

해당근 추출물의 항산화 활성 및 최종당화산물에 의한 혈관내피세포 기능장애 억제활성

남미현 · 이현순¹ · 홍충의 · 구윤창 · 서문영² · 이광원*
고려대학교 생명공학부, ¹고려대학교 보건과학연구소, ²(주)바이오버드

Preventive Effects of *Rosa rugosa* Root Extract on Advanced Glycation End product-Induced Endothelial Dysfunction

Mi-Hyun Nam, Hyun-Sun Lee¹, Chung-Oui Hong, Yoon-Chang Koo, Young Seomun², and Kwang-Won Lee*

Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Science & Biotechnology, Korea University

¹Institute of Life Science and Natural Resource, Korea University

²BioBud Inc.

Abstract *Rosa rugosa* has traditionally been used as a folk remedy for diabetes. The objective of this study was therefore to demonstrate the inhibition of endothelial dysfunction activities through antioxidants and the anti-glycation of *Rosa rugosa* roots. Dried roots of *Rosa rugosa* were boiled in methanol for three hours, evaporated and lyophilized with a freeze-dryer. The methanolic extract of *Rosa rugosa* roots (RRE) was tested for antioxidant activities by measuring total polyphenol (TP) content, flavonoid content, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical-scavenging activity (DPPH) assay, and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay. The total TP content, flavonoid content, FRAP value, and DPPH-SC₅₀ are 345.2 µg gallic acid equivalents/mg dry matter (DM), 128.1 µg quercetin equivalents/mg DM, 2.2 mM FeSO₄/mg DM and 34.2 µg DM/mL, respectively. Treatment of RRE significantly lowered fluorescent formation due to advanced glycation reaction. In addition, reactive oxygen species (ROS) scavenging assay, monocyte adherent assay and transendothelial electrical resistance (TEER) assay were performed to investigate the possibility that RRE improves endothelial dysfunction-induced diabetic complications. The adhesion of THP-1 to treated HUVEC with RRE (100 µg/mL; 33% and 500 µg/mL; 75%) was significantly reduced compared to HUVEC stimulated by glyceraldehydes-AGEs (advanced glycation end product). The TEER value (88 Ω·cm²) of stimulated HUVEC by glyceraldehydes-AGEs was reduced compared to non-stimulation (113 Ω·cm²). However, normalization with RRE increased endothelial permeability in a dose-dependent manner (100 µg/mL; 102 Ω·cm² and 500 µg/mL; 106 Ω·cm²). Thus, these results suggest that *Rosa rugosa* roots could be a novel candidate for the prevention of diabetic complications through antioxidants and inhibition of advanced glycation end product formation.

Key words: *Rosa rugosa* root, antioxidant activities, endothelial dysfunction, monocyte adherent assay, TEER, advanced glycation end product

서 론

과거 당뇨병은 “luxury disease”라고 알려져 왔지만 현재에는 서구화된 식생활, 비만, 운동부족, 스트레스 등 생활습관에 의해 영향을 받는 생활습관성 질환으로 알려져 있다(1). 세계보건기구에 따르면 전 세계에서 최소 20명당 1명이 당뇨병으로 사망하고 있으며 국내에서도 경제적인 발전으로 과식, 운동부족, 스트레스 증가 등으로 인하여 당뇨병 인구가 급속히 늘고 있다. 당뇨 환자의 가장 큰 문제는 고혈당으로 인한 합병증이다. 당뇨합병증은 눈,

신경, 신장 등에서 장애를 초래할 수 있으며(2) 특히 동맥경화증은 당뇨병 환자의 사망률 증가에 가장 큰 원인으로 보고되었다(3,4).

고혈당에 의한 당뇨합병증의 기작은 정확하게 규명되지 않았으나, 가장 대표적인 기전으로는 i) aldose reductase에 의한 ROS 증가와 GSH의 감소를 유발시키는 polyol pathway, ii) diacylglycerol의 합성 증가에 의해 cytokine들의 발현을 유발하는 protein kinase C (PKC) pathway, iii) uridine diphosphate N-acetyl glucosamine의 증가에 의한 transforming factor들의 발현의 증가로 hexosamine pathway, 마지막으로 iv) advanced glycation end products (AGEs) pathway 등이 있다(5). 마이알 반응(Maillard reaction)으로도 알려져 있는 glycation은 당이나 카보닐 화합물이 단백질이나 지질과 비효소적 반응을 함으로써 최종적으로 여러 가지 최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)을 생성하게 된다. 초기 이 반응은 단순히 식품화학적 측면에서 중요시 되었지만 최근에는 노화, 당뇨합병증, 알츠하이머, 동맥경화와 같은 질병의 원인 물질로 중요시 되고 있다(6,7). 당뇨합병증의 대표적인 질병인 동맥경화증의 초기반응은 혈관내피 장애로서 혈

*Corresponding author: Kwang-Won Lee, Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Science & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
Tel: 82-2-3290-3027
FAX: 82-2-927-1970
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Received October 16, 2009; revised January 19, 2010;
accepted January 20, 2010

