생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
39(3) : 249 ~ 254 (2008)

산수유 씨의 최종당화산물의 형성 및 교차결합에 미치는 효과

김찬식 · 장대식 · 김정현 · 이가영 · 이윤미 · 김영숙 · 김진숙*
한국한의학연구원 한약제제연구부

Inhibitory Effects of the Seeds of *Cornus officinalis* on AGEs Formation and AGEs-induced Protein Cross-linking

Chan-Sik Kim, Dae Sik Jang, Junghyun Kim, Ga Young Lee, Yun Mi Lee, Young Sook Kim and Jin Sook Kim*
Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstracts – An 80% EtOH extract and the solvent fractions of the seeds of *Cornus officinalis* were evaluated for their inhibitory activities against advanced glycation end products (AGEs) formation and AGEs-induced protein cross-linking *in vitro*. *In vitro* assay for AGEs-bovine serum albumin (BSA) formation showed that the 80% EtOH extract, *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH and water fractions significantly inhibited AGEs formation with observed IC_{50} values of 1.13, 17.64, 1.52, 1.24 and 3.27 μg/ml, respectively. In indirect AGEs-ELISA assay, the 80% EtOH extract, EtOAc and *n*-BuOH fractions exhibited more potent inhibitory activity on AGEs-BSA formation than aminoguanidine, a well know AGEs inhibitor. Furthermore, the 80% EtOH extract and all the solvent fractions inhibited concentration-dependently AGE-BSA cross-linking to collagen. The 80% EtOH extract, EtOAc, *n*-BuOH and water fractions also had a breaking activity against preformed AGE-BSA cross-linking concentration dependently. Thus these results suggest that the 80% EtOH extract and fractions of the seeds of *C. officinalis* could be an inhibitor as well as breaker of AGE-BSA cross-linking.

Keywords – advanced glycation end products, *Cornus officinalis,* cross-linking, diabetic complications, herbal medicines

당뇨병에서 만성 고혈당은 여러 병태생리학적 경로를 통해 조직손상을 유발하며, 이러한 고혈당에 의한 중요한 변화 중 하나는 단백질의 비효소적 당화 (glycation)와 당산화 (glycoxidation)반응이다. 단백질과 당은 정상 상태에서는 비효소 반응인 Millard 반응을 일으켜, schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리 (amadori)형의 초기당화산물 (early glycosylation products)을 생성하는데, 여기까지의 반응은 가역적으로 일어나 그 농도가 조절이 된다. 그러나 고혈당 상태가 지속되면 가역적인 아마도리형의 초기당화산물이 분해되지 않고 재배열 (rearrangement)되고 collagen과 같은 수명이 긴 단백질과 교차결합 (cross-link)하여 비가역적인 최종당화산물 (advanced glycation end products, AGEs)이 생성된다.[1)] 또한 이렇게 생성된 최종당화산물은 세포외 기질 단백질과의 교차결합, 세포 최종당화산물 수용체와의 반응 및 세포내 단백질 또는 핵산과의 최종당화산물을 형성하여 당뇨병성 합병증을 유발하는 것으로 알려졌다.[2)] *In vitro, in vivo* 실험들에서 최종당화산물은 collagen, laminin, fibronectin과 같은 수명이 긴 기질 단백질과 비가역적인 교차결합을 이룬다.[3)] 보통 정상적인 collagen의 교차결합은 N-과 C-말단의 특정적인 부위에서만 일어나지만, 최종당화산물에 의한 collagen과의 교차결합은 모든 부위에서 무작위로 일어난다. 이러한 비정상적인 교차결합은 조직에 변화를 주어 치명적인 합병증을 유발한다. 또한 혈당이 정상적으로 회복되었음에도 많은 당뇨병 환자가 합병증을 예방하지 못하고 실명, 신증, 뇌졸증, 족부절단 등 극심한 고통을 당하고 있는데, 이는 합병증 예방 또는 치료가 혈당 농도 조절만으로 가능하지 않고 이미 축적된 비가역적이고 장기간 생존하는 최종당화산물이 결정적인 역할을 함을 알 수 있다. 이러한 최종당화산물에 의한 치명적인 영향은 최종당화산물 생성 (formation) 및 교차결합 억제 (inhibition)에 사용되는 아미노구아니딘 (aminoguanidine)을 당뇨동물에 투여하였을 때, 당뇨병성 혈관합병증을 완화한다는 보고들에 의해 뒷받침

