

生地黃飮子 추출물이 단핵세포에서 당화종말산물로 유도된 염증반응에 미치는 효과

이광규 · 한 응 · 정한솔*

우석대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of *Saengjihwangeum-ja* Extracts on the Expression of Inflammation Response in Human Monocyte Cells Induced by Advanced Glycation End Product

Kwang Gyu Lee, Ung Han, Han Sol Jeong*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University

Saengjihwangeum-ja (SJHEJ) was recorded in DongEuiBoGam as being able to be used for treatment of Sogal whose concept had been applied to Diabetes Mellitus (DM). Modification of proteins by long term circulation of glucose leads to the formation of advanced glycation end product(AGE). Recent immunological studies demonstrated that ligation of AGE play an important role in the development of diabetic complications including atherosclerosis, which includes activation, adhesion, and migration of monocytes. Also, AGE and Maillard reaction product(MRP) could augment monocyte inflammatory responses via ligation of AGE receptor. In this study, the effects of SJHEJ extracts on the expression of inflammatory response-related genes such as tumor necrosis factor- α , monocyte chemoattractant protein-1, interferon-g-inducible protein-10, and cyclooxygenase-2 in the human monocyte cell line, THP-1 cells. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction revealed that SJHEJ had inhibitory effects on the expression of the TNF- α , MCP-1, IP-10, COX2, IL-1 β genes in MRP-induced THP-1 cells. Treatment with SJHEJ had reduced reactive oxygen production in THP-1 cells stimulated by MRP. These inhibitory effects might be exerted via prevention of oxidative stress in activated monocytes. In addition, radical scavenging activity of SJHEJ was increased. These results suggest that SJHEJ has a beneficial effects for improve diabetic vascular complication.

Key words : AGE, maillard reaction product

서 론

21세기에 들어서면서 산업화, 서구화됨에 따라 식습관을 포함한 생활습관의 변화로 인해 우리 사회는 전염성질환의 시대를 지나 만성 비감염성 질환의 시대를 맞고 있다. 만성 비감염성 질환 중 당뇨병은 국내에서 그 유병률이 크게 급격하게 증가하고 있는데, 대한당뇨병학회와 건강보험심사평가원의 공동연구협약에 따라 운영 중인 당뇨병기초통계TFT는 2005년 전국표본조사를 실시하여, 2003년 시점의 전국 20~79세 성인을 대상으로 당뇨병

환자규모와 관리현황을 파악한 결과 20~79세 당뇨병환인 유병 환자는 약 330만명으로 추정하였고, 당뇨병환인 최초진단 환자는 총 262,735명(전 국민의 0.755%)로 추정하였으며, 매년 전체 환자의 10%에 달하는 신규환자가 추가로 발생하고 있는 것으로 보고하였다¹⁾.

지속된 고혈당의 상태에서 단백질의 비효소적 당화과정으로 인해 생성되는 당과 단백질의 복합체인 Advanced glycation end product(AGE)는 당뇨의 합병증을 일으키는데 주요한 원인 인자로 알려져 있다²⁾. 고혈당으로 인해 생성된 AGE는 혈관벽이나 내피세포 및 단핵세포 등의 수용체와 결합하여 죽상경화증의 형성에 기여하는 것으로 생각된다³⁾. 당뇨의 합병증을 막기 위하여 합병증을 야기하는 원인, 예방 및 치료방법에 대한 많은 연구가 진

* 교신저자 : 정한솔, 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교 한의과대학

· E-mail : jhsol33@paran.com, · Tel : 063-290-1539

· 접수 : 2009/11/18 · 수정 : 2009/11/30 · 채택 : 2009/12/08

행되어 왔다^{4,5)}.

糖尿病의 病症은 韓醫學의 여러 病症에서 찾아 볼 수 있으니 消渴, 皮膚癢痛, 燥, 痿, 眼昏, 風痺, 二陽病 등의 範疇로 사료되며⁶⁾, 가장 유사한 病症은 消渴이다. 消渴은 證候와 病名을 모두 의미하는 것으로 서양의학의 病名으로는 당뇨병, 요붕증, 갑상선기능항진증과 관련되어 있다고 보고되었다⁷⁾.

消渴의 原因은 대부분이 熱邪나 濕熱이 內盛하거나, 肝火가 鬱結되었거나, 腎水의 耗損으로 인한 陰虛燥熱 등이며, 消穀善飢渴而多飲하는 病證을 보인다⁸⁾. 消渴의 명칭에 대해 《黃帝內經》에서는 “消渴”, “鬲消”, “風消”, “消中”, “熱中”, “脾癰” 등으로 명명하고 있으며⁹⁾, 《諸病源候論》¹⁰⁾ 《千金方》¹¹⁾에도 消渴이라는 용어가 보이고 消渴病에 대해서 구체적으로 서술하고 있다. 消渴이란 消穀善飢渴而多飲하는 病證이다. 특히 《諸病源候論·消渴候》에서는 “夫消渴者 渴不止 小便多是也…其病變多發癰疽 有病口甘者 五氣之溢也 名曰脾癰 故其氣上溢爲消渴”¹⁰⁾이라 하여 渴症이 있으면서 소변량이 많은 병으로 병의 진행과정 중에 癰疽가 발생할 수 있다고 하여 消渴의 병변과정 중 轉變證에 대하여 중요하게 기술해 놓았으며, 《千金方》에서는 “消渴을 앓는 사람의 예후는 큰 癰疽가 어디에 생겨나는지 살펴야 하는데, 큰 골절사이 癰疽가 발생하면 사망하므로 癰疽가 생기는 것을 경계해야 한다”¹¹⁾고 하여 오늘날 당뇨의 합병증과 매우 유사하게 묘사해 놓았다. 明代의 외과서적인 《外科正宗》에는 脫疽 章 가운데 “消渴脫疽”에 대한 변증논치를 자세히 기술해 놓았는데 문장 중에 지적한 脫疽는 현대의학적으로 고혈당으로 인한 혈관과피의 병리기전과 유사하며 결국 폐쇄성 동맥경화증으로 본다는 보고도 있었다¹²⁾. 그밖에 《東垣十種醫書》¹³⁾ 《醫方類聚》¹⁴⁾ 《聖濟總錄》¹⁵⁾ 《傷寒三十六書》¹⁶⁾등에서 오늘날 당뇨합병증과 매우 유사하게 묘사해 놓았다.

