

특집 : 비만 · 당뇨 조절과 건강기능식품

두충엽의 단백질 당화 억제 효과  
-당뇨합병증 예방제로서의 가능성-

김혜영

한국식품연구원 식품기능연구본부

Inhibitory Effect of Leaves from *Eucommia ulmoides* on Protein Glycation  
- Implication for Preventing Diabetic Complication

Hye Young Kim

Food Function Research Division, Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

당뇨병은 고혈당으로 특징지어지는 내분비계 질환이며, 고혈당 상태가 지속되면 눈, 혈관, 신경 및 신장 등과 관련된 질환이 합병증으로 발병된다. 당뇨병의 예방은 1차, 2차, 3차로 생각해 볼 수 있다. 당뇨병에서 1차 예방이란 건강자나 고위험군을 조기 선별하여 위험요소를 변화시켜 당뇨병으로 이환되는 것을 예방하는 방법이다. 2차 예방이란 당뇨병으로 이환된 이후 합병증으로 이환되는 과정을 지연시키거나 예방하는 방법이다. 3차 예방이란 당뇨병 합병증으로 이환된 환자들이 실명, end stage renal disease, amputation, 조기 사망 등을 예방하는 것이다. 당뇨병은 1차 예방으로 아예 발병하지 않는 것이 가장 바람직하며, 국내의 건강기능식품법이 규정한 건강기능성이란 질환의 1차 발병 위험 감소를 주요한 개념으로 하고 있다. 그러나 현실은 어쩔 수없이 당뇨병 환자의 발병률은 폭발적으로 증가하고 있다. 2003년말 현재 국내에서 당뇨병으로 병·의원 치료를 받고 있는 사람은 401만명에 달했다(건강보험심사평가원). 전체 인구의 8.4%이다. 이 추세로 가면 2030년에는 당뇨병 환자가 722만명(인구의 14.4%)에 이를 것이라고 한다. 따라서 당뇨병으로 이환된 이후 2차 및 3차 예방도 중요하며, 식품이나 식품 성분으로 합병증이 예방될 수도 있는 가능성이 있기에 소개하고자 한다.

단백질 당화

당뇨병으로 인한 만성적 고혈당은 체내 여러 가지 단백질의 당화(glycation)를 항진시키므로써 최종당화산물(advanced glycation endproducts; AGEs)이 축적되게 하여 당뇨병 합병증을 유발할 수 있다. AGE는 세포내 및

세포외 단백질, 지질, 핵산 등에서 형성되어, 형광 및 cross-linking을 생성하는 복합 구조물이 된다. 단백질 당화로 생성된 AGE는 자유 라디칼을 활성화시켜 세포에 손상을 주게 되어 합병증이 발병한다. 당뇨병 합병증으로 영향받는 세포에서는 AGE에 대한 receptors(RAGE)가 발견되었다. 최근에는 AGE와 RAGE의 반응이 세포간의 신호전달, 유전자 발현, pro-inflammatory molecules의 누출, 자유 라디칼 등을 변화시켜서 당뇨병 합병증을 유발한다고도 한다.

포도당을 비롯한 환원당의 aldehyde기나 ketone기가 단백질의 free amino기와 반응하여 nucleophilic addition reaction이 일어나 가역적인 당화물질인 Schiff base를 형성한다. 이 반응은 몇 시간 동안 일어나며 형성된 Schiff base는 좀더 안정되고 아직은 가역적인 ketoamine이나 Amadori products 형태로 재배열된다. Amadori products는 며칠 동안 일어난다. 단백질 당화는 고혈당의 정도와 기간, 해당 단백질의 half-life, 해당 조직의 포도당에 대한 투과성 등에 비례한다. 당화된 단백질은 더 반응이 진행되어 3-deoxyglucosones(3-DG)과 같은 dicarbonyl intermediates를 형성하며, 다시 탈수, 농축을 일으켜 비가역적 최종당화산물이 형성된다. AGE는 단백질의 cross-linking을 일으키는 복합적인 분자들이며 특이한 흡광도나 형광을 나타낸다. AGE는 크게 세 가지로 분류될 수 있다. 즉 첫째 pentosidine 및 crossline과 같은 형광을 띄고 cross-linking이 일어난 것, 둘째 imidazolium dilysine cross-links, alkyl formyl glycosyl pyrrole(AFGP) cross-links, arginine-lysine imidazole(ALI) cross-links와 같은 형광을 띄지 않으며 cross-linking이 일어난 것, 셋째 pyrrolidine 및 N-carboxymethyllysine(CML)과 같은

non-cross-linking AGE이다. Pentosidine은 lysine과 arginine기 사이에 일어난 cross-link이며 당뇨병에서 증가한다. Crossline은 당뇨병 쥐의 신장에서 처음으로 발견되었으며 in vitro 및 in vivo에서 형성된다.

