

黃芩湯 추출물이 THP-1 세포에서 당화종말산물에 의한 염증반응에 미치는 효과

정상훈 · 이광규 · 이창현² · 이상룡³ · 김재은⁴ · 하기태¹ · 신상우¹ · 정한솔^{1*}

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부,
2: 우석대학교 한의과대학 해부학교실, 3: 우석대학교 한의과대학 경혈학교실, 4: 동국대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of *Hwanggeum-tang* Water Extract on the Expression of Pro-inflammatory Responses Elicited by Advanced Glycation End Products in THP-1 Cells

Sang Hun Jeong, Kwang Gyu Lee, Chang Hyun Lee², Sang Ryong Lee³, Jae Eun Kim⁴,
Ki Tae Ha¹, Sang Woo Shin¹, Han Sol Jeong^{1*}

*Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
1: Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University,
2: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
3: Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
4: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongguk University*

Hwanggeum-tang (HGT) was recorded in *Dongeuibogam* as being able to treat *Sogal* whose concept had been applied to Diabetes Mellitus (DM). Advanced glycation end products (AGEs) play important roles in the development of diabetic complications such as atherosclerosis by eliciting inflammatory responses. In this study, we examined the suppressive effects of HGT against inflammation elicited by AGEs. AGEs treatment increased the expression of pro-inflammatory cytokine gene TNF- α ; chemokines MCP-1, IP-10; pro-inflammatory cyclooxygenase COX-2 on the THP-1 cells. HGT had suppressed the expression of pro-inflammatory genes and protein levels in AGE-treated THP-1 cells. HGT had also decreased intracellular ROS production stimulated by AGEs. These results suggest that HGT has beneficial effects for the improvement diabetic vascular complication through suppressing inflammatory responses elicited by AGEs.

Key words : Advanced glycation end products, TNF- α , MCP-1, COX-2

서 론

당뇨는 고혈당을 특징으로 하는 대사이상 질환으로 혈당을 내리는 인슐린의 분비나 작용에 문제가 생겨 발생한다. 고혈당은 대사이상의 결과 당뇨 합병증을 발생하는 것으로 알려져 있다. 당뇨의 합병증으로는 대혈관성 합병증과 소혈관성 합병증이 있는데 대혈관합병증은 동맥경화를 유발하여 동맥경화증 관상동맥 질환 및 심근병증, 뇌혈관 질환, 기타 말초혈관 질환을 초래하며, 소혈관성 합병증은 망막이나 콩팥 말초신경에 영향을 미쳐 당뇨 병성 망막증, 당뇨병성 신병증, 당뇨병성 신경병증 및 족병변을

일으킨다¹⁾. 따라서 장기간의 당뇨병을 앓아 생기는 합병증에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{2,3)}.

糖尿病의 病症은 韓醫學의 여러 病症에서 찾아 볼 수 있으나 消渴, 皮膚癢痛, 燥, 癢, 眼昏, 風痺, 二陽病 등의 範疇로 사료되며, 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, 갑상선 기능항진증과 관련되어 있다고 보고되었다⁴⁾.

《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 名曰脾瘴 故其氣上溢爲消渴”⁵⁾이라 하여 渴症이 있으면서 소변량이 많은 병으로 병의 진행과정 중에 癰疽가 발생할 수 있다고 하여 消渴의 병변 과정 중 전병증에 대하여 중요하게 기술해 놓았다.

黃芩湯은 《萬病回春》⁶⁾에 최초로 수록된 처방으로 《東醫

* 교신저자 : 정한솔, 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원

· E-mail : jhsol33@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8461

· 접수 : 2012/03/07 · 수정 : 2012/04/05 · 채택 : 2012/04/12

寶鑑》⁷⁾에서는 음식을 잘 먹지 못하면서 갈증이 나는 증상의 上消를 치료하는 것으로 기재되어 있다.

본 연구에서는 《東醫寶鑑》에 기재된 黃芩湯이 오랜 고혈당으로 만들어진 당화종말산물에 의한 염증반응을 어떻게 조절하는지 살펴보고자 우선 인위적 당화종말산물인 maillard reaction products (MRPs)를 단핵세포주인 THP-1 세포에 처리하여 염증반응을 유발한 후 黃芩湯 물 추출물이 이에 대한 억제 기능이 있는지 살펴본 결과 여러 종류의 염증 매개 화합물질들의 발현을 억제함을 관찰하여 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, USA)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 blue (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색하고 세포계수기 (Hematocytometry, German)를 이용하여 세포 (viable cell)를 계수하여 세포밀도 2×10^6 cell/mL 이 되게 하여 6 well plate에 배양하였다.