生地黃飮子는 《世醫得效方》¹⁷⁾에 최초로 수록된 처방으로 《東醫寶鑑》에서는 “二黃元에 甘露飮 약재를 합한 것으로 精氣를 生하게 하고 血을 補하며 마른 것을 적셔주고 갈증을 멎게 하며, 心火를 아래로 내려가게 하여 小便을 맑게 하며, 肺經이 윤택해지면 大腸이 잘 통하여 물려 있던 熱이 없어지고 갈증이 저절로 멎게 되는 데 그 조화가 정미롭고 심오하여 이보다 더 묘한 것은 없다”¹⁸⁾고 기재되어 있다.

본 연구에서는 消渴에 대응하는 生地黃飮子를 가지고 오랜 고혈당으로 유도된 AGE에 의한 염증반응을 어떻게 조절하는지 살펴보고자 우선 인위적 AGE산물인 maillard reaction product(MRP)를 단핵세포주인 THP-1 세포에 처리하여 염증반응을 유도시켜 양성대조군을 만든 후 生地黃飮子 물 추출물을 함께 처리한 실험군에서 양성 대조군에 비해 어느 정도의 염증억제 효과가 있는지 여러 가지 염증매개 화학물질들의 mRNA의 발현과 세포 내 활성산소의 소거능력에 어떤 영향을 미치는지 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Human monocyte cell line인 THP-1 세포주(KCNB40202)는 한국 세포주은행으로부터 분양받았다. 세포배양에 사용된 RPMI1640 medium과 fetal bovine serum(FBS), penicillin 및 streptomycin은 Gibco BRL(Grand Island, NY)제품을 사용하였다. 실험에 사용한 THP-1 세포주는 10 % FBS, 100 unit/mL의 penicillin 및 streptomycin을 포함하는 배지에 분주하여 포화상태 공기조건에서 배양하였다. 배양 후 수거한 세포를 trypan blue로 염색하고 세포계수기(Hematocytometry, German)를 이용하여 세포(viable cell)를 계수하여¹⁹⁾ 세포밀도 2×10⁶ cell/mL 이 되게 하여 6 well plate 에 배양하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), ampicillin, streptomycin 등은 Gibco BRL(GRAND Island, NY, USA) 을 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 시약 및 phosphate buffered saline(PBS), trypan blue는 Sigma(St. Louis, MO, USA), trypan blue, disodium TEMED, Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo(dT), PCR marker(Promega), dNTP set(Amersham Pharmacia), prestained SDS-PAGE standard, sodium dodecyl sulfate(Bio-Rad)를 사용하였다. 기타 시약은 특급시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다. 사용기구로는 culture flask, 96 well microplate(Nunc), micrometer(Mitutoyo), inverted microscope(Zeiss), ELISA reader(VERSAmax, Molecular Devices, USA), centrifuge (VS-15000CF), CO₂ incubator(Shellab, USA), freeze dryer 등(Vision Scientific Co)을 사용하였다.

3. 한약재 추출

본 실험에 사용한 生地黃飮子의 구성은 《東醫寶鑑》¹⁸⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방 2貼분량(84 g)을 증류수 360 mL로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 8 g(회수율 9.5%)을 얻어(이하 SJHEJ로 칭함) PBS에 용해시켜 사용하였다. 처방구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Contents of Saengjihwangeum-ja(SJHEJ)

Herbal	weight(g)
<i>Ginseng Radix</i>	4
<i>Rehmanniae Radix</i>	4
<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4
<i>Astragali Radix</i>	4
<i>Asparagi Radix</i>	4
<i>Liriope Tuber</i>	4
<i>Aurantii Fructus</i>	4
<i>Dendrobii Herba</i>	4
<i>Eriobotryae Folium</i>	4
<i>Alismatis Rhizoma</i>	4
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
Total weight	42

4. 세포독성반응 측정

Mitochondrial dehydrogenase activity를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 실험에 사용한 SJHEJ가 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann이 보고한 방법에 따라 측정하였다²⁰. THP-1세포를 96 well plate에 well 당 1×10^5 cells 밀도로 분주한 후 SJHEJ를 다양한 농도별(0, 2.5, 5, 10 mg/mL)로 처리하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT(1 mg/mL)용액 50 µL/mL를 각 well에 넣고 3시간 배양하였다. 그런 다음 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 200 µL/well씩 넣어 MTT-formazan을 용해하여 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다.

5. Advanced glycation end products(AGE)

비효소적 당화종말산물인 Advanced glycation end product(AGE)은 당과 아미노산 및 지질반응의 부산물로 혈관 내에 침착되어 고지혈증 및 심혈관 질환 등의 당뇨합병증과 관련된 염증반응유도물질이다. 일반적으로 단당류와 단백질은 가열시 비효소적 갈변반응이 야기되어지며 이를 일컬어 maillard reaction product(MRP)라 명한다. 본 실험에서는 탄수화물 중 5탄당인 D-Ribose와 아미노산 반응물질로는 L-Lysine을 이용하여 당화종말산물의 반응을 유도하여 사용하였다. MRPs는 D-Ribose와 L-Lysine를 농도로 500 mM이 되도록 하여 121°C에서 10시간 가열 반응시켜 생성되어진 최종산물로 진한 갈색을 띠는 갈변성상으로 반응종결을 확인할 수 있었으며, 이를 사용 전에 pH 8.0으로 맞추어 0.45 µm membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다. AGE 반응물은 MRP로 시간별, 농도별로 처리하여 염증이 유도되어지는 최적처리조건을 선정하여 실험에 사용하였다.

