

복합한약제제 KIOM-79의 STZ 유도 당뇨 모델에서의 최종당화산물 생성 및 Type IV Collagen 및 TGF-β1의 발현 억제 효과

김영숙 · 이윤미 · 김찬식 · 손은진 · 장대식 · 김진숙*

한국한의학연구원 한약제제연구부

Inhibitory Effect of KIOM-79, a New Herbal Prescription, on AGEs Formation and Expressions of Type IV Collagen and TGF-β1 in STZ-induced Diabetic Rats

Young Sook Kim, Yun Mee Lee, Chan-Sik Kim, Eun Jin Sohn, Dae Sik Jang, and Jin Sook Kim*

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

Abstract – Advanced glycation end products (AGEs) formation plays an important role in the progression of diabetic complications. To develop effective herbal formulations with suppression of diabetic nephropathy, a common complication in diabetic patients, we evaluated inhibitory activities of KIOM-79, a new herbal prescription, on the formation of AGEs using *in vitro* and *in vivo* model systems. Effects of KIOM-79 on the expression of AGEs, RAGEs (receptor for Advanced glycation end products), type IV collagen and renal TGF-β1 mRNA was also examined in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. STZ-induced diabetic rats were treated orally with KIOM-79 (250 and 500 kg⁻¹ once a day for 13 weeks). *In vitro* system KIOM-79 suppressed the formation of AGEs (18.12 μg/ml). In STZ-induced diabetic rats showing accumulation of AGE and RAGE, pathological examination revealed that KIOM-79 prevented AGE and RAGE deposition in the kidney. In STZ induced diabetic rats, the expansion of mesangial matrix and the glomerular tufts seemed to be larger than those in normal rats. However, after administration with KIOM-79, mesangial matrix and glomerular volume were decreased, and overexpression of type IV collagen was also decreased. Overexpression of renal TGF-β1 mRNA was inhibited significantly. These results suggest that the KIOM-79 might be an effective herbal prescription to prevent or alleviate the progression of diabetic nephropathy.

Key words – Advanced glycation end products (AGEs), renal TGF-β1 mRNA, diabetic complication, KIOM-79 (a new herbal prescription)

당뇨병을 한의학에서는 소갈(消渴), 소중(消中), 소신(消腎) 등으로 부르며, 상소(上消), 중소(中消), 하소(下消) 세 가지 증상으로 분류한다. 상소는 혀가 붉어지고 갈라지며 갈증이 몹시 나서 다식하며 격소(膈消)라고도 한다. 중소는 음식을 잘 먹으면서도 여위고 저절로 땀이 나며 대변이 굳고 잦은 소변 현상을 일으키는데, 단(癩)이라고도 한다. 하소는 번조(煩燥)하고 물을 쉼 없이 마시며 귀바퀴가 검게 되도록 마르며, 소변이 기름같고 허벅지와 무릎이 마르며 가늘어지는 증상으로 나타난다.¹⁾ 황제내경(黃帝內經)에서는 당뇨병을 심(心)이 폐(肺)에 한(寒)을 유발시켜 폐소(肺消)가 되어 당뇨를 일으켜 결국엔 사망에 이르게 하는 질병이라고 기록되

었다.²⁾ 허준(許浚)은 동의보감에서 당뇨합병증에 해당하는 소갈전변증(消渴傳變症)의 증세를 열기(熱氣)가 신체에서 순환되지 않고 경락(經絡)에 머물러 경락이 불리(不利)해지고 혈기(血氣)가 막히게 되어 응농(膿)이 생김으로 발생한다고 기록하였는데, 이는 서양의학적으로 혈관합병증과 동일하다. 이외에도 응저(癰疽), 실명(失明), 수병(水病) 등이 있으며 이러한 전변증을 불치병에 포함시킬 정도로 치료의 어려움을 파악하고 예방의 중요성을 강조하였다.¹⁾

단백질과 당은 정상 상태에서는 비효소 반응인 Millard 반응을 일으켜, schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리(amadori)형의 초기당화산물을 생성하는데, 여기까지의 반응은 가역적으로 일어나 그 농도가 조절이 된다. 그러나 고혈당 상태가 지속이 되면, 아마도리 산물이 분해되는 대신 재배열되어 최종당화산물(AGEs)이 생성된다. 최종당화산물