2. 한약재 추출

본 실험에 사용한 Hwanggeum-tang (HGT)의 구성은 《東醫寶鑑》⁷⁾에 준하였으며, 처방 2貼분량(80 g)을 증류수 360 mL로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 5 g(회수율 6.25%)을 얻어 PBS에 용해시켜 사용하였다. 처방구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Contents of *Hwanggeum-tang* (HGT)

Herbal	weight(g)
Scutellariae Radix	4
Gardeniae Fructus	4
Platycodi Radix	4
Liriopsis Tuber	4
Angelicae Gigantis Radix	4
Rehmanniae Radix	4
Trichosanthis Radix	4
Puerariae Radix	4
Ginseng Radix	4
Paeoniae Radix Alba	4
Total weight	40

3. 세포독성반응 측정

Mitochondrial dehydrogenase activity를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 실험에 사용한 HGT가 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann이 보고한 방법에 따라

측정하였다⁸⁾. THP-1세포를 96well plate에 well 당 1×10^5 cells 밀도로 분주한 후 HGT를 농도별 (0, 2.5, 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 (Sigma, St. Louis, MO, USA)용액 50 ul/mL를 각 well에 넣고 3시간 배양하였다. 그런 다음 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 200 μ l/well씩 넣어 MTT-formazan을 용해하여 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다.

4. 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 동량으로 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 μ m membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다. AGE 반응물은 MRP로 시간별, 농도별로 처리하여 염증이 유도되어지는 최적처리조건을 선정하여 실험에 사용하였다.

5. RT-PCR

Total RNA추출은 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 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 48-56°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, Hercules, CA, USA)을 사용하여 관찰하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2와 같다.

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'-CAGTTGGAGGAGACGGTA-3'	
MCP-1	sense 5'-CAAAGTGAAGCTCGCACTC-3'	239
	antisense 5'-CATTTCACAATAATATTTTAG-3'	
IP-10	sense 5'-TGAAAAAGAAGGGTGAAGAG-3'	413
	antisense 5'-GGAAGATGGGAAAGGTGAGG-3'	
COX-2	sense 5'-ATCTACCTCCTCAAGCTCC-3'	708
	antisense 5'-TACCAGAAGGGCAGGATACA-3'	

6. 단백질 정량 및 Western blot analysis

배양된 THP-1 세포에 HGT (2.5, 5, 10 mg/ml)의 농도로 24 시간 처리한 후 수집하여 PBS로 washing하고 lysis buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 µg/mL PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 1%NP-40)를 사용하여 30 분 가량 얼음에 둔 다음 pipetting으로 용해시켰다. 원심분리한 후 상층액을 얻어서 Bradford reagent를 이용하여 단백질을 정량하였고, 전체 lysate 30 µg/lane을 기준으로 12% SDS PAGE gel에 loading하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질들은 PVDF membrane으로 230 mA에서 1 시간 transfer하였고, 5% skim milk를 이용하여 1 시간 blocking하였다. 1차 항체는 monoclonal mouse Anti-iNOS antibody, monoclonal Anti-human COX-2 antibody를 각각 1:1000으로 3% BSA in PBS에 희석, 4°C에서 overnight 하여 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-goat IgG를 1:10000으로 5% skim milk에 희석하여, 실온에서 1 시간 반응시키고 ECL을 이용하여 band를 확인하였다.

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 DCF로 가수분해되고, 이 후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. 우선 세포를 1×10⁶ cells/ml의 농도로 PBSG (1g Glucose/ 1L PBS)에 부유시켜 96-well plate에 분주하였다. SJHEJ를 농도별로 처리 (2.5, 5, 10mg/ml)한 후 30분간 incubation하였고, MRP와 DCFH-DA를 각각10 mM, 125 mM의 농도로 처리하였다. DCF 형광도는 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter (Perkin-Elmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였고 excitation 파장을 485nm, emission 파장을 530nm로 하였다.

8. 항산화 활성 검색

HGT의 항산화 활성은 Blois의 방법9을 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(O.4 mM /EtOH)를 첨가한 후 HGT를 농도별로 200 µL처리하여 vortex하고 10 분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼소거능력을 검정하였다. 흡광도가 0.95~0.99가 되도록 DPPH용액 800 µL에 에탄올 3~4 mL을 첨가하였다. 이 에탄올에 HGT 200 µL과 DPPH용액 800 µL을 섞어 10 초 동안 진탕교반하고 10분 동안 빛을 차단하여 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다.

