

## THP-1 Cell과 HUVEC을 이용한 Co-Culture Model System에서 최종당화산물에 의한 Cytokines와 RAGE 발현

이광원<sup>1</sup> · 이현순<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 식품공학부

<sup>2</sup>고려대학교 식품영양학과 및 보건과학연구소

### Co-Culture Model Using THP-1 Cell and HUVEC on AGEs-Induced Expression of Cytokines and RAGE

Kwang-Won Lee<sup>1</sup> and Hyun-Sun Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Science and Biotechnology and

<sup>2</sup>Dept. Food and Nutrition and Institute of Health Science, Korea University, Seoul 136-703, Korea

#### Abstract

Although monoculture methods have been remarkably useful due to their simplicity, they have serious limitation because of the different types of cells communication with each other in many physiological situations. We demonstrated levels of markers of endothelial dysfunction such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) as well as stimulation of receptor of advanced glycation endproducts (AGEs) on mono- and co-culture system such as only monocyte (THP-1) cultivation system, only endothelial cell (HUVEC) cultivation system, and co-cultivation system of THP-1 and HUVEC. The mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  on HUVEC increased by the co-culture with monocyte after 4 hr at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glyceraldehyde-AGE. The secreted protein contents into medium of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  increased after 8 hr approximately 2~2.5 times compared to mono-cultivation. In contrast, the mRNA level of receptor of AGE (RAGE) was relatively insensitive on the co-culture system. The mediators by which monocytes activate endothelial cell have not been fully elucidated. In this study we confirmed production of soluble cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  by monocytes. Use of monocyte conditioned medium, which contains both cytokines, can activate endothelial cell.

**Key words:** advanced glycation endproducts (AGEs), endothelial dysfunction, co-culture, endothelial cell, monocyte

#### 서 론

글라이케이션 반응, 혹은 non-enzymatic glycation 반응이란 환원당의 carbonyl기가 단백질의 유리아미노기인 lysine이나 arginine과 반응하여 초기 Schiff base를 형성하고, 계속적으로 축합, 재전위, 산화, 분열, 고리화 등의 일련의 복잡한 반응을 통하여 갈색의 비가역적 최종당화산물(advanced end-products, AGEs)을 만드는 반응이다(1). 이 반응은 모든 단백질의  $\epsilon$ -amino group이나 N-terminal group에서 일어나며 또한 아미노산을 함유하고 있는 콜라젠, DNA나 low-density lipoprotein(LDL)과 같은 혈청 단백질과 쉽게 공유결합 하여 체내에서도 AGEs 화합물을 만든다고 알려져 있다(2). 생체내의 glycation 반응은 몇 주 정도에 걸쳐 일어날 정도로 천천히 일어나지만 일단 반응이 시작되면 비가역적 반응으로 AGEs 화합물이 체내에 축적되게 되면서 여러 가지 질병을 일으킨다(3). 특히 만성적인 고혈당

인 당뇨의 경우 AGEs가 급속도로 생성되며, 당뇨합병증이 진행되는 환자의 신장, 망막, 경화된 동맥에서 AGEs의 축적이 관찰되고 있다(4-6). AGE에 의해 동맥경화는 다음과 같은 기전에 의해 일어난다고 알려져 있다. 먼저 혈액 내에 존재하는 LDL의 인지질 성분에서 glycation 반응에 의해 LDL의 산화변성이 일어나며(7), 이렇게 변성된 LDL은 혈관 내피세포에 존재하는 receptor of AGEs(RAGE)를 통해 내막(intima)으로 흡수되어 거품세포(foam cell)의 형성을 촉진하며(8,9), 콜레스테롤에스터(cholesterol ester)의 축적(10) 등 혈관조직의 정상적인 기능을 저하시켜 최종적으로는 동맥경화와 같은 질환을 일으키는 것으로 보고되고 있다(11-13).

최근 식품소재로부터 AGEs의 생성을 억제하거나 AGEs에 의한 혈관 내피세포의 기능상실에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 녹차에서 추출한 epigallocatechin gallate (EGCG)와 같은 flavonol은 AGEs의 생성 및 RAGE signal

\*Corresponding author. E-mail: happylhs@korea.ac.kr  
Phone: 82-2-940-2858, Fax: 82-2-940-2850

을 억제하여 AGEs의 체내 생성 및 축적을 감소시켜(14), AGEs에 의한 다양한 질병을 억제하는 것으로 알려져 있다(15). 또한 숙성된 마늘 추출물은 AGEs 생성을 억제하여 당뇨병증을 억제한다고 알려져 있으며(16), 이외에도 가자나무(*Terminalia chebula*) 열매 추출물(17), anthocyanin cyanidin-3-*O*-glucoside(18)는 혈관내피세포의 기능상실을 억제한다고 알려져 있다.