포도당과 같은 단당류는 enediol과 평형을 이루며 transition metal이 존재할 때 enediol radical이 생성된다. 이 radical은 산소 분자를 환원시켜 superoxide radical ( $O_2 \cdot^-$ )로 되며 다시 dicarbonyl ketoaldehyde로 산화되어 단백질의 아미노기와 반응하여 ketoimine을 형성한다. 이 반응은 autoxidative glycation이라 불리운다. Ketoimine은 Amadori products보다 반응성이 높으며, AGE 형성에 관여한다. 산화 반응도 AGE 생성에 관여하여 산소가 존재할 때 AGE 형성은 가속화되며, 혐기성 조건하에서는 AGE 형성이 감소한다. Amadori products가 AGE로 자동산화될 때 glycoxidation이라고 한다.

당화생성물은 collagen과 같은 단백질의 browning을 일으키고 기저막의 비후 및 변화된 collagen이 lipoprotein이나 IgG의 침착을 유도한다. Brownlee는 macrophage에 당화생성물을 인지하고 제거할 수 있는 수용체가 있으며, interleukin-1, tumor necrosis factor(TNF), insulin-like growth factor-1(IGF-1) 등의 분비를 자극하여 fibroblast, smooth muscle cell, mesangial cell 및 endothelial cell의 증식을 유발시키며, glycated matrix는 proteoglycan을 고정시키는 능력이 감소되어 있어 미세혈관의 negative charge를 감소시켜 당뇨병성 합병증의 발생에 기여할 것으로 보고하였다. 또한 collagen에 결합된 당화생성물은 혈관내피세포에서 생성된 nitric oxide의 활성을 억제하여 혈관 확장에 장애를 초래하고, nitric oxide의 cytostatic effect를 억제하여 혈관 평활근 및 사구체 세포 간 세포의 증식을 초래함이 보고되어 비효소적 당화 기전은 당뇨병에서의 합병증 뿐만 아니라 고혈압 발생의 기전으로도 거론되고 있다. 당화는 지방이나 지단백에도 발생할 수 있어, 저밀도지단백의 아포단백이나 지질에 당화가 일어나면 AGE-LDL이 형성되는데 이물질은 LDL 수용체를 통하여 잘 제거가 되지 않기 때문에 혈액내에 체류하는 시간이 지연되고 이에 따라 산화가 잘 일어나게 되어 죽상경화의 발생도 촉진시키는 것으로 알려져 있다(1).

당화와 산화는 서로 연결되어 있기 때문에(Table 1), 항산화제는 당화를 억제하리라고 예상된다. 현재까지 보고된 당화 억제 효능이 있는 식품은 항산화효과가 높은 식품이었다. 녹차(2), 백리향(3), Garcinia indica(4) 등의 당화 억제 효능이 보고되었다.

## 두충엽의 단백질 당화 억제 효과

두충나무의 잎은 항산화효과가 보고되었으며(5,6), rutin, chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid 등의 flavonoids가 함유된 것으로 보고되었다(7). 따라서 당화 억제 효과가 있으리라고 예상되었다.

두충엽의 50% ethanol 추출물은 과당과 albumin의 당화 반응을 저해하였다( $IC_{50}$  162  $\mu$ g/mL). 두충엽의 50% ethanol 추출물을 in vitro assay로 확인하면서 chromatography에 의하여 당화 억제 효과가 있는 3개의 화합물을 분리하였다(Fig. 1). 분리한 화합물을 UV-spectra, IR-spectra,  $^1H$ -,  $^{13}C$ -,  $^1H$ - $^1H$ -COSY-, HMQC-, HMBC-NMR 및 ESI/MS 등으로 확인한 결과 quercetin 3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside(1), kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside(astragalol)(2), quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside(isoquercitrin)(3)이었으며 Fig. 2에 구조를 나타내었다(8).

분리한 화합물 및 추출물의 당화 억제 효과를 시험한 결과(Table 2)  $IC_{50}$ 을 몰농도로 나타내었을 때 알려진 당

*E. ulmoides* Leaves (1 kg)  
 ↓ 50% ethanol (at 60°C for 2 hours, repeat 3 times)  
 Aqueous ethanolic extract (95 g)  
 ↓ Partitioned with hexane, ethyl acetate, 1-butanol, water  
 Ethyl acetate-soluble fraction (15.8 g)  
 ↓ Preparative HPLC (water:methanol=85:15 $\rightarrow$ 50:50 for 60 min)  
 ↓ HPLC (water:methanol=85:15 $\rightarrow$ 50:50 for 60 min)  
 Compound 1 (0.621 g)  
 Compound 2 (0.452 g)  
 Compound 3 (0.258 g)

Fig. 1. Isolation procedure of glycation inhibitors from *E. ulmoides* leaves.

Table 1. Glycation interfaces with oxidative stress at multiple points

Protein glycation	Oxidative stress
Most of glycation products with pyridinium structure require an oxidative step.	Superoxide formation accelerates methylglyoxal formation in diabetes.
Protein glycation generates active centers for catalyzing one-electron oxidation-reduction reactions.	Free radicals catalyze N <sup>ε</sup> -(carboxymethyl) lysine (CML) formation & glycooxidation.
Glycated proteins provides stable active sites for catalyzing the formation of free radicals.	Mitochondrial superoxide initiates intracellular glycation.

