Journal of Nutrition and Health (J Nutr Health) 2016; 49(4): 233 ~ 240
http://dx.doi.org/10.4163/jnh.2016.49.4.233
pISSN 2288-3886 / eISSN 2288-3959

Research Article

우엉 뿌리 추출물의 최종당화산물 형성 억제 효능

이다례 · 김춘영†
영남대학교 식품영양학과

Inhibition of advanced glycation end product formation by burdock root extract

Lee, Darye · Kim, Choon Young†
Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongbuk 38541, Korea

ABSTRACT

Purpose: Diabetic complications are a major concern to manage progression of diabetes. Production of advanced glycation end products (AGEs) due to high blood glucose is one of the mechanisms leading to diabetic complications. Multiple pharmacologic AGE inhibitory agents are currently under development, but clinical applications are still limited due to safety issues. Thus, it is necessary to identify a safe anti-glycation agent. It is known that burdock roots have antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activities. The objective of the present study was to investigate the inhibitory role of burdock roots on the formation of high glucose-induced glycation of bovine serum albumin (BSA). **Methods:** In this study, glycation of BSA by glucose, galactose, or fructose at 37°C for 3 weeks was assessed based on levels of α-dicarbonyl compounds (early-stage glycation products), fructosamine (intermediate products of glycation), and fluorescent AGEs (late-stage glycation products). In order to compare the inhibitory actions of burdock root extract in AGE formation, aminoguanidine (AG), a pharmacological AGE inhibitor, was used as a positive control. **Results:** BSA glycation by glucose, fructose, and galatose was dose- and time-dependently produced. Burdock root extract at a concentration of 4 mg/mL almost completely inhibited glucose-induced BSA glycation. The results demonstrate that burdock root extract inhibited AGE formation with an IC_{50} value of 1.534 mg/mL, and inhibitory activity was found to be more effective than the standard anti-glycation agent aminoguanidine. This study identified a novel function of burdock root as a potential anti-glycation agent. **Conclusion:** Our findings suggest that burdock root could be beneficial for preventing diabetic complications.

KEY WORDS: burdock root extract, glycation of bovine serum albumin, hyperglycemia, diabetes complications

서 론

제 2형 당뇨병은 전 세계적으로 급속히 증가하고 있을 뿐만 아니라 당뇨 합병증의 위험성 때문에 당뇨병과 당뇨 합병증의 예방과 치료에 대한 관심이 증대되고 있다.[1] The International Diabetes Federation (IDF)의 자료에 따르면 전 세계 인류 중에서 약 3억 8천 명이 당뇨병을 앓고 있다고 보고하였으며, 2035년에는 약 2억 명의 환자가 증가하여 약 5억 8천 명이 될 것이라고 예측하였다.[2] 또한 대한당뇨학회의 2013년 자료에 따르면 대한민국 성인 중 당뇨병 환자는 약 400만 명으로 10명 중 1.2명 정도로 추정된다.[3,4] 당뇨병은 8~12시간 금식 후 측정한 혈당이 126 mg/dL이상이거나 경구 당 부하 검사에서 포도당 섭취 2시간 후 혈당이 200 mg/dL 이상으로 측정될 때 진단된다. 당뇨 환자의 경우 당뇨병으로 인한 합병증 발병이 큰 문제가 되며, 합병증으로는 당뇨망막증, 당뇨신경병증, 당뇨콩팥질환, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 그리고 말초신경질환 등이 알려져 있다.[5-9]

당뇨 합병증을 일으키는 원인으로 산화적 스트레스가 잘 알려져 있다.[10,11] 산화적 스트레스란 인체 내에서 발생하는 활성산소의 제거기능이 저하되거나 환경적인 요인으로 활성산소 생성이 급격하게 증가되어 일어나는 반응을 일컫는다. 당뇨 환자의 경우 고혈당에 의해 산화적 스트레스가 상승하여 인슐린 저항성을 증가시키고 혈관, 신장, 망막 등의 세포 손상을 발생시킨다고 알려져 있다.[11,12] 이

Received: May 9, 2016 / Revised: May 24, 2016 / Accepted: July 11, 2016
†To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-53-810-2871, e-mail: cykim@yu.ac.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

뿐만 아니라 산화적 스트레스로 인하여 생성되는 최종당화산물 (advanced glycation end products, AGEs)은 당뇨 합병증의 주요한 원인이 되고 있다. 당화 반응은 혈액이나 세포액에 존재하는 당류의 aldehyde group과 세포 내외의 단백질의 amino group 사이의 비효소적 반응이다.[13] 당화 반응은 당과 단백질이 반응하여 초기당화산물이 생성되고 이 초기당화산물이 분해되지 않고 재배열 된 후 다른 단백질과 교차 결합하여 AGEs를 생성하는 일련의 반응을 일컫는다.[14] 당화 반응으로 생성된 AGEs는 노화, 당뇨합병증, 동맥경화와 같은 질병의 원인 물질로 알려져 있다.[15-19]