그러나 기존의 연구는 대부분 AGEs에 의한 단구세포의 변화 혹은 혈관내피세포의 변화를 단독 system에서 연구되고 있으나 몇몇 연구자들의 보고에 의하면 AGEs에 의해 혈액 내 단구세포는 IL-1, TNF와 같은 cytokine을 생성하며 이렇게 형성된 cytokine은 혈관내피세포의 기능상실을 가속화시킬 것으로 예측하고 있다(19,20). 따라서 실제의 경우를 반영하는 모델인 단구세포와 혈관내피세포의 co-culture system이 중요하다. 따라서 AGEs 화합물에 의한 혈관내피세포의 기능상실의 연구를 위해서는 co-culture system이 확립되어야 하며, 이 system을 이용하여 AGEs에 의한 기전 연구 및 이를 억제할 수 있는 식품소재에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

세포배양을 이용한 연구는 기능성 소재나 기전 연구에 많이 이용되는 실험 방법이지만 한 가지 세포만을 이용하는 실험방법은 cell communication이 배제된 실험 방법이다. 특히 혈관성 질환의 연구의 경우 혈관내피세포와 단구세포의 상호작용이 매우 중요하다. 따라서 본 연구는 혈관내피세포의 기능상실에 매우 중요한 cytokine인 IL-1 $\beta$ 과 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도와 AGEs 화합물인 조직으로 들어가는 receptor인 RAGE 발현 정도를 단구세포/혈관내피세포의 단독과 co-culture system을 비교하였다. 또한 AGEs에 의한 혈관성질환을 억제할 수 있는 효능물질 검색을 위한 최적의 time point를 전체적으로 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 DL-glyceraldehyde, 2-deoxy-ribose, glycoaldehyde, glycoxal, diethylene triamine pentaacetic acid(DTPA), bovine serum albumin(BSA, low-endotoxin, fatty acid free)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 혈관내피세포인 human umbilical vein endothelial cell(HUVEC), endothelial growth medium 2(EGM-2)는 Clonetics(San Diego, CA, USA), 단구세포인 THP-1(human acute monocytic leukemia cell line)은 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이외의 세포 배양을 위한 배지 및 기타재료는 GIBCO-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. HUVEC은 EGM-2 배지에서 배양하였으며 80~90%의 confluence에서 실험하고, passage가 10번

을 넘기지 않은 세포만 사용하였다. THP-1은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin 및 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하였다.

### Advanced glycation endproduct(AGE)의 제조

최종당화산물 즉, AGEs의 제조는 Takeuchi 등(21)이 보고한 방법에 따라 제조하였다. 그 과정을 간략히 기술하면, 10 mg/mL BSA, 5 mM DTPA과 각각의 당류(DL-glyceraldehyde, 2-deoxy-ribose, glycoaldehyde 혹은 glycoxal)를 농도를 달리하여 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4)에 혼합한 후 0.2  $\mu$ m를 이용하여 멸균한 다음 37°C에서 7일간 당화시켰다. 당화의 정도는 형광분석기(VICTOR™, Perkin Elmer, Rockville, MD, USA)를 이용하여 형광도(Ex 370 nm, Em 440 nm)를 측정하였다. Glycer-AGE의 제조는 0.1 M glyceraldehyde와 상기의 방법과 동일한 조건으로 진행하였으며 당화과정이 종료된 후 잔존하는 glyceraldehyde를 제거하기 위하여 투석(MWCO: 1000 KDa) 후 단백질 양을 측정한 다음 사용하였다. Glycer-AGE의 처리 농도는 많은 선행 연구자들이 처리하고 있는 100  $\mu$ g/mL로 처리하였다(17,22,23).

### Co-culture system

HUVEC은 EGM-2 배지를 이용하여  $1 \times 10^6$  cell/60 mm dish에 seeding한 다음 24시간을 배양하였다. 그 후 THP-1 ( $1 \times 10^6$ ) 단구세포를 HUVEC과 1:1 비율로 넣고(24), 4시간 후 100  $\mu$ g/mL glycer-AGE를(17) 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 각 time point 마다 각각의 세포와 배지를 회수하여 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. 대조군으로 100  $\mu$ g/mL BSA를 동일한 조건에서 24시간 처리하였다.

### Reverse-transcription polymerase

Total RNA 분리는 Trizol-base protocol을 이용하여 chloroform/isopropanol 법(25)으로 추출하여 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 TNF- $\alpha$ 의 forward는 GGCAGTCAGATCATCTTCTCGAA, reverse는 GAAGGCCTAAGGTCCACTTGT를 사용하였으며(26), IL-1 $\beta$ 의 forward는 ATGGCAGAAGTACCTGAGCTC, reverse는 TTCCTTGAGGCCCAAGGCCAC를 사용하였으며(27), RAGE의 forward는 AGCCCTCTCCTCAAATC-CACT, reverse는 ACTACTCTCGCCTGCCTCAG를 사용하였다(28). 내부 표준 유전자로 사용한 GAPDH의 forward primer는 AGGTCGGAGTCAACGGATTTG, reverse는 ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG이었다. PCR은 94°C에서 3분(1 cycle), 94°C에서 1분, TNF- $\alpha$ 는 63°C, IL-1 $\beta$ 는 67°C, RAGE 62°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분씩(25 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle)간 실시하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 자외선 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다.