중의 단백질이 AGEs의 자극에 의해 혈관내피세포에 부착되고, 연결 부위를 침투하는 것으로 시작된다. 이는 결과적으로 동맥 내경이 좁아지고 혈류의 장애가 오게 되어 협심증, 심근경색, 뇌졸중 등의 심각한 심혈관계 장애를 초래할 수도 있다(8,9). 심혈관계 질환을 앓고 있는 제 2형 당뇨병 환자의 경우 혈관 내에 정상인보다 높은 농도의 AGEs가 관찰되었다(3). 이는 AGEs가 세포의 내 외부에 축적되면 당뇨병합병증의 초기 단계가 시작된다(10). 또한 AGEs는 세포막의 특정 단백질과 반응하고 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 촉진시켜 다양한 cytokine의 발현을 증가시켜 세포의 손상을 유발시킨다(11). ROS에 의해 증가된 cytokine들은 혈중에 존재하는 단백질의 동맥 내피에 부착을 유발한다(12). 특히 ROS는 AGEs 뿐만이 아니라 당뇨병합병증의 다른 기전 중에 하나인 polyol pathway 및 PKC pathway에 의해서도 생성된다고 보고되었으며(5), 최근에는 고혈당에 의해 유도된 ROS가 당뇨병성 혈관 합병증에 중요한 인자로 지적되고 있다(13).

해당화(*Rosa rugosa* Thunb.)는 예로부터 우리나라의 해안가에서 널리 볼 수 있는 낙엽 활엽관목이며, 장미과에 속하는 야생화이다. 매괴화로도 불리는 국내 자생 식물로 해당화는 당뇨에 효과가 있다고 보고되어 있으며(14) 민간에서는 해당화 뿌리가 고혈당증에 유효하다고 알려져 널리 사용되고 있다(15). 해당화 뿌리의 추출물은 고중성지방혈증 강화 및 간세포 보호 효과를 가질 뿐만 아니라, 독성이 매우 약하여 인체에 안전한 생약 추출물로 알려져 있다(15). 그 동안 민간에서 널리 사용되어 온 해당화의 혈당조절 능력이나 항산화 활성은 보고되어 있으나(16), 당뇨병의 가장 위험요소인 당뇨병합병증 억제 효능에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 항산화 작용을 통한 ROS 제거와 AGEs 생성 저해에 따른 초기 동맥경화증에 대한 억제 효과에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

재료

해당근은 2008년 강원도에서 재배된 것을 경동시장에서 구입하여 자연건조시킨 뒤 분쇄하여 사용하였고, 혈관내피세포 human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)은 (주)Biobud(Seoul, Korea)에서 primary culture된 것을 구입하여 사용하였으며, Human monocytic cell line인 THP-1은 (주)한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 실험에 사용된 시약의 경우 dimethyl sulfoxide(DMSO), quercetin dehydrate, gallic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2',7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), bovine serum albumin(BSA), glyceraldehyde, diethylenetriamine pentaacetic acid(DTPA), aminoguanidine, 2,7-Bis(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl-ester (BCECF-AM)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 소혈청(FBS, fetal bovine serum)과 항생제인 penicillin-streptomycin, RPMI 1640 배지는 Gibco사(Grand Island, NY, USA), endothelial cell basal medium-2(EBM-2) bullet kit는 Clonetics(San Diego, CA, USA) 제품을 이용하였으며, 그 이외의 것은 특급으로 사용하였다.

해당근 추출물의 제조 및 주요 성분 분석

해당근 메탄올 추출물은 건조한 해당근 약 300 g을 메탄올 3 L에 넣고 3시간 동안 환류 추출한 후 여과(Whatman No 41,

Table 1. Analytical HPLC conditions

Apparatus	: Varian Pro Star (model 210)
Detector	: Varian Pro Star (model 335)
Column	: Waters XTerra® RP ₁₈ 5 μm (3.9×150 mm, Analytical column)
Mobile phase	: 20%→100% MeOH (linear gradient elution)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Injection volume	: 20 μL

Maidstone, England)하여 농축 및 동결건조하여 제조하였고, 실험에 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였으며, 사용시에는 DMSO에 녹여 이용하였다. 또한 항산화 물질로 알려진 (-)-epigallocatechin-3-O-gallate(EGCG) 및 kaempferol의 함량을 분석하기 위하여 고속 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하였다. 분석에 이용한 기기는 Varian 940-LC(Varian, Palo Alto, CA, USA)이고, 이동상 A는 0.05% trifluoroacetic acid가 첨가된 물을, 이동상 B는 메탄올(HPLC grade, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. UV흡광도는 330 nm에서 측정하였다.

항산화력 측정

총 플라보노이드의 함량은 해당근 메탄올 추출물 100 μL에 2% AlCl₃·6H₂O 용액 100 μL를 가하고 5분 방치한 후, 흡광도 값 430 nm에서 spectrophotometer(Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였으며, 표준물질로는 quercetin dihydrate를 사용하였다(17). 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 정량하였다(18). 해당근 추출물 100 μL에 Folin-Ciocalteu reagent 250 μL를 가한 뒤 spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다.

Ferric-reducing antioxidant power(FRAP) 활성은 Benzie와 Strain에 의한 방법을 일부 변형하여 측정하였다(19). FRAP reagent는 pH 3.6의 0.3 M sodium acetate buffer 25 mL와 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 2.5 mL, 20 mM FeCl₃·6H₂O 용액 2.5 mL을 섞어 사용하였다. FRAP reagent 3 mL에 농도별 해당근 추출액 100 μL를 가하여 37°C에서 5분간 방치 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선으로 FeSO₄·7H₂O를 사용하여 환원력을 계산하였다. 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH· free radical-scavenging assay는 에탄올에 녹인 200 μM DPPH reagent에 농도별 추출물 100 μL를 넣고 900 μL의 DPPH reagent를 넣고 강하게 섞은 후 암소에 방치하였다. 30분 후 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 라디칼 소거능을 비교하였다. 각 시료의 SC₅₀(50% scavenging activity)은 DPPH·의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다(20).

