최종당화산물의 연구동향과 당뇨 합병증 억제조절기술 개발

Reseaerch trend on advanced glycation end products and its mechanism, and development of therapeutic control for diabetic complications

이광원*

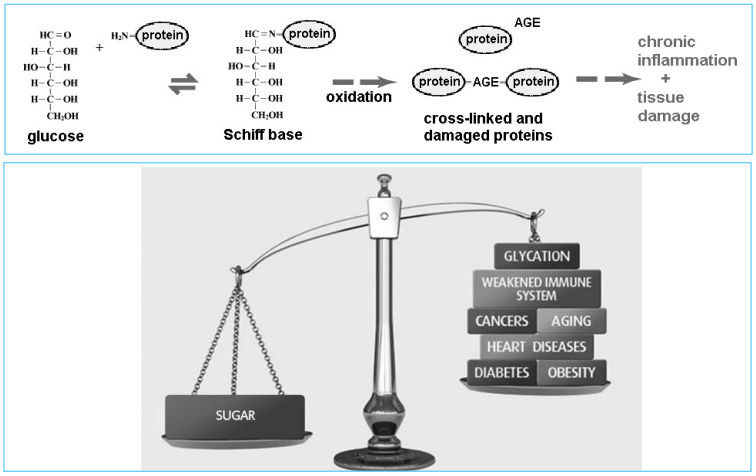
Kwang-Won Lee*

고려대학교 식품공학과 식품생화학 및 독성학 실험실

Food Biochemistry and Toxicology Laboratory, Dept. Food Bioscience and Technology, Korea University

1. 서론

글라이케이션(Glycation)은 마이얄 반응(Maillard Reaction)이라고도 알려져 있으며, 당과 단백질 사이의 비효소적 갈변 반응으로 일어나게 된다. 당뇨병은 혈당이 높은 상태로 유지되어 나타나는 질환으로서, 이로 인하여 생명유지에 필요한 단백질이 고혈당에 노출되어 글라이케이션이 되면 비가역적이고 다양한 종류의 최종당화산물(advanced glycation endproducts; AGEs, 이하 AGEs로 기술)의 형성이 촉진된다. 이러한 AGEs는 당뇨 합병증과 관련된 중요한 인자가 된다(Figure 1). 예를 들어 글라이케이션의 중요성은 당뇨환자의 혈액에서 당화혈색소(HbA1c)의 현저한 증가를 보이고 이는 현재 당뇨 합병증의 마커로 혈액임상에서 널리 쓰이고 있다.



<Figure 1.> 최종당화산물(AGEs)의 형성 과정과 그로 인한 당뇨 합병증의 발병

몸 안에서 일어나는 AGEs의 형성은 건강에 많은 피해를 주게 되는데 특히 당뇨 합병증인 심혈관 질환과 고혈압, 신장장애, 신경질환(치매)과 안질환(백내장)등의 발생에 영향을 준다. 대한당뇨병학회 「2012 한국인 당뇨병 연구 보

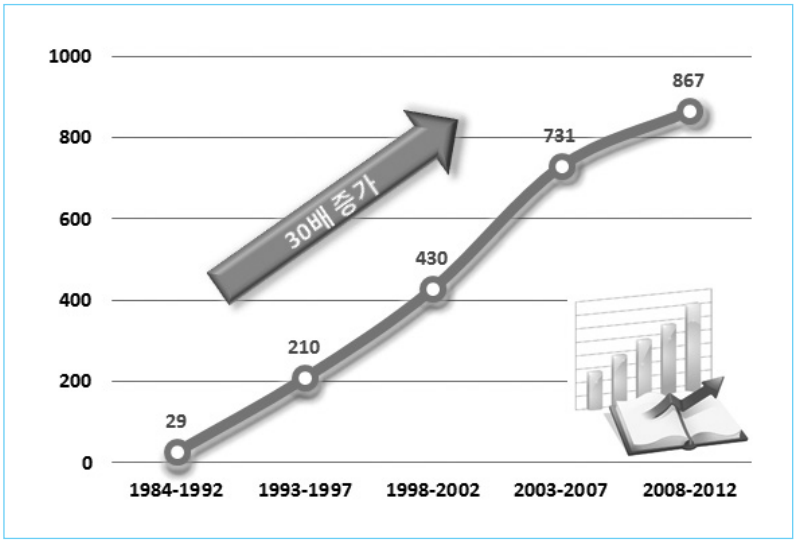
*Correspondence to: Kwang-Won Lee, Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, 1, 5-ga, Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