6. RT-PCR

THP-1 세포주는 MRP로 자극한 세포주와 및 SJHEJ처리 세포주들을 pasteur pipet을 이용하여 무균적으로 모아 원심분리하여 상층액을 버리고 세포를 수집하였다. Total RNA추출은 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. cDNA는 AMV reverse transcriptase와 oligo(dT)를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 94°C에서 30 초간 denaturation 시킨 후, primer에 따라 52~56°C에서 30 초간 annealing 시키고, 72°C에서 45 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다²¹. PCR에 사용된 primer는 Table 2와 같다.

7. 세포내 ROS 생성 측정

세포 내 ROS는 형광 표지자인 DCFH-DA를 사용하여 측정하였다. DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어

세포 안의 에스테라아제에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해되고, 이 후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. 우선 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 PBSG(1 g Glucose/ 1L PBS)에 부유시켜 96-well plate에 분주하였다. SJHEJ를 농도별로 처리(1, 2.5, 5, 10 mg/ml)한 후 30분간 incubation하였고, MRP와 DCFH-DA를 각각 10 mM, 125 mM의 농도로 처리하였다. DCF 형광도는 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter(Perkin-Elmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였고 excitation 파장을 485 nm, emission 파장을 530 nm로 하였다.

Table 2. Sequence of primer used for RT-PCR.

Target gene	PCR primer sequence	PCR product (bp)
TNF-α	sense 5'-CCAAACGATGTTGTACCCGA-3'	699
	antisense 5'-CAGTTGGAGGAGACCGTA-3'	
IL-1β	sense 5'-CTCTCTCACCTCTCTACTCAC-3'	807
	antisense 5'-ACACTGCTACTTCTTGCCCC-3'	
MCP-1	sense 5'-CAAAGCTGAGCTCGCACTC-3'	239
	antisense 5'-CATTTCCACAATAATATTTAG-3'	
IP-10	sense 5'-TGAAAAGAAGGGTGAAGAG-3'	413
	antisense 5'-GGAAGATGGGAAAGGTGAGG-3'	
COX-2	sense 5'-ATCTACCTCTCTCAAGCTCC-3'	708
	antisense 5'-TACCAGAAGGGCAGGATACA-3'	

8. 항산화 활성 검색

SJHEJ의 항산화 활성은 Blois의 방법²²을 변형하여 DPPH 라디칼 소거능으로 측정하였다. 유리 라디칼인 α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)라디칼이 감소하는 정도로 간접적으로 시료의 항산화활성을 측정하였다. 에탄올 3 mL에 DPPH 800 µL(0.4 mM /EtOH)를 첨가한 후 SJHEJ를 농도별로 200 µL처리하여 vortex하고 10 분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼소거능을 검정하였다. 흡광도가 0.95~0.99가 되도록 DPPH용액 800 µL에 에탄올 3~4 mL을 첨가하였다. 이 에탄올에 SJHEJ 200 µL과 DPPH용액 800 µL을 섞어 10 초 동안 진탕 교반하고 10분 빛을 차단하여 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다.

$$DPPH \text{ 라디칼 소거능} = [1 - \text{시료흡광도} / \text{대조구 흡광도}] \times 100(\%)$$

9. 통계처리

실험 자료들은 SPSS 프로그램(v. 9.0)을 이용하여 통계처리하였다. 3회 반복한 실험결과와 평균과 표준오차로 표시하고, 분산분석으로 유의성을 검정하며, a=0.05 수준에서 ANOVA를 실시하여 분석하였다.

결 과

1. 세포 생존율에 미치는 효과

세포 배양계를 통한 실험에서 SJHEJ를 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도로 24시간 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과 미처리군과 비교하였을 때 각각의 SJHEJ 처

리군에서 특별한 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

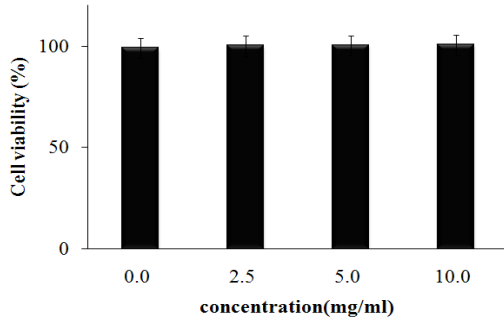


Fig. 1. Treatment with Saengjihwangeum-ja(SJHEJ) resulted in no significant effect of viability on THP-1 human monocyte cells. Cells were treated with 2.5-10 mg/mL SJHEJ for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay.

2. MRP로 유도된 THP-1 세포의 TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향

MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 10 mg/mL의 SJHEJ를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 TNF-α mRNA의 발현이 10 mg/mL의 SJHEJ처리군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

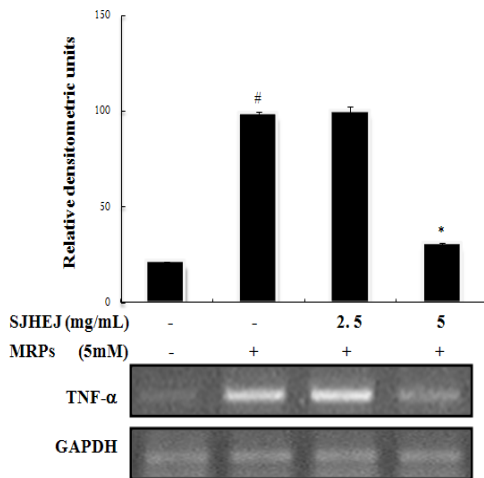


Fig. 2. Effects of Saengjihwangeum-ja (SJHEJ) on the expression of pro-inflammatory TNF-α mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction product. Cells were cocultured with the indicated SJHEJ (2.5, 5 mg/mL) and Maillard reaction product (5 mM) for 2 h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products.