당뇨 합병증을 예방하기 위해서 산화적 스트레스를 막는 역할을 하는 항산화제의 섭취가 권장되며 당뇨 합병증의 주원인인 AGEs의 생성 억제제로 aminoguanidine (AG)이 개발되었다.[20] AG는 nitric oxide synthase의 발생을 억제하여 당화 단백질들의 교차결합을 막는다고 보고되었다.[21] 당뇨병 질환 동물 모델을 이용한 연구에서 AG가 당뇨 합병증 예방제로서의 가능성이 보고되었으나, 제 2형 당뇨병 환자를 대상으로 한 3상 임상 연구에서 신장병 등의 부작용이 나타났다.[20,22] 따라서 당뇨 합병증을 예방하는 안전한 천연물을 기능성 식품 및 신약으로 개발하기 위한 연구에 많은 관심이 대두되고 있다.[23]

우엉 (Burdock, *Arctium lappa* L.)은 국화과에 속한 2년생 초본으로서 우리나라를 포함한 아시아 지역에서 식용 및 약용으로 오랫동안 사용되어 왔다. 『신농본초경』에서 "우엉은 염증, 종기, 안면부종, 어지럼증을 치료하며, 해소와 당뇨에도 효과가 있다."라고 제시되어있다. 최근 여러 연구는 우엉의 항산화, 항염증, 항암 등 다양한 생리활성 기능을 보고하였다. 우엉에 함유된 chlorogenic acid, lignin 종류 중 하나인 arctigenin, 그리고 caffeoylquinic acid 등이 우엉의 생리활성에 중요한 성분으로 밝혀졌다.[24-29] 우엉은 오랫동안 식재료로 널리 사용되어 왔기 때문에 안전성이 확보되어 있고 항산화 능력이 우수하여 산화적 스트레스와 관련된 질병의 예방 및 치료에 도움이 될 것으로 여겨진다. 최근 당뇨 합병증을 막으며 안전성이 확보된 천연물에서 유래한 새로운 물질을 규명하는 연구동향에도 우엉의 당뇨 합병증 예방과 관련된 연구는 전무하다. 그러므로 본 연구에서는 우엉 뿌리 추출물이 당뇨 합병증의 주요 원인인 AGEs 생성을 저해할 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하고자 한다.

연구방법

재료

Bovine serum albumin (BSA)은 Amresco (Solon, OH, USA)에서, D-(-)-glucose, aminoguanidine (AG), sodium azide, nitro blue tetrozolium (NBT), sodium formate, girard-T solution, glyoxal과 그 외 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

우엉 뿌리 추출물의 제조

우엉 뿌리는 경산시에서 2015년 6월에 구입하여 사용하였다. 우엉 뿌리는 수세하여 이물질을 제거한 후 2 mm의 크기로 절단하여 6회 덖음을 실시하고 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 우엉 뿌리 추출물 (1%, w/v)은 Autoclave (VS-1321-80, Vision Scientific Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 121°C에서 20분 동안 추출하였고 여과와 원심분리 후 상등액을 분리하여 제조하였다. 우엉 뿌리 추출물을 동결 건조하여 -20°C에서 보관하였으며 동결 건조된 우엉 뿌리 추출물을 1, 2, 4 g/mL의 농도로 증류수에 녹여 최종처리 농도보다 1,000배 높은 수준으로 stock solution을 조제하였다.

BSA 당화 반응

당의 종류에 따른 AGEs의 생성량을 비교하기 위하여 glucose군, fructose군, galactose군을 최종농도 25 mM로 준비하여 각각 BSA (42 g/L) 용액과 1:1 비율로 혼합한 후 37°C에서 배양하였다. 배양은 혈액 내 BSA 단백질의 반감기인 20일을 기준으로 3주간 실시하였다. 당과 BSA 용액은 20 mM phosphate buffer saline (pH 7.4)에 준비하였고 배양 중 변질을 방지하기 위하여 0.06% (w/v) sodium azide를 첨가하였다. 또한 glucose 농도별 AGEs의 생성량을 비교하기 위하여 5.6, 11, 25 mM의 glucose를 위와 동일하게 준비하여 배양하였다. 본 실험에서 사용한 glucose의 농도는 경구 당 부하 검사농도 (oral glucose tolerance test, OGTT)를 기준으로 하여, 정상인의 공복 시 혈중 glucose의 농도인 5.6 mM, 정상인의 식후 혈중 glucose의 농도인 11 mM, 당뇨 환자의 식후 혈중 glucose의 농도인 25 mM로 설정하였다. 우엉 뿌리 추출물의 BSA 당화 반응 저해능을 측정하기 위하여 최종처리 농도보다 1,000배 농축된 우엉 뿌리 추출물을 최종농도 1, 2, 4 mg/mL의 농도로 첨가하였다. 우엉 뿌리 추출물의 농도는 시중에서 평균적으로 판매되는 우엉 추출물의 농도인 2 mg/mL를 기준으로 하였다. AGEs의 생성 억제제인 AG를 1 M 농도로 증류수에 녹여 준비하여 최종농도 1 mM의 농도로 첨가하여 BSA 당화반응 억제군을 준비하였다. 각 실험은 시료의 형광도를 매주 측정하고 분액하여 -20°C에 보관한 뒤 3주간의 배양기간이 끝난 후 fructosamine 및 α-dicarbonyl compounds 함량을 측정하였다. 우엉 뿌리 추출물과 AG

의 BSA 당화 반응 저해능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - \text{Absorbance}_{sample} / \text{Absorbance}_{control}) \times 100$$

AGEs 생성량 측정

AGEs 중 일부가 형광을 띄는 특성을 이용한 Wu 등의 실험방법을 통해 AGEs 생성량을 측정하였다.[30] Flourescent microplate reader (VICTOR X3, Perkin Elmer, Turku, Singapore)를 이용하여 excitation 파장 355 nm와 emission 파장 460 nm에서 형광도를 측정하였다. AGEs 생성량은 arbritrary unit (AU)으로 나타내었다.