고서」발표에 의하면 성인 10명 중 1명은 당뇨병환자, 10명 중 2명은 잠재적인 당뇨병단계인 공복혈당장애, 국민 10명 중 3명이 고혈당으로부터 위협받고 있는 것으로 나타났다. 2010년 당뇨환자는 320만명이며, 40년 후인 2050년이 되면 현재의 약 2배 수준인 590만명 이상이 될 것으로 조사됐다. 또한 고령화 시대에는 당뇨 발병이 높은 노년층이 늘어나기 때문에 문제의 심각성이 배가되고 있다.

당뇨 합병증의 직접적인 원인으로 주목받고 있는 최종당화산물 AGEs에 대한 연구는 해마다 증가하는 추세이다(Figure 2). 그러나 AGEs는 종류가 매우 다양하며, 그 중에서 불과 1% 정도만이 구조가 규명되었다. 또한 AGEs는 단일한 화학적 성질을 가진 화합물이 아니기 때문에 시스템적인 접근이 필요하다. 현재까지의 AGEs에 대한 연구는 특정 AGEs만을 가지고 연구결과를 보고하고 있다. 따라서 그 밖의 나머지 AGEs에 대해서도 인체에 대한 영향을 연구 할 필요가 있다고 판단된다.

당뇨병에 대한 사회적 문제의 심각성에 따라, 당뇨 합병증의 원인이 되는 AGEs에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있고, AGEs 생성 억제 또는 항염증에 효과가 있는 후보 화합물들을 이용하여 당뇨 합병증의 발생을 예방 및 지연시키는 연구가 활발히 진행되고 있다. 여러 가지 AGEs 억제제(aminoguanidine, metformin, pyridoxamine, OPB-9195, LR-50 포함)가 당뇨 합병증 치료를 위해 시도가 되었으나, 임상 적용 시 사구체염과 체중 감소 등 사용하기에는 어려운 부작용을 일으켜서 문제가 되고 있다. 그러므로 이러한 부작용이 거의 없는 천연제제를 찾는 노력이 경쟁적으로 진행되고 있다. 또한 우리나라의 자생하는 식물 소재이거나 자체적으로 발굴한 천연 소재들을 가지고 당뇨 합병증 억제 연구를 시도하는 것 또한 상당한 연구 인력과 시간을 필요로 한다.

