

## 볼레기말(*Colpomenia sinuosa*)의 최종당화산물 저해 효능 및 신장 보호 효과

### Anti-glycation effect and renal protective activity of *Colpomenia sinuosa* extracts against advanced glycation end-products (AGEs)

김민경<sup>1,2</sup>, 조치흥<sup>2</sup>, 김세라<sup>3</sup>, 최인욱<sup>4</sup>, 이상훈<sup>5\*</sup>

Mingyeong Kim<sup>1</sup>, Chi Heung Cho<sup>2</sup>, Sera Kim<sup>3</sup>, In-Wook Choi<sup>4</sup> and Sang-Hoon Lee<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>대학원생, 과학기술연합대학원대학교 식품생명공학전공, 대전광역시 유성구 가정로 217, 34113, 대한민국

<sup>2</sup>박사후연구원, 한국식품연구원 식품기능연구본부, 전북 완주군 농생명로 245, 55365, 대한민국

<sup>3</sup>연구원, 한국식품연구원 식품기능연구본부, 전북 완주군 농생명로 245, 55365, 대한민국

<sup>4,5</sup>책임연구원, 한국식품연구원 식품기능연구본부, 전북 완주군 농생명로 245, 55365, 대한민국

<sup>1,5</sup>Department of Food Biotechnology, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Republic of Korea

<sup>1,2,3,4,5</sup>Division of Food Functionality Research, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Republic of Korea

(Received 22 November 2021, Revised 24 December 2021, Accepted 24 December 2021)

**Abstract** Here, we evaluated the anti-glycation effects and renal protective properties of 70% (v/v) ethanolic extract of *Colpomenia sinuosa* (CSE) against AGEs-induced oxidative stress and apoptosis at different concentrations (1, 5, and 20 µg/mL). At 20 µg/mL, CSE showed that anti-glycation activities via the inhibition of AGE formation (51.1%), inhibition of AGEs-protein cross-linking (61.7%), and breaking of AGEs-protein cross-links (33.3%), were significantly (###p < 0.001 vs. non-treated group) lower than the nontreated group. Methylglyoxal (MGO) significantly (\*\*p < 0.001) reduced cell viability (24.4%) and increased reactive oxygen species (ROS) level (642.3%), MGO accumulation (119.4 µg/mL), and apoptosis (55.0%) in mesangial cells compared to the nontreated group. Pretreatment with CSE significantly (###p < 0.001) increased cell viability (57.8%) and decreased intracellular ROS (96.5%), MGO accumulation (80.0 µg/mL), and apoptosis (22.6%) at 20 µg/mL. Additionally, we confirmed intracellular AGEs reduction by CSE pretreatment. Consequently, our results suggest that CSE is a good source of natural therapeutics for managing diabetic complications by the antiglycation effect and renal protective activity against MGO-induced oxidative stress.

**Keywords :** *Colpomenia sinuosa*, marine algae, advanced glycation end-products, renal protective effect, diabetic complications

## 서론

Maillard 반응이라고 불리는 환원당의 카르보닐 그룹과 단백질의 유리 아미노 그룹의 비효소적 당화

\* Corresponding author  
Phone: +82-63-219-9357 Fax: +82-  
E-mail: [shnlee@kfri.re.kr](mailto:shnlee@kfri.re.kr)

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

반응을 통해 최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)이 생성된다. [1]. 환원당과 단백질의 lysine 잔기 혹은 N 말단이 반응하여 carbinol-amine 중간체가 형성되고 amadori rearrangement를 통해 amadori형의 초기 당화산물이 생성된다. 고혈당 상태가 지속되어 amadori형의 초기 당화산물이 분해되지 않고 산화, 탈수, 및 축합 반응한다. 이 때 생성된 dicarbonyl 중간체들은 단백질과 교차결합(cross-link)을 형성하고, 비가역적인 반응을 통해 최종적으로 최종당화산물이 된다[2, 3]. 이러한 반응이 만성적인 고혈당 상태에서 발생하여, 혈장 단백질이나 여러 조직에 최종당화산물이 축적된다. 축적된 최종당화산물은 세포 증식, 유전자 발현 및 세포 내 산화적 스트레스에 영향을 미치고 최종당화산물 수용체(receptor of AGEs, RAGE)와 반응하여 망막 병증, 신경 병증 및 신장 병증과 같은 만성 당뇨병성 합병증의 발병의 주요 원인으로 작용한다[4].

체내 최종당화산물의 축적은 당뇨병성 합병증 유발에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 이를 완화할 수 있는 소재에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 당뇨병성 합병증 발병을 예방하거나 증상을 완화시키는 효과적인 방법으로 최종당화산물의 생성을 억제하거나 체내 축적된 최종당화산물과 단백질 간의 교차결합을 절단하거나 교차결합 형성을 억제하는 방법이 있다[5]. 당뇨 합병증의 치료제로 개발된 합성 물질 중 alagebrium (ALT-711)과 aminoguanidine (AG)은 최종당화산물의 교차결합을 절단하고 최종당화산물 생성 및 교차결합 형성을 억제한다고 보고되어 있으나, 임상시험 단계에서 위장 장애, 간 기능 이상, 독감 유사 증상 및 울혈성 심부전증 등과 같은 부작용이 발생하여 개발이 중단되었다[6, 7]. 최근에는 부작용의 위험성이 높은 합성 화합물 대신 상대적으로 부작용 발생 위험이 낮은 천연물 소재에서 유래한 생리활성 성분을 이용한 당뇨 합병증 치료제 연구가 활발히 이루어지고 있다.