### Cytokine 및 RAGE의 측정

60 mm dish에서 glycer-AGE를 100 µg/mL로 처리한 다음, 24시간까지 처리하였으며 처리 후 배지를 회수하여 cytokine을 ELISA kit(Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 통계 분석

실험 결과는 SPSS 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 data는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 군간의 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 최종 당화산물의 당화물 제조

글라이케이션 반응은 체내의 단백질과 당(포도당)이 반응해서 먼저 Schiff base를 형성하고 이 과정이 더 진행되면 Amadori product가 된다. 이것이 몇몇 과정을 거치면서 AGEs가 형성되는데 이것이 우리가 일반적으로 말하는 "classic"한 Hodge pathway이다(29). 그렇지만 최근에는 이 pathway 외에도 강력한 전구체인 dicarbonyl compound를 통해서도 체내에서 AGEs가 만들어지는 것으로 보고되었다. 이 과정은 포도당이 체내에서 자동산화 되면서 dicarbonyl이 생성되는 ball pathway, Schiff base에서 dicarbonyl이 생성되는 Namiki pathway, Amadori product에서 dicarbonyl이 만들어져서 AGE로 가는 다른 경로도 존재하며 이러한 dicarbonyl compound에 의해 AGEs가 더욱 빠르게 형성된다고 알려져 있다(30).

따라서 co-culture system의 연구에 앞서 AGEs 화합물을 제조하기 위한 당화물을 선정하였다. 4종의 당화물을 이용하여 AGEs 생성 속도를 측정할 결과(Fig. 1), ribose와 glyoxal은 7일간의 반응에서도 AGE의 형성이 급격히 증가하지 않았으나 glycoaldehyde와 glycer-aldehyde는 급격히 AGE 화합물이 형성되는 것을 확인하였으며 특히 glycer-aldehyde가 가장 강력하게 AGE 화합물을 형성하였다.

### 각 배양 조건에 따른 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 발현

Glyceraldehyde를 이용하여 제조된 AGEs 화합물(glycer-AGEs)을 THP-1, HUVEC 및 두 세포가 동시에 배양된 system에 100 µg/mL의 농도로 처리 후 24시간까지 처리시간을 달리하고 각 세포를 회수하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  발현 pattern을 mRNA 수준에서 조사하였다. Fig. 2의 결과를 보면, 단구세포인 THP-1의 경우 100 µg/mL의 glycer-AGE와 배양시킬 때 배양 2~3시간에서 배양전보다 유의적 차이를 보이면서 증가하였으며 대조구에 비해 2.2배 증가되는 것을 알 수 있었다. 혈관내피세포인 HUVEC의 경우에는 24시간 배양하는 동안 발현정도의 유의적인 차이가 없었다. 그러나

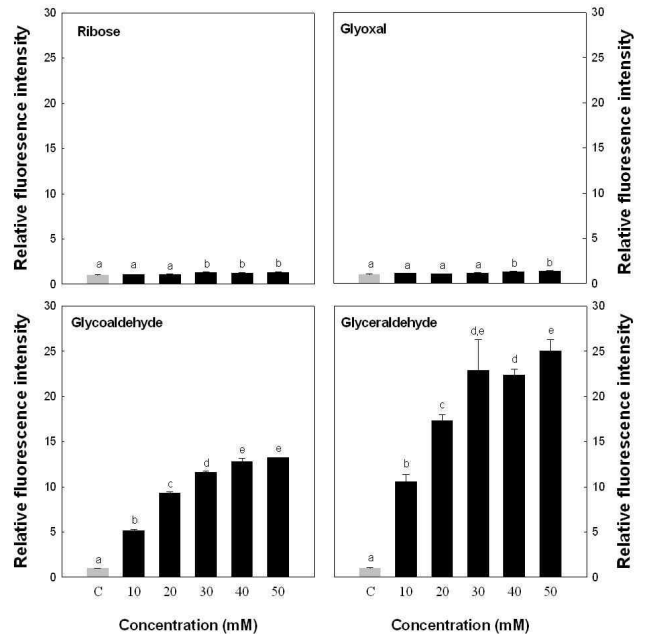


Fig. 1. Formation of various carbonyl compound-derived AGEs. AGEs-modified albumin was prepared by incubating BSA (10 mg/mL) with ribose, glyoxal, glycoaldehyde and glycer-aldehyde. Formative intensity of each AGEs was estimated using a fluorescence spectrophotometry with 370 nm excitation and 440 nm emission. Values are mean  $\pm$  SD and means with different letters (a-e) on bars are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests.