3. MRP로 유도된 THP-1 세포의 IL-1β mRNA 발현에 미치는 영향

MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5 mg/mL의 SJHEJ를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 IL-1β mRNA의 발현이 5 mg/mL의 SJHEJ처리군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

4. MRP로 유도된 THP-1 세포의 MCP-1 mRNA 발현에 미치는

영향

MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5 mg/mL의 SJHEJ를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 MCP-1 mRNA의 발현이 5 mg/mL의 SJHEJ처리군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

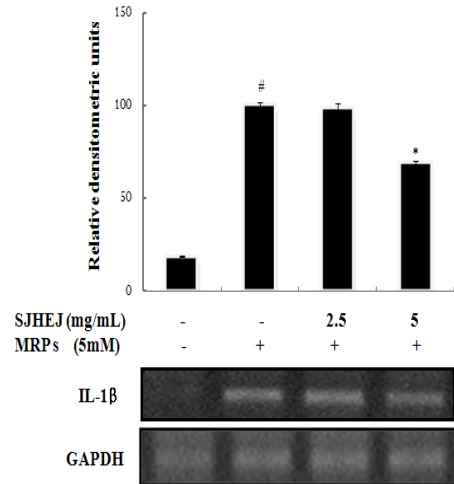


Fig. 3. Effects of Saengjihwangeum-ja (SJHEJ) on the expression of pro-inflammatory IL-1β mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction products. Cells were cocultured with the indicated SJHEJ (2.5, 5 mg/mL) and Maillard reaction product (5 mM) for 2 h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products.

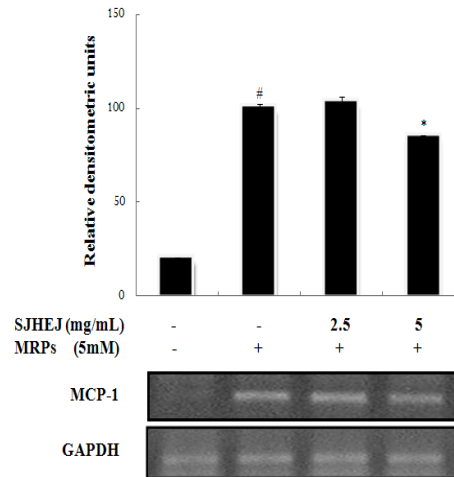


Fig. 4. Effects of Saengjihwangeum-ja(SJHEJ) on the expression of pro-inflammatory MCP-1 mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction product. Cells were cocultured with the indicated SJHEJ (2.5, 5 mg/mL) and Maillard reaction product (5 mM) for 2 h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products.

5. MRP로 유도된 THP-1 세포의 IP-10 mRNA 발현에 미치는 영향

MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5 mg/mL의 SJHEJ를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 IP-10 mRNA의 발현이 5 mg/mL의 SJHEJ 처리군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

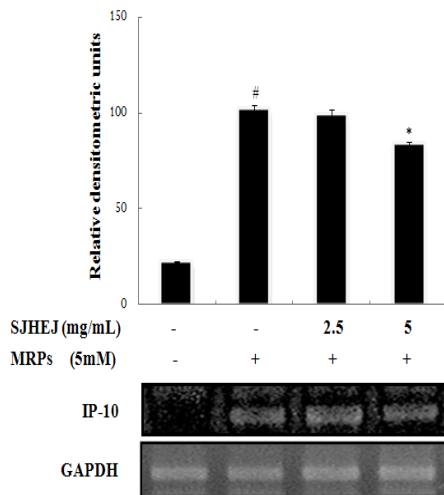


Fig. 5. Effects of Saengjihwangeum-ja(SJHEJ) on the expression of pro-inflammatory IP-10 mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction product. Cells were cocultured with the indicated SJHEJ (2.5, 5 mg/mL) and Maillard reaction products (5 mM) for 2 h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products.

6. MRP로 유도된 THP-1 세포의 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5 mg/mL의 SJHEJ를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 모든 SJHEJ 처리군에서 염증성 cytokine인 COX-2 mRNA의 발현이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

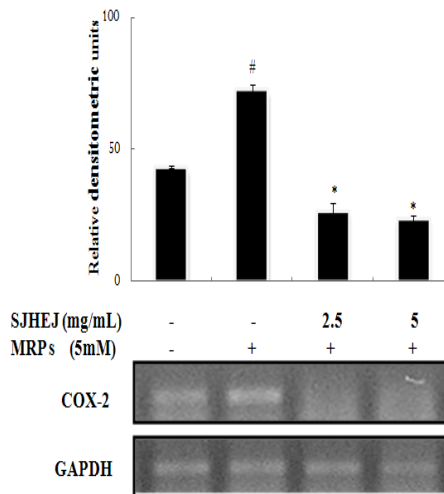


Fig. 6. Effects of Saengjihwangeum-ja(SJHEJ) on the expression of pro-inflammatory COX-2 mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction product. Cells were cocultured with the indicated SJHEJ (2.5, 5 mg/mL) and Maillard reaction product (5mM) for 2 h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products.

