



호두 열매 추출물의 메틸글라이옥살 유도 신장 세포손상 억제 효과 및 당화억제 효능

최지원¹ · 최상윤¹ · 유귀재¹ · 허진영^{1,2,*}

¹한국식품연구원, ²한국과학기술연합대학교대학원

Antiglycation and Protective Effect of *Juglans regia L.* in MGO-induced Renal cell Death

Ji-Won Choi¹, Sang Yoon Choi¹, Guijae Yoo¹, Jinyoung Hur^{1,2,*}

¹Korea Food Research Institute

²University of Science Technology (UST)

Abstract

Methylglyoxal is a highly reactive precursor which forms advanced glycation end products (AGEs). AGEs and methylglyoxal are known to induce various diseases such as diabetes, vascular disorders, Diabetes Mellitus (DM), and neuronal disorders. *Juglans regia L.* is an important food commonly used worldwide, having nutritious components, including phenolic compounds. Since ancient times, *Juglans regia L.* have been differently applied by various countries for health and in diverse diseases, including arthritis, asthma, skin disorders, cancer, and diabetes mellitus. However, the effect of diabetes-induced renal damage against AGEs remains unclear. This study evaluates the anti-glycation and renal protective effects of ethanol extract of *Juglans regia L.* against methylglyoxal-induced renal tubular epithelial cell death. Exposure to methylglyoxal resulted in reduced cell viability in NRK-52E cells, but co-treatment with *Juglans regia L.* extracts significantly increased the cell viability. In addition, we examined the anti-glycation effect of *Juglans regia L.* extracts. Compared to the positive control aminoguanidine and Alagebrium, treatment with *Juglans regia L.* extracts significantly inhibited the formation of AGEs, collagen cross-linking, and breaking collagen cross-linking. Taken together, our results indicate that *Juglans regia L.* is a potential therapeutic agent for regulating diabetic complications by exerting anti-glycation and renal protective activities.

Key Words : *Juglans regia L.*, methylglyoxal, advanced glycation end products, anti-glycation, NRK-52E cells

1. 서 론

우리나라를 비롯한 전 세계에서는 급격한 인구 노령화로 인해 질병 없이 건강하게 노후를 맞이하고자 하는 욕구가 증가하고 있다. 또한 현대인의 식생활 습관, 생활방식 등의 변화 등으로 인해 당 섭취가 증가하고 있으며, 이에 따라 대사성 증후군과 같은 만성질환의 위험도가 높아지고 있다. 대표적인 대사증후군으로는 고혈압, 고중성지방혈증, 비만, 당뇨병, 허혈 심장질환 등이 있다(Wang et al. 2020).

특히 당뇨병은 인슐린의 분비 및 기능 장애로 혈중 포도당의 농도가 높아져 소변으로 포도당을 배출하게 되는 만성 대사성질환 중 하나이다. 당뇨병은 그 자체보다 당뇨 합병증이 더 위험하여서 당뇨병 치료의 목적은 주로 당뇨합병증의 유발이나 진행을 억제하는 데 있다. 대표적인 당뇨 합병증으

로는 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신증, 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 심장병, 당뇨병성 골다공증, 당뇨병성 동맥경화 등이 있다(Ghaderian et al. 2015).

체내에 혈당이 높아진 상태가 지속되면 체내에 당화 반응으로 최종당화산물(Advanced glycation endproducts, AGEs)이라는 화합물이 생성되게 되며, 또한 외부의 최종당화산물이 많은 음식이나 식품의 섭취로도 축적되게 된다. 최종당화산물 당독소로도 알려져 있으며, 당뇨병병증의 여러 원인 중 하나로 알려져 있다(Park et al. 2014).