*교신저자 (E-mail) : jskim@kiom.re.kr
(FAX) : 042-868-9471

되고 있다.[2, 4] 그러나 임상에서 당뇨성 합병증이 진단 될 시기에는 이미 최종당화산물 생성과 축적으로 인해 이미 교차결합으로 진행되어 조직이 손상되므로 최종당화산물 생성과 교차결합 억제제로는 충분한 치료 효과를 보기 힘들다. 게다가 아미노구아니딘의 경우 당뇨병성 신경 장애 환자를 대상으로 한 대규모 임상 III상 실험에서 독성이 드러나 개발이 중단 되었다.[5]

ALT-711 (4,5-dimethyl-3-(2-oxo-2-phenacyl)-thiazolium chloride)는 thiazolium compound로부터 유래된 약물로 이미 형성된 최종당화산물 교차결합을 절단 (breaking)하는 약물로 개발되었다. ALT-711은 친핵성 물질로서 이미 형성된 최종당화산물 교차결합의 친전자성인 dicarbonyl기 등을 공격한다. Streptozotocin (STZ)에 의해 유도된 제 I형 당뇨쥐에 ALT-711을 투여하면 혈관과 신장내 최종당화산물 축적을 감소시키고,[6] 감소된 collagen solubility를 증가시킨다.[7] 따라서 glycation cascade 저해제 개발뿐만 아니라 기생성된 최종당화산물 교차결합 억제제 (inhibitor)와 절단제 (breaker) 개발은 당뇨합병증의 예방을 위한 접근방법 중의 하나로 볼 수 있다.[8, 9]

이러한 접근방법을 기초로 하여 최근에는 보다 안전하고 우수한 효능을 지닌 새로운 물질 발굴을 위한 많은 연구들이 진행되고 있으며,[5] 천연물에 함유된 생리활성물질을 분리 정제하여 이를 당뇨 및 당뇨합병증 예방에 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 일반적으로 천연물에 함유된 물질은 독성 및 알레르기 반응으로 인한 부작용이 합성의약품에 비해 적기 때문에 이러한 천연물을 이용한 기능성 식품 및 신약 개발이 많은 관심의 대상이 되고 있다.[10, 11]

산수유나무(*Cornus officinalis*)는 층층나무과 (Cornaceae)에 속하는 낙엽활목으로서 중남부의 산야에 재생하고 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매 (Corni Fructus)를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하며 한약 또는 민간에서 자양강장, 수렴약으로 사용하고 있으며 꽃은 관상자원으로 이용하기도 한다.[12, 13, 14] 그러나 산수유 씨는 일반적으로 유독하다고 인식되어 약용으로는 사용하지 않으며, 씨를 제거한 과육만을 약용으로 사용한다. 하지만 산수유 씨의 독성 문제는 그 독성이 어떤 것이며, 어느 정도인지 과학적으로 알려진 바가 없는 실정이다.

현재까지 알려진 산수유의 생리활성 연구로는 씨를 제거한 산수유 열매(과육)의 경우 항균 효과 및 STZ로 유도한 당뇨쥐에서 혈당강하 및 항산화 효능이 보고되었다.[12, 13] 산수유 씨의 경우는 당뇨쥐에서 혈당 강하 효능[14]이 보고되었으나 당뇨합병증 및 최종당화산물과 관련된 연구는 미비한 상황이다. 따라서 본 실험에서는 산수유 열매 (fruit; 과육+씨)와 씨를 제거한 과육 (pericarp) 및 씨 (seed)의 80% EtOH 추출물을 이용하여 *in vitro*에서 최종당화산물 생성 저해효능을 검증 하였으며. 또한 이들 중 효능이 가장 우수한 산수유 씨 80% EtOH 추출물을 대상으로 용매분획을 실시하여 용매분획물들의 최종당화산물 생성 저해효능 및 기형성된 최종당화산물과 collagen의 비특이적인 교차결합에 대한 억제 및 절단 효능을 검증하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 산수유 재료는 2004년 11월 대전시 동구 용운동 일대에서 채집하였고, 대전대학교 생명과학부의 김주환교수의 감정을 거친 후 사용하였으며 증거표본은 한국한의학연구원 한약제제연구부의 표본실에 보관중이다.