*교신저자(E-mail) : jskim@kiom.re.kr
(FAX) : 042-868-9471

은 세포외기질 단백질과의 교차결합, 세포 최종당화산물 수용체와의 반응 및 세포내 단백질 또는 핵산과의 최종당화산물을 형성하여 당뇨병성 합병증을 유발하는 것으로 알려졌다.³⁾ *In vitro*, *in vivo*에서 최종당화산물은 type IV collagen, laminin, fibronectin과 같이 수명이 긴 기질 단백질과 비가역적인 교차결합한다.⁴⁾ 정상적인 콜라겐의 교차결합은 N-과 C-말단의 특정한 부위에서만 일어나지만, 최종당화산물에 의한 콜라겐의 교차결합은 모든 부위에서 무작위로 일어난다. 이러한 비정상적인 교차결합은 조직에 변화를 주어 치명적인 합병증을 유발한다. 또한 혈당이 정상적으로 회복되었음에도 많은 당뇨병 환자가 합병증을 예방하지 못하고 실명, 신증, 뇌졸중, 사지절단 등 극심한 고통을 당하고 있는데, 이는 합병증 예방 또는 치료가 혈당 농도 조절만으로 가능하지 않고 이미 축적된 비가역적이고 장기간 생존하는 최종당화산물도 결정적인 역할을 함을 알 수 있다. 당뇨병 환자의 망막 capillary cell이나 신장에서 최종당화산물의 생성이 억제될 때, 당뇨병성 망막병증이나 당뇨병성 신증으로의 진전이 예방되었음이 보고되었다.⁵⁾

당뇨처방의 구성 한약재 약 90여종의 최종당화산물 생성 억제 효능 검증⁶⁾과 한의학적인 원리를 토대로,⁷⁾ 네 가지 한약재인 초갈근, 강후박, 감초, 대극을 혼합하여 한방제제(KIOM-79)를 구성하였다. 본 연구진은 기초연구로 KIOM-79가 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 억제함으로써 항염증 효능이 있음을 보고하였고,⁸⁾ KIOM-79의 구성 한약재 중의 하나인 강후박의 최종당화산물 생성 억제효능을 보고한 바 있다.⁹⁾ 당뇨 합병증 예방을 위한 선도 또는 후보 복합한약제제의 도출을 위하여 본 연구에서는 KIOM-79의 최종당화산물의 생성 및 이로 인한 당뇨병성 신증 억제 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 제조 - 본 실험에 사용한 갈근(*Puerariae radix*; *Pueraria lobata* Ohwi), 감초(*Glycyrrhizae radix*; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch), 후박(*Magnoliae cortex*; *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.), 대극(*Euphorbiae radix*; *Euphorbia pkinensis* Ruprecht)를 대전 소재 백제한약상에서 구입하였으며 전문가의 감정을 거친 후 실험재료로 사용하였으며 증거 표본은 한국한의학연구원 한약제제 연구부의 표본실에 보관 중이다.

초갈근은 갈근(100 g)을 75°C에서 45분간 초(炒)하였고,¹⁰⁾ 강후박은 후박 100 g에 생강(*Zingiberis rhizoma*) 3 g과 물 500 ml 가하고 60분간 70~80°C에서 끓인 후 자연 건조하였다.¹¹⁾ 네 가지 한약재들을 동일한 비율로 혼합하여 세절하고 80% 에탄올에 추출, 감압농축, 동결건조하였다(수득율: 18.1%).

검체의 HPLC 분석 - 대한약전에 갈근, 후박, 감초의 지표물질로 각각 puerarin, magnolol, glycyrrhizin으로 지정되었다. 표준물질들은 WAKO사(Japan)에서 구입하였으며 KIOM-79 추출물에서 각각의 지표물질의 함량을 HPLC(TSP, USA)로 분석하였다. 이동상은 AcCN-6.7% AcOH-H₂O=12:0:88(8분) → 50:0:50(8.9분) → 40:60:0(20분) → 50:50:0(40분)의 gradient였으며, 고정상은 protosil Eurobond Rp₁₈(4.63×250 mm)이며 유속은 분당 1 ml이고 UV 254 nm에서 검색하였다.

***In vitro*에서 최종당화산물 생성억제 효능** - 전보에 보고한 방법대로,⁹⁾ 10 mg/ml의 우혈청 알부민(bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹이고, 0.1 M fructose와 glucose 혼합액을 넣었다. 또한 장기간 배양 시 우려되는 박테리아의 생성을 방지하기 위하여 0.02% sodium azide를 첨가하였다. 30 일간 배양 후 spectrofluorometer (Shimazu, Japan)를 이용하여 형광도를 측정하였다(Ex: 350, Em: 450 nm). *In vitro* 실험에서 최종당화산물 생성억제 표준물질인 아미노구아니딘(aminoguanidine)을 양성대조군으로는 선택하여 비교하였다.

실험동물 - 실험동물은 오리엔트(주)로부터 체중 250~300 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 공급받아, 온도 23±1°C, 상대습도 55±15% 및 300~500 Lux의 조도로 12시간 간격으로 명암이 조절되는 동물실에서 고형사료(삼양사)와 물을 자유롭게 섭취시켰으며, 일주일 순화한 후 실험을 시작하였다. 순화기간 중 건강하다고 판정되는 동물들을 균간 균등하게 10마리 씩 분배하였다.

