灣目前市售調整血糖的保健產品，多為未經醫師處方的中草藥相關產品、民間偏方或傳銷商品，其產品多未經研究證實其療效，在製程上是否經有 GMP 認可亦不清楚，民眾服用後其效果堪慮，若有進一步問題發生，又多增健保醫療費用等社會成本的支出。所以如能開發出療效明確的具調整血糖活性之中醫藥新藥的序列產品，應能降低相關事件的發生，亦能增進國民的健康。

糖尿病是重要的慢性病之一，主要可分為胰島素依賴型與非胰島素依賴型糖尿病。胰島素依賴型的糖尿病病人，其胰臟無法生產胰島素，又稱做第一型糖尿病。非胰島素依賴型糖尿病病人則是胰島素分泌不足或對胰島素產生耐受性所導致，又稱做第二型糖尿病。無論第一型糖尿病或第二型糖尿病，人體皆會有高血糖的病徵，或是長時間處於高血糖的體液環境中，體內滲透壓過高，容易造成人體神經系統的持續傷害，以及讓整個血液循環系統壓力變大，導致日後神經與血管的病變產生。然而，對於糖尿病致病機轉的研究中，也發現有許多訊息傳遞路徑與葡萄糖的代謝相關，例如，葡萄糖的代謝、特定器官對葡萄糖的攝取路徑等。近年，除了從 insulin receptor 或是 glucose transporters 的研究方向去研究糖尿病的治療外，目

前認為轉錄因子 peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) 是治療的新標的物 (Rosenson, 2007)，此外已有文獻報告指出一些自然界作物在治療或改善糖尿病的主題中慢慢嶄露頭角 (Iwashima et al., 2001; Storling et al., 2005; Zhao et al., 2005a)，這些觀念也逐漸被用來作為治療糖尿病體內試驗的重要發展方向。因此由 insulin receptor，到 PPAR 相關基因及 glucose transporters，已成為糖尿病及其藥物研發一主要路徑。

由上述觀點轉換成研究平台，在體外試驗部份，對於胰島素耐受性所導致脂肪傷害的研究中，以細胞株 murine 3T3-L1 cells (Karalee et al., 2001) 與 GLUT4 (Maddux et al., 2001) 做為 glucose uptake 機轉探究的基礎。脂肪組織過多的形成堆積，與肥胖、第二型糖尿病有著密切關係，且會進一步導致脂肪中毒產生造成細胞傷害，使細胞內脂肪細胞對胰島素產生耐受性 (Lelliott and Vidal-Puig, 2004)。若細胞對胰島素產生耐受性，則會於脂肪細胞以及平滑肌中形成高血糖的狀態；然而，由不同部位產生之脂肪細胞被傷害後，也會產生不同的生理或病理的機制反應。

在體內動物實驗部份，嚙齒類動物是最佳的實驗動物種類，也有學者將老鼠的基因做修飾後，成為 knockout 的小鼠或是基因轉殖鼠，藉此進一步研究對糖尿病的影響機轉 (Rees and Alcolado, 2005; Masiello, 2006)。糖尿病的誘因可以藉由藥物的不當使用、意外傷害或是基因遺傳層面上，導致不同動物糖尿病的發生。在 1996 到 2006 年之間，許多民族重要天然物治療糖尿病的研究文獻投稿於 Journal of Ethnopharmacology 中，多利用此實驗模式，其中，Streptozotocin (STZ) 以及 alloxan 誘發糖尿病動物模式居多，各有 69% 與 31% 的出現率，其會誘發高血糖產生，但與人糖尿病病程差異度較大。至於 knockout 的小鼠或是基因轉殖鼠中，以 ob/ob mouse 最廣為被使用。Ob/Ob mouse，其血糖值能夠維持在 euglycemia (80-110 mg/dl) 以及持續補償對胰臟 β -cell 反應的狀態，保持在高胰島素血症的情況下與胰島素耐受性相抗衡著。Ob/Ob mouse 模式中，胰島素的耐受性大多是由於過度肥胖、高血脂以及高血糖所引起，上述這些症狀也同時能夠在第二型糖尿病病人中被發現。

傳統對於糖尿病的治療，現代藥物的使用率較中草藥來的廣泛，也因為不同的現代藥物在使用上有藥物副作用的堪慮，Li et al. (2004) 多次評論在臨床上常用來治療糖尿病的傳統中草藥處方，或者是治療由糖尿病所引起的其他併發症等，發現中草藥在對於糖尿病及其相關的預防治療上有