추출 및 시료조제 – 산수유 열매 (63 g), 과육 (16 g)과 씨 (20 g)를 음건・분쇄한 후 80% EtOH (100 ml)로 실온에서 3일간 3회 반복 추출하였다. 여과 후 40°C에서 감압 농축하여 열매, 과육, 씨 80% EtOH 추출물을 각각 17.99, 9.46, 4.24 g을 얻었다. 산수유 씨 80% EtOH 추출물 3.84 g을 증류수 (100 ml)에 현탁하고 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O 순으로 계통 분획한 후 농축하여 *n*-hexane (0.1 g), EtOAc (0.88 g), *n*-BuOH (2.12 g) 및 H_2O (0.74 g) 용매분획물을 각각 얻었다.

***In vitro*에서 최종당화산물 생성 저해 효능** – Vinson과 Howard[15]의 실험방법을 변형하여 실시하였다. 즉 10 mg/ml의 우혈청 알부민 (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 50 mM phosphate buffer (700 μl; pH 7.4)에 녹이고, 0.2 M의 fructose와 glucose를 100 μl 을 넣었다. 또한 0.02% sodium azide를 넣어 반응 기간 동안 미생물의 오염을 방지하였다. 이 혼합물에 시험 시료 또는 *in vitro* 표준 최종당화산물 생성 억제제인 아미노구아니딘을 200 μl 넣어 final volume이 1 ml이 되도록 한 후 37°C에서 14일 동안 반응 시켰다. 배양 후 spectrofluorometric detector (Bio-TEK, Synergy HT, USA)를 이용하여 형광도를 측정하였다 (Ex: 350 nm, Em: 450 nm).

효소면역측정법 (ELISA) 법에 의한 최종당화산물 생성 저해 효능 측정 – 96well plate에 *in vitro*에서 생성된 최종당화산물 샘플을 코팅완충액 (50 mM carbonate buffer; pH 9.6)과 1:2 비율로 섞어 final volume이 100 μl가 되도록 한 후 37°C에서 2시간 방치한다. 0.05% PBST로 세 번 세척 후 1% casein solution (Vector, USA)으로 blocking 한다. 한 시간 방치한 후 0.05% Tween in PBS (PBST)로 세 번 세척한다. AGEs (6D12) 또는 CML (NF-1G) antibody (TransGenic Inc., Japan)를 1:1000으로 희석 후 well당 100 μl 씩 로딩 후 상온에서 1시간 방치한다. 0.05% PBST로 세 번 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)-linked goat anti-mouse antibody (Santa Cruz, USA)를 1:1000으로 희석한 후 100 μl 를 로딩하여 1시간 방치한다. 0.05% PBST로 세 번 세척 후 100 μl 의 기질 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

(TMB, Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가한다. 5분 방치 후 반응 정지 용액 (1 M H_2SO_4)을 100 µl 첨가 후 ELISA reader (Synergy HT, Bio-TEK, USA)로 흡광도 450 nm로 측정한다.

최종당화산물 교차결합 억제 효능평가 – Forbes[16]의 실험방법을 변형하여 실시하였다. 1.0 µg AGE-BSA (MBL international, Woburn, MA)와 다양한 농도의 80% EtOH 추출물 및 용매분획물 샘플 및 AGEs cross-linking 억제제로 알려진 약물인 아미노구아니딘의 mixture를 준비한 후 collagen-coated 96-well microtitre plate에 분주한 후 37°C에서 4시간 동안 incubation한다. 0.05% PBST에 3번 washing하여 unattached AGE-BSA를 제거하고, mouse monoclonal anti-AGE-BSA antibody (6D12)를 1:250으로 희석하여 각 well 분주한 후 37°C에서 1시간 incubation한다. 1시간 후 0.05% Tween in PBS로 3번 washing하고, HRP-linked goat anti-mouse antibody를 적용한 후 TMB를 substrate로 하여 발색한 후 450 nm에서 흡광도를 측정한다. AGE-BSA의 cross-linking inhibtion %는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{Inhibition of AGE-BSA Cross-linking (\%)} = 100 - \frac{\text{약물을 첨가한 well의 흡광도}}{\text{약물을 첨가하지 않은 well 의 흡광도}} \times 100$$