두 세포를 동시에 배양한 system에서 혈관내피세포인 HUVEC의 경우에는 배양 1시간부터 유의적 차이를 보이면서 증가하였으며 배양 4시간에서 대조구보다 4.4배 정도까지 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가된 후 다시 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

IL-1 $\beta$ 의 발현 또한 Fig. 3에서와 같이 THP-1의 경우 배양 1시간부터 유의적 차이를 보이면서 증가하여 배양 3시간에서 대조구에 비해 2.1배까지 증가되는 것을 알 수 있었다. 혈관내피세포인 HUVEC의 경우에는 24시간 배양하는 동안 발현정도의 유의적인 차이가 없었다. 그러나 두 세포를 동시에 배양한 system에서 혈관내피세포인 HUVEC의 경우에는 배양 1시간째부터 증가하여 배양 3~4시간에서 대조구보다 5.5배 정도까지 IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 배지 내에서의 농도를 측정해본 결과 THP-1만 배양한 경우 대조구의 배지 내 TNF- $\alpha$  함량이 배양 6시간에 98.2 pg/mL로 대조구 53.8 pg/mL보다 증가하였으며 HUVEC의 경우 배양 8시간에 93.3 pg/mL로 증가하였다. 그러나 co-culture의 경우 배양 4시간부터 증가하여 배양 8시간에 199.2 pg/mL로 증가하였다 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 배지 내 IL-1 $\beta$  함량은 HUVEC의 경우 24시간 동안 큰 변화를 보이지 않았으나 co-culture의 경우 배양 6시간부터 증가하여 배양 8시간에 39.5 pg/mL로 증가하였다 배양 24시간에는 배양전과 같은 수준으로 감소