당뇨유발 - Streptozotocine (STZ, Sigma, St Louis, MO, USA)을 0.01 M citrate buffer (pH 4.5)에 투여 직전 녹여 60 mg/kg 체중용량으로 단회 투여하여 당뇨를 유발하였다. 투여 전 12시간 이상 금식을 시켰으며, STZ 투여 3일 후 꼬리정맥으로부터 혈액을 취하여 혈당이 300 mg/dl 이상인 것을 당뇨쥐로 택하였다. 한약재는 250 및 500 mg/kg 체중용량으로, 양성대조약물인 epalrestat는 25 mg/kg 체중용량으로 1% CMC(carboxymethylcellulose)에 녹여 1일 1회 13주간 경구투여하였다. 정상군은 날마다 1% CMC를 경구투여하였다. 당뇨유발 확인 후부터 13주간 검체를 각각 경구투여하였다.

독성실험 - 정상 쥐에 KIOM-79 1000 mg/kg를 13주 동안 투여하면서 동물 상태를 관찰하였고, 부검 후에는 장기 무게, 혈당, BUN, triglyceride, 총 cholesterol 및 creatinine 등을 비교분석하였다.

***In vivo*에서 최종당화산물 생성억제 효능** - 동물 부검 시 차가운 생리식염수로 신장 관류한 후 신장 피질(kidney cortex)를 작은 조각으로 자른 후, 차가운 PBS(pH 7.4)로 세척하고, 클로로포름과 메탄올 혼합액(1:1)에서 하루밤동안 잔잔

하게 흔들어 주었다. 그 후 메탄올과 증류수 순으로 세척하고, 균질화한 후, 4°C에서 15분간 원심분리하고 (8,000 g) 상등액의 형광을 측정하였다(Ex: 365 nm, Em: 450 nm).¹²⁾

RT-PCR에 의한 신장피질의 TGF-β1 mRNA 분석 – TGF-β1과 β-actin cDNA는 0.5 units의 reverse transcriptase가 들어있는 Accupower RT premix (Bioneer, Korea) 및 Taq polymerase를 사용하여 증폭하였다(TAKARA, Japan). 각각의 primer pairs 및 internal standard로 사용한 β-actin는 다음과 같다. TGF-β1 (409 bp): 5'-CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC-3' (sense), 5'-CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC-3' (antisense) β-Actin (365 bp): 5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AA-3' (sense), 5'-AGC CAT GCC AAA TGT GTC AT-3' (antisense). 증폭된 PCR product는 1.5% agarose gel로 분리한 후, 분석된 band의 강도는 densitometer software (Scion image)로 측정하였다.

조직병리학적 검사 – 신장을 적출한 후 4% paraformaldehyde에서 24시간 고정하고, 수세 과정과 탈수 과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직은 5 μm의 절편을 제작한 후, 헤마톡실린-에오신으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한, 면역화학 실험을 위하여 항체로는 type IV collagen (Santa Cruz, USA), RAGE(Santa Cruz, USA), AGE(6D12, TransGenic Inc., USA)를 사용하였다. 면역조직화학적 염색은 labeled streptoavidin biotin (LSAB) kit (Dako)를 이용

하였다. 탈파라핀 과정을 거친 절편은 내인성 peroxidase의 활성을 제거하기 위해 3% H₂O₂ 용액에 10분간 반응시킨 후, Tris-Tween buffered saline (TTBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 정상 말 혈청에 30분간 반응시켜 비특이적 반응을 제거한 후, 1차 항체인 type IV collagen(1:200), RAGE(1:200), AGE(1:200)을 실온에서 15분~1시간 반응시켰다. 항체반응 후, TTBS로 세척하고 biotinylated link 항체와 peroxidase conjugated streptoavidin에서 각각 10분간 처리하였다. 모든 반응 후에는 TTBS로 씻어내고, diaminobenzine (DAB)용액으로 발색시켜 광학현미경 하에서 관찰하였다.

통계학적 처리 – 모든 결과는 Graph Pad Prism 4.0 (Graph pad, San Diego, CA)의 ANOVA one-way와 Tukey's multiple comparison test로 분석하였으며, p<0.05인 경우 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

KIOM-79 중의 지표물질의 HPLC 분석 – Puerarin, glycyrrhizine, magnolol의 회귀방정식은 각각 $y=66714401.22X - 33403.96$ ($r^2=0.9999$), $y=17123898.00X - 33754.67$ ($r^2=0.9999$), $y=11169997.02X + 8747.67$ ($r^2=0.9999$)이며, HPLC chromatogram에서 각각의 피크는 9.4분대, 18.2분대, 38.5분대에 나타났다. 함량은 $2.65 \pm 0.14\%$, $1.94 \pm 0.12\%$, $1.36 \pm 0.05\%$ 로 나타났다(Table I, Fig. 1).

Table I. Regression equation of the Standard compounds and contents (%) of KIOM-79

Standard Compound	Regression Equation	Contents (%)
Puerarin	$y = 66714401.22x - 33403.96$ ($r^2 = 0.9999$)	2.65 ± 0.14
Glycyrrhizine	$y = 17123898.00x - 33754.67$ ($r^2 = 0.9999$)	1.94 ± 0.12
Magnolol	$y = 11169997.02x + 8747.67$ ($r^2 = 0.9999$)	1.36 ± 0.05

The HPLC condition was the same as in Fig. 1. Values are expressed as mean±S.D. of triplicate analyses.