아시아 연안 지역에서 한약재 및 식품으로 사용되는 해조류는 소화 흡수율이 낮고 영양가가 낮아 영양학적 측면에서 관심을 끌지 못하였으나, 최근 가공성 식이섬유, 필수아미노산, 폴리페놀, 다중 불포화 지방산 및 미네랄 등 다양한 생리 활성물질을 함유되어 있음이 보고되어 해조류에 대한 관심이 높아

지고 있다[8-10]. 불레기말(*Colpomenia sinuosa*)은 갈조류에 속하는 해조류 중 하나로 z,z-6,28-heptatriactontadien-2-one, 2-hexadecanol, L-(+)-ascorbic acid, 3-methyl-2-(2-oxopropyl)furan, palmitaldehyde, squalene, trans-5-Hexyl-1,4-dioxane-2-carboxylic acid 및 vitamin E 등 다양한 생리활성 화합물을 보유하고 있다[11]. 불레기말은 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), nitric oxide radical, hydrogen peroxide, scavenging of 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical and total antioxidant capacity (TAC)의 항산화 효능 관련 실험에서 자유 라디칼 소거능을 나타낸다고 보고되며[12] carbon tetra chloride (CCl<sub>4</sub>)로 유도한 산화적 스트레스 및 신장 독성으로부터 lipid peroxidation 과 자유 라디칼 생성을 감소시켜 신장을 보호하는 기능을 가진다[13]. 불레기말은 갯년기 장애를 유발한 쥐의 지질 및 혈소판 응집능 개선 효과를 나타내며 결합조직 중 콜라겐 합성을 촉진한다[14]. 또한 불레기말은 혈당 조절과 관련되어있는 α-glucosidase 에 높은 저해 활성을 나타낸다 [15]. 하지만 불레기말의 항당화 활성에 대한 활성 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 불레기말의 최종당화산물과 콜라겐 사이의 비가역적인 교차결합 형성 억제, 교차결합 절단 효과 및 최종당화산물 생성 저해 효과를 검증하였다. 또한 신장 사구체 간질을 구성하는 mesangial 세포주를 이용하여 불레기말 추출물이 최종당화산물 생성의 전구물질인 methylglyoxal (MGO)에 의한 산화적 스트레스로부터 신장 세포를 보호하고 세포 내 MGO 및 AGEs 축적을 감소시키는 효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 시약

본 실험에 사용된 Collagen 1 coated plate, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. alagebrium (ALT-711)은 Matrix Scientific (Columbia, SC, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)/Ham's F12 Medium (F-12)은 Welgene

(Daegu, Korea)에서 구입하였다. Muse Annexin V and Dead Cell kit는 Luminex Co., Ltd (Austin, TX, USA)에서 구입하였다. 이 외에 사용된 다른 시약은 Sigma-Aldrich Co.,Ltd (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

## 2. 추출물 제조

본 실험에 사용된 불레기말(*Colpomenia sinuosa*)는 (주)아쿠아그린텍에서 제공받아 사용하였다. 불레기말 분말은 시료 중량의 40배 용량의 70% (v/v) 에탄올을 이용하여 추출하였으며, 교반추출기를 이용하여 50°C, 120 rpm에서 24시간 동안 추출하여 실험에 사용하였다. 추출물은 Whatman No.2 여과지(Whatman International Ltd., Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과한 추출물은 회전식 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 농축하였다. 에탄올을 제거 한 후 동결건조기를 이용하여 -40°C에서 5일간 동결 건조하였다. 동결 건조된 추출물은 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

## 3. 최종당화산물 생성 저해 효능 평가

최종당화산물 생성 저해 활성은 Do 등[16]의 방법을 변형하여 실시하였다. 10 mg/mL의 우혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 용해시키고, 2 M의 fructose와 glucose를 처리하였다. 최종당화산물 생성 반응 기간 동안 미생물이 생성되는 것을 방지하기 위해 50 mM phosphate buffer에 0.02%의 sodium azide를 처리하였다. 총 반응 용액 1 mL을 기준으로 불레기말 70% (v/v) 에탄올 추출물(CSE)을 1, 5, 및 20 µg/mL 농도로 처리하였으며, 양성대조군으로 사용한 AG는 0.5 mM 농도로 첨가한 후 37°C 항온기에서 7일 동안 반응시켰다. 최종당화산물 생성 저해 활성은 마이크로플레이트 형광 판독기(Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하여 excitation은 350 nm, emission은 450 nm에서 형광도를 측정하였다. 불레기말 추출물의 최종당화산물 생성 저해는 무첨가 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

## 4. 최종당화산물 교차결합 억제 효능 평가

CSE의 최종당화산물 교차결합 억제 실험은 Lee 등[17]의 방법을 변형하여 실시하였다. AGEs (5 µ

g/mL)와 CSE (1, 5, 및 20 µg/mL)를 혼합한 용액 100 µL를 collagen 1 coated plate에 분주한 후 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. AGEs 교차결합 억제제로 알려진 AG는 양성대조군으로 사용하였으며, 1 mM 농도로 처리하였다. 이후 phosphate-buffered saline with 0.05% tween (PBST)를 이용하여 96-well plate를 3회 세척하였으며, 100 µL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate 용액을 첨가하여 발색 시켰다. 반응 종료 후 분광광도계(Spectramax M2e)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 불레기말 추출물의 최종당화산물 교차결합 억제 효능은 무첨가 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