7. MRP로 유도된 THP-1 세포의 ROS 형성에 미치는 영향

MRP를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 SJHEJ를 15분 처리 한 후 세포내 ROS의 형성을 살펴보았다. 그 결과 모든 처리군에서 세포내 ROS의 발현의 유의성 있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

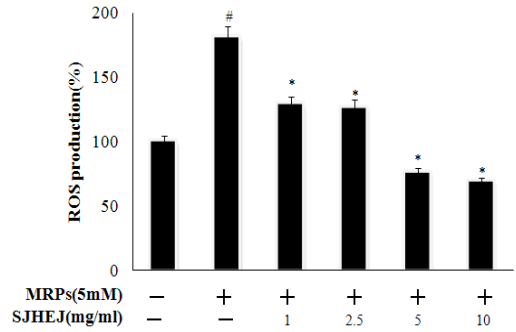


Fig. 7. Effects of Saengjihwangeum-ja(SJHEJ) on intercellular ROS generation. Treatment with MRP in THP-1 cells after 15 min induced an increase of ROS indicated by DCF fluorescence. The fluorescence intensities in normal glucose treatment cells are expressed as 100%. However, a significant reduction of ROS was observed after the treatment with SJHEJ at a concentration of 1, 2.5, 5, 10 mg/mL(p<0.01).

8. 라디칼 소거능 측정

SJHEJ의 항산화 활성에 대해 알아보하고자 DPPH radical 방법에 준하여 시험관내에서 라디칼 소거능을 측정하였다. SJHEJ를 5, 10, 25, 50 mg/mL 농도로 처리하여 DPPH 라디칼의 강한 자색이 소실되는 정도로 라디칼의 소거능을 확인 할 수 있었다(Fig. 8). 10 mg/mL 농도의 처리군에서 57 %의 라디칼 소거능을 보였고, 50 mg/mL 농도에서는 89 %의 라디칼 소거능을 보였으며, 처리농도가 증가함에 따라 항산화 활성도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

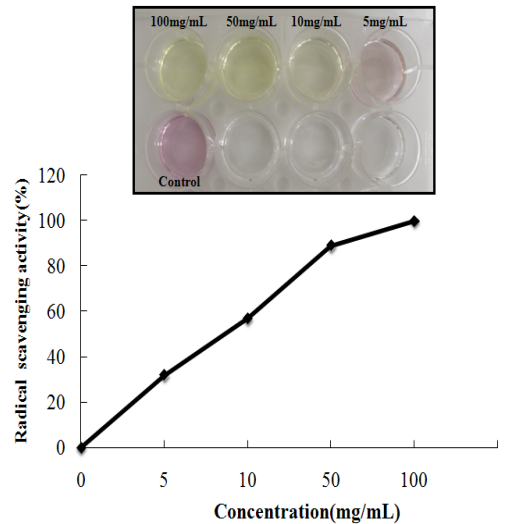


Fig. 8. Antioxidant effect of Saengjihwangeum-ja(SJHEJ) by DPPH radical scavenging assay. DPPH radical was significantly erased by treatment of SJHEJ in a dose dependant manner. This experiment has been repeated three times with similar observations.

고 찰

2003년 IDF(international Diabetes Federation) 보고에 의하면 전 세계 당뇨병 환자의 수는 거의 2억명에 가까운 것으로 추산하고 있다²³⁾. 또한 당뇨병 기초통계연구 TFT 심포지움에서 2005-2006년 당뇨병 기초통계연구 TFT 중간 보고에 의하면 우

리나라 20세 이상의 인구에서 당뇨병의 유병률을 남자는 8.73%, 여자는 8.42%, 남자는 1,522,407명, 여자는 1,510,859명으로 추정하였다¹⁾.

당뇨병은 혈액 내에 고혈당과 만성적 염증상태에서 더욱 악화되는 질환으로 적절히 조절되지 않을 경우 심각한 부작용을 야기시킨다. 당뇨병합병증의 주요한 원인으로 고혈당, 고지혈증^{24,25)} 및 동맥경화 및 염증성 질환, 산화와 관련되어지는 당화종말산물의 축적으로 더욱 심화되는 것으로 알려져 있다^{26,27)}.

당뇨는 고혈당을 특징으로 하는 대사이상 질환으로 혈당을 내리는 인슐린의 분비나 작용에 문제가 생겨 발생한다. 당뇨의 합병증으로는 대혈관성 합병증과 소혈관성 합병증이 있는데 대혈관합병증은 동맥경화를 유발하여 심근경색, 뇌중풍 및 하지의 괴사를 초래하고 소혈관성합병증은 망막이나 콩팥, 말초신경에 영향을 미쳐 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신병증, 당뇨병성 신경병증을 일으킨다. 당뇨병은 대혈관질환의 빈도를 정상인보다 2~4배 증가시킨다는 보고가 있으며²⁸⁾, 당뇨병 환자의 반수 이상은 결국 급성 혹은 만성 관상동맥질환의 합병증으로 사망한다²⁹⁾는 보고가 있다.

“Glycation” 또는 “Maillard reaction”으로 알려진 과정은 환원당에 의한 단백질의 비효적 변성반응에 의해 다양한 병리적 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다^{30,31)}. Maillard reaction은 식품에서 당과 단백질 결합에 열을 가하게 되면 갈색을 띄게 되며 또한 맛있는 풍미를 가지게 되어 다양한 식품산업에서 품질관리에 활용되어져왔다. 그러다가 40 여년 전부터 이러한 Maillard reaction과 유사한 Glycation과정이 생체 내에서 유발되어지는 것으로 알려졌으며 특히 당뇨환자에게 있어 혈중 헤모글로빈의 Glycation형성이 증가되고 이러한 당의 반응산물을 AGEs(advanced glycation end products, AGEs)로 명하고 이에 대한 연구를 보고하였다^{32,33)}. 초기단계의 Glycation으로부터 더욱 진행되어진 변성은 생체 내에서 비가역적인 교차반응을 일으키며 그 후로 지속적으로 진행되어 반응산물의 축적이 증가된 결과, 최종당화산물, AGEs(advanced glycation end products)를 형성하게 된다³⁴⁾. 이 최종당화산물은 당뇨병의 혈관합병증을 일으키는 주요한 물질로 보고되었다³⁵⁾. 장기간 고혈당의 상태에 노출되면 비효소성 당화단백질의 형성이 촉진되며, 이 후 복잡한 산화과정을 거쳐 AGEs를 형성하게 된다.