加重的趨勢。因此，我們將這些在文獻中已有使用的中草藥重新統整，其中也有已找到其生物活性成分的天然化合物 (Chen, 1987; Wu and Li, 1992; Gu and Jiang, 1997; Yin and Chen, 2000)，這些具備活性成分的構造包含 polysaccharides、terpenoids、flavonoids、sterols、alkaloids 及其他等。上述已發表的天然化合物中，由於 polypeptides 類成分的研究甚少，及由 insulin receptor，到 PPAR 相關基因及 glucose transporters 之糖尿病藥物研發路徑判讀，polypeptides 類成分較有可能在上游產生效果。因此研究調節血糖相關 polypeptides，應較具有新穎性與可專利性，未來進一步希望發展成新藥開發的新標的，以及用在臨床上治療糖尿病的新契機。

苦瓜是葫蘆科 *Momordica charantia* L. 的果實，廣泛分布於亞洲、亞馬遜河流域、東非等地，因此許多民族經常把苦瓜列入傳統藥物之一，用於治療及預防一些慢性疾病，如糖尿病、經痛、痛風、濕疹、節育、墮胎、腎結石、肺炎、乾癬等方面。在台灣，苦瓜同時也是一般民眾經常食用的蔬果之一，而在中醫藥重要的典籍中亦有記載，如本草綱目中認為苦瓜有“苦寒、無毒、除邪熱、解勞乏、清心明目”等功效。在現代生物性療效方面，苦瓜也有近百篇的相關文獻，其中主要有針對幾個方向，如治療糖尿病及其相關的併發症（神經系統的損傷、白內障）、抗菌、抗病毒（HIV、HSV）、抗腫瘤、節育、抗胃潰瘍、抗瘡、治療乾癬、抗發炎和抗氧化等活性 (Grover and Yadav, 2004)，而其中以苦瓜萃取物調整血糖或應用在糖尿病及其併發症最為顯著，但這些研究多偏重在動物實驗，少有苦瓜調整血糖之相關機制及其功能性成分之研究。

目前有關苦瓜在糖尿病方面的研究有降低正常動物血糖 (Bailey et al., 1985; Day et al., 1990; Shibib et al., 1993; Ali et al., 1993; Cakici et al., 1994; Sarkar et al., 1996; Jayasooriya et al., 2000)、抗 alloxan 及 streptozotocin 所誘發的高血糖 (Akhtar, 1982; Karunanayake et al., 1984; Singh et al., 1989; Pari et al., 2001; Rathi et al., 2002a; Kar et al., 2003; Kedar and Chakrabarti, 1982; Bailey et al., 1985; Day et al., 1990; Karunanayake et al., 1990; Higashino et al., 1992; Shibib et al., 1993; Sarkar et al., 1996; Ahmed et al., 1998; Ahmed et al., 2001; Sitasawad et al., 2000; Grover et al., 2002; Rathi et al., 2002)、增加胰臟功能而達到降血糖的作用 (Day et al., 1990; Sarkar et al., 1996)、增加 beta cells 的數目 (Ahmed et al., 1998)、促進胰島素分泌及胰島素樣作用 (Welihinda et al., 1986; Higashino et al., 1992)、抑制糖尿病大鼠肝中

hexokinase, glucokinase, phosphofructokinase 及受質 glucose-6-phosphate 的活性 (Rathi et al., 2002) 等。而根據相關研究指出，苦瓜的化學成分有皂苷、生物鹼、三萜、固醇及蛋白質等成分，其中固醇類皂苷化合物，如 charantins，及一些蛋白質成分被認為具有降血糖的活性 (Raman and Lau, 1996)。在許多種類的植物中，皂苷類成分的降血糖活性已有許多相關研究，甚至已有文獻研究該類成分結構與降血糖活性之關係 (Matsuda et al., 1998)。但是相對於其他植物成分的研究，苦瓜中已分離出具降血糖活性的蛋白質成分，在糖尿病動物模式的研究相對較少，且也缺乏進一步的分子機轉的研究，因此我們希望鎖定小分子量的蛋白質，設立萃取小分子量蛋白質的萃取製程，以進一步針對苦瓜機能性蛋白質進行深入的研究。

機能性食品必須具備含有已被闡明化學結構的功能因子且功能因子在食品中穩定存在等要件，而苦瓜中負責調整血糖的功能因子尚需進一步之研究，因此，實驗室擬由已建立之調整血糖分析系統，對台灣省產之各苦瓜品種進行評估，並以胰島素信息傳導路徑分析其調節血糖之相關機轉。進一步再經由不同萃取方法搭配分析化學及蛋白質體學技術等方法，搜尋苦瓜中功能性成分及其對胰島素信息傳導的影響。經由本研究的執行，預期可發現苦瓜中的功能性成分，未來應可進一步發展為治療或輔助糖尿病治療的中草藥保健食品。

