

## 한약재의 최종당화산물 생성저해활성 검색

장대식 · 이윤미 · 김영숙 · 김진숙\*

한국한의학연구원 한약제제연구부

### Screening of Korean Traditional Herbal Medicines with Inhibitory Activity on Advanced Glycation End Products (AGEs) Formation

Dae Sik Jang, Yun Mi Lee, Young Sook Kim, and Jin Sook Kim\*

Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** – Advanced glycation end products (AGEs) are largely involved in the pathogenesis of diabetic complications. As part of our ongoing project directed toward the discovery of preventive and/or delay agents for diabetic complications from natural sources, 92 Korean traditional herbal medicines have been investigated with an *in vitro* evaluation system using AGEs inhibitory activity. Of these, 17 herbal medicines exhibited a significant inhibitory activity against AGEs formation. Particularly, 9 herbal medicines, i.e., Cinnamomi Cortex, Artemisiae Argyi Herba, Ammomi Tsao-ko Fructus, Menthae Herba, Amomi Semen, Polygoni Avicularis Herba, Lycopi Herba, Salviae Radix, and Nelumbinis Semen showed more potent inhibitory activity (2-4 fold) than the positive control aminoguanidine.

**Key words** – Advanced glycation end products (AGEs), Diabetic complications, Herbal medicines

당뇨합병증은 당뇨병 환자의 치명적인 사망 원인으로써, 당뇨병 망막증 (Diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장 (D. cataract), 당뇨병 신증 (D. nephropathy) 등으로 나타난다. 이는 실명을 초래하거나, 말기 신부전으로 진행되어 혈액투석, 장기이식 이외에는 별다른 치료 방법이 없다. 만성적인 고혈당은 여러 경로를 통해 최종당화산물 (advanced glycation end products, AGEs)의 생성,<sup>1)</sup> polyol pathway flux의 증가<sup>2)</sup> 및 protein kinase C isoforms의 과발현<sup>3)</sup> 등으로 병태생리학적 조직을 손상시켜, 결국 눈, 신장, 심장 등 인체 곳곳에서 당뇨병증을 유발한다. 특히, 일단 생성이 되면 수명이 다하기까지 존재하여 다양한 대사성 질환을 유발하는 최종당화산물의 축적은 노화와 당뇨 관련 합병증의 발병의 주요한 요인으로 밝혀졌다.<sup>1,4)</sup> 이러한 치명적인 영향은 최종당화산물의 생성억제제인 aminoguanidine을 당뇨동물모델에 투여하였을 때, 당뇨병성 혈관합병증을 완화한다는 보고들에 의해 뒷받침되고 있다.<sup>5,6)</sup> 따라서 glycation cascade 저해제 개발은 당뇨병증의 예방을 위한 접근방법 중의 하나로 볼 수 있다.<sup>1,4)</sup> 하지만, aminoguanidine의 당뇨병성 신경장애 환자 대상의 대규모 임상 III상 실험에서 독성이 드러

나, 보다 안전하고 우수한 효능을 지닌 새로운 합성물질 발굴을 위한 많은 연구들이 진행되고 있다.<sup>7)</sup> 한편 전세계적으로 현대의학의 한계를 보완하기 위하여 대체의학, 전통의학에 대한 관심이 증가하고 있다.<sup>8)</sup> 우리의 전통 의학을 이용하여 효능이 우수하고 안전한 당뇨병증 예방제 또는 치료제 후보 도출을 위한 연구로,<sup>9)</sup> 한방에서 관련 질병에 사용되는 92종의 한약재를 *in vitro*에서 최종당화산물 생성저해 효능을 검색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 한약재 (Table I)는 대전 소재 백제한약상에서 구입하였으며 전문가의 감정을 거친 후 실험재료로 사용하였으며 증거 표본은 한국한의학연구원 한약제제연구부의 표본실에 보관 중이다.