Fructosamine 분석

Fructosamine은 혈액 내 당화 BSA를 반영하는 지표이며, fructosamine 함량을 측정하기 위해 Wu 등의 실험방법을 수정하여 다음과 같이 NBT assay를 실시하였다.[30] NBT 용액은 100 mM sodium carbonate buffer (pH 10.35)에 녹여 300 μM의 농도로 준비하고 4°C에 보관하여 사용하였다. 시료 40 μL와 NBT 용액 160 μL를 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 microplate spectrophotometer (Epoch, Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α-Dicarbonyl compounds 함량 분석

AGEs 생성의 중간 산물인 α-dicarbonyl compounds 함량을 측정하기 위하여 Wells-Knecht의 실험방법을 수정하여 Girard-T test를 시행하였다.[31] 시료 200 μL를 1,700 μL의 500 mM sodium formate (pH 2.9)와 500 mM Girard-T 용액 100 μL에 혼합한 후 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 용액의 흡광도를 Ultraviolet–Visible spectrophotometer (U-2900, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 290 nm에서 측정하였다. 다양한 농도 (0~5 mM)의 glyoxal (GO)을 동일한 방식으로 처리하여 표준곡선을 작성하였다. GO 표준곡선을 이용하여 α-dicarbonyl compounds 함량을 계산하고 mg GO/mL 단위로 나타내었다.

통계처리

본 실험에서 측정한 모든 수치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 실험 군 간의 통계학적 분석은 SAS program (version 9.4, Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시한 후 Bonferroni's multiple comparison test로 $\alpha = 0.05$의 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

결 과

당의 종류에 따른 AGEs 형성 및 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 형성 저해 능력

당의 종류에 따른 당화 반응의 정도를 비교하기 위하여 단당류인 glucose, fructose, 그리고 galactose를 각각 bovine serum albumin (BSA)과 3주간 배양하여 최종당화생성물 (advanced glycation end products, AGEs)의 생성량을 측정하였다. 형광도 및 fructosamine 생성량 측정 결과 AGEs의 생성량이 3주간 증가하는 추세를 보였다 (Fig. 1). 배양 3주차 시료의 형광도 측정 결과에 따르면 다른 두 군에 비해 fructose군이 유의적으로 높은 AGEs 생성을 보였다 (Fig. 1A). Fructosamine 함량을 3주차에 측정하였을 때, fructose군, galactose군, glucose군의 순서대로 fructosamine 함량이 높게 나타났다 (Fig. 1B).

우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성 저해능을 알아보기 위해서 형광물질 생성량과 fructosamine 함량을 측정하였으며 저해능은 AGEs 생성 억제제로 알려진 aminoguanidine (AG)의 저해능과 비교하였다 (Table 1). 대조군의 형광도와 비교하였을 때, 우엉 뿌리 추출물의 저해율은 glucose군에서 69.76 ± 8.08%로 galactose군의 저해율인 49.93 ± 7.11%보다 유의적으로 높게 측정되었다. 우엉 뿌리 추출물의 fructosamine 생성 저해율은 glucose군에서 58.08 ± 0.63%로 나타났으며 fructose군과 galactose군에서는 저해능이 각각 44.45 ± 1.63과 39.42 ± 3.98%이었다. Glucose군에서 우엉 뿌리 추출물의 fructosamine 생성 저해율은 AG 처리군에 비해 유의적으로 높았다. 본 실험을 통해 우엉 뿌리 추출물이 glucose, fructose 또는 galactose에 의해 BSA가 당화되는 반응을 억제하는 능력이 있음을 확인하였다.

Glucose의 농도에 따른 AGEs 형성 및 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 형성 저해 능력

혈중 glucose의 농도는 식사 전후로 급격한 변화를 보이며 당뇨병 환자의 경우 정상인에 비해 상대적으로 높은 혈중 glucose 농도를 보인다. 그러므로 당뇨병 환자 혈액에서 관찰되는 혈중 glucose 농도에 따른 AGEs 형성 정도를 알아보고자 다양한 농도 (5.6, 11, 25 mM)의 glucose를 BSA와 배양하여 관찰하였다. 형광물질의 함량은 glucose의 농도 및 배양기간에 비례하여 증가하였다 (Fig. 2). 배양 3주차에 형광물질의 생성량을 비교하였을 때, 25 mM의 glucose군에서 5.6 mM의 glucose군보다 2배가량 높은