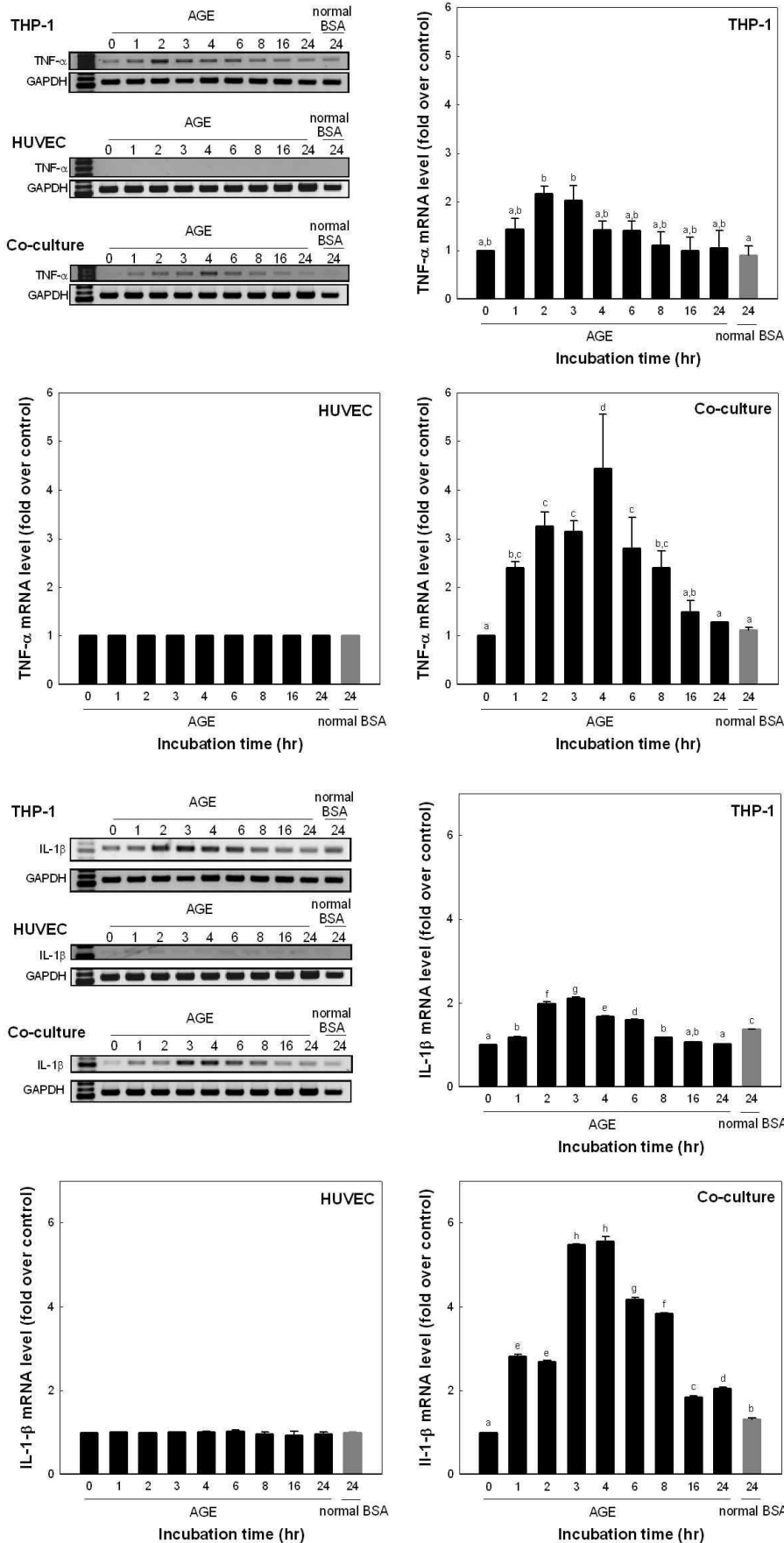


Fig. 2. mRNA expression of TNF- $\alpha$ . Each system was incubated with 100  $\mu$ g/mL glyceraldehyde-AGEs. Values are mean  $\pm$  SD and means with different letters (a-d) on bars are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests.

Fig. 3. mRNA expression of IL-1 $\beta$ . Each system was incubated with 100  $\mu$ g/mL glyceraldehyde-AGEs. Values are mean  $\pm$  SD and means with different letters (a-h) on bars are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests.

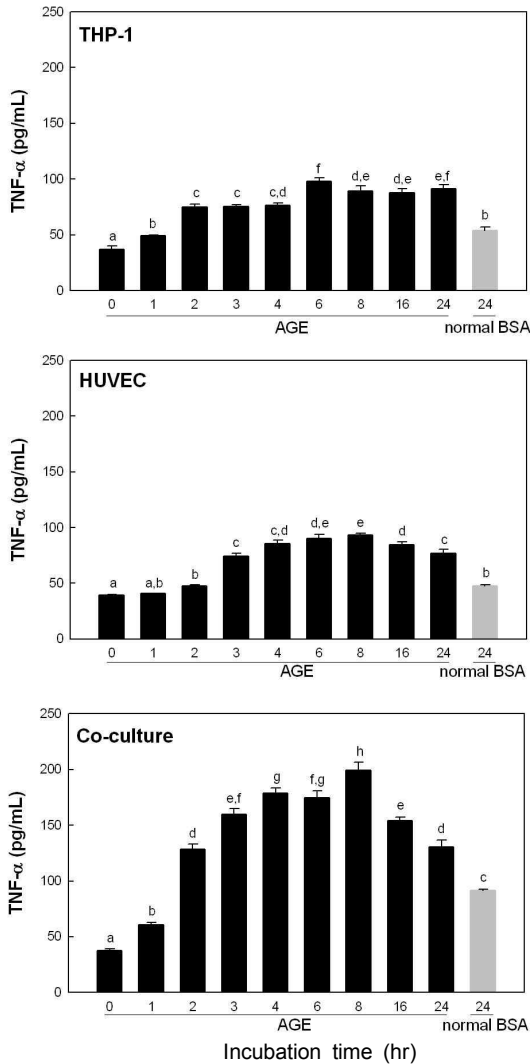


Fig. 4. TNF- $\alpha$  content in medium. Each system was incubated with 100  $\mu$ g/mL glyceraldehyde-AGEs. Values are mean $\pm$ SD and means with different letters (a-h) on bars are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests.

하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). RAGE는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 발현과 다르게 혈관내피세포인 HUVEC은 단독 및 co-culture에서 배양 16시간에 대조구에 비해 각각 1.6배, 1.9배 증가하였다(Fig. 6).

글라이케이션 반응에 의한 단백질의 가교결합(cross-linking)은 세포의 정상적인 기능의 저하를 일으켜 결과적으로는 당뇨 합병증(4-6), 동맥경화(7,8)와 같은 혈관성 질환 이외에도 알츠하이머(31), 요독증(uremia)(32) 등 많은 성인병의 원인으로 알려져 있다. 특히 당뇨 합병증이나 동맥경화증은 혈관성 질환으로 AGEs에 의해 혈관내피세포에서 생성되는 혈관 활성 조절 물질의 이상에 따른 것으로 설명된다(4-8). AGEs에 의한 동맥경화증이나 당뇨 합병증과 같은 혈관성 질환을 예방하거나 진행을 억제시킬 수 있는 유효성분의 효능연구에 있어 혈관내피세포의 기능 상실을 측정하는 방법은 매우 중요하다.