최종당화산물 생성 원리를 살펴보면 식품 중 환원당의 카보닐 그룹과 단백질 내 아미노산의 비효소적 반응인 마이야르(Millard) 반응을 통하여 형성되며(glycation), 인체 내에서 정상적인 신진대사 과정과 섭취하는 음식물의 조리과정에서 모두 발생한다. 당과 아미노산은 비효소적인 반응인 마이야

*Corresponding author: Jinyoung Hur, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea
Tel: +82-63-219-9299 Fax: +82-505-309-9299 E-mail: jyhur@kfri.re.kr

르 반응이 일어나 슈프염기(Schiff base)를 생성한 후 재배열되어 아마도리(amadori)형의 초기 당화산물(early glycation products)을 생성되는데 이 반응은 가역적으로 일어난다. 그러나 고혈당이 지속되면 아마도리형 초기 당화 산물이 분해되지 않고 재배열되고 콜라겐(collagen)과 같은 단백질과 교차결합(cross-linking)하여 비가역적인, 즉 분해되지 않은 최종당화산물(late glycation products)이 생성된다(Bucala et al. 1995). 이렇게 생성된 최종당화산물은 한번 생성되면 분해되기가 어렵고 모든 부위에서 일어나게 되어 정상혈당으로 회복되어도 분해되지 않고 혈액 주요 단백질이나 여러 조직에 결합하여 장기 손상을 유발한다(Huebschman et al. 2006). 또한 최근 보고에 의하면 형성된 최종당화산물은 각 세포 내 최종당화산물 수용체라 불리는 Receptor for Advanced glycation endproducts (RAGE) 수용체와 결합하여 활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 생성으로 세포 손상을 일으키고 이러한 ROS는 또한 최종당화산물 생성을 가속한다(Chen et al. 2016).

메틸글라이옥살(Methylglyoxal, MGO)은 포도당 대사 과정 중에서 생성되는 매우 반응성이 좋은 카보닐기(α -dicarbonyl) 대사체로 세포 내의 단백질과 핵산과 반응하여 독성을 일으키며(Murata-Kamiya & Kamiya 2001), 최종당화산물의 전구물질로서 활성산소(ROS) 기전, 염증 기전 등의 하위 신호에 영향을 미쳐 세포 및 조직에서 독성을 일으키는 물질이다(Maessen et al. 2015). 메틸글라이옥살을 조절하는 효소는 글라이옥살레이즈(glyoxalase, GO)로서 메틸글라이옥살의 형성을 억제하여 하위 기전인 산화에 따른 스트레스를 조절한다. 메틸글라이옥살에 의한 세포독성을 억제하는 물질도 당뇨병 예방제와 치료제로서 역할을 할 수 있다. 또한 최종당화산물을 저해하는 여러 가지 단계 중에 최종당화산물의 생성(formation), 교차결합(cross-linking)억제(inhibition)에 사용되는 아미노구아니딘(aminoguanidine (AG))은 당뇨병 동물 모델에 투여하였을 때 당뇨병성 합병증을 완화하며 최종당화산물 생성을 억제한다고 보고되어 있으나 임상실험 결과에서 독성이 나타나 개발이 중단되었다(Brownlee 1996).

ALT-711 (4,5-dimethyl-3-(2-oxo-2-phenacyl)-thiazolium chloride)는 thiazolium compound로부터 유래된 약물로 이미 형성된 최종당화산물 교차결합(cross-linking)을 절단(breaking)하는 약물로 개발되었다. Streptozotocin (STZ) 유도 제1형 당뇨병 모델 쥐에 ALT-711을 투여하였을 때, 혈관과 신장 내 최종당화산물의 축적을 감소시켰다(Engelen et al. 2013). 그러므로 이러한 ALT-711은 최종당화산물 생성 억제제(inhibition of formation)로서 이미 형성된 최종당화산물의 교차결합 억제제(cross-linking inhibition) 그리고 교차결합 절단제(cross-linking breaker)의 개발은 당뇨병을 예방하거나 치료할 수 있는 새로운 접근일 수 있다. 그러나 아미노구아니딘처럼 임상시험 독성을 나타낼 수 있어서 보다 천연

물이나 식품으로부터 유래된 안전하고 우수한 효능을 지닌 새로운 물질 개발이 시급히 요구되며, 최근에는 이러한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구 그룹은 그동안의 연구를 통해 최종당화산물 억제제로 많이 알려진 phenolic compound가 많이 함유된 두충, 형개, 정향 산자나무등을 연구한 바 있다(Do et al. 2018a, Do et al. 2018b, Do et al. 2020, Lee et al. 2022).