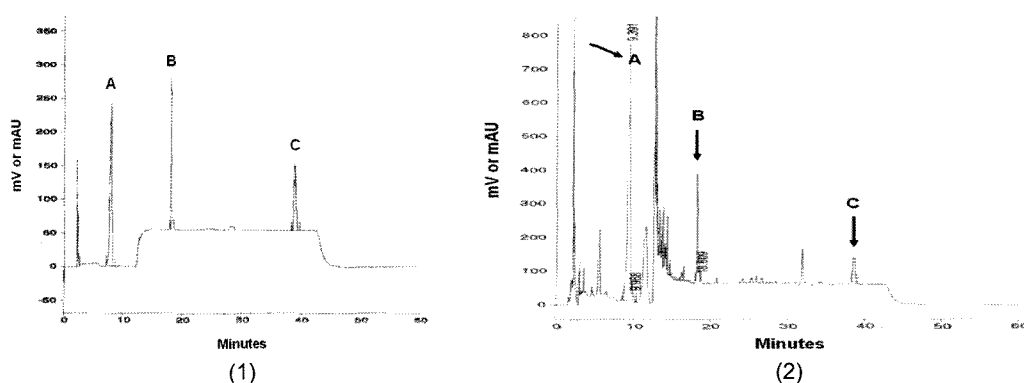


Fig. 1. HPLC Chromatogram of standard compounds (1) and KIOM-79 (2). The peaks of puerarin (A), glycyrrhizine (B), and magnolol (C) were appeared at retention times of 9.39, 18.24, and 38.54 min, respectively. The HPLC condition: column; prontosil Eurobond Rp₁₈ (4.63×250 mm), gradient mobile phase; AcCN-6.7% AcOH-H₂O (12:0:88/8.8 min)→(50:0:50/8.9 min.)→(40:60:0/20 min.)→(50:50:0/40 min.); flow rate; 1 ml/min, detection; UV 254 nm.

Table II. Inhibitory effect on AGEs formation

Herbal medicine	Concentration (µg/ml)	Inhibitory effect	
		Inhibitory effect (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
대극	50	9.91±1.55	88.10
	75	37.16±1.33	
	100	64.40±4.27	
강후박	5.0	30.82±2.36	29.46
	25	45.61±2.11	
	50	70.25±3.66	
초갈근	25	42.70±16.06	31.89
	50	69.19±14.61	
	75	95.68±9.56	
감초	100	35.15±3.90	120.20
	200	92.73±1.09	
	250	97.18±0.01	
KIOM-79	5.0	23.25±0.70	18.12
	10	45.00±1.40	
	25	63.55±2.23	
	50	93.28±5.19	
아미노구아니딘	18.5	45.78±2.40	26.00
	37.0	55.43±4.00	
	55.5	73.52±1.75	

Results are expressed as mean±S.D. (n=4).

In vitro에서 최종당화산물 생성 억제 효능 - 개별 한약재 인 대극(IC₅₀ 값: 88.10 µg/ml), 강후박(IC₅₀ 값: 29.46 µg/ml), 초갈근(IC₅₀ 값: 31.89 µg/ml) 및 감초(IC₅₀ 값: 120.20 µg/ml)보다 복합한약제제의 효능(IC₅₀ 값: 18.12 µg/ml)은 더 우수하였고, 또한 양성대조군인 아미노구아니딘보다 우수하였다(Table II).

신장피질에서 최종당화산물 생성 억제 효능 - 당뇨유발군의 경우 정상군(5.95±0.78 AU)에 비하여 최종당화산물이 현저하게 증가하였으며(11.00±0.73 AU, P<0.001), 500 mg/kg 용량투여군에서는 유의성 있게 감소하였다(8.67±0.71 AU, p<0.05). 250 mg/kg 투여군과 epalrestat 25 mg/kg 용량투여군에서는 감소하는 경향을 보였다(10.56±0.87 AU, 9.00±0.87) (Fig. 2).

RT-PCR에 의한 신장 피질의 TGF-β1 mRNA 과발현 억제 효능 - Renal TGF-β1 mRNA의 발현이 당뇨유발쥐에서 현저하게 증가하였으며, KIOM-79의 투여로 유의성 있게 감소하였다(p<0.01) (Fig. 3).

독성실험 - 13주 투여 기간 동안 한 마리도 사망하지 않았으며, 정상군의 체중이 252.83 g 증가한 것 같이 KIOM-79 투여군도 정상적인 증가를 보였다(248.35 g). 부검 시 이상소견을 관찰할 수 없었고, 심장, 간, 비장, 폐, 신장의 무게가 정상군과 별 다른 차이를 보이지 않았다. Glucose, BUN,