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

9. 통계처리

실험 자료들은 SPSS 프로그램(v. 9.0)을 이용하여 통계처리하였다. 3회 반복한 실험결과와의 평균과 표준오차로 표시하고, 분

산분석으로 유의성을 검정하며, a=0.05 수준에서 ANOVA를 실시하여 분석하였다.

결 과

1. THP-1 세포의 생존율에 미치는 효과

세포 배양계를 통한 실험에서 HGT를 각각 2.5, 5, 10 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과 미처리군과 비교하였을 때 각각의 HGT 처리군에서 특별한 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

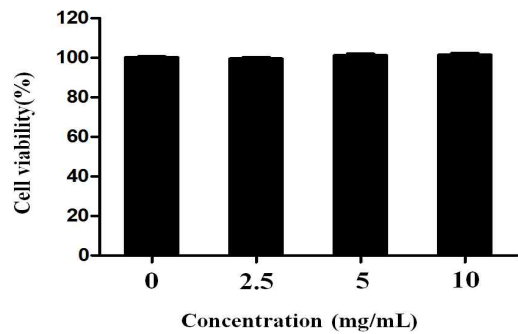


Fig. 1. Treatment with *Hwanggum-tang* (HGT) resulted in no significant effect on the viability of THP-1 human monocyte cells. Cells were treated with 2.5~10 mg/mL HGT for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay.

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

MRPs를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 HGT를 2시간 동안 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 TNF-α mRNA의 발현이 HGT처리군에서 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

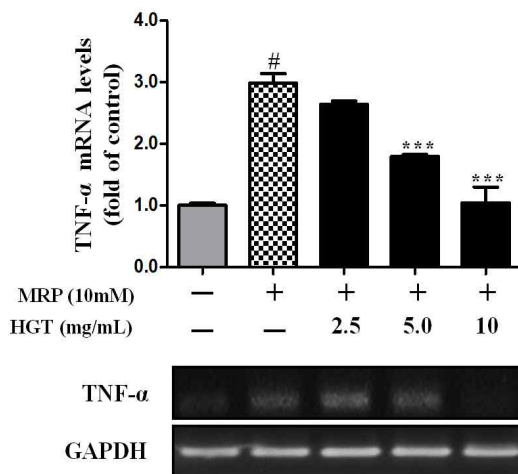


Fig. 2. Effects of HGT on the expression of pro-inflammatory TNF-α mRNA in THP-1 cells. Cells were treated with indicated concentration of HGT (2.5, 5, 10 mg/mL) for 30 min followed by MRP (10 mM) treatment for 2h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products. * p<0.05, *** p<0.01.

3. MRPs로 유도된 THP-1 세포의 MCP-1 mRNA 발현에 미치는 영향

MRPs를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 HGT를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 MCP-1 mRNA의 발현이 HGT처리군에서 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

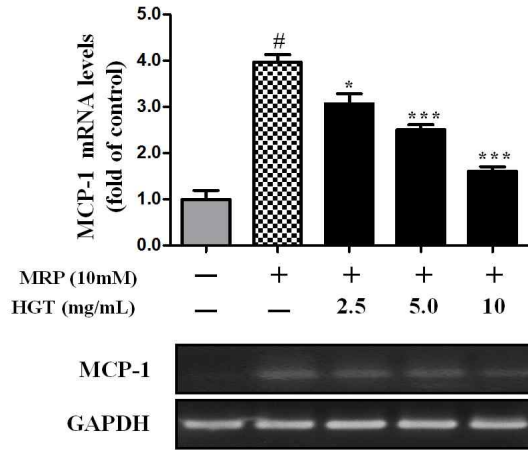


Fig. 3. Effects of HGT on the expression of pro-inflammatory MCP-1 mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction product. Cells were treated with indicated concentration of HGT (2.5, 5, 10 mg/mL) for 30 min followed by MRP (10 mM) treatment for 2h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products. * p<0.05, *** p<0.01.

4. MRPs로 유도된 THP-1 세포의 IP-10 mRNA 발현에 미치는 영향

MRPs를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 HGT를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 IP-10 mRNA의 발현이 HGT처리군에서 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4).