호두나무(*Juglans regia L.*)는 가래나무과(Julandaceae) 속 하는 낙엽교목이다. 식용으로 사용되는 호두의 열매에는 약 60%의 오일을 함유하고 있으며, 비타민 등의 영양성분 뿐만 아니라(Kim et al. 2020), 불포화 지방산인 리놀레산(α -linolenic acid)과 리놀레산(linoleic acid)와 천연 항산화제로 알려진 알파코토펜올과 감마토코페롤 등을 함유하고 있다고 알려져 있으며, 퀴세틴등의 폴리페놀 물질이 다량 함유되어 있다고 알려져 있다(Li et al. 2006). 호두 열매의 생리활성으로는 항 알레르기, 항산화, 혈중지질억제 등이 보고된 바 있으며(Seo et al. 2001, Kwak et al. 2014), 기호성 또한 좋아 다양한 식품 제조에 널리 쓰이고 있다. 본 연구에서는 쥐 유래 신세뇨관 상피세포(kidney tubular epithelial), NRK-52E 세포를 이용하여 호두 열매의 메틸글라이옥살 유도 신장 독성 억제 효능을 확인하였고, 호두 열매 추출물이 최종당화산물의 생성억제, 교차결합억제 그리고 이미 결합된 교차결합을 절단하는 최종당화산물생성을 저해하는 효능을 지니는지 확인하고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin은 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구매하였고 fetal bovine serum (FBS)은 Highclone (Logan, UT)에서 구매하였다. 또한 Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Methylglyoxal (MGO), Aminoguanidine (AG), tetramethylbenzidine (TMB), bovine serum albumin (BSA), sodium azide는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 실험에 이용하였다.

2. 호두 열매 추출물 제조

본 연구에 사용한 호두 열매(*Juglans regia L.*)는 2019년 10월에 충청북도 영동군에서 재배된 것을 사용하였다. 겉껍질 제거 후 과쇄하고 70% 주정(에탄올, 100 g/L)를 사용하여 50°C에서 3시간씩 2번 반복하여 추출하였다. 상등액 여과 후, 감압 농축 및 동결건조하여 제조된 고품 추출물(수율 3.8%)을 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 이후 호두 열매 에탄올 주정 추출물을 결과에 JS로 표시하였다.

3. 세포배양

본 실험에 사용한 NRK-52E 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 10% heat-inactivated FBS이 첨가된 DMEM 배지(10 units/mL penicillin, 10 µg/mL, streptomycin)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

NRK-52E 세포는 96-well 플레이트에 3×10⁴ cells/well로 분주하여 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 상등액을 모두 제거하고 MGO 700 µM과 호두 열매 추출물을 각각 50, 200 µg/mL 농도로 처리하여 추가로 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 시약 0.1 mg/mL을 첨가하여 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 동량의 DMSO에 녹여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{시료 처리 군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

5. *In vitro*에서 최종당화산물 생성 저해 효능

10 mg/mL의 BSA를 700 µL의 50 mM phosphate buffer에 녹이고, 0.2 M의 fructose와 glucose를 각각 100 µL씩 넣었다. 또한 0.02% sodium azide를 넣어 반응 기간 동안 미생물의 오염을 방지하였다. 이 혼합물에 호두 열매 추출물 또는 *in vitro* 표준 최종당화산물 생성억제제인 아미노구아니딘을 200 µL 넣어 최종 1 mL이 되도록 한 후 37°C에서 14일 동안 반응시켰다. 반응 14일 후 excitation 350 nm, emission 450 nm fluorescence analysis (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

6. 최종당화산물 교차결합억제 및 절단 효능 평가

최종당화산물 교차결합억제 및 절단 효능 평가에는 AGE-BSA는 horseradish peroxidase (HRP) 라벨이 부착된 Kit-NH₂ Unit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 최종당화산물 교차결합 억제 효능을 평가하기 위해서 1.0 µg AGE-BSA와 아미노구아니딘 또는 호두 열매 추출물을 콜라겐이 부착된 96-well microtiter 플레이트에 분주한 후 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 0.05% PBST에 3번 washing하고 TMB를 기질로 하여 발색한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. AGE-BSA의 교차결합저해(%)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{AGE-BSA (\%)} = (\text{약물을 첨가한 well의 흡광도} / \text{약물을 첨가하지 않은 well의 흡광도}) \times 100$$