AGEs는 세포내에 있는 포도당 유래의 디카르복실 전구체와 세포내외에 존재하는 아미노군과의 비효소성 반응산물로서 당뇨병 합병증의 표적세포(내피세포)와 바당질 구성 성분에 대해 화학적 및 생물학적으로 유해한 작용을 하는 물질이다³⁶⁾. AGEs 및 MRPs 유도물질들은 혈액 내에서 다양한 수용체와 결합하여 반응을 야기하는 것으로 알려져 있으며 그 중 대표적인 수용체인 RAGE(receptor for AGE)는 내피세포, 단핵구, 탐식세포, mesangial cell, 신경세포, 평활근세포 등에서 발견된다. AGE는 세포 표면의 RAGE와 상호 작용하여 세포 내 산화스트레스를 일으키고 유리기의 활성화를 초래하여 만성적인 염증을 유도시킨다³⁷⁾. 당뇨환자의 혈청에서는 AGE의 농도가 늘어나며, 동맥경화 병소, 소혈관, 신장실질세포, 심근 세포 등에서 AGE의 축적이 관

찰되며³⁸⁾, AGEs는 당뇨병성 혈관병변의 형성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다³⁹⁾.

糖尿는 韓醫學의 消渴病의 範疇에 속하는 病이다. 《素問·奇病論》에서 “此肥美之所發也 此人必數食甘美而多肥也 肥者令人內熱 甘者令人中滿 故其氣上溢 轉爲消渴”⁴⁰⁾이라 하여 기름진 음식을 자주 먹어 消渴病이 생긴다고 기술함으로써 消渴이라는 명칭을 처음 기록한 이래 消渴과 연관된 名稱은 肺消 鬲消 風騷 消中 熱中 脾瘕 食飢 腎熱病 등으로 기재되어 있다⁴¹⁾. 《黃帝內經》을 중심으로 역대 의서들에는 消渴病과 연관된 명칭, 병인, 병기 및 전변증 등에 대한 서술이 계통적으로 나와 있다. 또 消渴의 傳變證으로 《靈樞·五變》에 “血脈不行 轉而爲熱 熱則消肌膚 故爲消瘠”⁴²⁾이라 하여 혈액순환과 관계된 기술이 있으며, 《外臺秘要》에서는 “其病變多發癰疽 此坐熱氣留於經絡不引 血氣壅滯 故成癰腫”⁴³⁾이라 하여 熱氣가 經絡에 머물러 癰腫이 발생한다 하였고, 《仁齋直指》에서는 “但所食之物皆從小便出焉 甚而水氣浸漬溢於肌膚則 脹爲腫滿 猛火自炎 留於肌肉則 發爲癰疽 此又病之深而證之變者也”⁴⁴⁾라 하여 水氣가 肌膚로 넘쳐 흘러 腫脹이 되기도 하고, 맹렬한 火가 肌肉에 머물러 癰疽를 發生시키기도 하니 이것은 病이 深하여 證이 變한 것이라고 하였다. 《東醫寶鑑》의 消渴의 傳變證에는 《蘭室秘藏》의 내용을 인용하여 “消渴病이 마지막으로 가면서 잘 먹으면 반드시 腦腫나 등창이 생기고, 잘 먹지 못하면 中滿이나 鼓脹이 생긴다”고 하였다⁴⁵⁾. 한의학적 문헌고찰을 통해 消渴은 오늘날의 당뇨병과 유사하며, 消渴의 傳變症은 당뇨의 만성합병증으로 볼 수 있다⁴⁶⁾.

이에 본 연구에서는 《東醫寶鑑》에 기재된 SJHEJ가 당뇨병의 부작용 가운데 하나인 동맥경화증에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고자 하였다. 우선 AGE에 대한 수용체를 가지고 있으며 AGE로 인한 동맥경화증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 단핵세포 가운데 THP-1 세포를 배양하였다. SJHEJ를 THP-1 cell에 대해 농도별로 처리한 결과, 본 연구에서 처리한 2.5, 5, 10 mg/mL 농도에서는 전혀 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1). THP-1 cell에 AGEs 반응산물인 Maillard Reaction Products(MRPs)를 처리한 결과 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-1β의 mRNA 발현이 현저히 증가하는 것을 관찰하여 양성 대조군으로 삼았다(Fig. 2, 3). SJHEJ를 처리한 실험군에서는 MRPs로 증가된 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-1β의 mRNA 발현의 억제를 관찰하였으며, 특히 5 mg/ml에서는 유의성을 확인하였다 (Fig. 2, 3). 단핵세포에 대한 화학주성효과를 가지고 있어서 급만성 염증에 주요한 역할을 담당하는 것으로 생각되는 MCP-147은 MRPs로 처리한 양성 대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, 실험군에서는 5 mg/mL의 군에서 감소됨을 관찰하였다(Fig. 4). IP-10는 단핵세포와 혈관의 평활근세포에 대한 chemokine으로서 고혈당의 상황에서 의의가 있다⁴⁸⁾. 췌장의 islet cell의 기능이 상과 연관되어 있으며, 최근에는 당뇨환자에서 증가하는 것으로 보고되었다⁴⁹⁾. 본 연구에서는 MRPs를 처리한 THP-1 cell에서 IP-10의 mRNA가 현저히 증가함을 관찰하였고, SJHEJ 처리를 함께 함으로써 IP-10의 발현을 감소시켰다(Fig. 5). 이러한 결과를 살펴볼 때 SJHEJ는 MCP-1과 IP-10의 mRNA 발현을 억제시키는

로써 단핵구에 대한 화학주성을 조절하는데 일정한 역할을 갖고 있음을 알 수 있었다.