최종당화산물 교차결합 절단 효능평가 – Vasan[17]의 실험방법을 변형하여 실시하였다. 1.0 µg AGE-BSA를 collagen-coated 96-well microtitre plate에 분주한 후 37 ℃에서 4시간 동안 incubation하여 AGE-BSA와 collagen을 cross-linking 시킨다. 0.05% PBST에 3번 washing하여 unattached AGE-BSA를 제거한 후, 80% EtOH 추출물 및 용매분획물 샘플 및 최종당화산물 교차결합 절단제로 알려진 약물인 ALT-711을 1,000 µg/ml부터 2배식 연속 희석하여 1 µg/ml까지 준비한 후 각 well에 분주하고 37°C에서 4시간 동안 incubation한다. 이후 각 well을 0.05% PBST로 3번 washing하고, collagen과 cross-link되어 남아있는 AGE-BSA를 검출하기 위하여 mouse monoclonal anti-AGE-BSA antibody를 1:250으로 희석하여 각 well 분주한 후 37°C에서 1시간 incubation한다. 1시간 후 0.05% PBST로 3번 washing하고, HRP-linked goat anti-mouse antibody를 적용한 후 TMB를 substrate로 하여 발색한 후 450 nm에서 흡광도를 측정한다. AGE-BSA의 cross-linking breaking %는 위의 수식과 동일한 방법으로 계산한다.

통계처리

각 분석값은 평균±분산으로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 GraphPad Prism 4.0 software (Graph pad, CA, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test를 이용하여 $p<0.01$ 수준에서 실시하였다.

결 과

***In vitro*에서 최종당화산물 생성 저해 효능** – 산수유 열매와 과육 및 씨 80% EtOH 추출물의 최종당화산물 생성 저해 효능을 알아본 결과 산수유 열매와 과육 및 씨의 80% EtOH 추출물의 최종당화산물 생성 50% 억제 농도 (50% inhibition concentration, IC_{50})는 각각 4.23, 38.64, 1.13 µg/ml로 나타났다 (Table I). 이러한 결과는 최종당화산물 생성 억제제로 알려진 아미노구아니딘의 IC_{50} 값인 72.12 µg/ml 보다 월등히 우수한 효능 보였다. 이들 중 가장 효능이 좋은 산수유 씨 80% EtOH 추출물의 용매분획물들에 대한 최종당화산물 생성저해 효능을 알아본 결과는 Table II와 같다. 산수유 씨 80% EtOH 추출물의 모든 용매분획물들은 농도 의존적으로 최종당화 산물의 생성을 억제하였으며, *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, water 분획물의 IC_{50}은 각각 17.64, 1.52, 1.24, 3.27 µg/ml로 모두 아미노구아니딘 보다 최종당화산물 생성 억제 효능이 우수한 것으로 나타났다.

효소면역측정법에 의한 최종당화산물 생성 저해 효능 측정 – 최종당화산물 생성 억제효능 분석 결과를 뒷받침하기 위해 효과가 가장 우수했던 산수유 씨 80% EtOH 추출물과 용매분획물 (EtOAc와 *n*-BuOH)을 대상으로 추가 실험을 진행하였다. 최종당화산물 특이 항체(6D12)를 이용한 효소면역측정법으로 최종당화산물 생성 저해효능을 재검증 하였

Table I. Inhibitory effect of the fruits, pericarps and seeds of 80% EtOH extracts from *Cornus officinalis* on AGEs Formation

Part used	Conc. (µg/ml)	Inhibitory effect	
		Inhibitory effect (%)	IC_{50} (µg/ml)
Fruit (pericarp+seed)	1.25	-0.59±2.31	3.63
	2.5	30.21±4.49	
	5.0	76.97±0.54	
Pericarp	10.0	-7.28±1.65	38.64
	25.0	28.09±2.77	
	50.0	70.16±1.82	
Seed	1.0	14.18±3.44	1.13
	1.25	27.66±1.75	
	2.5	59.79±1.22	
Aminoguanidine	18.5	12.70±6.12	
	55.5	39.46±1.91	
	74.0	50.68±0.51	

Inhibitory effect was expressed as mean±S.D. of triplicate experiments. IC_{50} values were calculated from the dose inhibition curve.