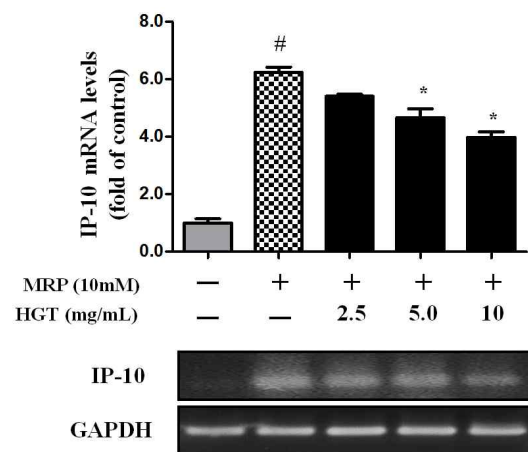


Fig. 4. Effects of HGT on the expression of pro-inflammatory IP-10 mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction products. Cells were treated with indicated concentration of HGT (2.5, 5, 10 mg/mL) for 30 min followed by MRP (10 mM) treatment for 2h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products. * p<0.05, *** p<0.01.

5. MRPs로 유도된 THP-1 세포의 COX-2 mRNA 발현에 미치는

영향

MRPs를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 HGT를 2시간 처리 한 후 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 염증성 cytokine인 COX-2 mRNA의 발현이 HGT처리군에서 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 5, 10 mg/mL에서 현저한 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

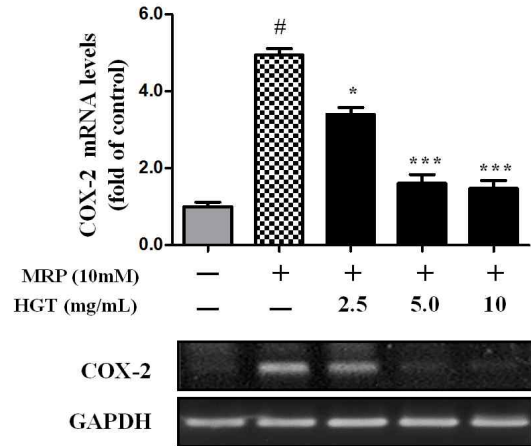


Fig. 5. Effects of HGT on the expression of pro-inflammatory COX-2 mRNA in THP-1 cells induced by Maillard reaction products. Cells were treated with indicated concentration of HGT (2.5, 5, 10 mg/mL) for 30 min followed by MRP (10 mM) treatment for 2h. The figure shows ethidium bromide-stained agarose gels of RT-PCR products. * p<0.05, *** p<0.01.

6. 세포 내 ROS 생성 측정

THP-1 cell에 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 HGT를 30분간 전처리 후 MRP와 DCF-DA시약을 함께 처리하고 15분 후에 세포 내 ROS의 형성을 살펴보았다. 그 결과 모든 처리군에서 세포내 ROS의 발현의 유의성 있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6).

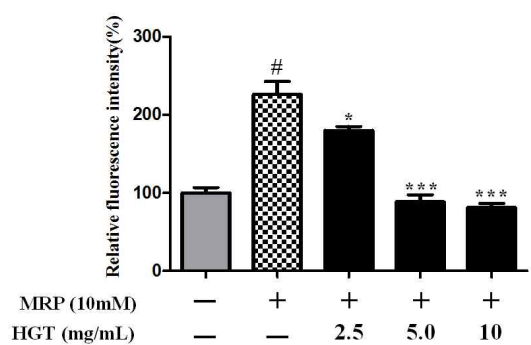


Fig. 6. Effects of HGT on intercellular ROS generation. Cells were pretreated with indicated concentration of HGT (2.5, 5, 10 mg/ml) for 30 min, followed by MRP (10 mM) and DCFH-DA. After 15min, we measure the fluorescence intensity which means the intracellular amount of ROS. * p<0.05, *** p<0.01.

7. Radical 소거능 측정

HGT의 항산화 활성에 대해 알아보하고자 DPPH radical 방법에 준하여 시험관내에서 라디칼 소거능을 측정하였다. HGT를 5, 10, 25, 50 mg/mL 농도에서 라디칼 소거능을 측정한 결과 10

mg/mL 농도에서 49%, 25 mg/mL 농도에서는 72 %의 라디칼 소거능을 보였으며, 처리농도가 증가함에 농도의존적으로 항산화 활성도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

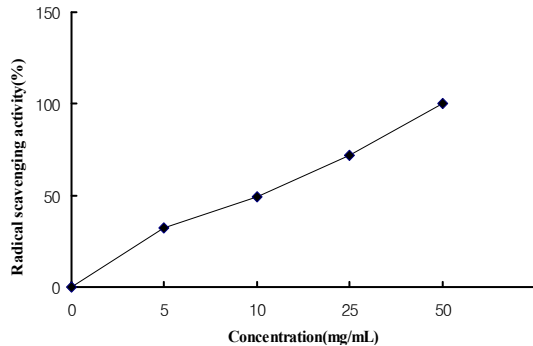


Fig. 7. Antioxidant effect of HGT by DPPH radical scavenging assay. DPPH radical was significantly erased by treatment of HGT in a dose dependant manner.