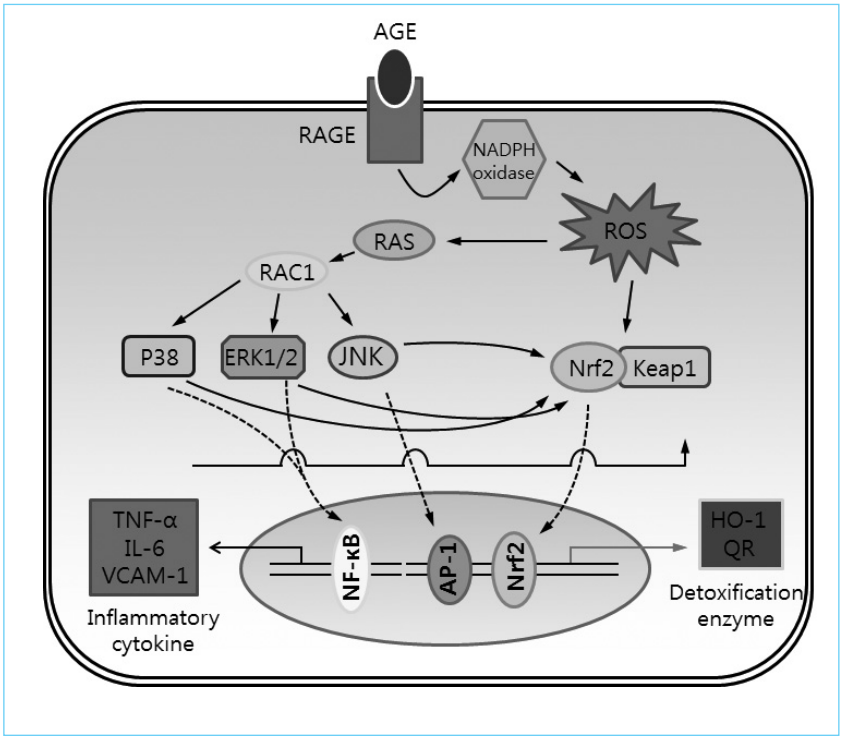
따라서 최종당화산물 AGEs 형성에 의한 당뇨 합병증에 대해서 효과적이고 차별화된 접근을 하기 위해서는 원인 물질인 AGEs를 시스템적으로 구분하여 접근하는 전략과 이미 검증된 고유 정제 화합물을 가지고 AGEs 억제 기전 규명과 치료 기술을 개발할 필요가 있다고 판단된다.



<Figure 2.> AGEs 유도 당뇨 합병증 관련 논문 수 증가 추세

2. AGEs 연구의 국내 · 외 동향

AGEs에 의한 산화스트레스는 당뇨 합병증의 주요한 기여 원인으로 받아드려지고 있다. AGEs 수용체(receptor for AGEs; RAGE, 이하 RAGE로 기술)는 protein kinase C(PKC)를 매개로하여 NADPH oxidase를 활성화시키고 superoxide 라디칼을 만들어 낸다. AGEs-RAGE의 결합로부터 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 증가된다는 연구가 보고되고 있다. AGEs로 유도된 산화에 의한 손상은 H_2O_2가 매개하고 GSH의 증가에 의해 감소된다[6]. 따라서 세포 내에 주요 항산화제인 환원형 글루타치온(GSH)의 농도를 높여 AGEs에 의한 산화 스트레스로부터 보호해주는 방향으로의 연구가 활발히 진행되고 있다. 아울러 AGEs-RAGE 축을 통한 염증 관련 물질의 증가도 산화 스트레스와 밀접히 연관되어 있다고 알려져 있으며, 활성산소가 인슐린의 신호전달을 간섭하여 인슐린 저