최종당화산물 교차결합절단 효능 평가는 1.0 µg AGE-BSA를 콜라겐이 부착된 96-well microtiter 플레이트에 분주한

후 37°C에서 4시간 동안 반응하여 AGE-BSA와 콜라겐을 교차결합 시켰다. 0.05% PBST에 3번 워싱 한 후 교차결합 억제제로 알려진 약물인 ALT-711을 1 mg/mL 과 호두 열매 추출물을 각 well에 분주하고 18시간 반응시켰다. 이후 각 웰을 0.05% PBST로 3번 washing하고 TMB를 기질로 하여 발색한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{AGE-BSA (\%)} = (\text{약물을 첨가한 well의 흡광도} / \text{약물을 첨가하지 않은 well의 흡광도}) \times 100$$

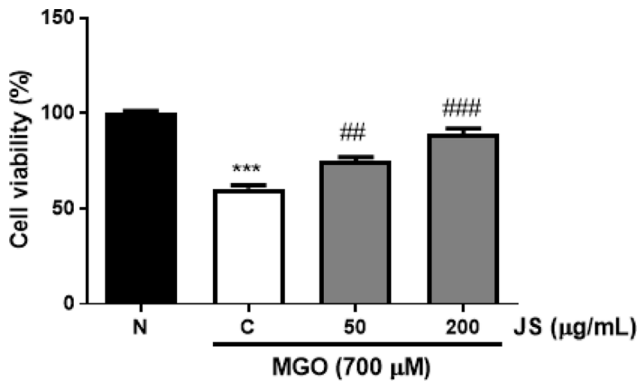
6. 통계분석

각 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 시험법으로 통계 처리하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 신세뇨관 상피세포 손상 억제 효능

신세뇨관 상피세포(renal tubular epithelial cell) 세포는 신장에서 대부분 재흡수과정을 담당한다. 이러한 신세뇨관 상피세포 세포주인 NRK-52E 세포에서 호두 열매 추출물의 신장 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 MGO유도 신장 독성 모델을 확립하였다. MGO는 최종당화산물의 전구체로 산화에 따른 스트레스 및 염증 반응을 유발하고 당과 지질대사에 이상을 초래하여 반응성이 강한 카르보닐기 화합물을 생성하게 된다. 이로 인해 최종당화 산물의 생성을 촉진하게 된다(Sena et al. 2012). 메틸글라이옥살 0-1,000 µM로 농도 범위를 설정한 뒤 MTT assay를 통하여 세포 생존율이 50-70%가 되는 농도 700 µM을 설정하였다. NRK-52E 세포에 호두 열매 추출물 50, 200 µg/mL과 MGO 700 µM을 동시에 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과 메틸글라이옥살 처리 군(MGO)에서는 60%의 세포 생존율을 나타내었고, 호두 열매 추출물(50, 200 µg/mL)과 메틸글라이옥살을 동시에 처리하였을 때 각각 75, 88%의 세포 생존율을 나타내었다. 신세뇨관 상피세포에서는 Na⁺-K⁺ ATPase 펌프를 이용하여 Na⁺ 이온을 간질액으로 수송하는데 이 이온들은 모세혈관을 통해 재 흡수된다. 정상적인 혈중 포도당 및 아미노산 범위에서 포도당과 아미노산은 100% 재 흡수되지만 혈중 포도당 농도가 일정 범위 이상으로 높아져 재흡수 용량을 초과하게 되면 소변에서 포도당이 검출되게 되어 당뇨병이 발생하게 된다(Carlström et al. 2015). 또한 신세뇨관 상피세포는 염증세포의 유입에 직접 관여할 수 있어 여러 자극으로 대식세포, T림프구 등의 염증 세포를 유입시킬 수 있는 여러 가지 화학주성반응 인자를 분비할 수 있으며 또한 ICAM-1, VCAM-1 등 부착물질들의 발현을 증가시킬 수 있다(Han et al. 2018). 그러므로 신세뇨관 상피세포의 손상을 억제하는



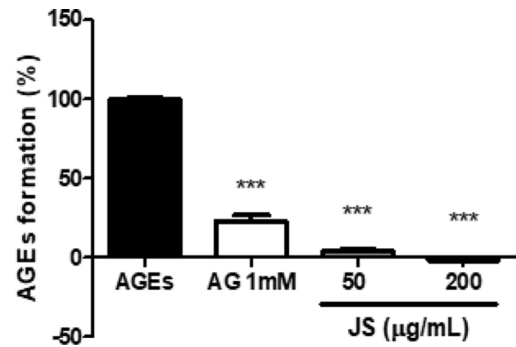
<Figure 1> Effect of JS on MGO-induced renal cell death in NRK-52E cells.