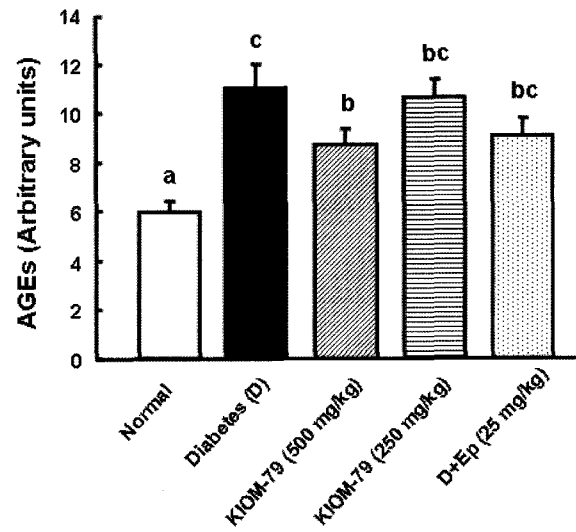


Fig. 2. Inhibitory effect of KIOM-79 on AGEs formation in kidney cortex of the STZ-induced diabetic SD rats. Ep means epalrestat, positive control. Values with different letter are significantly different at p<0.05.

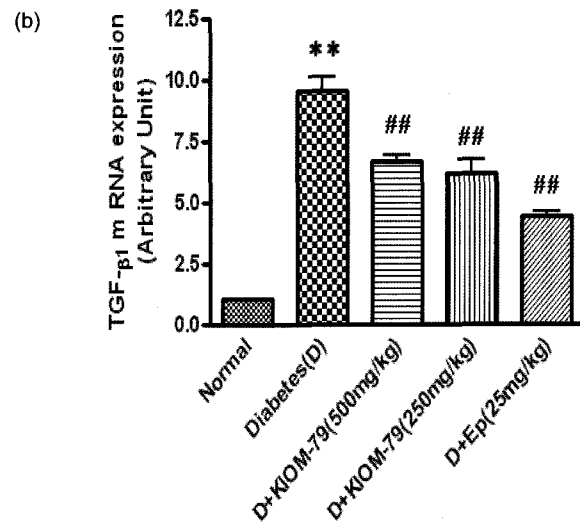
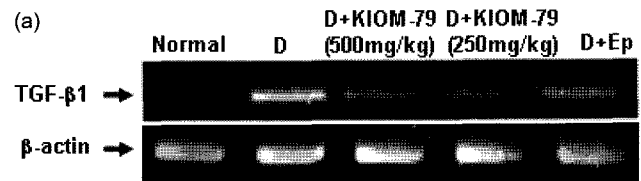


Fig. 3. Expression of TGF-β1 mRNA in the kidney cortex of diabetic rats with KIOM-79. The bar graph (Fig. 3a) shows the relative density (TGF-β1 mRNA/β-actin mRNA). *P<0.001 versus normal group ##P<0.01 versus diabetic group. Values are expressed as mean±S.E. (n=4).

T.G, T-cholesterol, creatinine 및 protein의 함량도 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table III).

Table III. Body weight changes, organ weight, and plasma biochemical factor of normal group and normal group treated with KIOM-79

	Body Weight (g)			Organ Weight (g)				Plasma Biochemical Factor			
	Normal	Normal + KIOM-79		Normal		Normal+KIOM-79		Normal	Normal + KIOM-79	Normal	Normal + KIOM-79
				Absolute weight	Relative weight	Absolute weight	Relative weight				
Initial	209.26 ±28.94	208.78 ±19.34	Heart	1.16 ±0.07	0.25 ±0.02	1.22 ±0.08	0.27 ±0.02	Glucose (mg/dl)	124.93 ±16.25	116.00 ±67.83	
Final	462.09 ±32.91	457.13 ±28.52	Liver	10.60 ±0.72	2.30 ±0.12	11.03 ±0.77	2.40 ±0.13	BUN (mg/dl)	15.12 ±0.54	18.66 ±1.15	
Gain	252.83	248.35	Spleen	0.79 ±0.10	0.17 ±0.02	0.82 ±0.08	0.18 ±0.02	T.G (mg/dl)	33.38 ±6.62	33.08 ±9.28	
			Lung	1.84 ±0.23	0.40 ±0.04	2.00 ±0.13	0.44 ±0.03	T-cholesterol (mg/dl)	63.73 ±11.05	62.64 ±13.19	
			Kidney	2.65 ±0.18	0.58 ±0.04	2.78 ±0.10	0.61 ±0.02	Creatinine (mg/dl)	1.54 ±0.08	1.65 ±0.06	
							Protein (ug/ul)	12.63 ±0.28	14.05 ±1.11		

Relative weight of organs was calculated per 100 g body weight. Results are presented as mean±S.D. (n=10).

조직병리적 검사 - 당뇨유발군의 신사구체에서 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 비후(Fig. 4B)가 나타났고, 250 mg/kg와 500 mg/kg KIOM-79 투여군은 당뇨유발군에 비하여 그 진행정도가 억제되었다(Fig. 4C, 4D). 세포외 기질을 형성하는 주요 단백질인 type IV collagen(Fig. 4G)은 당뇨유발군에서 신사구체내에서 과도하게 축적되었고, 약물 투여로 당뇨유발군에 비하여 type IV collagen 축적이 억제되었다(Fig. 4H, 4I). 최종당화 산물인 AGE는 당뇨유발군의 신세뇨관 보다 사구체 내부에 축적되어졌으며, 약물 투여로 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 4K~J). 반면, RAGE는 당뇨유발군에서 신사구체 보다는 세뇨관에서 증가되며(Fig. 4Q), 약물 투여군에서 억제되는 경향을 보였다(Fig. 4R~T).