최종당화산물의 제조 및 확인

AGEs는 10 mM의 glyceraldehyde와 10 mg/mL의 bovine serum albumin(low-endotoxin, fatty acid free), 1 mM의 DTPA와 0.1 M의 phosphate buffer(pH 7.4), 방부제로 sodium azide를 0.02% 사용하여 37°C에서 5일간 암소 보관하였으며, 5일 후 반응에 참여하지 않은 당을 제거하기 위해 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 24시간 동안 투석하였다. 대조군으로는 10 mM의 ami-

noguanidine을 사용하였다. AGEs의 생성 확인은 형광도를 찍어 확인하였으며(VICTOR3™, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), excitation 파장 370 nm와 emission 파장 440 nm에서 측정하였다.

추출물의 세포 독성 확인

HUVEC는 2% 젤라틴 코팅된 24-well plates에 2×10^5 의 농도로 처리한 다음 24시간 배양하였다. 세포가 바닥에 부착되면, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 해당근 추출물을 18시간 처리하였다. 이후 4시간 동안 AGEs를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였다. 이 후 40 μL 의 MTT 시약과 EGM-2 media 200 μL 의 조건으로 배지를 3시간 동안 교환하고, DMSO를 이용하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 540 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. MTT 측정법은 [대조군 O.D.-실험군 O.D.]/대조군 O.D.] $\times 100(\%)$ 과 같은 식에 의해 세포독성을 계산하였다.

활산산소종(reactive oxygen species, ROS) 소거능 측정

해당근의 AGEs에 의해 유도된 세포 내 ROS의 소거능을 측정하기 위해 2',7-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. DCF-DA는 세포 내 ROS의 존재 시 형광의 DCF로 산화하여 녹색의 형광을 나타낸다. 2% 젤라틴 코팅된 24-well plates에 2×10^5 의 농도로 HUVEC를 처리한 다음 24 시간 배양한다. 이 후 5 μM 의 DCF-DA를 EBM-2 배지에 넣어 암소에서 30 분간 처리하고 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 다음, AGEs 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 해당근 추출물 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한다. 24시간 배양 후 PBS(pH 7.4)로 3회 세척하고 0.2% triton X 100/PBS를 사용하여 HUVEC를 용해시킨 후 형광도(Ex 485/Em 535 VICTOR3™, Perkin Elmer)를 측정하였다(21).

세포 배양 및 단핵구 부착

HUVEC를 2%의 젤라틴을 코팅시킨 60 mm² petri dish에 1×10^6 cell/dish로 seeding한 후 24시간 후 실험에 사용하였다. 단핵구인 THP-1 cell은 1% penicillin-streptomycin과 50°C에서 30분간 불활성화시킨 10% FBS를 함유한 RPMI 1640배지를 사용하여 75-T flask에서 배양하였다. HUVEC은 1×10^6 /dish의 농도로 24시간 배양시킨 후 농도를 달리한 해당근 추출물을 18시간 처리 하였다. 이후 AGEs를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간 처리하였다(22). 단핵구 부착능을 관찰하기 위하여 THP-1을 BCECF-AM 5 mM을 함유한 RPMI 1640에 30분간 표지시켰다. 표지되지 않은 여분의 THP-1은 PBS(pH 7.4)를 이용하여 3회 씻어낸 다음, 2.5×10^5 cell/well의 농도로 미리 유도된 HUVEC과 1시간 동시 배양하였다. 이후 부착되지 않은 THP-1을 제거하기 위하여 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 공초점 레이저 주사 현미경(Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 50배의 비율로 형광 사진을 찍고, 0.1% SDS/50 mM Tris-HCl을 이용하여 부착된 세포를 부유시켜 형광도를 찍었다(Ex 485/Em 530 VICTOR3™, Perkin Elmer).

Transendothelial electrical resistance(TEER) 값 측정

HUVEC에 AGEs과 해당근 추출물을 각각 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 24 시간 동시 처리하였을 때 세포 폐쇄 연결의 저항값을 측정하여 치밀이음부의 느슨해진 정도를 확인하였다. 젤라틴 코팅된 챔버(pore size=0.4 μm)를 12 well transwell plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)에 삽입 후 HUVEC을 3×10^5 농도로 seeding하였다. 세포가 단층으로 챔버에 포화(confluence)되기까지는 약 4-5일 정도 소요되었다. TEER 값이 120 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 에 이르면 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 AGEs과 해당근 추출물을 처리하였다. 추출물 처리 농도는 앞선 실험과 동일한 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 처리 24시간 후 EVOM-Epithelial Voltohmmeter(MatTek, Ashland, MA, USA)를 이용하여 TEER 값을 측정하였다.