산화된 지방에 의하여 유도되는 COX-2는 동맥경화의 병리 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며⁵⁰⁾, 제 1형 당뇨와 연관된 도세포의 기능부전에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다⁵¹⁾. 본 실험에서는 MRP로 유도된 COX-2의 mRNA 발현을 SJHEJ 처리 실험군에서 현저히 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

활성산소는 생체 내외의 산화·환원 반응 및 자외선, 방사선 등에 의해 생성되어지며 지방산화와 DNA손상 및 단백질 변성 등을 초래하여 동맥경화, 심혈관질환, 당뇨 및 암 등을 유발하는 것으로 알려져 있다⁵²⁾. 본 실험에서는 MRP의 처리가 THP-1 세포 내 ROS의 양의 증가를 유도함을 확인하였고, SJHEJ는 MRP로 증가된 세포내 ROS의 양을 모든 농도의 군에서 현저히 감소시켰다(Fig. 7). 또한 SJHEJ의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능에 의해 관찰하였다. DPPH 라디칼은 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 라디칼로서 항산화성분에 의해 환원되면 짙은 자색이 탈색되어지는 것으로 특히 토코페롤, 아스코르브산, 방향족 아민류 등에 의해 환원력이 큰 것으로 알려져 있다²²⁾. DPPH시약에 대해 SJHEJ를 5, 10, 50, 100 mg/mL 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 진보라색을 탈색시켰으며, 분광광도계를 이용하여 탈색정도를 관찰한 결과 10 mg/mL 농도에서부터 50 % 이상의 항산화 활성을 보였다(Fig. 8). 또한 농도의존적으로 더욱 높은 활성을 보여 SJHEJ에는 항산화 활성을 갖는 유용한 성분들이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 SJHEJ의 항산화 활성성분들은 세포내에서 염증 발현시 증가되는 산화스트레스에 대해 효과적으로 방어하는 것으로 생각되어진다.

결론적으로 본 연구에서는 MRP가 당뇨합병증의 병리기전과 관련이 있을 것으로 생각되는 염증성 cytokine과 monocyte chemokine의 mRNA 발현을 증가시킴으로써 강력한 염증반응을 야기시키는 것을 관찰하였다. SJHEJ는 MRP에 의해 유도된 여러 염증매개성 cytokine의 과발현을 억제시켰고, 세포 내 ROS의 감소 및 DPPH 라디칼 소거능을 보유하고 있음을 확인하였다.

결 론

SJHEJ의 MRP의 처리로 염증이 유도된 THP-1 세포에 미치는 항염증효과를 관찰하기 위하여 염증의 매개 화학물질의 mRNA발현 및 세포 내 ROS 생성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

MTT assay를 통한 세포생존율을 관찰한 결과 SJHEJ의 모든 처리군에서 세포독성을 보이지 않았다. MRP와 함께 SJHEJ를 동시에 처리한 후 RT-PCR을 통해 mRNA의 발현을 관찰한 결과 처리군에서 염증성 cytokine인 TNF- α mRNA의 발현이 감소하였다. SJHEJ 처리군에서 염증성 cytokine인 IL-1 β 의 mRNA 발현이 감소하였다. SJHEJ 처리군에서 monocyte chemotactic factor인 MCP-1의 mRNA 발현이 감소하였다. SJHEJ 처리군에서 단핵구에 대한 chemokine인 IP-10의 mRNA 발현이 감소하였다.

SJHEJ 처리군에서 염증성 cytokine인 COX-2의 mRNA 발현이 감소하였다. 모든 농도의 SJHEJ 처리군에서 MRP로 유도한 활성산소의 생성을 유의성 있게 감소하였다. 모든 농도의 SJHEJ 처리군에서 DPPH radical 소거능을 통한 항산화활성을 확인할 수 있었다.

SJHEJ는 인위적으로 고혈당의 상황하에 동맥경화증의 합병증의 유발에 주요한 역할을 하는 AGEs와 수용체의 결합으로 인해 초래된 염증반응의 모델인 MRP로 염증을 유발시킨 THP-1 세포에서 다양한 염증성 cytokine의 mRNA 발현을 억제시켰으며, 염증발현에 관여하는 세포내 활성산소의 생성을 감소시켰다. 이상의 결과 SJHEJ는 당뇨병합병증의 예방에 병용요법제로서의 개발가능성을 보유하고 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 이준영, 김대중, 김재용, 김화영, 민경완, 백세현 외. 당뇨병 기초통계연구 TFT 심포지움 : 2005-2006년 당뇨병 기초통계연구 TFT 중간 보고 ; DisMod를 이용한 우리나라 당뇨병 유병률의 추정. 대한 당뇨병학회, pp 224-226, 2006.
- Bucala, R., Cerami, A., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabetes Rev* 3: 258-268, 1995.
- Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R., Nawroth, P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37: 586-600, 1998.
- Sheetz, M.J., King, G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 288: 2579-2588, 2002.
- Ahemed, N., Thornalley, P.J. Advanced glycation endproduct: what is their relevance to diabetic complications?. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 233-245, 2007.
- 杜鎬京. 東醫腎系學, 서울, 동양의학연구원, pp 939-990, 1991.
- 楊思樹, 張樹生, 傅景華 主編, 안세영 역. 동의임상내과학. 서울 법인문화사, pp 396-413, 1999.
- 龔廷賢. 萬病回春. 臺北, 大中國圖書公司, pp 70-71, 1983.
- 葛芳芳, 李紅淺, 徐蓉娟. 淺析《內經》中消渴之論述, 上海中醫藥雜誌, 41: 60-62, 2007.
- 巢元方. 巢氏諸病源候論, 卷五, 消渴病諸候 消渴候, 臺中, 昭人出版社, p 161.
- 孫思邈. 備急千金要方, 서울, 대성문화사, p 651, 1992.
- 黃瑛. 淺議《外科正宗》對消渴脫疽的論治. *新中醫* 37: 77-78,