Table II. Inhibitory effect of the solvent fractions of the 80% EtOH extracts of the seeds of *Cornus officinalis* on AGEs Formation.

Solvent fraction	Conc. (μg/ml)	Inhibitory effect	
		Inhibitory effect (%)	IC_{50} (μg/ml)
n-hexane	5.0	0.35±0.83	17.64
	10.0	18.78±0.77	
	25.0	79.52±0.32	
EtOAc	0.5	17.46±0.32	1.52
	0.75	23.84±0.56	
	2.5	82.40±0.44	
n-BuOH	0.75	17.49±0.59	1.24
	1.0	30.63±0.39	
	1.25	52.46±0.49	
Water	1.25	10.03±0.56	3.27
	2.5	43.08±0.49	
	5.0	78.14±0.49	

Inhibitory effect was expressed as mean±S.D. of triplicate experiments. IC_{50} values were calculated from the dose inhibition curve.

다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 산수유 씨의 80% EtOH 추출물과 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물들은 모두 농도 의존적으로 최종당화산물 생성을 저해 하였으며, 5 μg/ml 농도에서 각각 92%, 90%, 88% 정도의 저해 효능을 보였다. 이는 양성 대조군인 아미노구아니딘의 억제효능 보다 약 4~5배 가까이 우수한 것으로 나타났다.

최종당화산물 교차결합 억제 효능평가 – 산수유 씨가 최종당화산물과 collagen의 비가역적 교차결합을 억제하는를 알아 보기 위하여 최종당화산물 교차결합의 억제 효능을 *in vitro*에서 평가 하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 최종당화

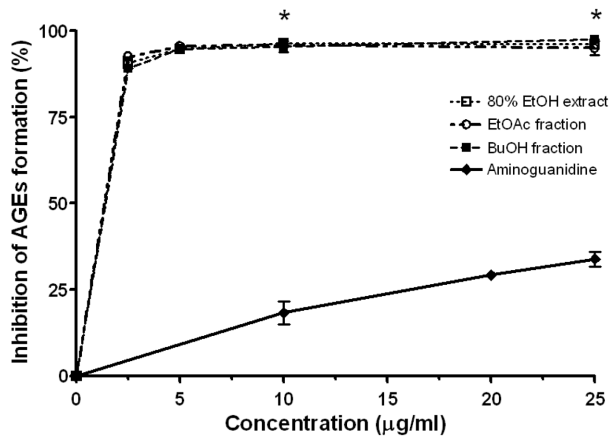

Fig. 1. Percentage inhibition of the 80% EtOH extract and the solvent fractions of the seeds of *Cornus officinalis* on AGEs Formation Measured by ELISA with Mouse Anti-AGEs Antibodies (6D12).