고찰

2000년 전세계 당뇨병 인구는 약 1억7천6백52만 명이었고, 2030년에는 약 3억7천만 명으로 증가할 것이라고 WHO는 예상하였으며, 특히 산업화된 국가의 경우 인구의 10%가 당뇨병 관련환자이다. 한국의 경우 전반적으로 삶의 질의 향상되고, 수명연장 및 식생활의 서구화로 당뇨병 유병률이 7~8%로 증가하고 있는 추세이다.¹³⁾ 그러나 아직 당뇨완치제가 개발되지 않았기 때문에 당뇨병 유병률의 증가는 곧 당뇨합병증 증가로도 볼 수 있을 것이다. 본 연구 대상인 KIOM-79에 포함되어 있는 갈근, 후박은 소갈에 빈번하게 사용하는 본초이다. 갈근은 생진지갈(生進止渴)의 효능이 있어 소갈을 치료하고,¹⁴⁾ STZ와 hydrogen peroxide에 의한 산화스트레스에 대한 예방효능이 보고되었고,¹⁵⁾ 갈근의

지표성분인 puerarin의 고혈당 저하 효능에 대하여 보고되었다.¹⁶⁾ 후박은 행기화습(行氣火濕)의 효능으로 중초를 치료한다.¹⁷⁾ 대극은 수종과 옹저 치료 효과가 있다.¹⁸⁾ 아시아산 대극 속의 약재의 당뇨 관련 연구는 아직 발표되지 않았으나, 멕시코에서는 당뇨 치료제로 민간에서 사용되었음이 보고되었으며, 토끼에서의 내당능 효능이 보고 되었다.¹⁹⁾ 감초는 내당능 효능과 aldose reductase 저해능이 우수함이 보고되었으며,^{20,21)} 특히 한의학적으로 약성이 평화(平和)하여 12 경락을 다 통과하여 가승가강(可勝可降), 능화능완(能和能緩)하여 약성을 조화(調和藥性)시키는 것을 고려하여 선택하였다.²²⁾ 한방에서는 후박은 생강으로 수치하고, 갈근은 초(炒)하여 사용하는 것을 감안하여 수치하여 사용하였다. 최종당화산물 생성 억제 효능은 개별 한약재 보다 복합한약제제가 더 우수하였는데, 이는 4종의 한약재들의 상호 작용에 의해서 증강되었으리라 생각된다. 또한 갈근, 후박, 감초의 지표물질로서 puerarin, magnolol, glycyrrhizin으로 대학 약전에 규정되었으며, KIOM-79에서의 함량을 HPLC로 분석한 결과 각각 2.65±0.14%, 1.36±0.05%, 1.94±0.12%이었다(Table I).

최종당화산물은 TGF-β와 같은 여러종류의 사이토카인을 과발현하여 합병증을 유발하는데,²³⁾ STZ 유도 당뇨병 쥐에서 최종당화산물에 의한 TGF-β 과발현에 대한 영향이 보고되었다.²⁴⁾ TGF-β는 prosclerotic cytokine으로 fibronectin, proteoglycan과 같은 collagen matrix component 합성을 촉진한다.²⁵⁾ 또한 신사구체에서는 최종당화산물이 TGF-β mRNA와 단백질 및 세포외기질 성분을 활성화하여 합병증을 유발한다. 본 동물실험에서 KIOM-79가 신장에서 최종당화산물