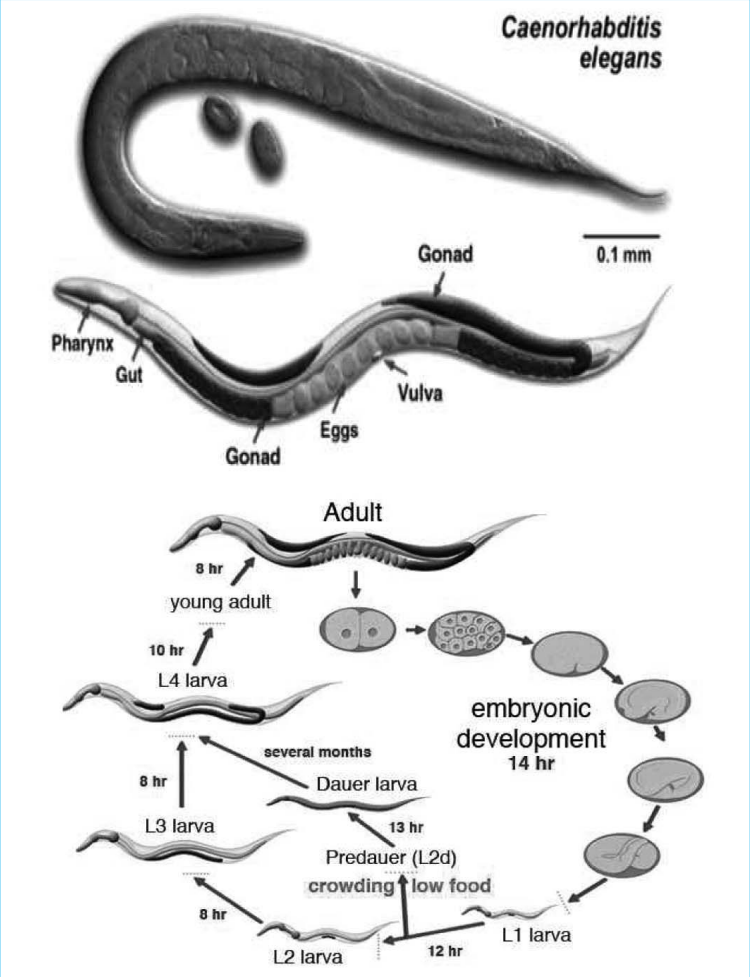
<Figure 3.> AGEs-AGEs 수용체 축(AGEs-RAGE axis)과 관련된 염증반응 및 무독화반응 신호전달과정 통합예측 그림

항성에 영향을 준다는 연구도 보고되었다.

AGEs-RAGE 경로를 통한 산화스트레스에 영향을 받는 전사조절인자로서 AP-1과 NF-κB가 있으며, 염증 반응을 매개 한다고 알려져 있다(Figure 3). 첫째로, AGEs에 의해 생성된 ROS는 $p21^{ras}$와 NF-κB를 활성화 시켜 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 염증 관련 사이토카인을 증가시킨다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 MCP-1, ICAM-1, p-selectin 등 단핵 세포의 부착에 관여하는 단백질들을 발현시켜 내피세포의 기능 장애를 유발한다는 연구 결과가 보고되었다. 둘째로 AGEs는 $p21^{ras}$와 Raf, JNK 경로를 통하여 AP-1을 활성화 시키고, 사이토카인과 phase Ⅱ 효소의 발현을 매개하여 염증 반응과 무독화 과정을 조절 한다고 보고되었다. ROS를 중개로 하여 NF-κB와 AP-1을 조절하는 신호 전달은 주로 MAP Kinase 경로를 통해서 전달된다. NF-κB는 ERK1/2, P38을 통해서, AP-1은 JNK 경로를 통해서 전달되어 이상을 일으킨다고 보고되어 있다.

세포 내 산화 반응에 관여하는 또 다른 단백질로 전사조절인자인 nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)가 중요한 역할을 하게 된다. 보통 조건에서는 Keap1 단백질과 결합하여 있지만, 활성화가 되면 Nrf2가 Keap1에서 떨어져 나와 핵 안으로 이동하여 c-Jun, Maf와 같은 전사조절인자와 hetero dimer 형태를 형성하고, 해당하는 유전자의 프로모터 내 조절 촉진 영역인 antioxidant response element(ARE)에 결합을 한다. Nrf2-ARE 결합은 세포 내 항산화 및 항염증에 관련된 200여개의 유전자 발현을 조절하는데 관여한다. 예를 들면 phase II 무독화 효소(NADPH quinone oxidoreductase 포함), GSH 생합성에 필요한 효소, superoxide dismutase, glucose-6-phosphate-dehydrogenase, heat shock proteins과 ferritin, COX-2, iNOS와 HO-1 효소의 발현에 관여한다. 즉, Nrf2의 손실은 Nrf2/ARE 경로를 저해하여 산화스트레스의 과중, 염증과 미토콘드리아의 이상기능을 유발하게 된다. 그렇기 때문에 Nrf2/ARE 경로의 조절은 당뇨 합병증 억제 연구에 잠재적으로 효과적인 접근법이 될 수 있다.