NRK-52E cells were treated MGO (Methylglyoxal) with or without JS (70% ethanol extract of *Juglans regia L*) and determined viability using the MTT assay. Statistical analysis was carried out by using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests in GraphPad Prism5. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments. Normal group vs Control group (**p<0.001); Control group vs MGO treated group (##p<0.05, ###p<0.001)

것은 신장 세포 및 조직의 기능을 유지하는 데 도움이 된다고 할 수 있다. 본 연구에서는 호두 열매 추출물이 최종당화산물 전구물질이며 신장 독성을 일으키는 메틸글라이옥살 유도 세포 모델에서 세포 손상을 억제함으로써 신장 세포 보호 효과를 나타낸다고 할 수 있다<Figure 1>.

2. 최종당화산물 생성(Formation) 억제 효능 평가

고혈당으로 인해 축적되는 최종당화산물은 당뇨병 환자에서 정상인보다 수배 이상 함량이 증가하는 것으로 연구되어 있으며 당뇨병증의 발병 원인으로 알려져 있다. 최근의 연구로부터 당뇨병증과 관련하여 천연물 및 식품소재로부터 최종당화산물의 생성을 효과적으로 억제하는 다양한 소재가 개발되고 있다. 호두 열매의 70% 주정 추출물의 최종당화산물 생성억제를 glucose와 fructose를 이용하여 효능 평가를 시행하였다. 최종당화산물 생성능을 100% (AGE)로 나타내었을 경우 양성대조군 아미노구아니딘을 1 mM 처리한 대조군(control)에서는 77%의 최종당화산물 생성억제효능을 나타내었으며 호두 열매 추출물 50, 200 μg/mL 농도에서 각각 95, 100%의 최종당화산물 생성억제효능을 나타내어 양성대조군보다 우수한 효능을 확인하였다. 이 결과를 통해 호두 열매 추출물이 glucose와 fructose에 의해 BSA가 당화되는 반응을 억제할 수 있음을 확인하였고 이는 당뇨병 환자에서 관찰되는 혈당 범위에서 최종당화산물의 생성을 억제할 수 있음을 나타낸다. 최종당화산물의 생성 원인에 산화에 따른 스트레스에 의해 최종당화산물의 생성이 가속된다고 알려져 있어(Moldogazieva et al. 2019) 추후, 호두 열매 소재의 항산화 효능에 대해서도 검증해 볼 필요가 있다<Figure 2>.



<Figure 2> Effect of AGEs formation activity of JS (70% ethanol extract of *Juglans regia L*) in vitro model.

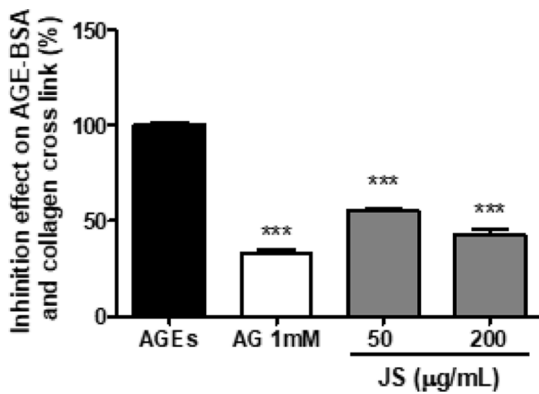
Inhibitory effects of JS on AGEs formation. AG (Aminoguanidine) was used as a positive control for AGEs formation. Statistical analysis was carried out by using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests in GraphPad Prism5. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments. AGEs group vs JS or AG treated group (**p<0.001).