## 5. 최종당화산물 교차결합 절단 효능 평가

CSE의 최종당화산물 교차결합 억제 실험은 Lee 등[17]의 방법을 변형하여 실시하였다. 5 µg/mL 농도의 AGEs를 collagen 1 coated plate에 100 µL씩 분주한 후 37°C에서 4시간 동안 콜라겐과 AGEs간의 교차결합을 형성시켰다. 반응 종료 후 0.05% PBST를 이용하여 96-well plate를 3회 세척하였으며, CSE (1, 5, 및 20 µg/mL) 및 교차결합 절단제로 알려진 ALT-711 (500 µg/mL) 용액을 100 µL씩 분주하여 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 이후 phosphate-buffered saline with 0.05% tween (PBST)를 이용하여 96-well plate를 3회 세척하였으며, 100 µL TMB substrate 용액을 첨가하여 발색 시켰다. 최종 용액은 분광광도계(Spectramax M2e)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. CSE의 최종당화산물 교차결합 절단 효능은 무첨가 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

## 6. 세포 배양

본 실험에 사용한 mesangial (SV40 MES 13)세포는 쥐 신장 사구체(glomerulus)의 사구체 간질(mesangium)을 구성하는 세포주로, American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 DMEM/F12에 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 14 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)가 첨가된 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양

하였다.

## 7. 신장 세포 보호능 평가

CSE의 신장 세포 보호 효과를 평가하기 위해 MTT법을 이용하였다. 96-well plate에  $3.0 \times 10^4$  cell/well로 분주하여 3시간 배양 후 CSE를 1, 5, 및 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석하여 1시간 동안 처리한 후 methylglyoxal (MGO)을 1 mM 농도로 각 well에 첨가하였다. 양성대조군으로 사용한 AG는 0.5 mM 농도로 처리하였다. MGO 처리 23시간 후, MTT를 3시간 동안 반응시키고, dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 formazan을 용해시킨 후 마이크로 플레이트 판독기(Tecan Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신장 세포의 생존율은 무첨가 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

## 8. 세포 내 산화적 스트레스 측정

세포 내 산화적 스트레스 수준은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 시약을 이용한 fluorescence probe 방법을 사용하여 측정하였다. Mesangial 세포는 12-well plate에  $5.0 \times 10^5$  cell/well로 분주하여 3시간 배양하였다. 이후 CSE를 1, 5, 및 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 분주하여 1시간 동안 처리하였다. 양성대조군으로 사용한 AG는 0.5 mM 농도로 처리하였다. 산화적 스트레스 유발을 위해 1 mM MGO를 1시간동안 처리한 후 20  $\mu\text{M}$  DCFH-DA를 30분 동안 처리하였다. 세포 내 산화적 스트레스 수준은 마이크로 플레이트 형광 판독기(Infinite M200)를 이용하여 들뜸(excitation)은 485 nm, 방출(emission)은 530 nm에서 측정하였으며, 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

## 9. Apoptosis 분석

MGO에 의해 유도되는 mesangial 세포의 apoptotic 세포 사멸에 대한 CSE의 보호 효과를 확인하기 위해 MUSE Annexin V & dead cell kit (EMD Millipore, USA)를 이용하여 flow cytometry 방법으로 측정하였다. Mesangial 세포는 6-well plate에  $1.0 \times 10^6$  cell/well로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3시간 배양하였다. 이후 CSE (1, 5, 및 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 AG (0.5 mM)을 1시간 동안 처리하였다. 이후 1 mM MGO를 첨가하여 23시간 동안 반응시켜 apoptosis를 유발시켰다.

반응 종료 후 세포는 Annexin V & dead cell reagent를 첨가하여 20분 반응시킨 후 유세포 분석기(MUSE cell analyzer, Millipore, USA)로 5,000개의 세포를 분석하여 apoptotic 세포를 정량적으로 측정하였다. Apoptotic 세포는 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

## 10. 세포 내 MGO 및 AGEs 변화 측정

세포 내 methylglyoxal(MGO)-cross-linked proteins은 OxiSelect™ Methylglyoxal (MG) Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 배양 후 CSE를 1, 5, 및 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석하여 1시간 처리한 후 MGO를 1 mM 농도로 각 well에 첨가하였다. 양성대조군으로 사용한 AG는 0.5 mM 농도로 처리하였다. MGO 처리 23시간 후 lysis buffer를 처리하였다. 12000 rpm에서 10분 원심 분리한 후, 상등액을 취하여 MGO의 양을 측정하였다. 세포 내 MGO 함량은 단백질 양을 나누어 계산하였다.

세포 내 AGEs 형광 염색은 Yao 등[18]의 방법을 변형하여 실시하였다. 4 chamber slide에  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하였다. CSE, MGO, 및 AG의 농도 및 처리 시간은 세포 내 MGO 측정 방법과 동일하게 진행하였다. MGO 처리 23시간 후 차가운 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 2번 washing하였다. 4% formalin 및 0.1% triton X-100를 각각 15분 및 5분 처리하였다. 그 후 1% bovine serum albumin (BSA)로 30분 blocking한 뒤 AGEs antibody (abcam, ab23722, 1:200)를 처리한 후 4°C에서 overnight하였다. 그 후 Alexa 488 형광을 띠는 2차 항체를 상온에서 1시간 부착한 후 4,6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI)가 함유된 mounting solution을 처리하였다. DAPI 및 AGEs는 형광 현미경(Zeiss Axio Observer A1, ZEISS, Germany)으로 촬영하였다.

## 11. 통계 분석

모든 실험은 독립적으로 3회 이상 반복하여 측정하였으며, 결과 값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 통계분석은 GraphPad Prism ver. 9 (GraphPad

Software, Inc., SanDiego, CA, USA)를 이용하였다. 각 평균값의 유의적 차이를 검증하기 위해 0.05 미만 유의수준에서 Tukey's multiple comparisons을 이용하여 유의차를 검증하였다.