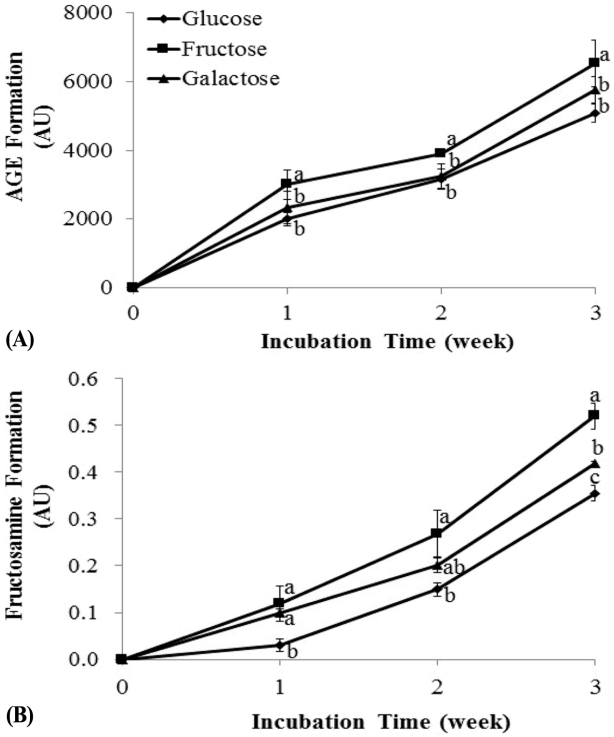

Fig. 1. Measurement of advanced glycation end products (AGEs) production from incubation of bovine serum albumin (BSA) with three different sugars including glucose, fructose, and galactose. BSA (42 g/L) was incubated with 25 mM glucose, 25 mM fructose, or 25 mM galactose in 20 mM phosphate buffer saline (pH 7.4) at 37°C for 3 weeks. (A) In order to measure AGE production, fluorescence intensity was detected using excitation at 355 nm and emission at 460 nm every week. (B) Fructosamine formation was estimated using NBT test described in material and method section. All data were obtained from at least 3 independent experiments. The data represent the means ± SD (n = 6) and values are expressed as arbitrary unit (AU). For each incubation time, means sharing the same letter are not significantly different at 5% level.

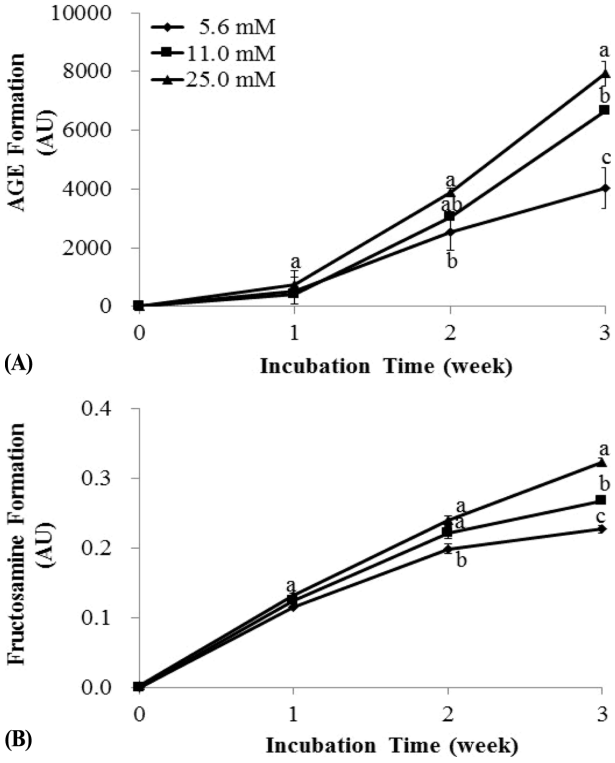

Fig. 2. The effects of glucose concentration on advanced glycation end products (AGEs) generation in bovine serum albumin (BSA)/glucose system. In order to estimate the effect of glucose concentrations on formation of AGEs, BSA (42 g/L) was incubated with different concentrations (5.6, 11, and 25 mM) of glucose in 20 mM phosphate buffer saline (pH 7.4) at 37°C for 3 weeks. (A) Fluorescence intensity of AGEs was measured using excitation at 355 nm and emission at 460 nm each week. (B) Fructosamine formation was characterized by absorbance at 530 nm every week. The data represent the means ± SD (n = 6) and values are expressed as arbitrary unit (AU). For each incubation time, means sharing the same letter are not significantly different at 5% level.