제 2형 당뇨(T2-D)의 병인으로 말초조직에서의 인슐린 저항성 증가 및 췌장 베타세포에서의 인슐린 분비능 감소, 간에서의 당신생 증가 등이 있다. 췌장 베타세포에서 glucokinase(GK)는 포도당 자극에 의한 인슐린분비(glucose stimulated insulin release)의 가장 첫 단계에 작용함으로서 일종의 센서역할을 한다. 이 효소는 글루코오스 저장과 처리에 필수적인 조절 역할을 하고 있다. 간세포는 글루코오스를 GLUT2(glucose transporter 2)를 통하여 흡수하고, liver-type GK(L-GK)는 글루코오스를 인산화시켜 세포질 안으로 가두어준다. 한편, 인슐린 수용체



<Figure 4.> C. elegans의 발생 과정

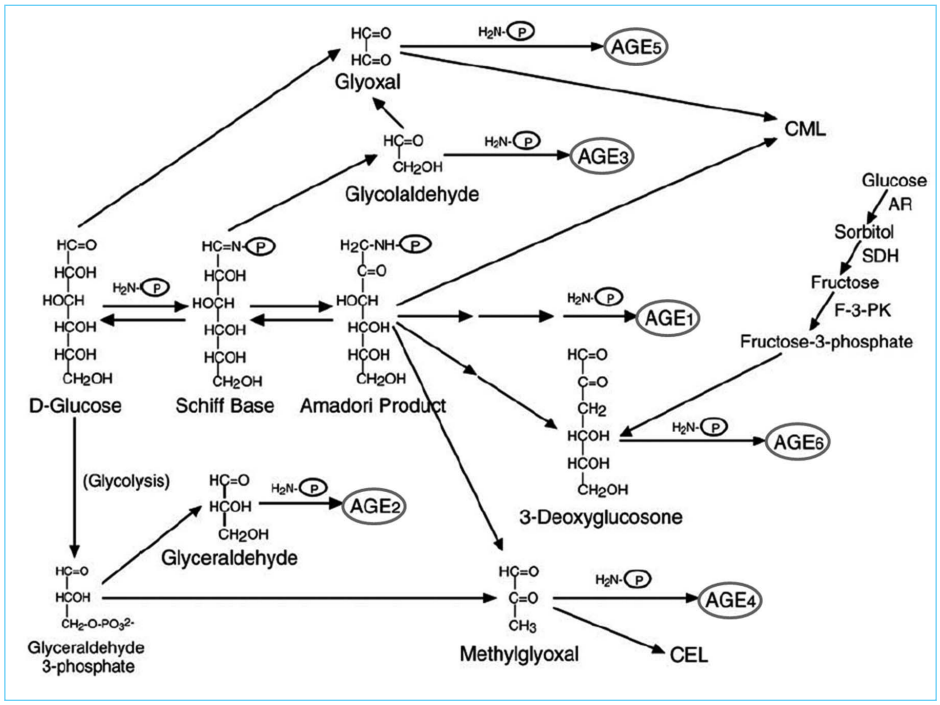
(insulin receptor; IR)의 활성화와 downstream kinase cascade를 연결하는 Akt가 간의 인슐린 민감도를 저해시키는 포인트가 알려져 있다. 인슐린 수용체 기질(IRS)의 Tyr 인산화는 PKB/Akt 신호전달을 활성화 시켜 글루코오스 수송체를 세포막으로 이동을 촉진하여 인슐린 민감성을 개선한다. 많은 연구들이 인슐린 신호전달을 활성화 시키고, 염증반응을 저해하여 간세포에서의 인슐린 저항성을 개선시키는데 집중되고 있다.