- 2005.
13. 李杲. 東垣十種醫書, 서울, 대성문화사, pp 164-167, 1983.
 14. 金禮蒙. 醫方類聚, 六卷, 서울, 醫聖堂, p 344, 1993.
 15. 曹孝忠 외. 聖濟總錄. 신문풍출판공사, pp 504-520, 1994.
 16. 劉河間. 傷寒 三六書. 서울, 정보사, pp 82-83, 1976.
 17. 危亦林. 世醫得效方. 서울, 도서출판 금강출판사, pp 167-168, 1981.
 18. 許 浚. 東醫寶鑑·雜病篇 卷六 消渴, 서울, 법인문화사, p 1405, 2007.
 19. Mishell, B.B. and Shiingi, S.M. Selected methods in cellular immunology. Freeman and W. M. Co., San Francisco, p 16, 1980.
 20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983.
 21. Birch, D.E., Kolmodin, L., Laird, W.J., McKinney, N., Wong, J., Young, K.K.Y., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A. Simplified Hot-Start PCR. Nature 381: 445-446, 1996.
 22. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use a stable free radicals. Nature. 26: 1191-1204, 1958.
 23. Diabetes Atlas: International Diabetes Federation, 2nd ed., Brussels, 2003.
 24. Ruderman, N., Williamson, J.R., Brownlee, M. Glucose and diabetic vascular disease. FASEB J 6: 2905-2914, 1992.
 25. Pugliese, G., Tilton, R.G., Williamson, J.R. Glucose-induced metabolic imbalances in the pathogenesis of diabetic vascular disease. Diabete Metab Rev 7: 35-59, 1991.
 26. Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 318: 1315-1321, 1988.
 27. Schmidt, A., Hori, O., Brett, J., Yan, S.D., Wautier, J.L., Stern, D. Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. Arterioscler Thromb 14: 1521-1528, 1994.
 28. American Diabetes Association. Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. Diabetes Care. 12: 573-579, 1989.
 29. Geiss, L., Herman, W., Smith, P. Mortality in non-insulin dependent diabetes. National Institutes of Health, Bethesda, pp 233-258, 1995.
 30. M. Brownlee, Advanced protein glycosylation in diabetes and aging, Ann Rev Med 46: 223-234, 1995.
 31. S.K. Grandhee and V.M. Monnier. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors, J Biol Chem 266: 11649-11653, 1991.
 32. Rahbar, S. Hemoglobin H disease in two Iranian families, Clinica Chimica Acta 20: 381-385, 1968.
 33. Rahbar, S., Blumenfeld, O., Ranney, H.M. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. Biochemical and Biophysical Research Communications 36: 838-843, 1969.
 34. Bucala, R., Cerami, A., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. Diabetes Rev 3: 258-268, 1995.
 35. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414: 813-820, 2001.
 36. 대한병리학회. 병리학II. 제6판. Korea Seoul Komoonsa Medical Science, p 702, 2007.
 37. Chappy, O., Dosquet, C., Wautier, M.P., Wautier, J.L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. Eur J Clin Invest 27: 97-108, 1997.
 38. Horiuchi, S., Sano, H., Higashi, T., Ikeda, K., Jinnouchi, Y., Nagai, R., et al. Extra- and intracellular localization of advanced glycation end-products in human atherosclerotic lesions, Nephrol Dial Transplant 11(5):81-86, 1996.
 39. H. Vlassara, R. Bucala, L. Striker. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging, Lab Invest 70: 138-151, 1994.
 40. 金達鎬. 注解補注 黃帝內經 素問(上) 서울, 도서출판 의성당, p 974, 2001.
 41. 葛芳芳, 李紅淺, 徐蓉娟. 淺析《內經》中消渴之論述, 上海中醫藥雜誌 41: 60-62, 2007.
 42. 金達鎬. 注解補注 黃帝內經 靈樞, 서울, 醫聖堂, p 877, 2002.
 43. 王燾. 外臺秘要, 卷十一, 消渴方一十七首, 서울, 대성문화사, p 339, 1992.
 44. 楊士瀛. 仁濟直指, 卷十七, 消渴, 消渴方論. 서울, 여강출판사, (12) p (744)329, 1995.
 45. 許浚. 東醫寶鑑 雜病篇 卷六 消渴. 서울, 법인문화사, p 1408, 2007.
 46. 강석봉. 소갈의 전병증과 당뇨병의 만성합병증에 대한 비교 고찰, 대한한의학회지 36: 137-152, 1998.
 47. Gu, L., Tseng, S.C., Rollins, B.J. Monocyte chemoattractant protein-1. Chem Immunol 72: 7-29, 1999.
 48. Shanmugam, N., Reddy, M.A., Guha, M., Natarajan, R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine gene in monocyctic cells. Diabetes 52: 1256-1264, 2003.
 49. Shimada, A., Morimoto, S.A., Kodama, K., Suzuki, R., Oikawa, Y., Saruta, T., et al. Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. Diabetes Care 24: 510-515, 2001.
 50. Inoue, H., Umehara, K., Nishimori, T., Hirata, T., Tanabe, T. Glucocorticoid-mediated suppression of the promotor

- activity of the cyclooxygenase-2 gene is modulated by expression of its receptor in vascular endothelial cells. *Biochem Bioph Res Commun* 254: 292-298, 1999.
51. Tabatabaie, T., Vasquez-Weldon, A., Moore, D.R., Kotake, Y. Free Radicals and the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: beta-Cell Cytokine-Mediated Free Radical Generation Via Cyclooxygenase-2. *Diabetes* 52: 1994-1999, 2003.
52. Miquel, J., Quintanilha, A.T., Weber, H. Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press, 1: 223, 1989.