Table. 1. Inhibitory effect of burdock root extract on advanced glycation end products (AGEs) and fructosamine formation from incubation of bovine serum albumin (BSA) with three different monosaccharides at 3 weeks of incubation

Treatment		Conc.[1)]	AGEs		Fructosamine	
			Formation	Inhibition	Formation	Inhibition
			(AU)[2)]	(%)	(AU)	(%)
Glucose	Control		5,084 ± 1,821^{a}	0 ± 3.54	0.35 ± 0.01^{ab}	0 ± 2.51
	Burdock	2 mg/mL	1,576 ± 1,204^{b}	69.76 ± 8.08	0.15 ± 0.01^{b}	58.08 ± 0.63
	AG[3)]	1 mM	2,434 ± 112^{b}	52.52 ± 2.39	0.21 ± 0.02^{b}	39.94 ± 1.99
Fructose	Control		6,527 ± 459^{a}	0 ± 1.24	0.52 ± 0.02^{a}	0 ± 3.45
	Burdock	2 mg/mL	3,263 ± 263^{b}	50.13 ± 3.98	0.29 ± 0.02^{b}	44.45 ± 1.63
	AG	1 mM	4,046 ± 202^{b}	38.88 ± 3.00	0.34 ± 0.09^{b}	34.11 ± 6.69
Galactose	Control		5,755 ± 294^{a}	0 ± 2.41	0.42 ± 0.01^{a}	0 ± 5.64
	Burdock	2 mg/mL	2,935 ± 1,092^{c}	49.93 ± 7.11	0.26 ± 0.03^{b}	39.42 ± 3.98
	AG	1 mM	3,683 ± 1,145^{b}	36.76 ± 7.40	0.32 ± 0.08^{ab}	23.60 ± 5.77

All data were obtained from at least 3 independent experiments.
The data represent the means ± SD (n = 6). Means sharing the same letter are not significantly different at the 5% significant level.
1) Conc.: concentration 2) AU: arbitrary unit 3) AG: aminoguanidine

AGEs 생성량을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). Fructosamine 생성량 또한 형광물질의 생성량 결과와 동일하게 1주차에서 생성되는 양은 농도별로 유의적인 차이가 없었으며 3주차에 농도 의존적으로 AGEs 생성량이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 2B).

우엉 뿌리 추출물의 glucose 농도별 AGEs 생성 저해능을 평가하기 위하여 배양 3주차 시료의 형광도와 fructosamine 및 α-dicarbonyl compounds 함량을 측정하였다. AG와 우엉 뿌리 추출물은 25 mM glucose 농도에서 가장 우수한

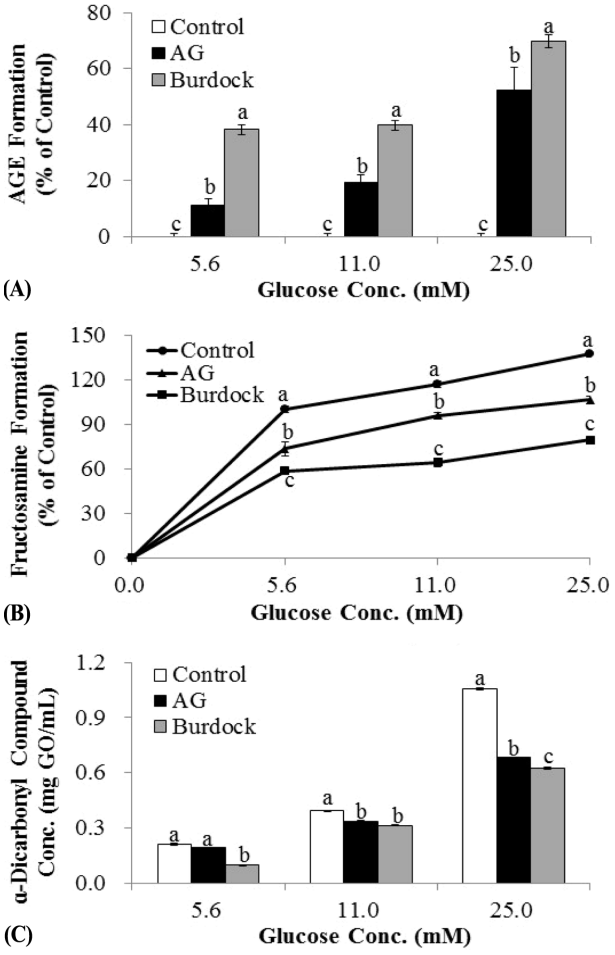

Fig. 3. Inhibitory effect of burdock root extract on advanced glycation end products (AGEs) production from incubation of bovine serum albumin (BSA) with different concentrations of glucose. In order to examine the effect of burdock root extract on BSA (42 g/L) glycation with different concentrations (5.6, 11, and 25 mM) of glucose in 20 mM phosphate buffer saline (pH 7.4), 2 mg/mL concentration of burdock root extract was incubated with BSA-glucose system at 37°C for 3 weeks. Aminoguanidine (1 mM) was used as a positive control. Inhibition of AGE formation by burdock root extract was determined at 3 weeks of incubation by fluorimetric (A), NBT (B), and Girard-T (C) assays. All data were obtained from at least 3 independent experiments. The data represent the means ± SD (n = 6). For each glucose concentration, means sharing the same letter are not significantly different.