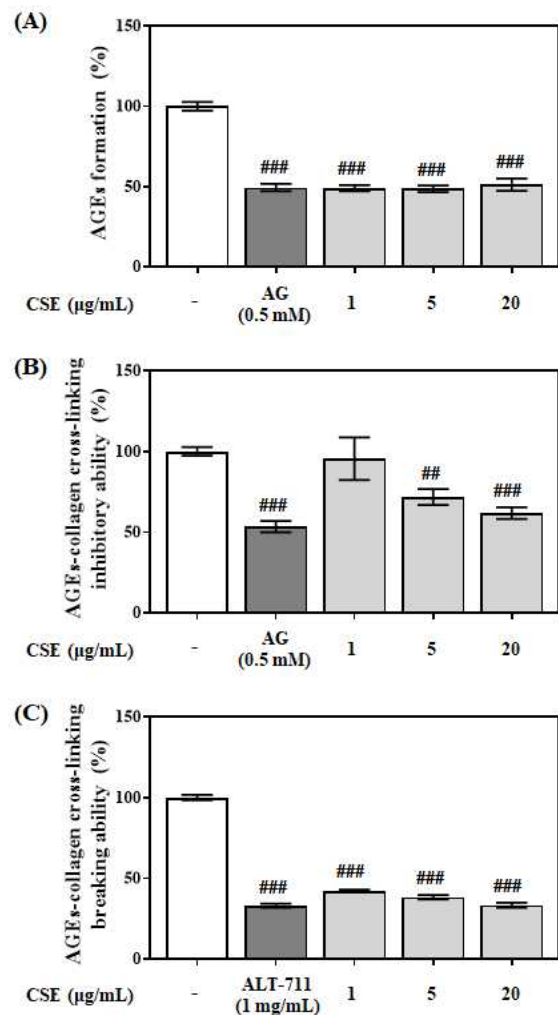
## 결과 및 고찰

### 1. 최종당화산물 생성 저해 효과, 교차결합 절단 및 억제 효과

해조류의 고리매과(Scytosiphonaceae)에 속하는 불레기말은 다양한 생리활성 화합물을 함유하고, 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[11-13]. CSE의 최종당화산물 생성 저해 효과는 Fig. 1A에 나타내었다. CSE의 최종당화산물 생성 저해 효능은 1, 5, 및 20 µg/mL 농도로 실험하였다. CSE는 1, 5, 및 20 µg/mL 농도에서  $48.94 \pm 1.92\%$ ,  $48.56 \pm 2.05\%$  및  $51.06 \pm 3.89\%$ 로 유의적(### $p < 0.001$ )인 억제 효능을 나타내었다. 양성 대조군으로 처리한 AG를 0.5 mM 농도로 처리하였을 때 무첨가 대조군에 비해  $49.34 \pm 2.29\%$ 의 최종당화산물 생성 저해 효능을 나타내었다.

CSE의 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성을 억제하는 효능은 Fig. 1B에 나타내었다. CSE의 교차결합 형성 억제 효능은 1, 5, 및 20 µg/mL 농도에서 농도 의존적인 효능을 확인하였다. CSE는 20 µg/mL 농도에서 최종당화산물과 콜라겐 사이에 교차결합 형성을  $61.73 \pm 3.63\%$  수준으로 억제하는 가장 높은 활성을 나타내었다. 최종당화산물 교차결합 억제제로 알려진 AG의 경우 0.5 mM 농도에서 교차결합 억제 효능은  $53.32 \pm 3.48\%$ 였다.

CSE의 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합을 절단하는 효능을 측정한 결과는 Fig. 1C와 같다. CSE의 교차결합 절단 효과는 추출물의 농도가 증가할수록 증가하였다. CSE의 농도가 1, 5, 및 20 µg/mL 일 때,  $42.18 \pm 0.69\%$ ,  $38.26 \pm 1.31\%$  및  $33.25 \pm 1.55\%$ 로 유의적(### $p < 0.001$ )인 절단 효능을 나타내었다. 최종당화산물과 콜라겐 단백질 사이에 형성된 교차결합을 절단하는 약물로 알려진 alagebrium (ALT-711)의 경우 1 mg/mL에서  $32.98 \pm 1.15\%$ 의 교차결합 절단 효능을 보였다.

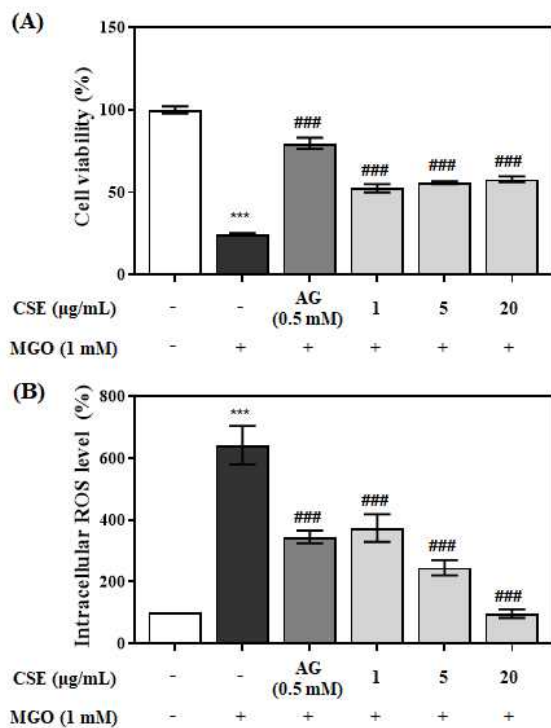


**Figure 1.** Effects of the CSE on AGEs-induced glycation reaction *in vitro*. Inhibition of AGEs formation (A), inhibition of AGEs-BSA and collagen cross-link formation (B) and breaking of AGEs-BSA and collagen cross-links (C). Aminoguanidine (AG) and alagebrium (ALT-711) were used as positive control. Bar values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 6$ ) (## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs non-treated group)