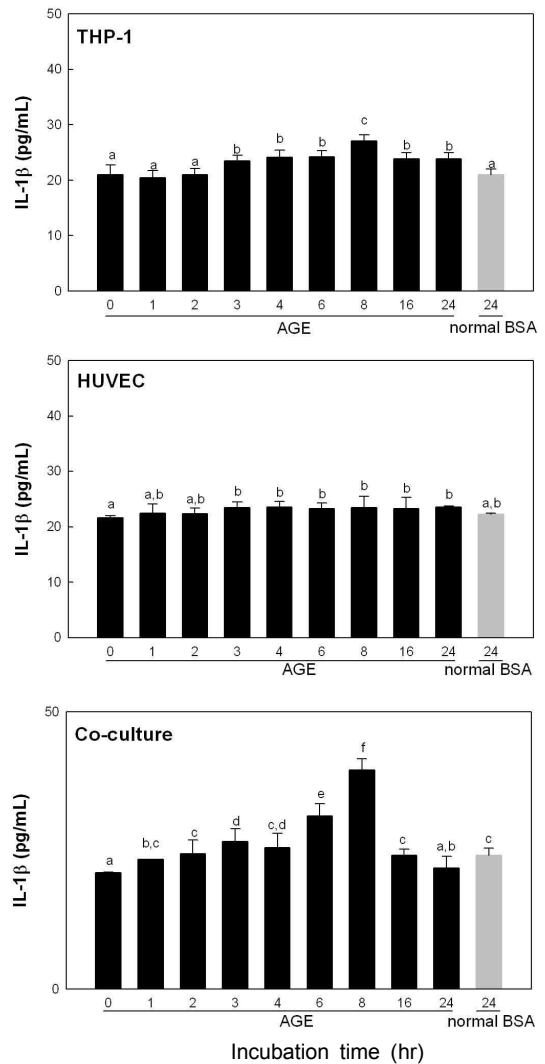


Fig. 5. IL-1 $\beta$  content in medium. Each system was incubated with 100  $\mu$ g/mL glyceraldehyde-AGEs. Values are mean $\pm$ SD and means with different letters (a-f) on bars are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range tests.

혈관내피세포의 기능상실에 혈구세포와의 상호작용이 매우 중요한 것이 이미 선행 연구자들에 의해 보고되어 있다. 혈구세포에 의해 활성화된 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine류는 혈관내피세포에 영향을 주어 E-selectin과 P-selectin과 같은 혈관내피세포의 adhesion receptors나 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), IL-8과 같은 chemokine을 생산하게 한다(24,33). Tsouknos 등(24)의 연구 결과에 의하면 혈구세포와 혈관내피세포의 1:1 배양이 혈관내피세포에 100 U/mL의 TNF- $\alpha$ 를 처리한 것과 유사한 수준으로 E-selectin과 VCAM-1이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 배양 4시간과 24시간을 비교해본 결과 배양 24시간에 더 증가하였다고 보고하였다(이때의 측정방법은 immunofluorescence임). 그러나 본 연구자들이 검색해 본 결과 혈관내피세포와 혈구세포의 co-culture system은 보고된 논문을 찾을 수 있었으나 이 두 세포주와 AGEs와의 검색

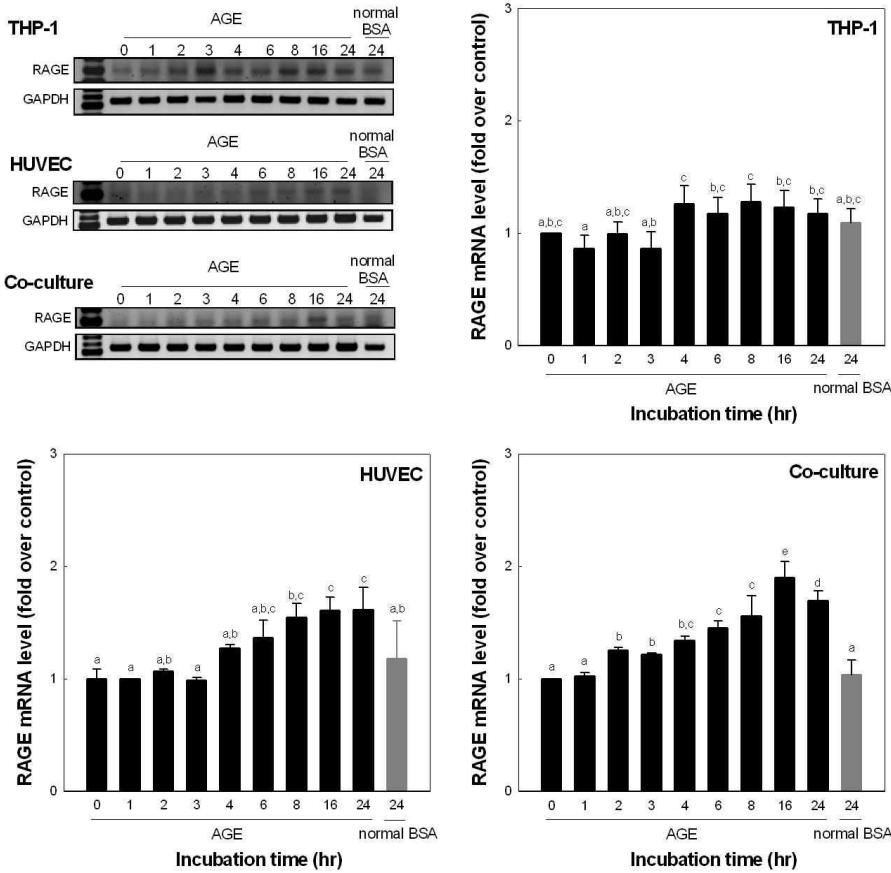


Fig. 6. mRNA expression of RAGE. Each system were incubated was 100 µg/mL glyceraldehyde-AGEs. Values are mean±SD and means with different letters (a-e) on bars are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range tests.