AGEs 저해력을 보였다 (Fig. 3). 우엉 뿌리 추출물 (2 mg/mL)을 25 mM의 glucose군에 첨가하였을 때 형광도로 측정한 AGEs 저해능은 69.76 ± 8.08%로 나타났다 (Fig. 3A). 모든 glucose 농도에서 우엉 뿌리 추출물이 AG보다 AGEs 생성 저해능이 유의적으로 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3A). 우엉 뿌리 추출물의 fructosamine 생성을 저해하는 능력은 5.6 mM의 glucose군에서 58.46 ± 3.94%, 11 mM의 glucose군에서 63.84 ± 7.24%, 25 mM의 glucose군에서 약 58.08 ± 0.63%로 측정되었다 (Fig. 3B). 모든 glucose 농도군에서 우엉 뿌리 추출물이 AG보다 fructosamine 생성을 유의적으로 억제하였다 (Fig. 3B). α-Dicarbonyl compounds 함량은 25 mM의 glucose 농도일 때 대조군, AG 첨가군, 우엉 뿌리 추출물 첨가군에서 1.0 ± 0.27, 0.7 ± 0.34, 0.6 ± 0.19 mg GO/mL로 각각 측정되었다 (Fig. 3C). 대조군에 비해 2 mg/mL의 우엉 뿌리 추출물 첨가군이 α-dicarbonyl compounds 생성을 55.28 ± 0.08% 억제함을 확인하였다. 이 결과를 통해 우엉 뿌리 추출물이 당뇨병 환자에서 관찰되는 혈당 범위에서 AGEs 생성을 억제할 수 있음을 유추할 수 있다.

우엉 뿌리 추출물의 농도에 따른 AGEs 형성 및 저해능력

우엉 뿌리 추출물의 농도 (1, 2, 4 mg/mL)에 따른 AGEs 생성 저해능을 3주간 배양하며 비교하였다. 우엉 뿌리 추출물이 농도 의존적으로 AGEs 생성을 억제함을 확인하였다 (Fig. 4). 배양 3주차에서 낮은 농도 (1 mg/mL)의 우엉 뿌리 추출물은 AGEs 생성량을 약 2배 저해하였고 특히 가장 높은 농도 (4 mg/mL)의 우엉 뿌리 추출물은 AGEs의 생성을 완전히 억제하였다 (Fig. 4A). 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성을 50% 억제하는 농도 (The half maximal inhibitory concentration, IC_{50})를 계산하였을 때 IC_{50}은 1.534 mg/mL이었다. Fructosamine의 생성량 또한 우엉 뿌리 추출물의 농도에 비례하여 억제능이 높았다 (Fig. 4B). 배양 3주차에서 4 mg/mL 농도의 우엉 뿌리 추출물은 대조군에 비하여 fructosamine 생성량을 약 3배 저해하여 1 mM AG 보다 유의적으로 높은 저해능을 보였다 (Fig. 4B). 배양 3주차에서 α-dicarbonyl compounds 생성량은 우엉 뿌리 추출물을 1, 2, 4 mg/mL의 농도로 첨가하였을 때 약 0.7, 0.6, 0.1 mg GO/mL로 각각 측정되었다 (Table 2). 이를 저해능으로 나타내면 35.40 ± 0.05, 55.28 ± 0.08, 90.95 ± 0.05%로 농도 의존적으로 저해함을 관찰하였다. 이를 통해 우엉 뿌리 추출물이 BSA-glucose 당화반응에 의한 AGEs 생성을 농도 의존적으로 저해함을 알 수 있었다.

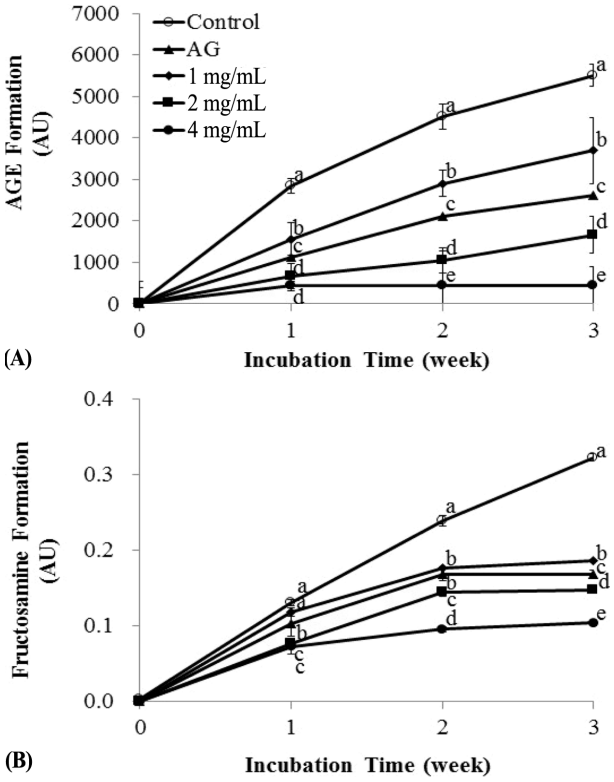

Fig. 4. Anti-glycation activity of different concentrations of burdock root extract during 3 weeks of incubation. BSA (42 g/L) was incubated with 25 mM glucose in the absence (which is a control in the figure) and presence of different concentrations (1, 2, and 4 mg/mL) of burdock root extract at 37°C for 3 weeks. Aminoguanidine (1 mM) was used as a positive control. Fluorescence intensity (A) and fructosamine formation (B) were analyzed. All data were obtained from at least 3 independent experiments. For each incubation time, means sharing the same letter are not significantly different determined by Bonferroni's multiple comparison test ($p > 0.05$).