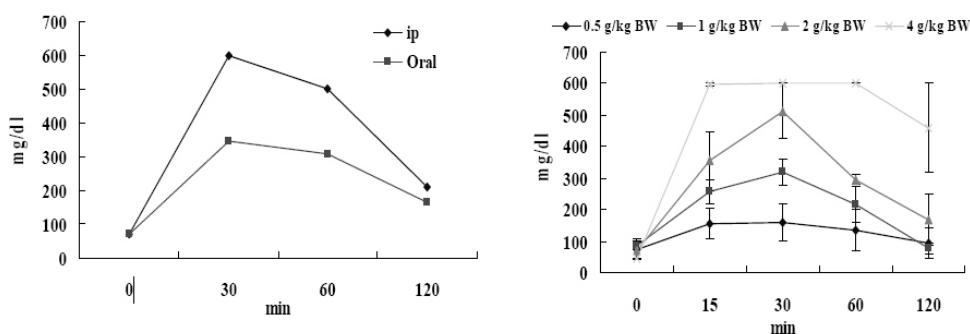
內容

苦瓜為中草藥，本草綱目中認為苦瓜有“苦寒、無毒、除邪熱、解勞乏、清心明目”等功效，而其中以苦瓜萃取物調整血糖或應用在治療糖尿病及其併發症方面最為顯著，但這些研究多偏重在動物實驗，少有苦瓜調整血糖之相關機制及其功能性成分之研究。一般而言，機能性食品必須具備含有已被闡明化學結構的功能因子且功能因子在食品中穩定存在等要件，而苦瓜中負責調整血糖的功能因子尚需進一步之研究。因此，實驗室已建立之調整血糖的動物模式，已確定苦瓜特定製程蛋白萃取液具調整血糖功效，進一步也利用區隔性分離方式驗證調整血糖之最佳分子量區間苦瓜蛋白。

目前已建立超音波震盪、透析、分子量及等電點分離等不同苦瓜特定品種萃取製程，已確定特定品種苦瓜之萃取液在動物試驗中具調整血糖功效。因從上述 Khanna 等人的研究中發現苦瓜調整血糖的功能性蛋白主要

為小分子量的蛋白質，為了快速分析出苦瓜中功能性蛋白質之類型，我們分別以熱水、水、甲醇、乙醇、酸性乙醇等溶媒萃取不同極性的蛋白質成分，並將各種苦瓜的不同部位直接均質後萃取蛋白質成分，再以 SDS-PAGE 分析其小分子量蛋白質所佔之比例和比較各品種苦瓜蛋白質之差異，以找出萃取苦瓜小分子量蛋白質最有效的方法。進一步搭配凝膠層析 (gel filtration) 等方法，製備苦瓜可能調整血糖之區隔性成分。本項研究中主要以活性分析平台及動物模式交叉實驗，引導苦瓜活性蛋白的萃取與純化策略。

調整血糖動物模式之建立根據 Day 等人的方法，建立正常動物降血糖模式。動物模式是以 8 週齡、體重 20 ± 1 公克的雌性 BALB/c 小鼠為實驗動物，在禁食 18 小時後，分別以口服或腹腔注射方式給予高濃度的葡萄糖溶液 (2g/kg 體重)。經實驗證實葡萄糖溶液以腹腔注射的方式給予小鼠，可以使小鼠維持穩定的高血糖狀態 (左圖)。而以腹腔注射葡萄糖溶液 ($0.5\sim 4\text{ g/kg}$ 體重) 進行劑量反應的測試，發現血糖濃度會隨著葡萄糖注射濃度的上升而增加，在腹腔注射 30 分鐘後，血糖濃度會達到高峰，而 2 小時後，血糖濃度會下降成背景值 (右圖)。因此我們利用每公斤體重 4 公克的葡萄糖濃度、腹腔注射的條件，進行後續苦瓜萃取液調整血糖的實驗。



目前已確定至少一種苦瓜特定製程蛋白萃取液 (MCSE) 調整血糖的效果。將不同濃度的苦瓜特定製程蛋白萃取液以口服方式的方式投與小白鼠，再注射葡萄糖溶液 (4g/kg 體重) 後，檢測其血糖的變化。結果顯示，血糖濃度隨著苦瓜特定製程蛋白萃取液濃度的增加而下降，而於 2 小時後，血糖濃度會下降成背景值，證明苦瓜特定製程蛋白萃取液確實具有調