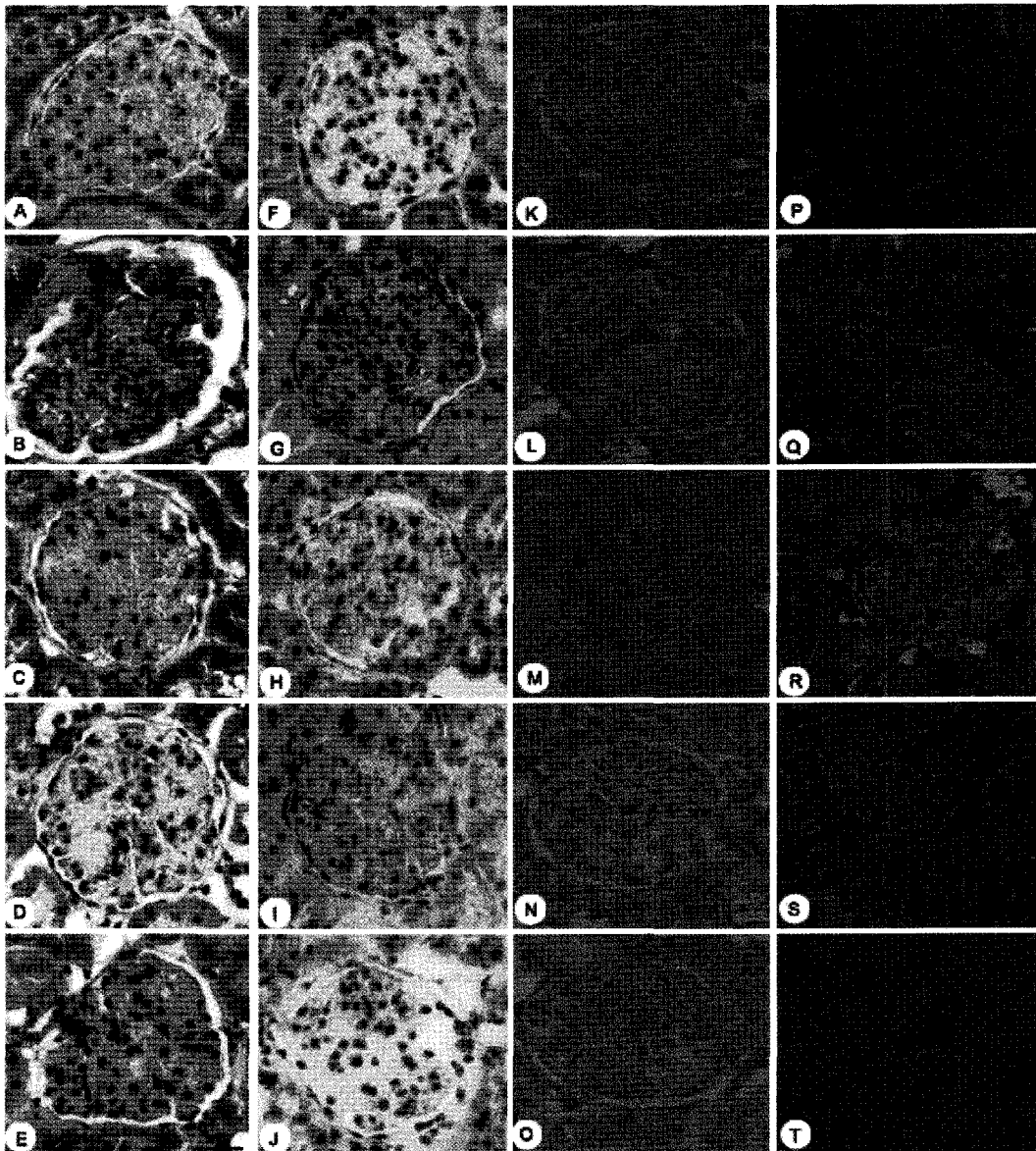


Fig. 4. Pathological Changes of the Kidney.

Representative PAS staining (A-E) in renal tissues and immunostaining of type IV collagen (F-J), AGE (K-O) and Receptor for AGE (P-T) in renal tissues at the age of 13 weeks. Control: A, F, K, P, STZ-induced-rat: B, G, L, Q, STZ-rat treated with KIOM-79 (500 mg/kg): C, H, M, R, STZ-rat treated with KIOM-79 (250 mg/kg): D, I, N, S, STZ-rat treated with Epalrestat (25 mg/kg): E, J, O, T. Original magnification $\times 400$ in A-O and $\times 200$ in P-T.

생성을 유의성있게 억제하여(Fig. 2), renal TGF- $\beta 1$ mRNA의 발현이 억제시킴을 나타내었다(Fig. 2, 3). 약물투여군의 AGE, RAGE 염색 결과도 당뇨유발군에 비하여 감소하였다(Fig. 5). 신장조직의 면역염색 결과 당뇨유발군은 세포외 기질의 비후가 현저하게 진행되었으나, KIOM-79 투여군은 당뇨유발군에 비하여 그 진행 정도가 현저하게 억제 되었으며(Fig. 4C-E), type IV collagen 축적 또한 당뇨유발군에 비하여 축적이 억제되었다(Fig. 4H-J). 대조약물인 Epalrestat는 최종당화산물의 혈중 농도를 저하시킴으로 당뇨합병증

을 예방한다고 보고되었다.²⁶⁾ 이상의 결과를 토대로 epalrestat를 본 실험의 양성대조군으로 사용하여 KIOM-79의 효능을 비교하였다. Ishii 연구팀은 epalrestat이 신장의 mesangial cell에서 고혈당으로 유도된 TGF- $\beta 1$ 의 발현을 저해함을 보고하였으며,²⁷⁾ 본 실험에서도 epalrestat 투여군이 TGF- $\beta 1$ mRNA의 과도한 발현을 예방하였다(Fig. 3).

KIOM-79를 13주간 체중 kg당 1g를 투여한 결과를 통하여 독성이 없음을 알 수 있으며, 유전독성 실험 결과도 독성이 없는 것으로 판명되었다(미발표). 이상의 결과를 통하

여 KIOM-79가 치료작용 이외의 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

결론적으로, KIOM-79는 신장의 비후 억제, AGE 생성 저해, TGF- β 1 mRNA와 type IV collagen의 발현 저해를 통하여 당뇨병성 신증의 진행을 저해하는 효능을 지니는 한약제제로서 가치가 있을 것으로 여겨진다.