통계 처리

본 실험에서 측정된 모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 실험군간의 통계학적 분석은 Sigma-Stat 3.5(Jandal Co., San Rafael, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시하였으며 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$, 0.001의 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

항산화력 측정

높은 혈당은 우리 체내에서 polyol pathway, NAD(P)H oxidase 및 AGEs pathway를 거쳐 직접 혹은 간접적으로 세포 내 미토콘드리아의 전자전달계를 통해 ROS를 생성한다(23). 이렇게 생성된 ROS는 다양한 cytokine의 발현을 증가시켜 세포의 손상을 유발시킨다(11). 따라서 최근에는 고혈당에 의해 유도된 ROS가 당뇨병성 혈관 합병증에 중요한 인자로 지적되고 있다(13). Names-Nagy 등의 보고에 따르면(24), 임상실험을 통해 당뇨병환자의 경우 식이를 통한 항산화 물질의 섭취는 혈액 중 당노합병증의 진행 여부를 판단하는 glycated hemoglobin(HbA1c)을 유의적 수준으로 낮추었다고 보고하였다. 또한 폴리페놀 함량이 높은 식물 추출물이 cytokine에 의해 유도된 염증반응을 억제한다는 결과가 알려져 있다(25). 따라서 항산화 활성은 당뇨병합병증 뿐만이 아니라 다양한 염증반응을 억제하는데 매우 중요한 활성이다.

해당근 추출물(*Rosa rugosa* extract, RRE)의 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 항산화 활성을 측정해 본 결과(Table 2), 총 폴리페놀 함량은 345.2 \pm 5.7 mg gallic acid equivalents(GAE)/kg dry matter (DM)이며 플라보노이드는 128.1 \pm 2.0 μg quercetin equivalents(QE)/kg DM을 함유하고 있었다. RRE의 항산화 활성을 DPPH radical을 이용하여 측정해 본 DPPH의 SC₅₀ 값이 34.2 \pm 0.1 μg DM/mL로 대조군인 ascorbic acid의 6.8 \pm 0.1 μg DM/mL과 비교 시 약 20% 정도의 항산화력을 가지고 있었다. FRAP assay는 Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃를 산화제로 사용하여, 항산화 물질에 의해 Fe(II)

Table 2. Total flavonoid, polyphenol, and antioxidant activities of methanol extracts from root of *Rosa rugosa* Thunb

	Total flavonoid (μg QE/mg DM)	Total polyphenol (μg GAE/mg DM)	DPPH·SC ₅₀ (μg DM/mL)	FRAP (mM FeSO ₄ ·7H ₂ O/mg DM)
<i>Rosa rugosa</i>	128.1 \pm 2.0	345.2 \pm 5.7	34.2 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1
Ascorbic acid	-	-	6.8 \pm 0.1	25.5 \pm 0.3

Total flavonoid contents are expressed as quercetin equivalents (QE). Total polyphenol contents are expressed as gallic acid equivalents (GAE). Antioxidant activities are expressed as DPPH-scavenging activity (DPPH SC₅₀) and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of the methanol extract of *Rosa rugosa* roots. Each value is mean \pm standard deviation of three replicate experiments. DM and SC₅₀ express dry matter and amount of sample necessary to decrease the initial DPPH \cdot concentration by 50%, respectively.

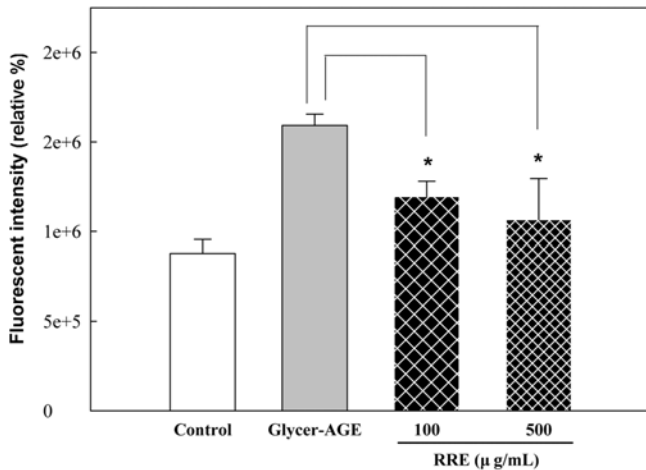


Fig. 1. ROS scavenging activities of methanolic extract of *Rosa rugosa* roots (RRE) against glycer-AGEs by fluorescence intensity. The production of intracellular reactive oxygen species (ROS) by glycer-aldehyde induced-AGEs was detected by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence. DCF-DA-loaded HUVEC were incubated for 24 hr with BSA (control), 100 µg/mL glycer-AGEs, 100 µg/mL glycer-AGEs+RRE 100 µg/mL, 100 µg/mL glycer-AGEs+RRE 500 µg/mL. Values are mean±standard deviation of three replicate experiments. *: $p < 0.05$, significantly different from only glycer-AGEs treated group.

(TPTZ)₂Cl₃로 환원되는 것을 이용하는 분석법으로 항산화 물질의 환원력을 측정하는 실험법으로 라디칼 소거 방식의 항산화 측정법과는 다른 메커니즘의 항산화 측정법이다(26). FRAP assay를 이용하여 RRE의 환원력을 측정한 결과 2.2±0.1 mM FeSO₄·7H₂O/mg DM으로 25.5±0.3 FeSO₄·7H₂O/mg DM인 ascorbic acid에 비해 약 9%에 해당하는 환원력을 가지고 있었다. RRE가 정제과정을 거치지 않은 단순한 추출물임을 감안하면 RRE는 상당한 라디칼 소거능과 환원력을 가지고 있는 항산화 물질임을 예측할 수 있다. 한편 HPLC 분석을 통하여 항산화력이 있는 물질로 알려진 EGCG와 kaempferol의 함량을 측정하였다. 분석 결과 해당근 생물 100 g을 기준으로 계산하였을 때, 240 mg의 EGCG와 50 mg의 kaempferol의 함량을 나타내었다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 소거능 측정

ROS는 노화, 각종 염증반응 및 암과 밀접한 관련이 있어 소거능을 가지는 항산화제들은 관련 질병의 잠재적인 예방 및 치료의 효과가 있다. DCF-DA를 이용하여 세포 내 ROS를 측정함으로써 해당근 추출물의 AGEs에 의해 유도된 ROS 소거능을 평가하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 100 µg/mL의 AGEs에 의해 ROS가 유도되고, 해당근 추출물 100, 500 µg/mL에 의해 각각 63, 77%의 농도 의존적인 ROS 소거능을 확인하였다.