**추출 및 시료조제** - 시료를 분쇄한 후 600 g을 칭량하여 2배 용적의 80% 에탄올을 넣고 실온에서 3일간 3회 추출하였다. 여과한 후 40°C 이하의 수욕상에서 감압농축하고, 다시 동결건조기에서 건조하였다. 추출물은 실험 직전에 감압 하에서 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>를 이용하여 12시간 이상 재 건조한 후 DMSO에 녹여 stock solution을 만들었으며 최종 DMSO의

\*교신저자(E-mail) : jskim@kiom.re.kr  
(FAX) : 042-863-9466

Table I. List of Korean traditional herbal medicines tested

Korean Name	Pharmaceutical Name	Korean Name	Pharmaceutical Name
감국	Chrysanthemi Flos	여정실	Ligustri Fructus
감초	Glycyrrhizae Radix	연자육	Nelumbinis Semen
강활	Ostericum Rhizoma	영지	Ganoderma
간강	Zingiberis Rhizoma	오가피	Acanthopanax Cortex
계내금	Galli Stomachichum Corium	오매	Mume Fructus
계피	Cinnamomi Cortex	와송	Orostachys Herba
고삼	Sophorae Flavescentis Radix	우방자	Arctii Semen
곤포	Laminariae Japonicae Thallus	욱리인	Pruni Nakaii Semen
곽향	Agastachis Herba	원삼	Potentillae Discolor Radix
구기자	Lycii Fructus	육두구	Myristicae Semen
금앵자	Rosae Laevigatae Fructus	육중용	Cistanchis Herba
금은화	Lonicerae Flos	의이인	Coicis Semen
길경	Platycodi Radix	익지인	Alpiniae Cortex
단삼	Salviae Radix	익모초	Leonuri Herba
당귀	Angelicae Sinensis Radix	인삼	Ginseng Radix
당귀신	Angelicae Gigantis Radix	인진호	Artemisiae Capillaris Herba.
대계	Cirsii Herba	적복령	Hoelen Rubra
대황	Rhei Rhizoma	적작약	Paeoniae Rubra Radix
독활	Araliae Continentalis Radix	전호	Angelicae Decursivae Radix
마자인	Cannabis Semen	정력자	Drabae Semen
마황	Ephedrae Herba	죽여	Bambusae Caulis in Taeniam
맥아	Hordei Fructus Germinatus	죽엽	Bambusae Folium
박하	Menthae Herba	진교	Gentianae Macrophyllae Radix
백굴채	Chelidoni Herba	차전자	Plantaginis Semen
백복령	Hoelen	창이자	Xanthii Fructus
백선피	Dictamni Radicis Cortex	창출	Atractylodis Rhizoma
백질려	Tribuli Semen	천초	Zanthoxyli Pericarpium
백출	Atractylodis Rhizoma Alba	천화분	Trichosanthis Radix
백화사설초	Hedyotidis Diffusae Herba	청상자	Celosiae Semen
복분자	Rubi Fructus	초과	Ammomi Tsao-ko Fructus
빈랑	Arecae Semen	초오	Aconiti Tuber
사인	Amomi Semen	측백엽	Thujae Orientalis Folium
산사육	Crataegi Fructus	치자	Gardeniae Fructus
산약	Dioscoreae Rhizoma	택란	Lycopi Herba
산조인	Zizyphi Spinosi Semen	과두	Tinglizi Semen
상기생	Visci Herba et Loranthis Ramulus	편측	Polygoni Avicularis Herba
상백피	Mori Cortex Radicis	포황	Typahe Pollen
상엽	Mori Folium	하수오	Polygoni Multiflori Radix
상지	Mori Ramulus	해동피	Kalopanax Cortex
석고	Gypsum Fibrosum	현삼	Scrophulariae Radix
석곡	Dendrobii Herba	형개	Nepetae Spica
석창포	Acori Gramineri Rhizoma	홍화	Carthami Flos
소엽	Perillae Herba	황금	Scutellariae Radix
신곡	Massa Medicata Fermentata	황기	Astragali Radix
애엽	Artemisiae Argyi Herba	황정	Polygonati Sibiricum Rhizoma
오미자	Schizandrae Fructus	흑두	Glycine Semen Nigra

**Table II.** Inhibitory activity of 80% EtOH extracts of the Korean traditional herbal medicines on AGEs formation *in vitro*