3. 호두 열매 추출물의 최종당화산물의 콜라겐 교차결합 억제 효능 평가(Cross-linking inhibition)

당과 아미노산은 비효소적인 반응인 마이야르 반응이 일어나 슈프엄기를 생성한 후 재배열되어 아마도리형의 초기 당화산물(early glycation products)을 생성되는데 이 반응은 가역적으로 일어난다. 그러나 지속적인 고혈당 상태는 초기 당화산물이 분해되지 않고 체내에서 재배열되고 콜라겐, 파이브로넥틴(fibronectin)과 같은 단백질과 교차결합 하여 분해되지 않고 축적되게 된다. 본 연구에서는 호두 열매 추출물이 최종당화산물과 콜라겐 단백질과 비가역적 교차결합 억제 효능을 확인하기 위하여 최종당화산물 교차결합의 억제 효능을 평가하였다. 최종당화산물 교차결합 억제제로 알려진 양성대조군인 아미노구아니딘은 교차결합 억제 효능이 1 mM에서 67%로 나타났다. 호두 열매 추출물을 50, 200 μg/mL로 처리한 군에서는 교차결합 억제가 각각 54, 99%로 최종당화산물의 교차결합을 억제하였으며, 특히 저농도에서 효능이 있음을 확인하였다. Brandt 그룹에서는 당뇨병 환자 중에 각막의 두께가 증가하여 있음을 연구하였고 아미노구아니딘이 막 콜라겐 단백질의 교차결합억제에 효능이 있음을 확인하였다(Brandt et al. 2001). 고혈당은 glycation을 통하여 각막 기질 내의 콜라겐 교차결합을 유도한다고 알려져 있다. 이는 최종당화산물이 당뇨병증 중 당뇨병성 망막합병증을 일으키며 이를 조절하여 당뇨병증을 조절할 수 있음을 나타낸다<Figure 3>.

4. 호두 열매 추출물의 최종당화산물 교차결합 절단 효능 평가(cross-linking breaker)

In vitro, in vivo에서 최종당화산물은 콜라겐, 라미닌(laminin), 피브로넥틴과 같이 수명이 긴 기질 단백질과 비가

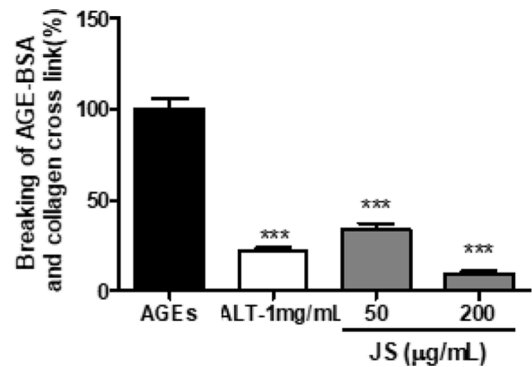


<Figure 3> Anti-glycation effect of JS (70% ethanol extract of *Juglans regia L*) on AGEs induced cross-linking formation. AG (Aminoguanidine) was used as a positive control for cross-linking formation. Statistical analysis was carried out by using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests in GraphPad Prism5. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments. AGEs group vs JS or AG treated group (**p<0.001).

역적인 교차결합을 한다. 정상적인 콜라겐 교차결합은 아미노기와 카르복실기 말단의 특징적인 부위에서 일어난다고 알려졌지만, 최종당화산물에 의한 콜라겐의 교차결합은 모든 부위에서 무작위적으로 일어난다. 비정상적인 교차결합은 조직에 변화를 주고 기능을 상실시킨다(Edelstein & Brownlee 1992). 본 연구에서는 호두 열매의 최종당화산물과 콜라겐 사이에 이미 형성된 글라이코알데하이드(glycoaldehyde)과 같은 비가역적 교차결합을 절단하는 효능을 확인한 결과, 200 µg/mL의 호두 열매 추출물을 처리하였을 때 9.73%의 교차결합 억제 효능을 나타내었다. 최종당화산물 절단 약물로 알려진 양성대조군 ALT-711은 1 mg/mL 처리하였을 때 22% 절단 효능을 확인하여 고농도에서는 양성대조군보다 더 효능이 우수함을 확인하였다. 기존 연구에 의하면 천연물 및 식품소재의 페놀릭 화합물이 항산화 효능과 더불어 최종당화산물 억제 효능을 나타낸 연구가 많이 진행되고 있어 본 연구에서도 추후 호두 열매 추출물에 존재하는 페놀릭 화합물 및 그 외 어떠한 성분이 최종당화산물의 교차결합을 억제하는지에 대한 평가가 필요하다고 생각한다<Figure 4>.