최종당화산물의 제조 및 확인

식이를 통해 섭취된 포도당은 체내에서 해당과정을 통해 포도당보다 반응성이 높은 carbonyl 화합물로 전환되며, glycer-aldehyde와 같은 carbonyl 화합물에 의해 만들어진 AGEs가 포도당에 의해 만들어진 AGEs보다 더 큰 세포독성을 유발한다고 알려져 있다(27). 특히 Kitahara 등은 glycer-aldehyde는 체내에서 포도당의 해당과정을 통해 생성되어 단백질의 아미노 그룹과 신속히 반응하여 glycer-aldehyde-derived AGEs를 생성하며 이 물질은 혈관계

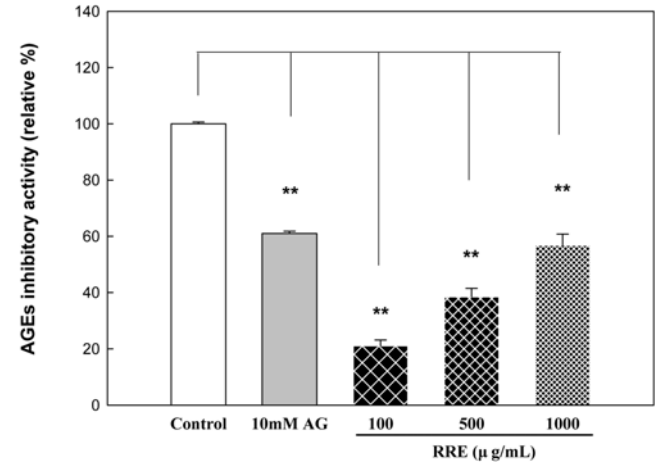
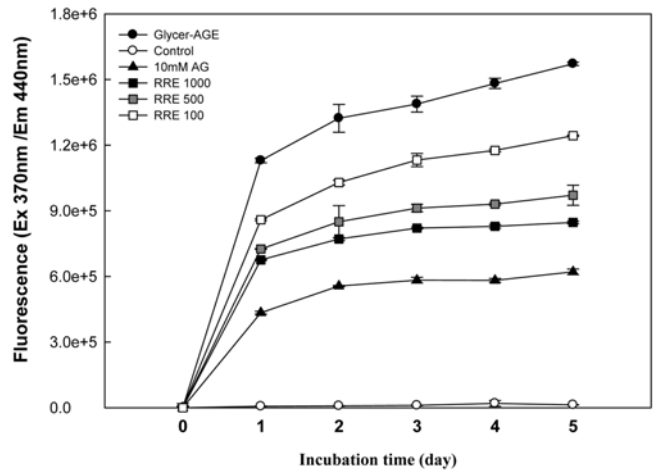


Fig. 2. Anti-glycation effect of RRE by fluorescence intensity during 5 days incubation (top) and dialyzed AGEs after 5 days incubation (bottom). BSA (10 mg/mL) was glycated with 10 mM glycer-aldehyde (Glycer-AGEs) at 37°C for 6 days in the dark. Control was prepared in the same way, but without glycer-aldehyde, and 10 mM aminoguanidine treated- glycer-AGEs (10 mM AG) was used as a positive control. *R. rugosa* was prepared by incubating with 100, 500, 1000 µg/mL of *R. rugosa* roots extract, respectively. To measure AGEs fluorescence intensity, AGEs were characterized by fluorescence at 370 nm excitation and 440 nm emission. After 5 days incubation, AGEs were dialyzed against phosphate buffer (pH 7.4) for 24 h at 4°C in the dark to remove non-reactive glycer-aldehyde. Values are mean±standard deviation of three replicate experiments. **: $p < 0.001$, significantly different from control group.

염증반응 및 혈관내피세포의 기능 상실을 유도하여 고혈당에 있어 동맥경화를 유도한다고 보고하였다(28). 따라서 본 연구에서는 포도당 대신 glycer-aldehyde를 이용하여 RRE의 AGEs 생성 억제 효능을 확인하였다. 대조군으로는 AGEs의 생성을 억제하고 당뇨합병증의 발생을 억제하는 효과가 입증된 aminoguanidine(AG)을 사용하였으며, AG의 아미노 말단은 Amadori 화합물의 카보닐기와 반응하여 단백질간 교차결합을 억제한다고 알려져 있다(29). 결과로 반응시간이 경과할수록 AGEs의 생성물이 급속히 증가하였으며(Fig. 2) RRE나 AG가 없는 AGEs는 반응 5일이 경과하여도 계속 증가했으나 RRE가 500, 1000 µg/mL 첨가된 경우 반응 3일 후부터 AGEs의 증가율이 낮음을 알 수 있었다. 반응 5일 후 AGEs 생성 억제능을 확인해 본 결과(Fig. 2) 10 mM의 AG가 60% 정도 AGEs 생성을 억제하였으며, RRE는 100, 500,