사 사

이 연구는 과학기술부 특정연구개발과제(M 10413010001)와 한국한의학연구원 일반사업비(L06010)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- 대역동의보감 (對譯東醫寶鑑) (1999) 1337. 범인문화사, 서울.
- 배병철 (1999) 금석 황제 내경 소문, 제 37, 370, 성보사, 서울.
- LeRoith, D. and Taylor, S.I. (2003) Diabetes mellitus a Fundamental and clinical text. In Hofmann, S. and Brownlee, M.(ed.), Biochemistry and molecular cell biology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism, 1444, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Edelstein, D. and Brownlee, M. (1992) Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* 41: 26-29.
- Kowluru, R.A. (2005) Effect of advanced glycation end products on accelerated apoptosis of retinal capillary cells under *in vitro* condition. *Life Science* 76: 1051-1060.
- Jang, D.S., Lee, Y.M., Kim, Y.S. and Kim, J.S. (2006) Screening of Korean Traditional Herbal Medicines with inhibitory activity on Advanced Glycation End Products (AGEs) Formation. *Kor. J. Pharmacogn.* 37: 48-52.
- 김호철 (2001) 한약약리학, 434. 집문당, 서울.
- Jeon, Y.J., Li, M.H., Lee, K.Y., Kim, J.S., You, H.J., Lee, S.K., Sohn, H.M., Choi, S.J., Koh, J.W. and Chang, I.Y. (2006) KIOM-79 inhibits LPS-induced iNOS gene expression by blocking NF- κ B/Rel and p38 kinase in murine macrophages. *J. of Ethnopharmacology*, accepted.
- Kim, J.S., Kim, H.Y. and Ko, J.H. (2002) Studies om 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 Magnoliae Bark-. *Kor. J. Pharmacogn.* 33: 308-311.
- Lee, J.Y. and Kang, B.S. (1994) Processing of herb medicines and clinical application, 124. Younglim publishes Co., Seoul.
- Lee, J.Y. and Kang, B.S. (1994) Processing of herb medicines and clinical application, 136. Younglim publishes Co., Seoul.
- Abiko, T.A., Abiko, S., Ishiko, M., Takeda, M., Horiuchi, S. and Yoshida, A. (1999) A Relationship between autofluorescence and advanced glycation end products in diabetic lenses. *Exp. Eye Res.* 68: 361-366.
- Park, Y., Lee, H., Koh, C.S., Min, H., Yoo, K., Kim, Y. and Shin, Y. (1995) Prevalence of diabetes and IGT in Yonchon county, South Korea. *Diabetes care* 18: 545-548.
- 김호철 (2001) 한약약리학, 92. 집문당, 서울.
- Kang, K.A., Chae, S., Koh, Y.S., Kim, J.S., Lee, J.H., You, H.J. and Hyun, J.W. (2005) Protective effect of puerariae radix on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1154-1160.
- Chen, W.C., Hayakawa, S., Yamamoto, T., Su, H.C. and Cheng, I.M. (2004) Mediation of beta-endorphin by the isoflavone puerarin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* 70: 113-116.
- 김호철 (2001) 한약약리학, 211. 집문당, 서울.
- 김호철 (2001) 한약약리학, 181. 집문당, 서울.
- Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, CC. and Flores-Saenz, J.L. (1998) Study of anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. of Ethnopharmacology* 61: 101-110.
- Chizuko, H., Kanji, Y. and Toshihide, Y. (2004) Efficacy of bofu-tsusho-san, an oriental herbal medicine, in obese Japanese women with impaired glucose tolerance. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31: 614-619.
- Aida, K., Tawata, M., Shindo, H., Onaya, T., Sasaki, T., Yamaguchi, T., Chin, T. and Mitsuhashi, H. (1990) Isoliquiritigenin: a new aldose reductase inhibitor from glycyrrhizae radix. *Planta Med.* 56: 254-258.
- 김호철 (2001) 한약약리학, 434. 집문당, 서울.
- Cooper, M.E. (2000) Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 44: 1957-1972.
- Rumble, J.R., Cooper, M.E., Soulis, Cox, T., Wu, A.L. and Youssef, S., Jasik, M., Jerums, G. and Gibert, R.E. (1997) Vascular hypertrophy in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.* 99: 1016-1027.
- Sharma, K. and Ziyadeh, F.N. (1995) Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 44: 1139-1146.
- Nakamura, N., Yamazaki, K., Satoh, A., Urakaza, M., Kobayashi, M., Yamabe, H., Osawa, H., Shirato, K., Sugawara, T., Nakamura, M., Tamura, M. and Okumura, K. (2003) Effects of epalrestat on plasma levels of advanced glycation end products in patients with type 2 diabetes. *In Vivo* 17: 177-180.
- Ishii, H., Tada, H. and Isogai, S. (1998) An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor-beta and protein kinase C activity in cultured mesangial cells. *Diabetologia* 41: 362-364.

(2006년 5월 2일 접수)