Table. 2. Inhibition of α-dicarbonyl compounds by different concentrations of burdock root extract at 3 weeks of incubation

Treatment	Conc.[1)]	Inhibition of α-dicarbonyl compound (%)
Control		0 ± 0.04^{e}
Burdock	1 mg/mL	35.40 ± 0.05^{d}
	2 mg/mL	55.28 ± 0.08^{b}
	4 mg/mL	90.95 ± 0.05^{a}
AG[2)]	1 mM	43.58 ± 0.08^{c}

All data were obtained from at least 3 independent experiments. The data represent the means ± SD (n = 6). Means sharing the same letter are not significantly different at the 5% significant level.
1) Conc.: concentration 2) AG: aminoguanidine

고 찰

본 연구에서는 다양한 단당류, glucose, fructose와 galactose에 의한 BSA의 당화를 3주간 배양하며 advanced glycation end products (AGEs) 생성량을 확인하였고 그 결과 AGEs 생성은 배양 시간에 비례하였다. 이는 BSA와 fructose를 함께 배양하였을 때 AGEs의 생성량이 시간에 비례하여 증가하는 추세를 보고한 Yeboah 등의 연구 결과와 같은 경향을 보였다.[32] 당 종류에 따른 AGEs 생성능을 비교하였을 때 본 연구에서는 AGEs의 생성능이 fructose, galactose, glucose 순으로 높은 경향이 관찰되었으나 군간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 Münch 등은 fructose, glactose, glucose의 순으로 AGEs가 생성됨을 보고하였다.[33,34] 우엉 뿌리 추출물 (2 mg/mL)은 glucose, fructose와 galactose에 의한 BSA의 당화 반응을 유의적으로 저해함을 관찰하였다. BSA와 25 mM glucose를 함께 3주간 배양하였을 때 우엉 뿌리 추출물은 AGEs 생성을 69.76 ± 8.08% 저해함을 보였다.

AGEs 생성량은 glucose의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보이며 25 mM glucose에 우엉 뿌리 추출물을 첨가하였을 때 AGEs 생성 저해능이 가장 높았다. Glucose 농도 25 mM (450 mg/dL)은 당뇨병 환자에서 관찰될 수 있는 식후 혈당으로 우엉 뿌리 추출물이 25 mM glucose 농도에서 AGEs의 생성을 효과적으로 저해한다는 점은 우엉 뿌리 추출물이 당뇨 합병증 억제제로 가능성이 있음을 시사한다. 최근에 본 연구와 같이 올리브 잎, 허브 티, 채소 및 과일 등 다양한 천연물에서 AGEs 생성을 억제하는 생리활성 효능을 밝히고자 다양한 연구가 수행되고 있다.[35-38] 그러나 이러한 선행 연구에서는 BSA 당화 반응에 사용된 glucose 농도가 200 mM로 연구 결과를 *in vivo* 시스템에서 적용하기에 어려움이 있다고 사료된다. 본 연구에서는 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성 억제능을 생리학적 glucose 농도에서 확인한 바 의미가 있다 할 수 있다.

우엉 뿌리 추출물의 첨가 농도가 높을수록 AGEs 생성이 더욱 억제되었으며 3주차 배양 시 4 mg/mL의 농도에서는 약 80% 이상의 저해를 보였다. 배양 3주차에서 농도 2 mg/mL 이상의 우엉 뿌리 추출물은 1 mM aminoguanidine (AG) 보다 높은 AGEs 생성 저해능을 나타내었다. 이는 기존 AGEs의 저해제로 잘 알려져 있는 AG보다 우엉 뿌리 추출물이 우수한 AGEs 저해제임을 보여준다. AGEs의 생성은 산화 반응이기 때문에 항산화제의 첨가로 이를 효과적으로 막을 수 있다. 이 점에서 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 저해능은 기존 연구에서 보고된 우엉 뿌리의 항산화력에 기인하는 것으로 판단된다. 우엉 뿌리의 생리활성물질 중 가장 높은 함량을 가지는 chlorogenic acid는 높은 항산화력을 가지며 최근 Kim 등의 연구는 chlorogenic acid가 AGEs 형성을 억제한다고 보고하였다.[39,40] Gugliucci 등의

연구는 사철 감 참나무 잎인 마테에서 추출한 caffeic acid와 chlorogenic acid가 AGEs 생성을 억제함을 밝혔다.[41] 따라서 본 연구에서 관찰된 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성 억제효과는 우엉 뿌리 추출물에 함유되어 있는 chlorogenic acid를 비롯한 다양한 생리활성 물질의 작용에 의한 것으로 추정되며 AGEs 생성을 억제하는 주성분을 찾기 위한 추가 연구가 필요하다.