IV. 요약 및 결론

가래나무과(Julandaceae) 속하는 낙엽교목인 호두나무(*Juglans regia L.*)의 호두 열매의 메틸글라이옥살 유도 신장 세포의 독성 억제 활성을 검토하고, 당뇨병증 및 다양한 질병의 원인이라고 알려진 최종당화산물(Advanced glycation endproducts, AGEs)의 생성, 생성된 최종당화산물의 생성억제, 교차결합 억제 그리고 이미 결합된 교차결합을 절단하여 최종당화산물을 억제하는 효능을 측정하였다. 호두 열매 70%



<Figure 4> Effects of the JS on AGEs-induced glycation in vitro. JS (70% ethanol extract of *Juglans regia L*) attenuated collagen cross-linking.

ALT-711 (Alagebrium) were used as positive control Statistical analysis was carried out by using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests in GraphPad Prism5. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments. AGEs group vs JS or ALT treated group (**p<0.001).

주정 추출물은 메틸글라이옥살로 유도한 NRK-52E 신세뇨관 상피세포의 세포독성을 억제하여 75.88%의 세포생존율을 나타내었다. 이는 신세뇨관 상피세포의 기능저하를 억제할 수 있음을 시사한다. 최종당화산물의 형성 세가지 단계에서 호두 열매 추출물(50, 200 µg/mL)의 최종당화산물 생성 조절에 관여하는지 확인하였다. 그 결과, 최종당화산물의 억제 효능은 95, 100%로 양성대조군인 아미노구아니딘은 77%의 억제율보다 우수하였다. 또한 이미 형성된 최종당화산물은 체내 콜라겐 단백질과의 결합을 통해 조직 및 세포의 이상을 나타내는데 호두 열매 추출물은 이러한 콜라겐 단백질과의 교차결합을 억제하거나 이미 형성된 교차결합을 절단하는 효능을 확인할 수 있다. 호두 열매 추출물을 50, 200 µg/mL을 처리하였을 때 교차결합 억제는 54, 99%로 양성대조군인 아미노구아니딘보다 우수한 효능을 나타내었고, 절단 효능에서는 200 µg/mL의 호두 열매 추출물을 처리하였을 때, 절단효능이 9.73%로 양성대조군으로 알려져 있는 ALT-711 (1 mg/mL)의 22%보다 우수한 효능이 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해 보면, 주정 70% 호두 열매 추출물은 당뇨병증 및 주요질병의 원인이라고 알려져 있는 최종당화산물의 생성 기작을 조절함으로써 최종당화산물과 관련된 다양한 질병을 예방하거나 치료할 수 있을 것으로 생각된다. 호두 열매 추출물에는 많은 페놀성분이 함유되어 있어, 항균, 항산화, 항암 활성을 나타낸다고 알려져 있는 많은 그룹의 선행연구에서 인지기능, 항산화기능등의 건강기능성 관련 효능 연구가 활발히 진행되었다. 특히 Juglone이라는 성분은 가래나무과에 많이 함유되어 있는 페놀성분으로 항생 방부 그리고 항산화효과가 우수하다고 알려져 있다(Ahmad & Suzuki 2019). 추후 Juglone을 비롯한 호두 추출물의 단일화합물에 대한 효능 검증 및 최종당화산물의 생성기작에 대한 효능 검

증이 필요할 것으로 생각되며, 더 나아가 메틸글라이옥살 유도 세포모델에서의 추가적인 기전 연구와 더불어 *in vivo* 실험을 통해서 안전한 당뇨합병증 예방 및 치료제 검증이 필요할 것으로 생각된다.

저자 정보

최지원 (한국식품연구원 식품기능인프라팀, 연구원, 0000-0001-7225-004X)

최상윤(한국식품연구원 기능성소재연구단, 책임연구원, 0000-0001-8712-6877),

유귀재(한국식품연구원 기능성소재연구단, 연구원, 0000-0003-1939-0187),

허진영 (한국식품연구원 기능성소재연구단, 과학기술연합 대학교대학원, 선임연구원, 교수, 0000-0003-1292-9290)

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 기본사업의 지원을 받아 연구되었습니다(E0212021, E0210200, E0210300,)

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

Ahmad T, Suzuki YJ. 2019. Juglone in oxidative stress and cell signaling. *Antioxid.*, 8(4):91-103

Brandt JD, Beiser JA, Kass MA, Gordon MO. 2001. Central corneal thickness in the Ocular Hypertension Treatment Study (OHTS). *Ophthalmology*, 108:1779-88