조건은 명확하게 검색할 수 없었다.

본 연구 결과 AGEs에 의한 혈관내피세포의 기능상실의 연구에 있어서 혈관내피세포를 단독으로 연구하는 것보다 단구세포와 같이 co-culture할 때 TNF-α와 IL-1β 같은 cytokine의 발현이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다. TNF-α와 IL-1β의 m-RNA 수준에서는 배양 4시간에서 가장 높은 증가량을 보였고, 방출된 단백질의 수준에서는(배지 내에 함유된 단백질 양) 배양 8시간에 가장 많은 증가량을 보였다. 특히 단구세포인 THP-1에 glycer-AGE를 처리한 경우 처리 2~3시간 후에 TNF-α와 IL-1β가 증가하였다. 그러나 HUVEC의 경우 유의적인 증가가 확인되지 않았으나 co-culture할 때에는 대조군에 비해 5.5배까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 AGEs에 의한 혈관내피세포의 cytokine의 발현은 단구세포와의 cell communication이 중요한 역할을 하는 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 RAGE의 경우 TNF-α와 IL-1β의 결과와는 다르게 co-culture나 단독배양이나 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 그러나 배양 시간이 길어질수록 co-culture system에서 혈관내피세포에서 AGEs의 receptor의 발현이 증가하는 것으로 보아 증가된 cytokine의 영향은 있는 것으로 추정할 수 있었다.

본 연구결과 최종당화산물에 의해 혈관내피세포의 기능상실의 연구에 있어 식품소재나 천연소재로부터 효능물질의 유효성 검색 시 본 연구결과에서 얻은 co-culture 조건이

유용하게 사용될 것이며 특히 mRNA 수준에서는 처리 후 4시간에, protein 수준에서는 8시간에 효능을 측정하면 유효성 있는 연구 성과를 얻을 있을 것으로 기대된다.

### 요 약

Glyceraldehyde를 이용하여 제조된 AGEs 화합물(glycer-AGEs)을 단구세포인 THP-1, 혈관내피세포인 HUVEC 및 이 두 세포가 동시에 배양된 system에서 100 µg/mL로 처리 후 24시간까지 처리시간을 달리하여 처리하였다. 배양시간 동안 각 세포와 배양액을 회수하여 TNF-α와 IL-1β의 발현을 mRNA 수준에서 조사하였다. 그 결과, THP-1의 경우 배양 2시간에서 TNF-α나 IL-1β의 mRNA 발현이 대조군에 비해 증가되었으나 혈관내피세포인 HUVEC의 경우에는 24시간 배양하는 동안 유의적인 차이가 없었다. 그러나 두 세포를 동시에 배양한 system에서 혈관내피세포인 HUVEC의 경우에는 배양 4시간에서 대조군보다 TNF-α의 발현은 4.4배, IL-1β의 경우 5.5배 정도 증가되는 것을 확인할 수 있었다. TNF-α와 IL-1β의 배지 내에서의 농도를 측정해 본 결과, THP-1만 배양한 경우 대조군의 배지 내 TNF-α 함량이 배양 6시간에 98.2 pg/mL로 대조군 53.8 pg/mL보다 증가하였으며 HUVEC의 경우 배양 8시간에 93.3 pg/mL로 증가하였다. 그러나 co-culture의 경우 배양 4시간부터 증가

하여 배양 8시간에 199.2 pg/mL로 증가하였다. RAGE는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 발현 pattern과 다르게 단독 및 co-culture에서 배양 16시간에 대조구에 비해 각각 1.6배, 24시간에 1.9배 증가하였다. 따라서 본 연구 결과 최종당화산물에 의해 혈관내피세포의 기능상실의 연구에 있어 co-culture 조건이 유용하며, 특히 mRNA 수준에서는 4시간에, protein 수준에서는 8시간에 효능을 측정하면 유효성 있는 연구 성과를 얻을 있을 것으로 예측할 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었으며(KRF-2008-532-F00019) 이에 감사드립니다.