8. MRPs로 유도된 THP-1 세포의 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

MRPs를 처리하여 양성대조군을 만들었고, 여기에 각각 2.5, 5, 10 mg/mL의 HGT를 24시간 처리 한 후 Western blot analysis를 시행하였다. 그 결과 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 각각 5 mg/mL과 10 mg/mL의 처리군에서 감소되었다(Fig. 8).

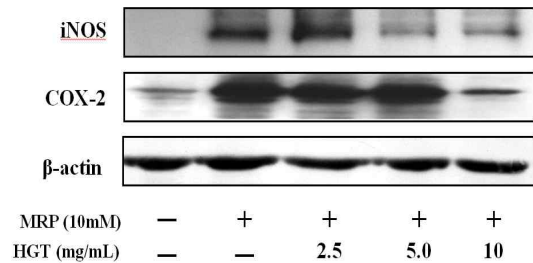


Fig. 8. Effect of HGT on Maillard reaction products-induced pro-inflammatory protein expression in THP-1 cells. iNOS and COX-2 protein expression was inhibited by treatment of HGT in the MRPs-induced THP-1 cells. The THP-1 cells were treated with indicated concentrations of the HGT to the addition of 10 mM of MRPs, and the cells were further incubated for 24 h. This experiment has been repeated three times with similar observations.

고 찰

당뇨의 합병증은 대개 고혈당으로 인한 대사기능의 교란 결과로 생겨난다. 오랜 기간 당뇨병을 앓았을 때 지속되는 고혈당의 상태는 비효소적 당화를 일으킨다. 혈액과 세포 내의 당 농도가 증가되면 효소의 도움이 없이 당의 카르보닐기가 단백질의 아미노기에 화학적으로 달라붙게 된다. 이런 반응을 거쳐 당과 단백질의 복합체인 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)이 형성된다¹⁰. AGEs는 일생동안 혈관벽에 축적되게 되며, 혈관벽의 아교질과 같은 단백질에 형성된 AGEs는 펩타이드 간에 교차 결합을 일으켜 큰 혈관에서 저밀도지단백과 같은 혈장단백질을 잡아 혈관내벽에 축적시킴으로써 동맥경화를

가속화시킨다. 또한 AGEs에 의해 변형된 혈장단백질들은 혈관 내피세포나 대식세포 표면의 AGE 수용체(RAGE)와 결합하여 대식세포로부터 여러 cytokine들과 성장인자들을 분비하도록 하며, 혈관내피세포의 투과성을 증진시키고, 혈관내피세포와 대식세포에서 응고인자 분비를 증가시키며, 섬유아세포와 평활근세포로 하여금 세포외 기질의 합성과 증식을 촉진시키게 한다. 이러한 영향들로 말미암아 당뇨의 합병증이 생겨난다¹¹.

당뇨의 합병증은 크게 급성 대사성 합병증과 만성 합병증으로 대별된다. 급성 합병증에는 당뇨병성 케톤산혈증, 고삼투압성 비케톤성 혼수, 저혈당 등이 있으며 만성 합병증에는 망막병증, 신장병증, 신경병증, 당뇨병성 족부병변, 대혈관 장애 및 소혈관 장애로 구분되어지며 대혈관 장애에는 동맥경화증 관상동맥질환 및 심근병증, 뇌혈관 질환, 기타 말초혈관 질환으로 구분되어지며, 소혈관 장애로는 망막병증, 신장병증, 신경병증, 당뇨병성 족부병변으로 구분된다^{12,13}. 특히 당뇨병의 만성합병증 가운데 심근경색, 뇌경색, 실명, 하지괴저 등을 일으키는 죽상경화증은 당뇨로 인한 사망률에 있어서 가장 큰 원인이 되고 있다. 당뇨합병증의 주요한 원인으로 고혈당, 고지혈증^{14,15}, 및 동맥경화 및 염증성 질환, 산화 와 관련되어지는 당화종말산물의 축적으로 더욱 심화되는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸.