Caenorhabditis. elegans(꼬마선충)는 진핵 생물 중에서 가장 먼저 전체 DNA의 염기서열이 분석된 생물로서 포유류와의 생물학적 유사성이 확인 되었다. *C. elegans*의 사멸 주기는 정상적인 조건에서 약 3주 정도로 짧으며 여러 가지 변인들을 통제하기 쉽고 빠른 결과를 얻을 수 있는 등의 장점으로, 다양한 연령과 산화스트레스 관련된 당뇨병, 치매, 파킨스병을 포함한 다양한 질병들을 연구하기 위해 사용되고 있다(Figure 4). 고혈당이 지속되면 활성산소의 증가와 미토콘드리아 단백질의 글라이케이션으로 *C. elegans*의 수명을 단축시킨다는 연구 결과가 보고되었다. *C. elegans*는 질환 발병과 약물 효과의 분자 기전을 연구하는 매우 중요한 *in vivo* 모델이 되고 있다.

동물 실험을 통하여 AGEs-RAGE의 조절이 질병에 미치는 영향에 대한 연구들이 진행되고 있다. RAGE 발현 조절에 대한 연구로 CLP(Cecal ligation and puncture)로 인하여 패혈증이 유발 된 쥐에서 RAGE를 knockout 시키거나 anti-RAGE 항체를 처리한 그룹들은 대조군에 비해 생존률이 증가하는 결과를 보여주었다. 이는 RAGE의 발현 억제 및 저해를 통하여 당뇨 합병증으로서의 패혈증 예방과 치료에 중요한 타겟이 될 수 있음을 의미한다. 한편, methylglyoxal(MG)을 섭취한 ddY mice에서 혈액 내의 GSH는 농도가 감소하고, 적혈구의 산소 포화율이 낮아지는 것을 관찰하였으며, 글루코오스의 흡수율이 대조군에 비하여 5.3배 정도 떨어진다는 연구 결과가 보고되었다. AGEs의 일종인 MG는 체내 항산화 효소인 glutathione S-transferase(GST)의 활성을 저해시키고 산화스트레스와 세포 독성을 나타낼 뿐만 아니라, 글루코오스의 흡수를 억제하여 당뇨병 기전 연구 모델로 중요하게 활용될 수 있다는 것을 제시하고 있다.

3. 향후 AGEs 연구의 방향

기존의 당뇨병 연구는 글라이케이션 반응을 진행시킬 때, 고 농도의 글루코오스를 사용해 왔지만, 글루코오스는 화학



<Figure 5> 당뇨 환자에서 발견 된 여섯 가지 종류의 AGEs

적으로 상당히 안정한 당이라 글라이케이션 반응을 일으키기 위해서, 생리적인 농도 보다 높은 수준의 농도로(18,000 g/dL 이상) 장기간(~6 개월) 단백질과 반응시키는 프로토콜을 사용했다는 것이다. 그렇지만 글루코오스가 글라이케이션을 과도하게 일으킨다면, 이로 인한 생체 내 시스템의 손상으로 인류의 생존 자체가 어려울 것이다. 다시 말해 글루코오스 자체만으로 글라이케이션에 의한 당뇨 합병증에 관한 접근은 한계가 있다. 또한 글라이케이션으로 생성된 AGEs를 공통되고 단일화된 형태로 간주하여 이에 대한 영향을 연구하려고 하는데 글라이케이션 반응물은 화학적으로 비균질화된 복합체이기 때문에, 현재까지 구조가 알려진 AGEs는 전체의 1%에 불과하다. 따라서 AGEs에 대한 체계적인 접근법이 필요하다고 할 수 있다.

최근 연구에 의하면, 인체에 항암, 항염증 등의 면역증진 활성을 나타내는 AGEs도 보고되고 있다. 예를 들어 갈락토오스와 키토산 단백질 간의 당화반응은 대식 세포의 상호작용 및 *in vivo* 실험을 통해 면역 반응을 유도한다는 사실이 증명되었다. 또한 글루코오스-카제인의 마이얄 반응물은 IL-8, iNOS 등의 사이토카인을 발현시켜 항염증의 효과가 있다고 보고되었다.