Pharmaceutical Name (Korean Name)	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Cinnamomi Cortex (계피)	5	17.7 $\pm$ 4.2	16.1
	10	28.6 $\pm$ 1.0	
	25	78.0 $\pm$ 0.3	
Artemisiae Argyi Folium (애엽)	10	10.1 $\pm$ 1.6	29.3
	25	44.7 $\pm$ 0.8	
	50	89.3 $\pm$ 1.6	
Ammomi Tsao-ko Fructus (초과)	10	15.7 $\pm$ 3.4	31.4
	25	42.7 $\pm$ 3.4	
	50	77.5 $\pm$ 2.0	
Menthae Herba (박하)	10	10.0 $\pm$ 0.5	32.0
	25	34.6 $\pm$ 1.0	
	50	84.8 $\pm$ 0.7	
Amomi Semen (사인)	5	9.6 $\pm$ 3.5	32.4
	10	36.5 $\pm$ 1.3	
	25	81.9 $\pm$ 0.9	
Polygoni Avicularis Herba (편축)	5	6.6 $\pm$ 3.5	33.1
	10	38.5 $\pm$ 3.2	
	25	79.0 $\pm$ 0.3	
Lycopi Herba (택란)	10	8.7 $\pm$ 1.6	34.0
	25	34.0 $\pm$ 0.9	
	50	77.8 $\pm$ 1.0	
Salviae Radix (단삼)	10	10.0 $\pm$ 2.9	34.9
	25	33.9 $\pm$ 2.9	
	50	74.3 $\pm$ 1.2	
Nelumbinis Semen (연자육)	10	10.0 $\pm$ 2.8	41.2
	25	16.7 $\pm$ 2.6	
	50	66.5 $\pm$ 1.7	
Orostachys Herba (와송)	25	19.4 $\pm$ 1.6	70.4
	50	43.2 $\pm$ 2.3	
	100	65.9 $\pm$ 1.0	
Acanthopanax Cortex (오가피)	25	15.9 $\pm$ 1.1	70.9
	50	43.2 $\pm$ 1.5	
	100	66.5 $\pm$ 0.4	
Crataegi Fructus (산사육)	25	10.9 $\pm$ 4.8	74.6
	50	29.2 $\pm$ 7.6	
	100	70.8 $\pm$ 2.1	
Bambusae Folium (죽엽)	25	20.5 $\pm$ 2.1	79.1
	50	37.0 $\pm$ 1.9	
	100	60.2 $\pm$ 1.0	
Angelicae Gigantis Radix (당귀신)	10	13.0 $\pm$ 3.2	81.0
	50	27.0 $\pm$ 4.0	
	100	63.1 $\pm$ 2.8	
Chrysanthemi Indici Flos (감국)	25	3.3 $\pm$ 0.7	93.6
	50	11.3 $\pm$ 1.2	
	100	56.9 $\pm$ 1.7	
Angelicae Sinensis Radix (당귀)	25	9.2 $\pm$ 1.0	97.5
	50	23.8 $\pm$ 3.9	
	100	51.3 $\pm$ 5.7	
Plantaginis Semen (차전자)	25	-3.03 $\pm$ 0.38	99.1
	50	11.9 $\pm$ 2.7	
	100	51.4 $\pm$ 2.4	
Aminoguanidine (positive control)	37	27.4 $\pm$ 1.5	71.1
	55.5	40.0 $\pm$ 0.9	
	74	51.8 $\pm$ 1.9	

Inhibitory effect was expressed as mean $\pm$ S.D. of quadruplicate experiments. IC<sub>50</sub> values were calculated from the dose inhibition curve.

농도가 0.1% 이하가 되도록 15% TWEEN 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 희석하여 사용하였다. 추출에 사용한 에탄올은 증류한 후 사용하였으며 그 외 시약은 1급 및 특급시약을 구입하여 사용하였다.