고혈당하에서 증가된 AGE는 AGE-LDL을 형성하거나, 혈관벽에 축적되거나 내피세포 등의 세포 수용체와의 결합을 통해 죽상경화증의 형성에 기여할 것으로 보고되었다^{19,20}. 당뇨병 합병증 발생에서 AGE의 역할은 AGE 생성억제제인 아미노구아디딘의 투여로 인한 당뇨병동물모델에서의 합병증 발생 예방에 대한 보고를 통해 확인할 수 있다²¹.

혈액 중에 순환하는 비효소적 당화종말산물인, Advanced glycation end products (AGEs)는 특수한 세포 수용체에 결합하여 만성염증을 유도하며 당뇨병만성합병증과 같은 반응을 유도한다. AGEs, MRPs 유도물질들은 혈액 내에서 다양한 수용체와 결합하여 반응을 야기하는 것으로 알려져 있으며 그 중 대표적인 수용체로의 RAGE (receptor for AGE)는 내피세포, 단핵구, 탐식세포, mesangial cell, 신경세포, 평활근세포 등에서 발견된다. 세포 표면 RAGE는 AGEs와의 상호작용을 함으로써 세포내 산화스트레스를 일으키고 유리의 활성화를 초래하여 만성적인 염증이 유도되어진다²².

《黃帝內經》에서 "消癰", "消渴"이라 기술한 이래 시대에 따라 消渴病에 대한 다양한 서술을 볼 수 있다. 지금까지의 문헌연구 결과 消渴은 처음에는 證候였으나 시대를 거쳐감에 따라 病名으로 발전하였고 서양의학적으로는 당뇨병과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고 있다²³. 殷²⁴은 역대 문헌고찰을 통해 消渴病의 病機에 대하여 다음과 같이 개괄하였다. 우선 消渴이 생겨나는 원인은 肺, 脾胃, 腎의 陰이 傷하여 생겨난다고 인식하였다. 이로써 上中下 三消의 구분이 생겨났으며 각각의 원인을 肺燥, 胃熱, 腎虛로 보았다. 이 가운데 腎陰의 不足을 가장 근원적 원인으로 삼았는데 陰이 虛하면 陽을 制할 수 없어 陽氣가 躁動함으로써 內熱을 일으키고 위로 肺金을 燻灼시켜 多飲煩渴하며(上消), 가운데로는 脾胃를 灼하여 胃熱의 상태를 만들어 多食하며, 腎陰

虛는 脾虛를 조래하여 전신으로 散精작용을 못하게 함으로써 多食함에도 불구하고 몸은 마르게 된다(中消). 또한 陰虛함으로 인해 상대적으로 陽이 盛하게 되면 腎의 開闔작용이 제대로 이루어지지 않아 固攝하지 못하고 水穀의 精微가 급격하게 체외로 배설되며 水穀의 甘味가 변하지 않아 多尿한 가운데 단 맛이 남게 되어(下消) 消渴의 증상을 이룬다고 인식하였다.

消渴의 轉變證은 糖尿病의 合併症과 매우 유사하게 기술되어 있다. 또 消渴合併證은 치료가 잘 되지 않음을 설명하기도 하였는데 《東垣十種醫書》에서는 "消渴病에 腦瘡, 背瘡과 中滿鼓瘡가 合併하면 不治"²⁵⁾라 하여 消渴病에 癰疽가 생겨나면 치료하기 어려운 것으로 인식하였을 뿐만 아니라, 《醫學入門》에서는 "消渴의 말기에 癰疽와 脹滿이 合併하면 위험하다고 했으며, 瘡가 생기는 것을 예방해야 한다"고 하였다²⁶⁾. 姜의 보고에 의하면 消渴의 轉變證을 당뇨병의 만성 합병증으로 보았으며²⁷⁾, 黃²⁸⁾은 消渴脫症을 현대서양의학의 동맥경화질병으로 보았다.

黃芩湯은 《萬病回春》에 최초로 수록되었으며, 《東醫寶鑑》에 기재된 본 처방⁷⁾은 瀉肺熱하는 黃芩, 清熱瀉火, 涼血하는 梔子, 宣肺利咽, 祛痰排膿하는 桔梗, 生津潤肺, 瀉熱除煩하는 麥門冬, 補血活血, 潤燥, 養新血하는 當歸, 清熱涼血하는 生地黃, 降火潤燥, 解渴하는 天花粉, 升陽解肌, 透疹止瀉, 除煩止渴하는 葛根, 大補元氣, 固脫生津, 安神하는 人蔘, 養血斂陰, 緩急止痛하는 白芍藥, 斂肺生津止渴하는 烏梅로 구성되어 음식을 잘 먹지 못하면서 渴症이 나는 上消證를 치료할 때 사용된다.