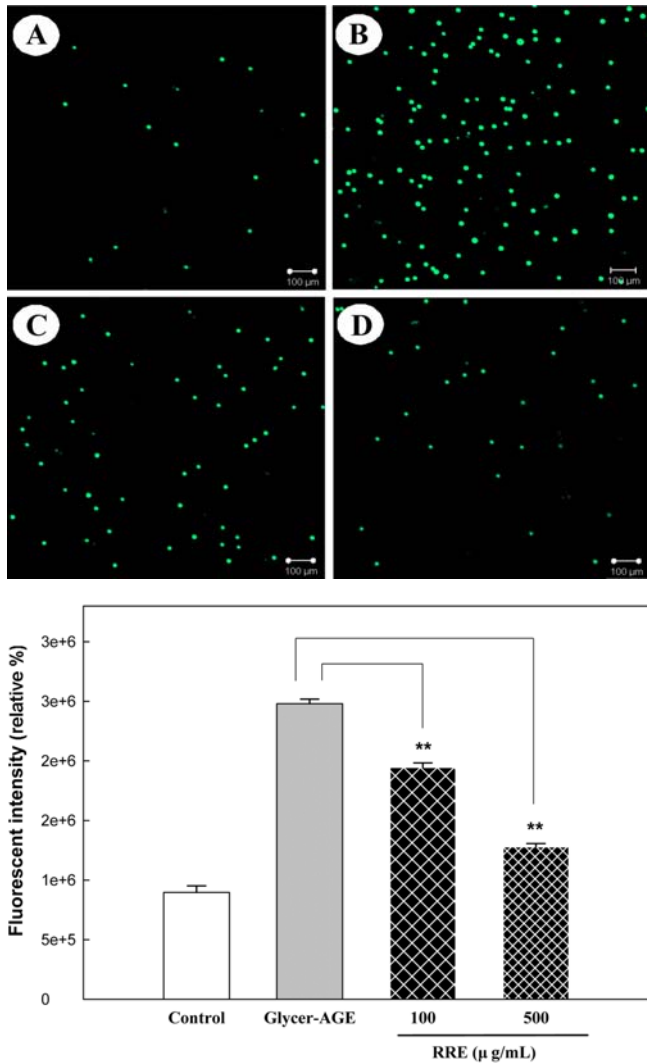


Fig. 3. Fluorescent microscope images of adhesion of THP-1 cells to HUVEC stimulated with glycer-AGEs (top) and the effect of RRE to adhesion (bottom). HUVEC stimulated with 100 μg/mL BSA (A) 100 μg/mL glycer-AGEs (B), 100 μg/mL glycer-AGEs+100 μg/mL RRE (C), 100 μg/mL glycer-AGEs+500 μg/mL RRE (D) to the adhesion assay. **: $p < 0.001$, significantly different from only glycer-AGEs treated group.

1000 μg/mL의 농도에서 각각 21, 38, 56%의 농도 의존적인 저해 활성을 보여주었다.

세포 독성 확인

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 측정법은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 숙신산 탈수소효소에 의해 노란색의 MTT가 보라색의 formazan을 형성하는 것을 흡광도로 측정하는 방법이다(30). 불용성의 formazan 생성물은 살아있는 세포 미토콘드리아 내의 활성 정도를 측정하는 것으로 세포 독성이 있을 경우 감소하고, 대사를 촉진시킬 경우 증가하는 형태를 보이는 것을 알 수 있다. MTT assay를 통하여 HUVEC에서의 *in vitro* 세포 독성을 측정해 본 결과(데이터 생략) RRE 1000 μg/mL 처리군에서 생존율이 32%, 500 μg/mL 처리군에서 94%의 세포 생존율을 보였다. 따라서 RRE의 활성산소종 소거능, 단핵구 부착 및 transendothelial electrical resistance

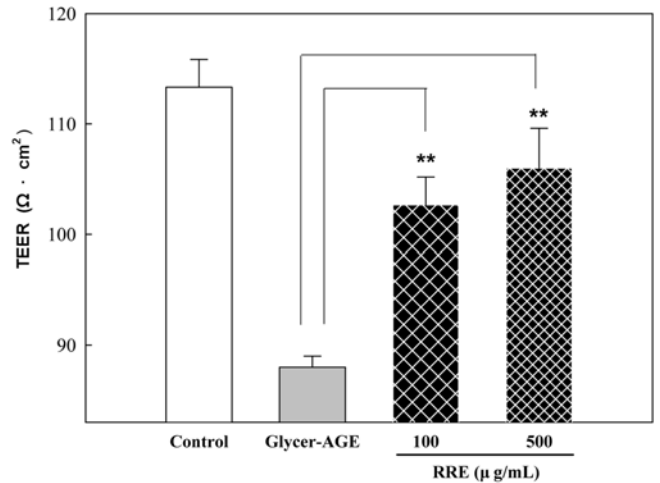


Fig. 4. Effects of transendothelial permeability measured by TEER (transendothelial electrical resistance). The effect of glycer-AGEs on TEER was measured by EVOM (epithelial voltohmmeter) apical chamber of a 12-well transwell system. HUVEC was seeded 3×10^5 cells per inset on gelatin coated apical chamber in the 12 transwell system. After monolayer confluence achieved, HUVEC was treated with 500 μg/mL and 100 μg/mL of *R. rugosa* roots extract and 100 μg/mL of glycer-AGEs. The TEER was measured after 24 hours. Measurements were taken on triplicate and data are expressed as relative percentage of control. Values are mean±standard deviation of three replicate experiments. **: $p < 0.001$, significantly different from only glycer-AGEs treated group.