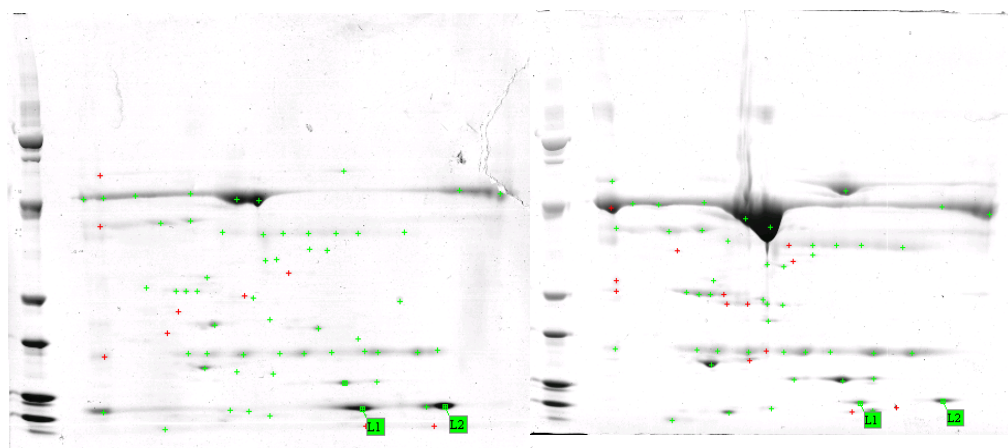
整血糖的功能。

苦瓜特定製程蛋白萃取液之療效進一步以糖尿病動物模式分析其療效，糖尿病有許多動物模式，因本研究希望以第二型糖尿病為主要之標的，因此經由本研究團隊過去之經驗，選擇果糖誘導的胰島素耐受型 Sprague-Dawley (SD) 大鼠糖尿病模式，進行苦瓜蛋白質萃取液在調整血糖方面療效的活性評估 (Chen et al., 2001)。依照本團隊過去的研究顯示，高果糖飲食組的胰島素及游離脂肪酸含量約為正常組的兩倍，而在三酸甘油脂方面則約為 2.5 倍，在陽性對照組方面則降回背景值左右。故本實驗以 150-200g SD 大鼠，分別給予正常與高果糖的飲食連續 6 週。陽性對照組與苦瓜組則分別在高果糖飲食中同時給予 troglitazone 和苦瓜蛋白萃取液或其功能性成分進行治療，最後再測定其血壓、胰島素、游離脂肪酸、三酸甘油脂等相關生化數值之改變。

除了 SD 大鼠糖尿病模式外，另有其它胰島素非依賴型糖尿病動物模式，以雙重驗證苦瓜蛋白質萃取液調整血糖的活性 (Luo et al., 1998; Apweiler and Freund, 1993; Chen and Wang, 2005; Rees and Alcolado, 2005)。動物模式的建立方法如下：以 3 週週齡的 C57BL/6J 小鼠，分別給予正常與高脂肪 (35.5%脂肪) 的飼料 3 週後，再以 STZ 100mg/kg 誘發糖尿病，對照組則注射等體積之溶媒 (0.05 M citric acid, pH4.5)，持續給予相同之飲食。在 STZ 注射後的適當時間給予不同的苦瓜蛋白萃取液治療及抽血檢測其血糖之變化，陽性對照組則投予 tolbutamide (200 mg/kg) 進行治療。STZ 注射後的第 31 天將小鼠犧牲採集其血液與相關組織，進行血糖、組織切片與糖尿病控制相關機轉之檢測。以 6~7 週的 Obese (fa/fa) Zucker 大鼠正常飼養 12 週，待其自行產生胰島素耐受性及高血糖等糖尿病症狀後，再給與藥物治療並觀察相關生化數值的變化。

本實驗以上述動物模式為基礎，將測試不同苦瓜萃取液在不同動物模式交叉實驗，以引導較高療效，較低成本之調整血糖保健產品之開發。應用蛋白質體學技術，搜尋具調整血糖功能苦瓜萃取液中蛋白質組成成分，利用苦瓜可能調整血糖之區隔性成分為基礎，以 2D-PAGE-MS 進行其組成蛋白質成分之鑑定與分析。簡述如下：將製備好的苦瓜各部位樣品，先以二維凝膠電泳分析，再以影像成像系統擷取並分析其結果。之後，切下欲檢測蛋白質的點並消化後，再以質譜儀進行序列分析，最後將胺基酸序列利用蛋白質資料庫進行搜尋比對。蛋白質序列比對資料經生物資訊學工具