이에 본 연구에서는 《東醫寶鑑》에 기재된 黃芩湯이 당뇨병의 부작용 가운데 하나인 동맥경화증의 발생에 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. HGT를 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- α 의 mRNA 발현이 현저히 증가하는 것을 관찰하여 양성 대조군으로 삼았다(Fig. 2). HGT를 처리한 실험군에서는 MRPs로 증가된 염증성 cytokine인 TNF- α mRNA 발현의 억제를 관찰하였다(Fig. 2). 단핵세포에 대한 화학주성효과를 가지고 있어서 급만성 염증에 주요한 역할을 담당하는 것으로 생각되는 MCP-130은 MRPs로 처리한 양성 대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, 실험군에서는 농도의존적으로 감소됨을 관찰하였다(Fig. 3). IP-10는 단핵세포와 혈관의 평활근세포에 대한 chemokine으로서 고혈당의 상황에서 의의가 있다³⁰⁾. 췌장의 islet cell의 기능이상과 연관되어 있으며, 최근에는 당뇨병환자에서 증가하는 것으로 보고되었다³¹⁾. 본 연구에서는 MRPs를 처리한 THP-1 cell에서 IP-10의 mRNA가 현저히 증가함을 관찰하였고, HGT 처리를 함께 함으로써 IP-10의 발현을 감소시켰다(Fig. 4). 이러한 결과를 살펴볼 때 HGT는 MCP-1과 IP-10의 mRNA 발현을 억제시킴으로써 단핵구에 대한 화학주성을 조절하는데 일정한 역할을 갖고 있음을 알 수 있었다.

산화된 지방에 의하여 유도되는 COX-2는 동맥경화의 병리 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며³²⁾, 제 1형 당뇨와 연관된 도세포의 기능부전에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다³⁴⁾. 본 연구에서는 MRPs로 유도된 COX-2 mRNA와 단백질 발현을 HGT처리 실험군에서 현저히 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 8).

활성산소는 생체 내외의 산화·환원 반응 및 자외선, 방사선 등에 의해 생성되어지며 지방산화와 DNA손상 및 단백질 변성 등을 조래하여 동맥경화, 심혈관질환, 당뇨 및 암 등을 유발하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 본 연구에서는 MRPs의 처리가 THP-1 세포 내 ROS의 양의 증가를 유도함을 확인하였고, HGT는 MRPs로 증가된 세포내 ROS의 양을 모든 농도의 군에서 현저히 감소시켰다(Fig. 6). 또한 HGT의 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 있다⁹⁾. DPPH시약에 대해 HGT를 5, 10, 25, 50 mg/mL 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 진보라색을 탈색시켰으며, 분광광도계를 이용하여 탈색정도를 관찰한 결과 10 mg/mL 농도에서부터 49 % 이상의 항산화 활성을 보였다(Fig. 7). 또한 농도의존적으로 더욱 높은 활성을 보여 HGT에는 항산화 활성을 갖는 유용한 성분들이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 HGT의 항산화 활성 성분들은 세포내에서 염증 발현시 증가되는 산화스트레스에 대해 효과적으로 방어하는 것으로 생각되어진다.

IKK β - NF- κ B 에 의해 발현이 조절되는 iNOS는³⁵⁾ 다양한 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 공복시 고혈당과 인슐린 저항상태에서의 iNOS의 역할이 보고되었다^{36,37)}. 본 연구에서는 MRPs로 유도된 iNOS 단백질 발현을 실험군 특히 HGT 5, 10 mg/mL의 처리군에서 현저히 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 8).

결론적으로 본 연구에서는 MRPs가 당뇨합병증의 병리기전과 관련이 있을 것으로 생각되는 염증성 cytokine과 monocyte chemokine의 mRNA 및 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 증가시킴으로써 강력한 염증반응을 야기시키는 것을 관찰하였다. HGT는 MRPs에 의해 유도된 여러 염증매개성 cytokine의 과발현을 억제시켰고, 세포 내 ROS의 감소 및 DPPH 라디칼 소거능을 보유하고 있음을 확인하였다.