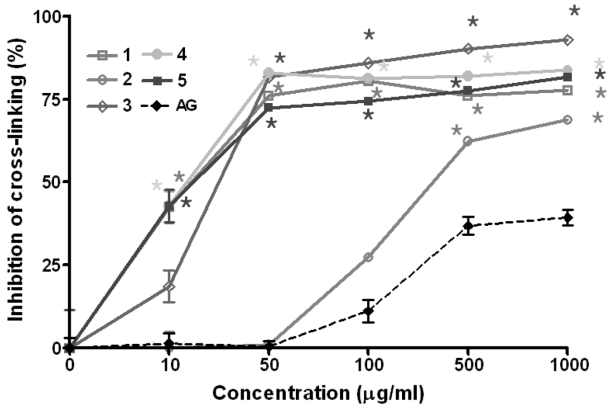

Fig. 2. Effect of the 80% EtOH extract and the solvent fractions of the seeds of *Cornus officinalis* as inhibitor of AGE-BSA cross-linking to collagen. AGE-BSA was cross-linked to collagen in the present or absent of the fraction samples and aminoguanidine, and then AGE-BSA attached to collagen was determined by ELISA with mouse anti-AGEs antibodies (6D12). 1 [80% EtOH extract], 2 [*n*-hexane fraction], 3 [EtOAc fraction], 4 [*n*-BuOH fraction], 5 [water fraction], and Aminoguanidine (AG). Data are mean±SD. (n=4). *P<0.01 vs. incubated sample with AG.

산물 교차결합 억제제로 알려진 아미노구아니딘의 경우 교차결합 억제 효능은 50 μg/ml 이하의 농도에서는 관찰되지 않았으며, 500 μg/ml에서 교차결합 억제효능은 36.90±5.30% 였다. 반면에 80% EtOH 추출물 및 *n*-hexane 분획물을 제외한 모든 용매분획물에서는 10 μg/ml 농도에서부터 교차결합 억제효능이 관찰되었으며, 50 μg/ml의 농도에서 산수유 씨의 80% EtOH 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH, water 분획물의 교차결합 억제효능은 각각 76.50±9.64, 81.60±1.80, 83.82±9.64, 73.84±9.64% 였다. 또한 1000 μg/ml의 농도에서는 80% EtOH 추출물 및 모든 용매분획물들이 아미노구아니딘에 비해 2~3배 이상 유의성 있는 효능을 보였다.

최종당화산물 교차결합 절단 효능평가 – 산수유 씨가 최종당화산물과 collagen 사이에 이미 형성된 비가역적인 교차결합을 절단 하는 효능을 살펴본 결과, *n*-hexane 분획물의 경우 실험에 사용한 모든 농도에서 유의성 있는 교차결합 절단 효능이 관찰되지 않았다. 반면 80% EtOH 추출물 및 나머지 용매분획물의 경우는 500 μg/ml 농도 이상부터 농도의존적인 교차결합 절단 효능이 관찰되었으며, 1000 μg/ml 농도에서 80% EtOH 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH, water 분획물의 교차결합 절단 효능은 각각 81.26±1.51, 64.98±0.81, 85.0±0.80, 59.8±0.81% 이였다. 또한 최종당화산물 교차결합 절단제로 알려진 ALT-711의 경우 1000 μg/ml 농도에서 교차결합 절단 효능은 33.38±6.48% 이였으며, 산수유 씨 80% EtOH 추출물 및 *n*-hexane 을 제외한 용매분획물의 억제효능이 동일 농도에서 ALT-711 보다 2-3배 이상 유의성 있게 억제 효능이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3).

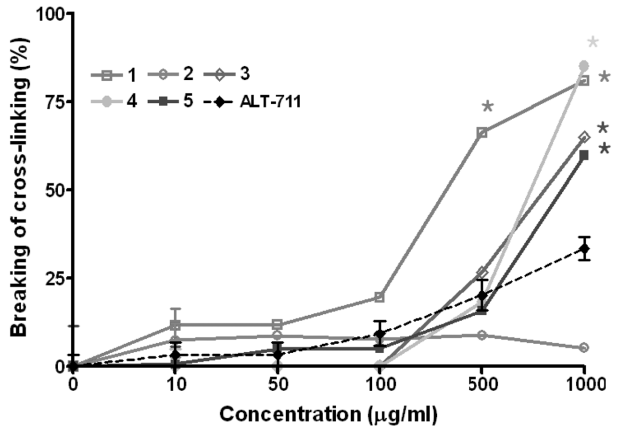

Fig. 3. Effect of the 80% EtOH extract and the solvent fractions of the seeds of *Cornus officinalis* as breaker of AGE-BSA cross-linking to collagen. Preformed AGE-BSA–collagen complex incubated with the fraction samples and ALT-711, and then AGE-BSA attached to collagen was determined by ELISA with mouse anti-AGEs antibodies (6D12). 1 [80% EtOH extract], 2 [*n*-hexane fraction], 3 [EtOAc fraction], 4 [*n*-BuOH fraction], 5 [water fraction], and ALT-711. Data are mean ± SD. (n=4). *P<0.01 vs. incubated sample with ALT-711.