*In vitro*에서 최종당화산물 생성저해 실험 - Vinson과 Howard<sup>10)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉 10 mg/ml의 우혈청 알부민 (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹이고, 0.2 M의 fructose와 glucose를 넣었다. 또한 0.02% sodium azide를 넣어 반응 기간 동안 박테리아 생성을 방지하였다. 이 혼합물에 시험 시료 또는 *in vitro* 표준 최종당화산물 생성억제제인 aminoguanidine을 넣은 후 37°C에서 14일 동안 반응 시켰다. 배양 후 spectrofluorometric detector (Bio-TEK, Synergy HT, USA)를 이용하여 형광도를 측정하였다 (Ex: 350, Em: 450 nm).

## 결과 및 고찰

당뇨합병증은 혈당이 정상적으로 회복되었음에도 불구하고 발병하는 경우가 많다. 이는 고혈당과 단백질의 반응이 비가역적으로 진행되어 최종당화산물 (Advanced Glycation Endproducts: AGEs)이 생성되어 혈중이나 조직의 다른 단백질과 교차 결합하여 여러 가지 합병증을 유발시킨다. 포도당과 여러 종류의 단백질과의 반응에 의하여 생성된 최종당화산물 중의 하나인 당화알부민은 만성 신증을 일으키는 중요한 원인으로 알려졌다. 이와 같이 비효소적 단백질 당화반응에 의하여 기저막, 혈장알부민, 수정체 단백질, 피브린, 콜라겐 등의 단백질에서 당화가 일어나 조직의 기능 및 구조를 비정상적으로 변화시켜 당뇨병 망막증 등 여러 가지 당뇨병성 합병증을 유발시킨다.

동물실험을 위한 후보한약재를 선별하기 위하여, 한방에서 당뇨 및 당뇨합병증에 복용되는 한약재 중 92종을 선정하여 *in vitro*에서 최종당화산물 생성 저해효능을 검색하였다 (Table II). Terasawa 그룹의 경우<sup>8,11)</sup> aminoguanidine의 IC<sub>50</sub>값을 기준으로 효능 정도를 결정하였는데, 이를 참고로 aminoguanidine의 IC<sub>50</sub>값보다 낮은 농도를 지닌 한약재는 우수 (strong)하다고 판정하고, aminoguanidine 수준인 경우는 보통 (moderate)이라고 하였다. 즉 계피 (16.1 µg/ml), 애엽 (29.3 µg/ml), 초과 (31.4 µg/ml), 박하 (32.0 µg/ml), 사인 (32.4 µg/ml), 편축 (33.1 µg/ml), 택란 (34.0 µg/ml), 단삼 (34.9 µg/ml), 연자육 (41.2 µg/ml) 등 9종의 한약재 추출물의 IC<sub>50</sub>값은 aminoguanidine (71.1 µg/ml)보다 낮은 우수한 효능을 나타내었다. 애엽,<sup>12)</sup> 초과,<sup>13)</sup> 박하,<sup>14)</sup> 사인<sup>15)</sup>의 주성분은 essential oil이며, 애엽,<sup>12)</sup> 단삼,<sup>16)</sup> 연자육<sup>17)</sup>의 주성분은 terpenoid이고, 계피,<sup>18)</sup> 편축<sup>19)</sup>은 flavonoid 계통이 주성분이다. 지금까지 보고된 단일화합물의 경우, 최종당화산물 생

성 저해물질의 대부분이 flavonoid계 화합물이며 이들의 저해효능은 IC<sub>50</sub>값은 90에서 200 µM정도이다.<sup>20,21)</sup>

본 실험결과는 flavonoid계 뿐만 아니라 다른 이차대사산물도 최종당화산물 생성 억제에 관여함을 의미한다. 또한 위의 한약재들은 여러 물질들의 복합체이지만 단일 화합물보다 효능이 우수함을 알 수 있다.