Brownlee M. 1996. Advanced glycation endproducts in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes.*, 3:291-297

Bucala R, Cerami A, Vlassara H. 1995 Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabetes. Rev.*, 3: 258-268

Carlström M, Wilcox CS, Arendshorst WJ. 2015. Renal autoregulation in health and disease. *Physiol. Rev.*, 95(2):405-511

Chen J, Jing J, Yu S, Song M, Tan H, Cui B, Huang L. 2016. Advanced glycation endproducts induce apoptosis of endothelial progenitor cells by activating receptor rage and nadph oxidase/jnk signaling axis. *Am. J. Translat. Res.*, 8:2169-2178

Do MH, Choi J, Kim Y, Ha SK, Yoo G, Hur J. 2020. Syzygium aromaticum reduces diabetes-induced Glucotoxicity via the NRF2/Glo1 Pathway. *Planta Med.*, 86(12):876-883

Do MH, Hur J, Choi J, Kim M, Kim MJ, Kim Y, Ha SK.

2018a. *Eucommia ulmoides* ameliorates glucotoxicity by suppressing advanced glycation end-products in diabetic mice kidney. *Nutr.*, 10(3):265-273

Do MH, Hur J, Choi J, Kim Y, Park HY, Ha SK. 2018b. *Spatholobus suberectus* ameliorates diabetes-induced renal damage by suppressing advanced glycation end products in db/db mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(9):2774-2782

Edelstein D, Brownlee M. 1992. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes.* 41(1):26-29

Engelen L, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. 2013. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: Evidence from clinical studies. *Diabetes Obes. Metab.*, 15:677-689

Ghaderian SB, Hayati F, Shayanpour S, Mousavi SSB. 2015. Diabetes and end-stage renal disease; a review article on new concepts. *J. Renal. Inj. Prev.*, 4:28-33

Han WQ, Xu L, Tang XF, Chen WD, Wu YJ, Gao PJ. 2018. Membrane rafts-redox signaling pathway contributes to renal fibrosis via modulation of the renal tubular epithelial-mesenchymal transition. *J. Physiol.*, 596(16): 3603-3616

Huebschman AG, Vlasara H, Regensteiner JG, Reush JE. 2006. Diabetes and advanced glycation end products. *Diabetes Care*, 29:1420-143

Kim GH, Kim JM, Park SK, Kang JY, Han HJ, Shin EJ, Moon JH, Kim CW, Lee U, Shin EC, Heo HJ. 2020. Nutritional composition of domestic and imported walnuts (*Juglans regia L.*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 49(6):608-616

Kwak JS, Park M, Kwon O. 2014. The effect of walnut (*Juglans regia L.*) intake on improvement of blood lipid levels and vascular health: A meta-analysis. *J. Nutr. Health.*, 47(4): 236-246

Lee HHL, Lee CJ, Choi SY, Kim Y, Hur J. 2022. Inhibitory effect of sea buckthorn extracts on advanced glycation endproducts formation. *Food Chem.*, 373:131364

Li L, Tsao R, Yang R, Liu C, Zhu H, Young JC. 2006. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia L.*). *J. Agric. Food Chem.*, 54:8033-8040

Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. 2015. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin. Sci.*, 128:839-861

Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Mel'nikova TI, Porozov YB, Terentiev A. 2019. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation endproducts (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases *Oxid Med Cell Longev.*, Article ID 3085756, 14

Murata-Kamiya N, Kamiya H. 2001. Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucleic Acids Res.*, 29:3433-3438

Park CH, Yokozawa T, Noh JS, Oligonol. 2014. a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced renal damage through the

- advanced glycation end product-related pathway in db/db mice-3. *J. Nutr.*, 144:1150-1157
- Sena, CM, Matafome P, Crisostomo J, Rodrigues L, Fernandes R, Pereira P, Seica RM. 2012. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacol. Res.*, 497-506
- Seo YH, Kim UH, Kim KM, Hwang TY, Son HS. 2001. Physico-chemical composition and anti-allergic effects of walnut oil. *J. East Asian Soc. Diet. Life*, 11(3):204-208
- Wang HH, Lee DK, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. 2020. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.*, 23(3):189-230
-
- Received October 14, 2022; revised October 26, 2022; revised November 9, 2022; accepted November 16, 2022