당노합병증 예방 및 치료제 개발을 위한 연구에서 넓패, 패 및 툃과 같은 해조류 소재가 최종당화산물의 생성 저해, 최종당화산물과 콜라겐의 교차결합 형성 억제 및 교차결합 절단 효과를 나타내는 것으로 보고되었다[19-21]. 불레기말은 *in vitro*에서 항산화 효과를 나타낸다고 보고된 바 있으며[12], 산화적 스트레스 및 신장 장애를 유도한 *in vivo* 모델에서 항산화 방어 체계를 증진시키고 신장을 보호하는 효

능을 나타낸다고 보고된 바 있다[13]. 또한 *in vivo* 모델에서 지질 및 혈소판 응집능 개선 효과를 나타낸 바 있으며[14], 당뇨와 관련된 효소로 알려진 α-glucosidase에 우수한 저해활성을 나타낸다고 알려져 있다[15]. 본 실험결과를 보았을 때 불레기말 추출물의 항산화능이 최종당화산물 생성 억제 및 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 억제 및 절단에 도움을 주는 것으로 사료된다. 이후 불레기말의 신장 세포에 대한 보호 효능 실험을 진행하였다.

## 2. 신장 세포 보호 효과



**Figure 2.** Protective effects of CSE on the cell viability of mouse glomerular mesangial cells. Protective effect (A) and intracellular antioxidant capacity (B) of CSE on MGO-induced renal damage in mouse glomerular mesangial cells. A decrease in cell viability to lower than 80% compared to non-treated group was considered to be cytotoxic. Aminoguanidine (AG) was used as positive control. Bar values are presented as mean ± standard deviation (*n* = 3). (\*\*\*)*p* < 0.001 vs. normal group and #####*p* < 0.001 vs. MGO-treated group)

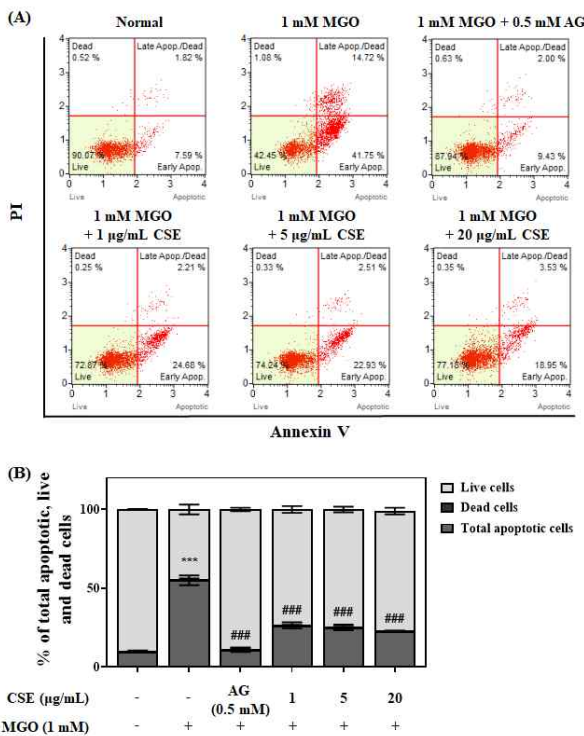
사구체 간질은 신장 사구체의 중심부를 형성하며 혈액을 여과하는 glomerular tuft를 지지하는 역할

을 한다[22]. 사구체 간질은 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM)과 ECM 내부의 mesangial 세포로 구성되며, mesangial 세포는 전체 사구체의 30~40%를 차지한다[23]. Mesangial 세포는 한외여과를 조절하며 사구체의 항상성을 조절하는 역할을 한다[24]. MGO에 의해 유도된 세포 사멸로부터 mesangial 세포를 보호하는 효능을 Fig. 2A에 나타내었다. 1 mM MGO를 처리한 mesangial 세포에 CSE를 1, 5, 및 20 μg/mL로 처리하였을 때 52.41 ± 2.53%, 55.86 ± 0.91%, 및 57.83 ± 1.77%의 세포 생존율을 보였으며 이는 CSE를 처리하지 않은 MGO 처리군에 비해 유의적(####*p* < 0.001)으로 증가한 수치이다. 양성대조군으로 사용된 AG를 0.5 mM 농도로 처리하였을 때 무첨가 대조군에 비해 79.70 ± 3.39%의 세포 생존율을 나타내었다.

CSE의 세포 내 항산화 작용은 DCFH-DA 시약을 사용하여 평가하였으며, Fig. 2B에 나타내었다. MGO 처리군은 무첨가 대조군에 비해 산화적 스트레스가 약 642.34%까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 CSE를 처리하였을 때 유의적(####*p* < 0.001)으로 산화적 스트레스가 감소하였다. CSE를 1, 5, 및 20 μg/mL 농도로 처리하였을 때 mesangial 세포의 산화적 스트레스 수준이 약 373.63%, 245.01%, 및 96.52%로 최대 대조군 수준까지 감소하였다. 양성 대조군으로 사용된 AG를 0.5 mM로 처리하였을 때 세포 내 산화적 스트레스는 약 345.10%까지 감소하였으며, CSE가 AG보다 효과적으로 MGO로 유도되는 세포 내 산화적 스트레스를 감소시켰다.