결론

THP-1 세포에서 모든 농도의 HGT 처리군에서 세포독성이 관찰되지 않았다. THP-1 세포에서 MRP를 처리한 결과 염증성 사이토카인 TNF- α , COX-2 케모카인 MCP-1, IP-10의 mRNA 발현이 증가되었고, HGT는 농도의존적으로 이들의 발현을 억제하였다. HGT는 DPPH radical 소거능을 지니고 있었고, THP-1 cells에 MRP를 처리하여 증가된 ROS의 세포내 생성을 HGT는 억제하였다. 중요한 염증성 화학 매개체인 iNOS와 COX-2의 단

백질 발현을 HGT는 억제하였다. 이상의 결과 HGT는 당뇨병합 병증에 있어서 중요한 역할을 하는 AGE 매개 염증반응을 억제 함으로써 당뇨병합증의 예방에 병용요법제로서의 개발가능성을 보유하고 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- VINAY KUMAR, ABUL K., ABBAS, NELSON FAUSTO. The endocrine pancreas. In: Pathologic basis of disease. 7th ed. Elsevier saunders; pp 1189-1200, 2005.
- 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.
- 楊思樹, 張樹生, 傅景華 主編, 안세영 역. 동의임상내과학, 서울 법인문화사; pp 396-413, 1999.
- 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.
- 龔廷賢. 萬病回春 五券 서울, 법인문화사, p 747, 2007.
- 許 浚, 東醫寶鑑, 卷六, 雜病篇, 消渴, 서울, 법인문화사, p 1401, 2007.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods. 65: 55-63, 1983.
- Blois, M.S. Antioxidant determination by the use a stable free radicals. Nature. 26: 1191-1204, 1958.
- Bucala, R., Cerami, A., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. Diabetes Rev. 3: 258-268, 1995.
- Kumar et al. Robbins Basic Pathology 8ed, SAUNDERS ELSEVIER: p 780, 2007.
- 김응진 외. 당뇨병학, 서울, 고려의학, pp 391-468, 1992.
- 서울대학교 의과대학 내과학교실: 내과학, 서울, 군자출판사, pp 806-813, 1996.
- Ruderman, N., Williamson, J.R., Brownlee, M. Glucose and diabetic vascular disease. FASEB J. 6: 2905-2914, 1992.
- 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.
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 414: 813-820, 2001.
- 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.
- 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.
- Vlassara, H. Recent progress in advanced Nglycation end products and diabetic complications. Diabetes. 46(2):S19-S25, 1997.
- Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R., Nawroth, P. AGEs and their interation with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. Cardiovasc Res. 37: 586-600, 1998.
- Brownlee, M. Advanced glycation end products in diabetic complications. Curr Opinion Endocrinol Diabetes. 3: 291-297, 1996.
- 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.
- 조선영, 유원준, 안상우, 김남일. 한국 한의학에서 소갈 분류의 형성과정, 한국한의학연구논문집, 13(2):1-13, 2007.
- 殷百萬, 消渴病機說, 陝西中醫 23(6):527-529, 2002.
- 李 杲. 東垣十種醫書, 서울, 대성문화사, pp 164-167, 1983.
- 李 梴. 醫學入門, 北京, 中國中醫藥出版社, pp 378-379, 1995.
- 강석봉. 소갈의 전병증과 당뇨병의 만성합병증에 대한 비교 고찰, 대한한의학회지 36: 137-152, 1998.
- 黃 瑛, 淺儀《外科正宗》對消渴脫疽的論治, New Journal of Traditional Chinese Medicine. 37(12):77-78, 2005.
- Gu, L., Tseng, S.C., Rollins, B.J. Monocyte chemoattractant protein-1. Chem Immunol. 72: 7-29, 1999.
- Shanmugam, N., Reddy, M.A., Guha, M., Natarajan, R. High glucose-induced expressioin of proinflammatory cytokine and chemokine gene in monycytic cells. Diabetes. 52: 1256-1264, 2003.
- 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.
- Inoue, H., Umesonono, 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.
- 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.
34. Miquel, J., Quintanilha, A.T., Weber, H. Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press, vol I p 223, 1989.
35. Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 269: 4705-4708, 1994.
36. Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Jeevendra, Martyn, J.A., Ueki, K., Kaneki, M. A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. *Diabetes*. 54: 1340-1348, 2005.
37. Hiroki, S., Masao, K., Eriko, T., Michiko, S., Chieko, K., Shingo, Y. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282: 386-394, 2002.