2004년 발표된 독성 최종당 화 산 물 (toxic AGEs, TAGE) 접근법으로 AGEs를 분류하는 것에 주목할 필요가 있다. 이 논문에 따르면 당뇨 환자에게서 여섯 가지의 AGEs(AGEs1-6)가 확인되었다 (Figure 5). 이 중 glyceraldehyde 유래의 AGEs(AGE2)와 glycolaldehyde 유래의 AGEs(AGE3)가 TAGE로서 세포 독성이 있다고 한다. 그러나 나머지 AGE1(Amadori product), AGE4(methylglyoxal), AGE5(glyoxal), AGE6(3-deoxy glucosone)에 대한 세포 신호전달 및 당뇨 합병증의 영향에 대한 체계적이고 전반적인 기전 연구는 연구된 바 없다.

마지막으로 고려해야 할 사항은 당뇨 합병증에 관련된 *in vitro* 실험을 진행할 경우 세포 내 신호전달, 유전자 발현 등의 연구는 일반적으로 타겟 세포만을 가지고 단일배양 하는 것이 대부분이다. 그러나 실제 혈관에서 이웃하고 있는 세포들과의 관계를 고려한 AGEs의 영향을 연구하기 위해 혈관 동시배양 시스템을 구축할 필요가 있다. Glycolaldehyde 유래의 AGEs가 혈관내피세포(HUVEC)와 단구세포(THP-1)가 공존하는 상태에서 혈관 평활근세포(HA-VSMC)의 염증 반응 및 세포의 증식 관련 사이토카인을 더 많이 발현한다는 것을 보고하였다. 이로써 AGEs가 관련된 당뇨 합병증 연구에서 생체 내 환경을 조성하기 위해서는 동시 상호배양 시스템을 이용 할 필요가 있다. AGEs 생성 억제 활성이 있는 화합물의 경우, 보통 그 활

성을 일으키는 신호전달이 전사 조절인자와 그와 관련된 유전자 발현으로 연결되는 하나의 신호전달로만 인식하는 제한적인 접근법을 취해왔다. 그러나 활성에 관여하는 신호전달 체계는 서로 cross-talking 되어있기 때문에 보다 포괄적인 차원에서 관련 유전자들과 단백질의 상호의존적인 관계를 알아보는 연구가 필요하다.

4. 결론

AGEs에 대한 접근 방법을 다각화하여 다양한 당 유래의 AGEs를 체계적으로 분류하고, 어떠한 AGEs가 질병에 관계된 변화를 유도하는지를 구분할 필요성이 있다. 이에 대한 시도는 당뇨 합병증에 영향을 미치는 정도에 따라 AGEs의 기준을 세우는데 기여를 할 것이다. 아울러 상호 배양시스템 및 *C. elegans*를 이용한 AGEs와 당뇨 합병증 에 대한 연구는 최종당화산물 AGEs의 시스템적 구분 및 이를 이용한 당뇨 합병증 신호 전달을 규명하고, 고유 정제 화합물을 활용한 당뇨 합병증 억제 및 치료 기전을 개발하는 데 상당한 기여를 할 것이다.

참고 문헌

1. N.A. Ankrah and R. Appiah-Opong. Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. Toxicology Letters 1999. 109(1-2):61-67.

2. A. Bag, S.K. Bhattacharyya, R.R. Chattopadhyay. Therapeutic potential of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae):The Ayurvedic wonder. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2013. 3(3):244-252.

3. S. Cellek, W. Qu, A.M. Schmidt and S. Moncada. Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: A new insight into selective nitrergic neuropathy in diabetes. Diabetologia 2004. 47(2):331-339.

4. C.Y. Chao, M.C. Mong, K.C. Chan and M.C. Yin. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. Molecular Nutrition & Food Research 2010. 54(3):388-395.