고 찰

당뇨병은 유전적 요인과 후천적 환경 요건으로 비만, 식생활, 운동 부족 및 stress 등에 의해 영향을 받는 대사성 질환이다.[18] 현대 의학으로 당뇨병을 근원적으로 치료할 수 있는 방법은 아직 개발되지 못하고 있으며, 혈당을 정상적인 수준으로 유지되도록 하는 것이 최선의 치료 방법으로 알려져 있다. 그러나 경구 혈당 강하제 투여나 인슐린 치료 등으로 혈당을 정상으로 유지한다 하더라도 당뇨합병증까지 막는데 에는 어려움이 있다.[19, 20] 고혈당으로 인해 형성된 최종당화산물은 체내의 collagen, laminin, fibronectin과 같은 기질 단백질과 비가역적인 교차결합 (cross-link)을 형성하여 기능 이상을 초래하게 된다. 그러므로, 최종당화산물과 관련된 당뇨합병증을 예방하기 위해서는 1차적으로는 최종당화산물의 형성을 억제해야 하며, 2차적으로는 이미 형성된 최종당화산물들의 교차결합을 억제 하거나 절단 할 수 있어야 한다.

최근에는 약물 요법과 함께 다양한 생리 활성을 갖고 있는 천연물을 소재로 한 당뇨합병증 예방 및 치료제로서의 가능성에 관한 연구가 시도되고 있다. 그 중 산수유의 활성 작용에 관한 보고로는 산수유 열매가 당뇨 1형 동물모델에서 최종당화산물생성 저해효능이 보고되었고,[21] 산수유 씨의 영양성분 분석[22]과 항당뇨 효과[16]에 대한 보고가 있을 뿐이고, 산수유 씨에 대한 생리 활성이나 그 기전에 대한 기초자료는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 동물실험을 위한 후보한약재를 선별하기 위한 선행 실험으로 *in vitro*에서 최종당화산물 생성 저해효능을 검증해 보았다. Terasawa 그룹의 경우[23, 24] 아미노구아니딘의 IC_{50}값을 기준으로 효능 정도를 결정한 것과 같이, 본 연구도 산수유의 80% EtOH 추출물과 용매분획물들 IC_{50} 값으로 그 효능을 결정하였다. Table I에서와 보는 바와 같이, 산수유 열매와 과육 및 씨의 80% EtOH 추출물에 대한 최종당화산물 생성 억제 효능은 양성대조군인 아미노구아니딘 보다 훨씬 우수 하였다. 산수유 과육과 씨 80% EtOH 추출물의 최종당화산물 생성 IC_{50} 값에서 알 수 있듯이 산수유 열매의 최종당화산물 생성 억제 효능은 과육 보다는 씨에 기임함을 알 수 있다. 가장 효능이 우수한 산수유 씨 80% EtOH 추출물의 용매분획물에 대한 최종당화산물 생성 억제 효능을 알아 본 결과, 모든 용매분획물들이 아미노구아니딘 보다 훨씬 우수한 것으로 나타났으며 (Table II), EtOAc와 *n*-BuOH 분획물은 아미노구아니딘 보다 3배 가까이 높은 효능을 보였다 (Fig. 1). 또한 최종당화산물은 세포외기질 단백질과 교차결합하여 세포내 축적되는데, 이 교차결합에 산수유 씨의 80% EtOH 추출물 및 용매분획물이 미치는 영향을 알아보는 실험에서도 산수유 씨가 최종당화산물 형성을 저해 하는 효능뿐만 아니라, 억제제나 절단제로써의 효능도 각각의 양성 대조군인 아미노구아니딘과 ALT-711과 비교하여 월등함을 밝혔다.