### 문헌

- Monnier VM, Elmetts CA, Frank KE, Vishwanath V, Yamashita T. 1986. Age-related normalization of the browning rate of collagen in diabetic subjects without retinopathy. *J Clin Invest* 78: 832-835.
- Vishwanath V, Frank KE, Elmetts CA, Dauchot PJ, Monnier VM. 1986. Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus. Correlation with long-term complications. *Diabetes* 35: 916-921.
- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. 1990. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 932-939.
- Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR. 1994. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 343: 1519-1522.
- Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED. 1999. Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 42: 728-736.
- Bucala R, Vlassara H. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis* 26: 875-888.
- Hsieh CL, Lin YC, Ko WS, Peng CH, Huang CN, Peng RY. 2005. Inhibitory effect of some selected nutraceutical herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. *J Ethnopharmacol* 102: 357-363.
- Ma H, Li SY, Xu P, Babcock SA, Dolence EK, Brownlee M, Li J, Ren J. 2009. Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) upregulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 13: 1751-1764.
- Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bunting CE, Slavina ES, Dedov II, Orekhov AN. 1993. Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis* 100: 41-54.
- Magalhaes PM, Appell HJ, Duarte JA. 2008. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic complications: the protective role of regular physical activity. *Eur Rev Aging Phys A* 5: 17-29.
- Goh SY, Cooper ME. 2008. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1143-1152.
- Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, Stern DM, Yan SD. 2001. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol* 171: 29-45.
- Linden E, Cai W, He JC, Xue C, Li Z, Winston J, Vlassara H, Uribarri J. 2008. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 691-698.
- Lo CY, Li S, Tan D, Pan MH, Sang S, Ho CT. 2006. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol Nutr Food Res* 50: 1118-1128.
- Takada M, Ku Y, Toyama H, Suzuki Y, Kuroda Y. 2002. Suppressive effects of tea polyphenol and conformational changes with receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression in human hepatoma cells. *Hepatogastroenterology* 49: 928-931.
- Ahmad MS, Ahmed N. 2006. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *J Nutr* 136: 796S-799S.
- Lee HS, Koo YC, Suh HJ, Kim KY, Lee KW. 2010. Preventive effects of chebulic acid isolated from *Terminalia chebula* on advanced glycation endproduct-induced endothelial cell dysfunction. *J Ethnopharmacol* 131: 567-574.
- Speciale A, Canali R, Chirafisi J, Saija A, Virgili F, Cimino F. 2010. Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF- $\alpha$ -induced endothelial dysfunction: involvement of nuclear factor- $\kappa$ B signaling. *J Agric Food Chem* 58: 12048-12054.
- Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. 2008. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 578-583.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. 2004. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63: 582-592.
- Takeuchi M, Makita Z, Bucala R, Suzuki T, Koike T, Kameda Y. 2000. Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds *in vivo*. *Mol Med* 6: 114-125.
- Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Takeuchi M, Kikuchi S, Ohno S, Yoshimura A. 2002. Incadronate disodium inhibits advanced glycation end products-induced angiogenesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 419-424.
- Niyya Y, Abumiya T, Shichinohe H, Kuroda S, Kikuchi S, Ieko M, Yamagishi S, Takeuchi M, Sato T, Iwasaki Y. 2006. Susceptibility of brain microvascular endothelial cells to advanced glycation end products-induced tissue factor upregulation is associated with intracellular reactive oxygen species. *Brain Res* 1108: 179-187.
- Tsouknos A, Nash GB, Rainger GE. 2003. Monocytes initiate a cycle of leukocyte recruitment when cocultured with endothelial cells. *Atherosclerosis* 170: 49-58.
- Shibata M, Hariya T, Hatao M, Ashikaga T, Ichikawa P.

1999. Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for determination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol Sci* 49: 290-296.
26. Tanji K, Mori F, Imaizumi T, Yoshida H, Matsumiya T, Tamo W, Yoshimoto M, Odagiri H, Sasaki M, Takahashi H, Satoh K, Wakabayashi K. 2002. Upregulation of  $\alpha$ -synuclein by lipopolysaccharide and interleukin-1 in human macrophages. *Pathology International* 52: 572-577.
27. Heraud JM, Lavergne A, Kazanji M. 2002. Molecular cloning, characterization, and quantification of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) Th1 and Th2 cytokines. *Immunogenetics* 54: 20-29.
28. Lee SJ, Lee WK. 2007. Protective effect of (-)-epigallocatechin gallate against advanced glycation endproducts-induced injury in neuronal cells. *Biol Pharm Bull* 30: 1369-1373.
29. Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. 1999. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 251-258.
30. Sato T, Shimogaito N, Wu X, Kikuchi S, Yamagishi S, Takeuchi M. 2006. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 21: 197-208.
31. Münch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA, Perry G, Riederer P. 1998. Alzheimer's disease-synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 105 : 439-461.
32. Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y. 1988. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 51: 515-519.
33. Dunon D, Piali L, Imhof B. 1996. To stick or not to stick-the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* 8: 714-723.

(2011년 1월 6일 접수; 2011년 2월 28일 채택)