과도한 수준의 세포 내 산화적 스트레스는 단백질, 지질, 핵산, 세포막 및 세포 소기관에 손상을 일으켜 apoptosis를 유도한다[25]. 세포의 정상적인 상태에서 세포막을 구성하는 phosphatidylserines (PS)는 세포 내부에 노출되어 있지만 초기 apoptosis 동안 외부로 노출되고, 후기 apoptosis가 진행되는 동안 세포 파열로 인해 DNA가 외부로 노출된다[26, 27]. MGO처리로 인해 유도되는 산화적 스트레스로부터 CSE의 mesangial 세포 보호 효과를 확인하기 위해 Annexin V & dead cell kit를 이용하여 apoptotic 세포를 정량적으로 분석하였다(Fig. 3). MGO의 처리는 무첨가 대조군에 비해 apoptotic 세포(early apoptotic cells + late apoptotic cells)의 비율이 증가할 뿐만 아





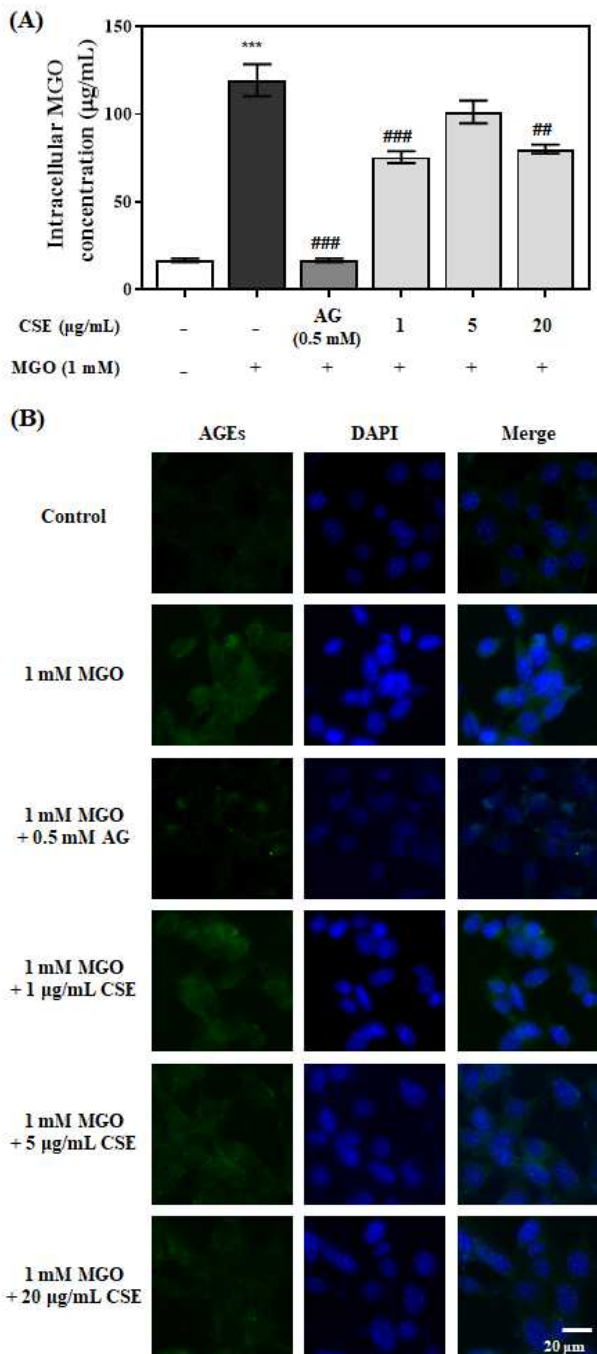
**Figure 3.** Protective effects of CSE on MGO-induced apoptosis in mouse glomerular mesangial cells. Dot plots for flow cytometric analysis of apoptotic cells. Annexin V-positive cells were assigned to the upper-right (late stage apoptotic cells) and lower-right (early stage apoptotic cells) quadrants, respectively. Dead cells are presented in the upper-left in the dot plots. Living cells without signs of apoptosis in the lower-left quadrant were negative for both Annexin V & PI staining (A). Bar graph showing the percentage of live, apoptotic (early and late apoptotic), and dead cells determined using the Muse Annexin V & Dead Cell Kit (B). Aminoguanidine (AG) was used as positive control. Bar values are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). (\*\*\*) $p < 0.001$  vs. normal group and (###) $p < 0.001$  vs. MGO-treated group).

나라 live cell의 비율 또한 감소시키는 것을 확인하였다. 반면 CSE를 1, 5, 및 20  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때 MGO에 의해 유도되는 산화적 스트레스로부터 mesangial 세포를 보호하여 apoptosis를 억제하는 효과를 확인하였다(Fig. 3A). MGO 처리로 유도되는 산화적 스트레스로부터 CSE의 mesangial 세포의 apoptosis 억제 효과는 Fig. 3B에 정량적으로 나타내었다. 무첨가 대조군에서 live 세포가 약 89.77%, apoptotic 세포(early apoptotic cells + late apoptotic cells)의 비율이 약 9.49%로 나타난 반면, 1 mM MGO

를 처리한 mesangial 세포에서는 live 세포의 비율이 약 43.94%로 감소하였으며, apoptotic 세포의 비율은 무첨가 대조군에 비해 54.99%로 약 5배 이상 증가하였다. CSE는 1, 5, 및 20  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리 시 MGO에 의해 유발되는 apoptosis를  $26.35 \pm 1.94\%$ ,  $25.11 \pm 1.76\%$  및  $22.58 \pm 0.34\%$  비율로 감소시켰다. 양성대조군으로 사용한 AG를 0.5 mM로 처리하였을 때 apoptotic 세포(early apoptotic cells + late apoptotic cells)의 비율이  $10.92 \pm 1.45\%$ 로 감소하였다.