현재 산수유 씨는 산수유 과육만을 한약재로 쓰이기 위해 수확 후 제거 되어 버려지고 있다. 그러나 산수유 씨는 이미 혈당 강하 효과[14]가 증명 되었으며, 본 실험에서는 산수유 씨가 최종당화산물생성 억제 효능뿐만 아니라 최종당화산물 교차결합 억제 및 절단 효능이 있음을 최초로 밝혔다. 이상의 결과를 토대로 산수유 씨가 당뇨합병증 예방 및 치료제 후보물질로서 이용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원 일반사업비 (L07010)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. Bucala, R., Cerami, A., Vlassara, H. (1995) Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabetes Rev.* **3**: 258-268.
2. Brownlee, M. (1996) Advanced glycation endproducts in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **3**: 291-297.
3. Edelstein, D. and Brownlee, M. (1992) Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* **41**: 26-29
4. Bierhaus, A., Hofmann M.A., Ziegler R, Nawroth P. (1998)

AGEs and their interaction with AGE-receptors in. vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Re0s.* **37**: 586-600.

5. Rahbar, S., Figarola, J.L., (2003) Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**: 63-79.
6. Wolffenbuttel, B.H., Boulanger, C.M., Crijns, F.R., Huijberts, M.S., Poitevin, P., Swennen, G.N., Vasan, S., Egan, J.J., Ulrich, P., Cerami, A., Levy, B.I. (1998). Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4630-4634.
7. Oldfield, M.D., Bach, L. A., Forbes, J.M., Nikolic-Paterson, D., McRobert, A., Thalla, V., Atkins, R.C., Oscika, T., Jerums, G., Cooper, M.E. (2001) Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RACE). *J. Clin. Invest.* **108**: 1853-1863
8. Sakurai, T. and S. Tsuchiya. (1988) Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett.* **236**: 406-410.
9. Forbes, J. M., Cooper, M. E., Oldfield, M. D., and Thomas, M. C. (2003) Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: S254-258.
10. Corns, C.M. (2003) Herbal remedies and clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem.* **40**: 489-507.
11. Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C.S., Sullivan, D.R., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M., Williams, P.G., Fazio, V.A., Inge, K.E. (2006) Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med. J. Aust.* **185**: S4-24.
12. Kim, O.K., (2005) Antidiabetic and antioxidative effects of *Corni fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Oil. Chem. Soc.* **22**: 157-167.
13. Yamahara, J., Mibu, H., Sawada, T., Fujimura, H., Takino, S. (1981) Antidiabetic principles of *Corni fructus* experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku. Zasshi.* **101**: 86-90.
14. Park, Y.K., Whang, W.K., Kin, H.I. (1995) The antidiabetic effects of extract from *Cornus officinalis* seed. *Chung-Ang. J. Pharm. Sci.* **9**: 5-11.
15. Vinson, J.A. and Howard III, T.B. (1996) Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 659-663.
16. Forbes, J.M., Soulis, T., Thallas, V., Panagiotopoulos, S., Long, D.M., Vasan, S., Wagle, D., Jerums, G., Cooper, M.E. (2001) Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia.* **44**: 108-114
17. Vasan, S., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J., Ulrich, P. (1996) An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature.* **382**:275-278
18. Morris, R.D., Rimm, D.L., Hartz, A.J., Kalkhoff, R.K., Rimm, A.A. (1989) Obesity and heredity in the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus in 32,662 adult white women. *Am J Epidemiol.* **130**: 112-21
19. Dillman, W.H. (1980) Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes.* **29**: 579-582.
20. Lee, H.C., Kim, S.J., Kim, S.S., Shin, H.C., Yoon, J.W. (2000) Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature.* **408**: 483-488.
21. Yamabe N., Kang K. S., Goto E., Tanaka T., Yokozawa T. (2007) Beneficial Effect of Corni Fructus, a Constituent of Hachimi-jio-gan, on Advanced Glycation End-product-Mediated Renal Injury in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 520-526.
22. Kim, Y.D., Kim, H-K., Kim, K.J. (2003) Analysis of Nutritional Components of *Cornus officianalis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 785-789.
23. Yokozawa, T., Nakagawa, T., Terasawa, K. (2001) Effects of Oriental medicines on the production of advanced glycation endproducts. *J. Trad. Med.* **18**: 107-112.
24. Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K. (2001) A study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J. Trad. Med.* **18**: 161-168.

(2008년 8월 18일 접수)