分析，歸類其蛋白質家族，推測可能功能後，進一步分析基因啓動子上轉錄因子結合位的種類，研究其生合成的調控機制。下圖爲本研究團隊利用已建立之蛋白質體相關技術平台，進行兩個不同部位的蛋白質二維凝膠電泳分析之初步成果，相同點以綠色表示，相異點以紅色表示。



在此蛋白質體相關技術平台中，兩個不同部位的蛋白質二維凝膠電泳分析選擇最具有意義的點進行液相層析串連質譜儀。液相層析串連質譜儀水解特定胜肽所形成之圖譜，經資料庫比對後可分析出胺基酸序列。最後將相關序列經 NCBI 蛋白質資料庫進行比對分析，分析其胺基酸序列。二維凝膠電泳分析選擇最具有意義的點，至少需分析 5 段胺基酸序列，其中至少須有 3 段胺基酸序列與 NCBI 蛋白質資料庫比對分析具高度相似性，方能判讀其蛋白質之種類。

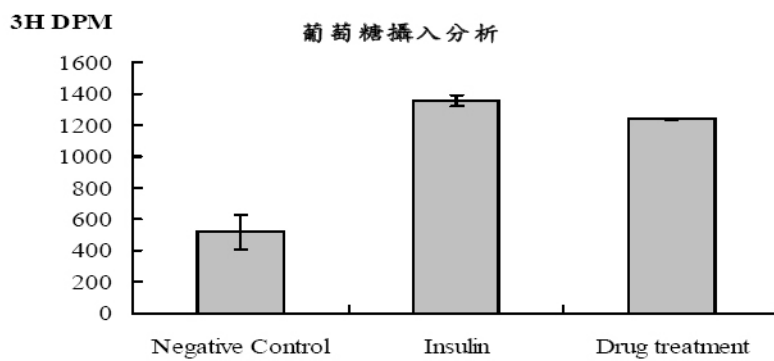
臨床上治療糖尿病的藥物，主要是以 biguanides、sulphonylureas、thiazolidinediones、D-phenylalanine 衍生物等藥物爲主，而這些藥物的共同點都是藉由影響胰島素分泌或改變其訊息傳導路徑來發揮其療效。因此，可先將具有胰島素受體的細胞株 3T3-L1 誘發分化成脂肪細胞後，處理不同的苦瓜萃取物或其成分，再投與放射線標定的葡萄糖後，觀察各種處理組的細胞是否會將葡萄糖攝入細胞內，以分析不同的苦瓜萃取物或其成分是否具有調整血糖的功能。

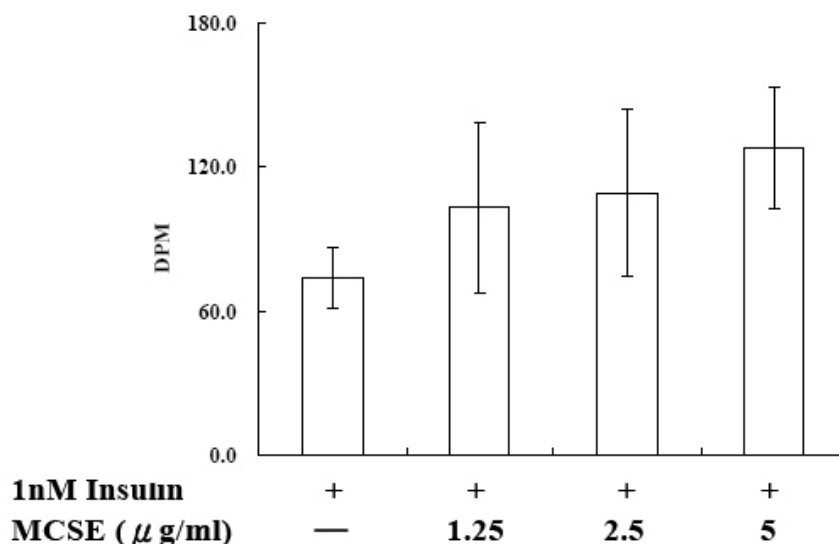
下圖爲本研究團隊誘發細胞分化的初步結果，分別是以顯微鏡在固定放大倍率（200X）下觀察 3T3-L1 在誘發分化前後的細胞形態變化。左圖爲在 Oil Red 染色下，觀察 3T3-L1 原來的細胞形態，3T3-L1 呈現出原本