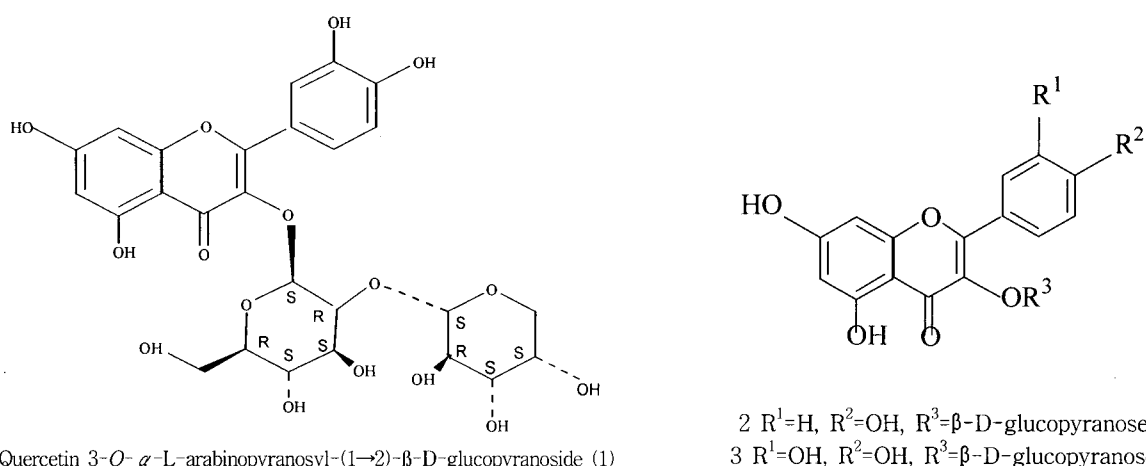


Fig. 2. Glycation inhibitors isolated from *E. ulmoides* leaves.

Table 2. Antiglycation activity<sup>1)</sup> of the isolated compounds and extracts from *E. ulmoides* leaves

Samples	Concentration (mg/mL)	Inhibition <sup>2)</sup> (%)	IC <sub>50</sub>	
			μg/mL	μM
1	0.05	20.0±3.4	17.6±2.4	29.5±3.4
	0.1	27.5±2.7		
	0.2	57.1±2.3		
2	0.05	16.3±1.9	21.8±3.3	48.6±3.4
	0.1	24.1±3.9		
	0.2	46.8±6.5		
3	0.05	24.1±1.8	14.9±1.8	32.0±3.4
	0.1	29.1±3.0		
	0.2	67.6±5.6		
E.U. leaves <sup>3)</sup>	0.05	31.3±1.8	162±2.3	-
	0.1	32.8±2.5		
	0.2	54.6±2.7		
Amino-guanidine <sup>4)</sup>	0.002	33.9±2.8	6.0±1.0	54.5±1.7
	0.02	57.3±3.0		
	0.2	82.7±6.4		

<sup>1)</sup>Measured by BSA-fructose assay (fructose-mediated development of fluorescence of AGE).

<sup>2)</sup>Inhibition at the given concentration and IC<sub>50</sub> values with standard deviation are from at least three independent experiment.

<sup>3)</sup>50% ethanol extract.

<sup>4)</sup>Positive control.

화 억제제인 aminoguanidine이 54.5 μM인데 비하여 1은 17.6 μM, 2는 21.8 μM, 3은 14.9 μM로서 aminoguanidine보다 낮았다(8). 즉 당화 억제 활성은 높았다. 후속 연구로서 두충엽 추출물 및 분리한 화합물을 대상으로 in vivo에서 당뇨 합병증 억제 활성이 입증되어야 할 것이다.

### 참고 문헌

- Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. 1992. Glycation and autoxidation of proteins in aging and diabetes. In *Hyperglycemia, Diabetes, and Vascular Disease*. Ruderman N, Williamson J, Brownlee M, eds. Oxford University Press, New York. p 197-217.
- Kinae N, Shimoi K, Masumori S, Harusawa M, Furugori M. 1994. Suppression of the formation of advanced glycosylation products by tea extracts. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*. Ho CT, ed. ACS Symposium Series 547, American Chemical Society, Washington DC. p 68-75.
- Oya T, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. *Biosci Biotech Biochem* 61: 263-266.
- Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. 2000. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem* 48: 180-185.
- Yen GC, Hsieh CL. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J Agric Food Chem* 46: 3952-3957.
- Hsieh CL, Yen GC. 2000. Antioxidant actions of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sciences* 66: 1387-1400.
- Kulomaa A, Siren H, Riekkola ML. 1997. Identification of antioxidative compounds in plant beverages by capillary electrophoresis with the marker index technique. *J Chromatography A* 781: 523-532.
- Kim HY, Moon BH, Lee HJ, Choi DH. 2004. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *J Ethnopharm* 93: 227-230.