### 3. 세포 내 MGO 및 AGEs 감소 효과

최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)의 전구체인 MGO는 당과 지질대사에 이상을 초래하여 반응성이 강한 카르보닐 화합물 생성량을 증가시켜 최종당화산물의 생성을 촉진시키고, 산화적 스트레스 및 염증 반응을 유발한다[28]. 고혈당 상태에서 신장 세포 내부에 MGO의 양이 증가하며 [29], 세포 내 MGO의 축적은 reactive oxygen species (ROS)를 증가시키고, p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) 활성화 및 세포 사멸을 통해 신장 손상을 일으켜 당뇨병성 신장증의 다양한 합병증과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[30]. CSE 처리에 의한 세포 내 MGO 농도는 Methylglyoxal Competitive ELISA Kit를 이용하여 측정하였다(Fig. 4A). MGO 처리에 의해 세포 내 MGO 농도가 무첨가 대조군에 비해 유의적(\*\*\*) $p < 0.001$ )으로 증가하는 것을 확인하였다. 반면 CSE를 처리하였을 때 MGO 처리에 의한 세포 내 MGO 축적을 감소하는 효과를 확인하였다. 무첨가 대조군에서 세포 내 MGO 농도는  $16.67 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ 인 반면, 1 mM MGO를 처리한 mesangial 세포 내부의 MGO 농도는 약  $119.41 \mu\text{g/mL}$ 로 약 7배 증가하였다. CSE를 최고 농도인 20  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때 세포 내 MGO 농도는  $80.04 \pm 2.60\%$ 로 유의적(###) $p < 0.001$ )으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 양성 대조군으로 사용한 AG를 0.5 mM로 처리하였을 때 세포 내 MGO 농도는  $16.65 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ 로 감소하였다. 최종당화산물의 전구체인 MGO 처리에 의한 세포 내 AGEs 축적 변화는 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 4B). MGO를 처리하였을 때 무첨가 대조군(control)에 비해 AGEs 발현량이 증가하는 동시에 DAPI의 형광



**Figure 4.** Effects of CSE on intracellular MGO and AGEs accumulation in mouse glomerular mesangial cells. Inhibition of MGO-cross-linked protein accumulation (A) and AGEs with DAPI staining (B). Bar values are presented as mean ± standard deviation (n = 3). (\*\*\*)p < 0.001 vs. normal group and ###p < 0.01, ####p < 0.001 vs. MGO-treated group). AGEs and DAPI were expressed with green colored Alexa 488 dye and blue color respectively. Scale bar: 20 µm

강도 또한 증가한 것을 확인하였다. 반면 CSE를 처

리하였을 때 1, 5, 및 20 µg/mL 농도로 처리하였을 때 세포 내 AGEs 축적이 감소하고 DAPI 또한 강도가 감소하는 것을 확인하였다. 양성 대조군으로 사용된 AG를 처리하였을 때 세포 내 AGEs 축적과 DAPI의 형광 강도가 감소하였다. DAPI는 핵을 염색할 때 사용되는 시약으로 손상된 chromatin을 염색하면 정상 세포에 비해 더 밝게 빛난다[31]. MGO 처리에 의한 DAPI의 형광 강도 증가는 apoptosis를 분석한 결과(Fig. 3)와 일치한다.

본 연구에서 CSE는 최종당화산물의 생성을 억제하였으며 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성을 억제 및 절단 능력을 확인하였다. 또한 CSE는 MGO에 의해 유도되는 mesangial 세포 내 산화적 스트레스 수준, 세포 내 MGO 및 AGEs 축적을 감소시켜 apoptotic cell death를 억제함으로써 신장 세포 보호 효능을 가지는 것을 확인하였다.

### 결론

본 연구에서는 갈조류 중 하나인 불레기말의 항당화 효능 및 신장 세포 보호 효능을 평가하였다. 불레기말은 최종당화산물 생성 억제 및 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 억제 및 절단에 있어서 우수한 효능을 보였다. 불레기말은 methylglyoxal (MGO)에 의해 유도되는 mesangial 세포 내 산화적 스트레스를 유의적으로 감소시킬 뿐만 아니라 apoptosis로 인한 세포 사멸을 감소시켰다. 또한 세포 내부에 MGO와 최종당화산물의 축적을 감소시킨 것을 확인하였다. 결과적으로 불레기말은 부작용 발생 위험이 낮은 당뇨합병증 예방 및 치료제 개발을 위한 천연물 후보로 높은 잠재력을 가지고 있는 것으로 사료된다. 추가적으로 불레기말에 함유된 최종당화산물과 연관된 당뇨합병증 발병 예방 및 증상 완화 작용에 기인하는 활성 물질 규명 및 관련 메커니즘을 명확히 하는 추가적인 연구가 필요하다.