이외에도 와송, 오가피, 산사육, 죽엽 등의 IC<sub>50</sub>값은 70.4, 70.9, 74.6, 79.1 µg/ml로 aminoguanidine (71.1 µg/ml) 수준으로 나타났다. 한편, 복합처방이나 단일 한약재를 대상으로 한 최근 다른 연구팀의 결과들과<sup>8,11)</sup> 본 실험결과를 고찰해 보면, 몇몇 단일/복합한약재의 추출물 자체가 *in vitro*에서 aminoguanidine보다 그 효능이 우수할 뿐만 아니라, 당뇨병 동물모델에서도 효능이 입증되어, 이들 단일/복합한약재가 당뇨병증 치료제의 직접적인 원료로 사용될 수 있음을 보여준다. 또한 본 연구의 결과는 앞으로 우수한 최종당화산물 생성억제효능을 가지는 새로운 선도화합물의 발굴을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 당뇨병증이나 이와 관련된 여러 질병들의 치료를 위한 한약제제나 생약제제의 개발에 이용될 수 있을 것이다.

## 결 론

한방에서 당뇨 및 당뇨합병증에 사용되고 있는 92종의 한약재 중에서 17종의 80% EtOH 추출물이 *in vitro*에서 최종당화산물 생성 저해에 대해 우수한 효능을 보였다. 그 중에서 특히 계피, 애엽, 초과, 박하, 사인, 편축, 택란, 단삼, 연자육 등 9종의 한약재는 양성대조군인 aminoguanidine보다 2-4배 우수한 효능을 나타내었다.

## 사 사

본 연구는 과학기술부 특정연구개발과제 (M 10413010001)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Sakurai, T. and Tsuchiya, S. (1988) Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett.* **236**: 406-410.
2. Shinohara, R., Mano, T., Nagasaka, A., Sawai, Y., Uchimura, K., Hayashi, R., Hayakawa, N., Nagata, M., Makino, M., Kakizawa, H., Itoh, Y., Nakai, A. and Itoh, M. (1998) Effects of thyroid hormone on the sorbitol pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**: 577-586.
3. Larkins, R.G. and Dunlop, M.E. (1992) The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia* **35**:

- 499-504.
4. Forbes, J.M., Cooper, M.E., Oldfield, M.D. and Thomas, M.C. (2003) Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: S254-S258.
  5. Bierhaus, A., Hofmann M.A., Ziegler, R. and Nawroth, P. (1998) AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetic mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* **37**: 586-600.
  6. Brownlee, M. (1996) Advanced glycation endproducts in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol Diabetes* **3**: 291-297.
  7. Rahbar, S. and Figarola, J.L. (2003) Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**: 63-79.
  8. Yokozawa, T., Nakagawa, T. and Terasawa, K. (2001) Effects of Oriental medicines on the production of advanced glycation endproducts. *J. Trad. Med.* **18**: 107-112.
  9. Kim, J.S., Kim, H. and Ko, J.H. (2002) Studies on the processing of herbal medicines (III)-HPLC analysis of magnolol and inhibitory effects on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) *in vitro* of unprocessed and processed Magnolia Bark. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 308-311.
  10. Vinson, J.A. and Howard III, T.B. (1996) Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.* **7**: 659-663.
  11. Nakagawa, T., Yokozawa, T. and Terasawa, K. (2001) A study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J. Trad. Med.* **18**: 161-168.
  12. 김호철 (2001) 한약약리학, 309. 집문당, 서울.
  13. 생약학연구회 (1995) 현대생약학, 218. 학창사, 서울.
  14. 생약학연구회 (1995) 현대생약학, 137. 학창사, 서울.
  15. 생약학연구회 (1995) 현대생약학, 144. 학창사, 서울.
  16. 김호철 (2001) 한약약리학, 332. 집문당, 서울.
  17. 김호철 (2001) 한약약리학, 297. 집문당, 서울.
  18. 생약학연구회 (1995) 현대생약학, 154. 학창사, 서울.
  19. 김호철 (2001) 한약약리학, 234. 집문당, 서울.
  20. Matsuda, H., Wang, T., Managi, H. and Yoshikawa, M. (2003) Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.* **11**: 5317-5323.
  21. Jung, Y.S., Joe, B.Y., Cho, S.J. and Konishi, Y. (2005) 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinones and 2-methyl-1,4-naphthoquinones: Glycation inhibitors with lipid peroxidation activity. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 1125-1129.

(2006년 2월 9일 접수)