的纖維母細胞的形態特徵。中間圖則為 3T3-L1 在誘發分化後所形成的脂肪細胞，從圖中可觀察到細胞內具有明亮的油室，此即是脂肪細胞的特徵之一。右圖是中間圖的細胞再經由 Oil Red 染色後進行觀察，從圖中可以更清楚的看到被染成紅色的油室，證明 3T3-L1 已經確實被誘導分化成脂肪細胞。



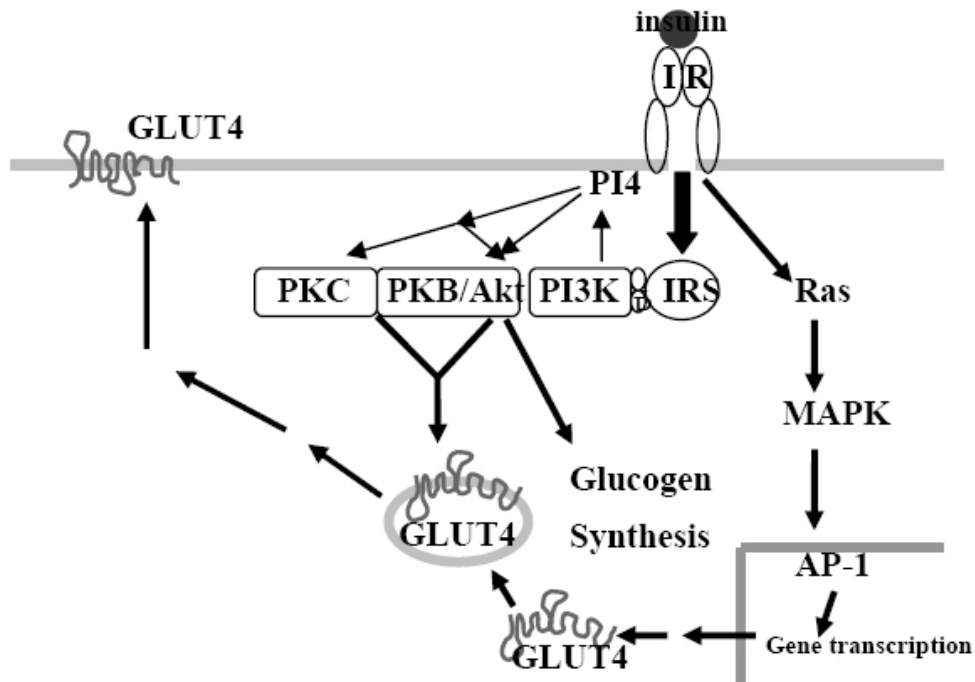
下圖為 3T3-L1 分化成的脂肪細胞經胰島素及藥物等處理後，其對氘（³H）標定葡萄糖的不同攝取能力。陰性對照組只有誘導分化未做任何其他處理，以胰島素刺激葡萄糖的攝取為陽性控制組，最後給予藥物看藥物是否能刺激其葡萄糖的攝取。由下圖結果顯示藥物可以成功的促進脂肪細胞葡萄糖的攝取。





上述苦瓜特定製程蛋白萃取液 (MCSE) 調整血糖的效果可能與促進 3T3-L1 脂肪細胞攝取葡萄糖有關。3T3-L1 分化成的脂肪細胞後，再經胰島素或不同濃度的 MCSE 處理，測定對氘 (3H) 標定葡萄糖的攝取能力。結果顯示隨著 MCSE 濃度的上升，細胞攝取葡萄糖的能力也增加，證明 MCSE 可以藉由促進細胞攝取葡萄糖，而降低血糖濃度。

3T3-L1 細胞經胰島素刺激後，會經由下圖兩條主要路徑調節葡萄糖轉運分子 (GLUT4) 在細胞膜上的量，以促進細胞膜外的葡萄糖攝入細胞內。第一條主要路徑是經由胰島素刺激後活化 insulin receptor- β subunit (IR)，之後藉由將 insulin receptor substrate 磷酸化後，活化 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)，再經由相關路徑，活化下游的 protein kinase C (PKC) 和 Akt，最後促進 GLUT4 轉運與細胞內的糖質新生。另一條路徑是經胰島素刺激活化 Ras 後，活化 MAPK 相關路徑之轉錄因子 (包括 PPAR γ 、AP-1)，增加 GLUT4 的產生，以達到降低血糖的反應。因此本研究擬以 Western blot 分析相關訊息傳導、以 electrophoretic mobility shift assay 探討對轉錄因子的影響及以免疫螢光分析法測定細胞表面 GLUT4 的 translocation，分析苦瓜機能性成份調整血糖之可能機轉。本項研究與本校附醫新陳代謝科陳清助醫師合作執行。