### 감사의 글

본 연구성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단(NRF-2020R1A2C201260811)의 지원을 받아 수행된 연구임



## References

- Rabbani, N. and P.J. Thornalley, 2018. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney international*, 93. 803-813.
- Rowan, S., E. Bejarano and A. Taylor, 2018. Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864. 3631-3643.
- Vistoli, G., D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini and G. Aldini, 2013. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*, 47. 3-27.
- Huebschmann, A.G., J.G. Regensteiner, H. Vlassara and J.E. Reusch, 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes care*, 29. 1420-1432.
- Khalifah, R.G., J.W. Baynes and B.G. Hudson, 1999. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 257. 251-258.
- Edelstein, D. and M. Brownlee, 1992. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes*, 41. 26-29.
- Thornalley, P.J., 2003. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 419. 31-40.
- El Gamal, A.A., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi pharmaceutical journal*, 18. 1-25.
- Lee, C.-H., Y.N. Park and S.G. Lee, 2020. Analysis and comparison of bioactive compounds and total antioxidant capabilities of Korean brown algae. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 52. 54-59.
- Pangestuti, R. and S.-K. Kim, 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of functional foods*, 3. 255-266.
- Ponnudurai, G. and J.J.P. Paul, 2020. GC-MS Analysis of Methanolic Extract of *Colpomenia Sinuosa* (Mertens Ex Roth) Derb. Et Sol. From Manapad in the South East Coast of Tamil Nadu, India. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8. 41-43.
- Lekameera, R., P. Vijayabaskar and S. Somasundaram, 2013. Evaluating antioxidant property of brown alga *Colpomenia sinuosa* (DERB. ET SOL). *African Journal of Food Science*, 2. 126-130.
- Ramarajan, L., S.T. Somasundaram, S. Subramanian and V. Pandian, 2012. Nephroprotective effects of *Colpomenia sinuosa* (Derbes & Solier) against carbon tetrachloride induced kidney injury in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2. S435-S441.
- Lee, J., B. Kim, M.-H. Park, K.-H. Choi, C. Kong, S.-H. Lee, Y.Y. Kim, K.H. Yu and M. Kim, 2016. Effects of *Colpomenia sinuosa* extract on serum lipid level and bone formation in ovariectomized rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45. 492-500.
- S.-C. Ko, S.-H. Lee, S.-M. Kang, G. Ahn, S.-H. Cha and Y.-J. Jeon, 2011. Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Activity of Jeju Seaweeds Using High Throughput Screening (HTS) Technique, 5. 33-39.
- Do, M.H., J. Hur, J. Choi, M. Kim, M.J. Kim, Y. Kim and S.K. Ha, 2018. *Eucommia ulmoides* ameliorates glucotoxicity by suppressing advanced glycation end-products in diabetic mice kidney. *Nutrients*, 10. 265.
- Lee, J.-y., J.-G. Oh, J.S. Kim and K.-W. Lee, 2014. Effects of chebulic acid on advanced glycation end-products-induced collagen cross-links. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b14-00034.
- Liu, Y.-W., X.-L. Liu, L. Kong, M.-Y. Zhang, Y.-J. Chen, X. Zhu and Y.-C. Hao, 2019. Neuroprotection of quercetin on central neurons against chronic high glucose through enhancement of Nrf2/ARE/glyoxalase-1 pathway mediated by phosphorylation regulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109. 2145-2154.
- Kim, M., C.H. Cho, G.H. Youm, Y. Park and S.-H. Lee, 2020. Glycation inhibitory effect and renal protective ability of *Hizikia Fusiformis* extracts against advanced glycation end-products (AGEs). *Journal of Chitin and Chitosan* 25. 175-183.
- Kim, M., C. Cho, C. Lee, B. Ryu, S. Kim, J. Hur and S.-H. Lee, 2021. *Ishige okamurae* Ameliorates Methylglyoxal-Induced Nephrotoxicity via Reducing Oxidative Stress, RAGE Protein Expression, and Modulating MAPK, Nrf2/ARE Signaling Pathway in Mouse Glomerular Mesangial Cells. *Foods*, 10. 2000.
- Cho, C.H., M. Kim, G.H. Youm, S. Kim, Y. Park and S.-h. Lee, 2020. Advanced glycation end-products inhibitory activities and renoprotective effects of *Ishige foliacea* ethanolic extract. *Journal of Chitin and Chitosan*, 25. 134-142.

22. Cove-Smith, A. and B.M. Hendry, 2008. The regulation of mesangial cell proliferation. *Nephron Experimental Nephrology*, 108. e74-e79.
23. Olivetti, G., P. Anversa, W. Rigamonti, L. Vitali-Mazza and A.V. Loud, 1977. Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study. *Journal of Cell Biology*, 75. 573-585.
24. Stockand, J.D. and S.C. Sansom, 1998. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiological reviews*, 78. 723-744.
25. Redza-Dutordoir, M. and D.A. Averill-Bates, 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863. 2977-2992.
26. van Engeland, M., F.C. Ramaekers, B. Schutte and C.P. Reutelingsperger, 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 24. 131-139.
27. Riccardi, C. and I. Nicoletti, 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1. 1458-1461.
28. Sena, C.M., P. Matafome, J. Crisóstomo, L. Rodrigues, R. Fernandes, P. Pereira and R.M. Seça, 2012. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacological Research*, 65. 497-506.
29. Yang, M., J. Fan, J. Zhang, J. Du and X. Peng, 2018. Visualization of methylglyoxal in living cells and diabetic mice model with a 1, 8-naphthalimide-based two-photon fluorescent probe. *Chemical science*, 9. 6758-6764.
30. Liu, B.-F., S. Miyata, Y. Hirota, S. Higo, H. Miyazaki, M. Fukunaga, Y. Hamada, S. Ueyama, O. Muramoto and A. Uriuhara, 2003. Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney international*, 63. 947-957.
31. Doonan, F. and T.G. Cotter, 2008. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 44. 200-204.