(TEER) 실험에서 RRE의 처리 최고 농도를 500 μg/mL로 결정하였다.

세포 배양 및 단핵구 부착

체내에 생성된 AGEs는 혈관내피세포에 ICAM-1, MCP-1, TNF-α 등의 cytokine 분비를 유도하며(31), 분비된 cytokine에 의해서 혈관내벽에 단핵구가 부착되면, 세포의 폐쇄 연결이 느슨해져서 혈중의 단핵구가 동맥 벽 안으로 들어가게 된다. 이 후 단핵구는 대식세포로 분화되고 염증을 유발하며, 거품세포로의 분화로 인해 결과적으로 동맥 경화를 유발하게 된다(32). BCECF-AM에 표지된 THP-1이 AGEs에 의해 유도된 HUVEC에 부착되는 정도 및 RRE의 부착 억제능을 측정해 보았으며 이때 RRE는 세포독성이 없는 100, 500 μg/mL의 농도로 처리하였다. 그 결과(Fig. 3) BCECF-AM에 표지된 THP-1은 AGEs에 의해 유도되지 않은 HUVEC(Fig. 3의 상단 A)에도 부착하였으나 AGEs에 의해 그 부착 정도가 증가되었다. RRE의 AGEs에 의해 유도된 혈관내피에 단핵구의 부착을 억제하는 활성을 측정해 본 결과(Fig. 3의 하단) RRE 100 μg/mL 처리시 정상을 0%로 하였을 때 AGEs에 의해 유도된 단핵구 부착을 33%, 500 μg/mL 처리시 약 75% 정도 억제하는 것을 확인하였다.

TEER 값 측정

혈관내피세포의 치밀이음부는 혈액 내 고분자 물질의 혈관내포 유입을 억제하는 작용을 한다. ROS 등에 의한 혈관내피세포의 저항 저하는 혈관 내부로 물질을 유입시켜 결과적으로 동맥경화와 같은 염증반응을 촉진시킨다(33). 혈관내피세포가 AGEs에 의해 TEER중 세포의 폐쇄 연결 부위 저항값 측정으로 인하여 AGEs에 유도된 HUVEC의 세포연접이 느슨해지는 정도를 측정하였다. 4시간 처리 시 저항값이 대조군과 유의적인 차이가 없

어서 AGEs를 추출물과 24 시간 동시 처리하였다. 그 결과(Fig. 4) AGEs에 의해 유도되지 않은 HUVEC의 저항은 $113 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 이었으나 glycer-AGEs 처리시 $88 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 로 낮아졌으며 RRE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 약 $102 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 약 $106 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 로 저항이 증가하는 것을 확인하였다.

우리는 이 연구를 통해 해당근 추출물은 1) 세포 내 강한 라디칼 소거능과 환원력을 가지고 있어 높은 항산화활성을 가지고 있으며, 2) AGEs의 생성을 억제하며, 3) ROS와 AGEs에 의해 유도되는 혈관내피세포의 기능 장애(세포 내의 ROS 소거, 단백질 부착 및 투과도 증가)를 억제하여 최종적으로는 동맥경화의 초기 염증반응을 예방하고 나아가 당뇨합병증 유발을 억제하는 효능을 가지고 있는 것을 확인하였다. 그러나 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 추출물이 혈관내피세포에 독성을 유발하는 것으로 보아 좀 더 심도 있는 안전성 연구가 필요하며 활성의 지표물질에 대한 연구가 필요하다. 따라서 이런 부분이 수행된다면 해당근은 당뇨합병증 억제 활용가치가 충분하다고 판단된다.

요 약

혈당강하 효과가 있다고 알려진 해당근 추출물을 이용하여 AGEs 생성 저해에 따른 초기 동맥경화증에 대한 효과에 대하여 검토하였다. 먼저 해당근 추출물이 AGEs에 의하여 생성이 촉진된 ROS를 제거하는 효과가 있는지를 확인하기 위하여 항산화 활성을 측정하였다. 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 해당근의 메탄올 추출물은 $128.1 \pm 2.0 \mu\text{g}$ quercetin equivalents(QE)/mg DM, 총 폴리페놀 함량은 $345.2 \pm 5.7 \mu\text{g}$ gallic acid equivalents(GAE)/mg DM으로 나타났다. 환원력 측정을 위한 FRAP assay는 $2.19 \pm 0.1 \text{ mM FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{mg DM}$ 으로 $25.5 \pm 0.3 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{mg DM}$ 인 ascorbic acid에 비해 약 9% 정도의 환원력을 가지고 있었으며, 전자공여능의 경우 DPPHSC₅₀값이 $34.2 \pm 0.1 \mu\text{g DM}/\text{mL}$ 로 대조군인 ascorbic acid의 $6.8 \pm 0.1 \mu\text{g DM}/\text{mL}$ 과 비교하여 약 20% 정도의 높은 항산화력을 갖고 있었다. 또한, HPLC 분석을 통해 해당근 생물 100 g을 기준으로 240 mg의 EGCG와 50 mg의 kaempferol을 함유하는 것으로 나타났다. AGEs에 의해 유도된 HUVEC의 ROS 생성 저해 효과는 해당근 추출물 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 각각 63, 77%로 나타났다. 또한, monocyte adherent assay에서 해당근 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 정상을 0%로 하였을 때 AGEs에 의해 유도된 단백질 부착을 33%, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 약 75% 정도로 농도 의존적으로 부착을 저해하는 것을 관찰할 수 있었으며, 유도되지 않은 HUVEC의 저항은 $113 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 에서 glycer-AGEs 처리 시 $88 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 로 낮아진 것을 해당근 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 약 $102 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 약 $106 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 로 저항의 감소를 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부 학술진흥재단의 지원에 의해 이루어진 연구(2009-007-4070)로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Jansson S, Engfeldt P. Changed life style can prevent type 2 diabetes. Intervention studies show good results in "pre-diabetics". *Lakartidningen* 104: 3771-3774 (2007)
2. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Ebeling P, Fuller JH. Soluble vascular cell adhesion

- molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in Type 1 diabetic patients. *J. Diabetes Complicat.* 20: 188-195 (2006)
3. Bogdanov VY, Osterud B. Cardiovascular complications of diabetes mellitus: The tissue factor perspective. *Thromb Res.* 125: 112-118 (2010)
4. Miyagawa J, Hanafusa T. Mechanism of atherosclerosis in diabetes: altered cytokine network in the vascular wall. *Nippon Rinsho* 57: 601-606 (1999)
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820 (2001)
6. Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin. Inv. Drugs* 11: 1205-1223 (2002)
7. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Invest.* 70: 138-151 (1994)
8. Jiang MZ, Tsukahara H, Ohshima Y, Todoroki Y, Hiraoka M, Maeda M, Mayumi M. Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and NF-kB activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Sci.* 75: 1159-1170 (2004)
9. Stannard AK, Riddell DR, Bradley NJ, Hassall DG, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E and regulation of cytokine-induced cell adhesion molecule expression in endothelial cells. *Atherosclerosis* 139: 57-64 (1998)
10. Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Curran M, Newhook LA, Grant M, Hagerty D, Schneider C. Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clin. Biochem.* 42: 562-569 (2009)
11. Huijberts MS, Schaper NC, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab. Res.* 1: S19-S24 (2008)
12. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Bio. Med.* 28: 1379-1386 (2000)
13. Nishikawa T, Araki E. Investigation of a novel mechanism of diabetic complications: impacts of mitochondrial reactive oxygen species. *Rinsho Byori.* 56: 712-719 (2008)
14. Cho EJ, Yokozawa T, Kim HY, Shibahara N, Park JC. Rosa rugosa attenuates diabetic oxidative stress in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Am. J. Chin. Med.* 32: 487-496 (2004)
15. Lee SY, Kim JD, Lee YH, Rhee H, Choi YS. Influence of extract of Rosa rugosa roots on lipid levels in serum and liver of rats. *Life Sci.* 49: 947-951 (1991)
16. Altiner D, Kilicgun H. The antioxidant effect of Rosa rugosa. *Drug Metab. Drug Interact.* 23: 323-327 (2008)
17. Maksimovic Z, Malencic D, Kovacevic N. Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technol.* 96: 873-877 (2005)
18. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2: 875-877 (2007)
19. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
20. Wang KJ, Zhang YJ, Yang CR. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of Polygonum paleaceum. *J. Ethnopharmacol.* 96: 483-487 (2005)
21. Jazwa A, Loboda A, Golda S, Cisowski J, Szlag M, Zagorska A, Sroczynska P, Drukala J, Jozkowicz A, Dulak J. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radical Bio. Med.* 40: 1250-1263 (2006)
22. Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M. Prostaglandins E2 inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression, cytokine production and lymphocyte proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331: 656-670 (2009)
23. Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochon-

- dria and reactive oxygen species. *Curr. Diabetes Rev.* 4: 46-54 (2008)
24. Nemes-Nagy E, Szocs-Molnar T, Dunca I, Balogh-Samarghitan V, Hobai S, Morar R, Pusta DL, Craciun EC. Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children. *Acta Physiol. Hung.* 95: 383-393 (2008)
25. Pastore S, Potapovich A, Kostyuk V, Mariani V, Lulli D, De Luca C, Korkina L. Plant polyphenols effectively protect HaCaT cells from ultraviolet C-triggered necrosis and suppress inflammatory chemokine expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1171: 305-313 (2009)
26. Yoo K, Lee C. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 177-182 (2007)
27. Sato T, Iwaki M, Shimogaito N, Wu X, Yamagishi S, Takeuchi M. TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. *Curr. Mol. Med.* 6: 351-358 (2006)
28. Kitahara Y, Takeuchi M, Miura K, Mine T, Matsui T, Yamagishi S. Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs). A novel biomarker of postprandial hyperglycaemia in diabetic rats. *Clin. Exp. Med.* 8: 175-177 (2008)
29. Ahmed N. Advanced glycation endproducts - role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pr.* 67: 3-21 (2005)
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
31. Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation end product-induced NF- κ B activation and cytokine expression. *FEBS Lett.* 453: 283-287 (1999)
32. Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 335: 191-203 (2009)
33. Ye SQ, Zhang LQ, Adyshev D, Usatyuk PV, Garcia AN, Lavoie TL, Verin AD, Natarajan V, Garcia JGN. Pre-B-cell-colony-enhancing factor is critically involved in thrombin-induced lung endothelial cell barrier dysregulation. *Microvasc. Res.* 70: 142-151 (2005)