化學組成固定、生物反應明確、及無安全性顧慮之苦瓜調整血糖保健產品之開發，主要以活性分析平台及動物模式交叉實驗，引導苦瓜最大活性物質的萃取策略的製定。未來如進一步確認某一種蛋白質為苦瓜中之可能相關調整血糖因子，進一步可設計為大量富集活性蛋白及固定蛋白質組成的苦瓜萃取製程。目前已確定在苦瓜在在特定分子量區間具較佳之血糖調整效應。

苦瓜調節血糖保健食品的產品設計可與產業界協同進行。由本研究篩選出具調整血糖之功能性蛋白後，配合前述的苦瓜特定製程蛋白萃取液分析，找出哪一品種苦瓜的特定部位含量最高，再以不同的方法進行活性蛋白質的萃取及純化，進一步以本研究的活性平台與動物實驗進行驗證，製訂出合理的各種活性蛋白含量範圍。之後再採用cGMP之製程將市售苦瓜，進行萃取與部分純化後，製造成苦瓜調整血糖保健食品之原型產品，在原型產品療效確認後，同時確立並修正其製程，以加速相關保健產品的開發時程。

參考文獻

1. Ahmed, I., Adeghate, E., Sharma, A.K., Pallot, D.J., Singh, J., 1998. Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Research Clinical Practices* 40, 145–151.
2. Ahmed, I., Lakhani, M.S., Gillett, M., John, A., Raza, H., 2001. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Research Clinical Practices* 51, 155–161.
3. Akhtar, M.S., 1982. Trial of *Momordica charantia* Linn (karela) powder in patients with maturity-onset diabetes. *Journal of Pakistan Med Association* 32, 106–107.
4. Ali, L., Khan, A.K., Mamun, M.I., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., Nur-e-Alam, M., Rokeya, B., 1993. Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. *Planta Medicine* 59, 408–412.
5. Bailey, C.J., Day, C., Turner, S.L., Leatherdale, B.A., 1985. Cerasee, a traditional treatment for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research* 2, 81–84.
6. Cakici, I., Hurmoglu, C., Tunctan, B., Abacioglu, N., Kanzik, I., Sener, B., 1994. Hypoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts in normoglycaemic or cyproheptadine-induced hyperglycaemic mice. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 117–121.
7. Chen, F.C., 1987. Present advance in chemical and pharmacological research of natural products for anti-hyperglycemia. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 18: 39–44.
8. Day, C., Cartwright, T., Provost, J., Bailey, C.J., 1990. Hypoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts. *Planta Medica* 56, 426–429.
9. Fröde TS, Medeiros YS. 2008 Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115:173-183.
10. Grover, J.K., Rathi, S.S., Vats, V., 2002. Amelioration of experimental diabetic neuropathy and gastropathy in rats following oral administration of

- plant (*Eugenia jambolana*, *Mucuna pruriens* and *Tinospora cordifolia*) extracts. *Indian Journal of Experimental Biology* 40, 273–276.
11. Gu, G.Y. and Jiang, Y., 1997. A survey on anti-hyperglycemic constituents from plants. *World Phytomedicines* 12: 55–58.
 12. Higashino, H., Suzuki, A., Tanaka, Y., Pootakham, K., 1992. [Hypoglycemic effects of Siamese *Momordica charantia* and *Phyllanthus urinaria* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats (the 1st report)] *Nippon Yakurigaku Zasshi* 100, 415–421.
 13. Iwashima, Y., Abiko, A., Ushikubi, F., Hata, A., Kaku, K., Sano, H., Eto, M. 2001 Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) β -subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 923–932.
 14. Jayasooriya, A.P., Sakono, M., Yukizaki, C., Kawano, M., Yamamoto, K., Fukuda, N., 2000. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol free and cholesterol-enriched diets. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 331–336.
 15. Kar, A., Choudhary, B.K., Bandyopadhyay, N.G., 2003. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 105–108.
 16. Karalee, J.J., Anderson, R.A., Graves, D.A. 2001 A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of the American College of Nutrition* 20:327–336.
 17. Karunanayake, E.H., Jeevathayaparan, S., Tennekoon, K.H., 1990. Effect of *Momordica charantia* fruit juice on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 30, 199–204.
 18. Karunanayake, E.H., Welihinda, J., Sirimanne, S.R., Sinnadorai, G., 1984. Oral hypoglycaemic activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *Journal of Ethnopharmacology* 11, 223–231
 19. Kedar, P., Chakrabarti, C.H., 1982. Effects of bittergourd (*Momordica charantia*) seed & glibenclamide in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology* 20, 232–235.
 20. Lelliott, Vidal-Puig, A.J. 2004 Lipotoxicity, an imbalance between

- lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *International Journal of Obesity and related Metabolic Disorders* 28:22–28.
- 21.Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J., De Kimpeb N. 2004 Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 92:1–21.
- 22.Maddux, B.A., See, W., Lawrence Jr., J.C., Goldfine, A.L., Goldfine I.D., Evans, J.L. 2001 Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 50:404–410.
- 23.Masiello, P. 2006 Animal models of type-2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38:873–893.
- 24.Matsuda, H., Li, Y., Murakami, T., Matsumura, N., Yamahara, J., Yoshikawa, M., 1998 Antidiabetic principles of natural medicines. III. Structure-related inhibitory activity and action mode of oleanolic acid glycosides on hypoglycemic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 46, 1399-1403.
- 25.Pari, L., Ramakrishnan, R., Venkateswaran, S., 2001. Antihyperglycaemic effect of Diamed, a herbal formulation, in experimental diabetes in rats. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 53, 1139–1143.
- 26.Raman, A. and Lau, C., 1996. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L.(Cucurbitaceae). *Phytomedicine* 2, pp. 349–362.
- 27.Rathi, S.S., Grover, J.K., Vats, V., 2002. The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Phytotherapy Research* 16, 236–243.
- 28.Rees, D.A., Alcolado, J.C. 2005 Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 22:359–370.
- 29.Rosenson, R.S. 2007 Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology* 99:96–104.
- 30.Sarkar, S., Pranava, M., Marita, R., 1996. Demonstration of the hypoglycemic action of *Momordica charantia* in a validated animal model

- of diabetes. *Pharmacology Research* 33, 1–4.
31. Shibib, B.A., Khan, L.A., Rahman, R., 1993. Activity of *Coccinia indica* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry Journal* 292, 267–270.
 32. Singh, N., Tyagi, S.D., Agarwal, S.C., 1989. Effects of long term feeding of acetone extract of *Momordica charantia* (whole fruit powder) on alloxan diabetic albino rats. *Indian Journal of Physiology Pharmacology* 33, 97–100.
 33. Sitasawad, S.L., Shewade, Y., Bhonde, R., 2000. Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic state in vivo and in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 71–79.
 34. Storling, J., Zaitsev, S.V., Kapelioukh, I.L., Karlsen, A.E., Billestrup, N., Berggren, P.O., Mandrup-Poulsen, T. 2005 Calcium has a permissive role in interleukin-1 β -induced c-jun N-terminal kinase activation in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 146: 3026–3036.
 35. Welihinda, J., Karunanayake, E.H., Sheriff, M.H., Jayasinghe, K.S., 1986. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 17, 277–282.
 36. WHO <http://www.who.int/diabetes/en/>
 37. Yin, J. and Chen, M.D., 2000. Present advance in active constituents of Chinese medicinal herbs for anti-hyperglycemia. *Information on Chinese Traditional Medicine* 6:12–13.
 38. Zhao, Y.F., Keating, D.J., Hernandez, M., Feng, D.D., Zhu, Y., Chen, C. 2005 Long-term inhibition of protein tyrosine kinase impairs electrophysiologic activity and a rapid component of exocytosis in pancreatic β -cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 35: 49–59.

ABSTRACT

Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) is a commonly known vegetable and medicinal herb. Several scientific papers indicated that bitter gourd extracts are used for the treatment of diabetes and its complications, such as nephropathy, cataract and insulin resistance, by regulating the levels of blood glucose. However, the active components of bitter gourd responsible for hypoglycemic activities remained to be identified. In the first-year project, we have demonstrated that the protein extracts of bitter gourd exhibited the hypoglycemic activities by glucose tolerance test in mice. By molecular weight cutting assay, we identified that specific protein components were responsible for the regulation of blood glucose. In the second- year and third-year project, we will compare the effects of various species and parts of bitter gourd on the regulation of blood glucose. The protein components of bitter gourd will be identified by proteomic approach and the hypoglycemic mechanism of protein components will be demonstrated by molecular biology approach. The chemical defined, bioactivity defined, and biosafe bitter gourd health food for the regulation of blood glucose will be further developed. The better understanding of the functional proteins could provide the molecular evidences for the hypoglycemic activity of bitter gourd and further develop as the health food for the improvement of diabetes.

Key words : bitter gourd, hypoglycemic activity, health food, proteomics