5. C.H. Cottart, V. Nivet-Antoine, C. Laguillier-Morizot and J.L. Beaudeux. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. Molecular Nutrition & Food Research 2010. 54(1):7-16.

6. M. Endo, K. Yanagisawa, K. Tsuchida, T. Okamoto, T. Matsushita, M. Higuchi, A. Matsuda, M. Takeuchi, Z. Makita and T. Koike. Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. Horm Metab Res 2001. 33(5):317-22.

7. N. Higuchi, M. Kato, M. Miyazaki, M. Tanaka, M. Kohjima, T. Ito, M. Nakamuta, M. Enjoji, K. Kotoh and R. Takayanagi. Potential Role of Branched-Chain Amino Acids in Glucose Metabolism Through the Accelerated Induction of the Glucose-Sensing Apparatus in the Liver. Journal of Cellular Biochemistry 2011. 112(1):30-38.

8. D.D. Kitts, X. M. Chen and H. Jing. Demonstration of Antioxidant and Anti-inflammatory Bioactivities from Sugar-Amino Acid Maillard Reaction Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2012. 60(27):6718-6727.

9. E.C. Lutterloh, S.M. Opal, D.D. Pittman, J.C. Keith, X.Y. Tan, B.M. Clancy, H. Palmer, K. Milarski, Y. Sun, J.E. Palardy, N.A. Parejo and N. Kessimian. Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection. Critical Care 2007. 11(6).

10. R.M. O'Doherty, D.L. Lehman, S. Telemaque-Potts and C.B. Newgard. Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver - Lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. Diabetes 1999. 48(10):2022-2027.

11. R. Pazdro and J. R. Burgess. The antioxidant 3H-1,2-dithiole-3-thione potentiates advanced glycation end-product-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. Exp Diabetes Res 2012. 2012:137607.

12. B. Ponugoti, G.Y. Dong and D.T. Graves. Role of Forkhead Transcription Factors in Diabetes-Induced Oxidative Stress. Experimental Diabetes Research 2012.

13. I. Rahman and W. MacNee. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. Free Radic Biol Med 2000. 28(9):1405-20.

14. T. Sato, M. Iwaki, N. Shimogaito, X. G. Wu, S. Yamagishi and M. Takeuchi. TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. Current Molecular Medicine 2006. 6(3):351-358.

15. Y.C. Shi, V.H.C. Liao and T.M. Pan. Monascin from red mold dioscorea as a novel antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and Caenorhabditis elegans. Free Radical Biology and Medicine 2012. 52(1):109-117.

16. M. Takeuchi and S. Yamagishi. TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. Medical Hypotheses 2004. 63(3):449-452.

17. Y. Urata, M. Yamaguchi, Y. Higashiyama, Y. Ihara, S. Goto, M. Kuwano, S. Horiuchi, K. Sumikawa and T. Kondo. Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages. Free Radical Biology and Medicine 2002. 32(8):688-701.

18. F.L. van Muiswinkel and H. B. Kuiperij. The Nrf2-ARE Signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2005. 4(3):267-81.

19. H. Vlassara. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes Metab Res Rev 2001. 17(6):436-43.

20. M.P. Wautier, O. Chappey, S. Corda, D.M. Stern, A.M. Schimidt and J.L. Wautier. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2001. 280(5):E685-E694.

21. C.H. Wu, S M. Huang, J.A. Lin and G.C. Yen. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. Food & Function 2011. 2(5):224-234.

22. W. Zhang, H. Liu, M. Al-Shabrawey, R.W. Caldwell and R. B. Caldwell. Inflammation and diabetic retinal microvascular complications. J Cardiovasc Dis Res 2011. 2(2):96-103.

23. F.F. Zhou, S. Song, W.R. Chen and D. Xing. Immunostimulatory properties of glycated chitosan. Journal of X-Ray Science and Technology 2011. 19(2):285-292.