이상의 결과를 통해 당뇨 합병증의 주요 원인이 되는 AGEs 생성은 우엉 뿌리 추출물의 첨가로 억제됨을 확인할 수 있었다. 우엉 뿌리 추출물이 당뇨병 환자에게 관찰되는 높은 포도당 농도 (25mM)에서 우수한 저해능을 보이며 식품으로 오랫동안 이용되어 안전성이 확보되어 있다는 점에서 당뇨 합병증 예방에 이용 가치가 있다고 여겨진다. 그러나 우엉 뿌리 추출물의 당뇨 합병증 예방에 사용을 위해서는 향후 동물 모델을 이용한 *in vivo* 연구 및 메커니즘 규명 등의 심도 있는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

항산화, 항암 및 항염증 효능 등의 생리 활성이 보고된 우엉 뿌리의 열수 추출물을 제조하여 advanced glycation end products (AGEs) 형성 저해 효과를 확인하였다. AGEs는 bovine serum albumin (BSA)과 단당류인 glucose, fructose, galactose를 혼합하여 37ºC에서 3주간 배양하여 생성하였고 매주 형광도 측정, fructosamine 분석, α-dicarbonyl compounds 함량 분석을 통해 AGEs의 생성량을 확인하였다. 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성 저해능을 AGEs 생성 억제제로 알려져 있는 aminoguanidine (AG)의 저해능과 비교하였다. 우엉 뿌리 추출물은 BSA와 단당류인 glucose, fructose, galactose 각각의 당화반응을 억제하였으며 특히 배양 3주차에서 BSA와 glucose의 당화반응 결과물인 AGEs 생성을 유의적으로 저해하였다. 농도 2 mg/mL 이상의 우엉 뿌리 추출물은 1 mM AG보다 AGEs 생성 저해능이 우수하였으며 농도 4 mg/mL의 우엉 뿌리 추출물은 배양 3주차에서 AGEs 생성을 약 80% 이상 억제하는 효능을 나타냈다. 체내 혈당은 당뇨병과 같은 질환과 식이의 영향을 받으므로 다양한 glucose 농도에서 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성 억제능을 조사하였다. 그 결과 AGEs 생성은 glucose의 농도에 비례하여 증가하였으며 우엉 뿌리 추출물은 당뇨환자의 식후에 관찰되는 혈당인 25 mM glucose 군에서 1 mM의 AG보다 높은 우수한 저해 효과를 확인하였다. 본 연구 결과는 우엉 뿌리 추출물의 AGEs 생성 억제라는 새로운 기능성을 밝히며 향후 당뇨 합병증 예방 효능을 가진 기능성 식품으로의 개발 가능성을 제시한다.

References

1. Dunkley AJ, Bodicoat DH, Greaves CJ, Russell C, Yates T, Davies MJ, Khunti K. Diabetes prevention in the real world: effectiveness of pragmatic lifestyle interventions for the prevention of type 2 diabetes and of the impact of adherence to guideline recommendations: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care 2014; 37(4): 922-933.
2. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. Diabetes Res Clin Pract 2014; 103(2): 137-149.
3. Jeon JY, Ko SH, Kwon HS, Kim NH, Kim JH, Kim CS, Song KH, Won JC, Lim S, Choi SH, Jang MJ, Kim Y, Oh K, Kim DJ, Cha BY; Taskforce Team of Diabetes Fact Sheet of the Korean Diabetes Association. Prevalence of diabetes and prediabetes according to fasting plasma glucose and HbA1c. Diabetes Metab J 2013; 37(5): 349-357.
4. Jeon JY, Kim DJ, Ko SH, Kwon HS, Lim S, Choi SH, Kim CS, An JH, Kim NH, Won JC, Kim JH, Cha BY, Song KH; Taskforce Team of Diabetes Fact Sheet of the Korean Diabetes Association. Current status of glycemic control of patients with diabetes in Korea: the fifth Korea national health and nutrition examination survey. Diabetes Metab J 2014; 38(3): 197-203.
5. Bogdanov VY, Østerud B. Cardiovascular complications of diabetes mellitus: the tissue factor perspective. Thromb Res 2010; 125(2): 112-118.
6. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. Clin Diabetes 2008; 26(2): 77-82.
7. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR; UKPDS GROUP. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). Kidney Int 2003; 63(1): 225-232.
8. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. JAMA 2002; 287(19): 2570-2581.
9. Almdal T, Scharling H, Jensen JS, Vestergaard H. The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. Arch Intern Med 2004; 164(13): 1422-1426.
10. Ceriello A, Testa R. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. Diabetes Care 2009; 32 Suppl 2: S232-S236.
11. Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. Am J Hypertens 2001; 14(5 Pt 1): 475-486.
12. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res 2010; 107(9): 1058-1070.
13. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. J Am Osteopath Assoc 2000; 100(10): 621-634.
14. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. Korean J Physiol Pharmacol 2014; 18(1): 1-14.
15. Baynes JW. The role of AGEs in aging: causation or correlation. Exp Gerontol 2001; 36(9): 1527-1537.
16. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? Curr Diab Rep 2014; 14(1):

453-464.
17. Schleicher E, Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. Kidney Int Suppl 2007; (106): S17-S26.
18. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 1991; 40(4): 405-412.
19. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev 2002; 23(5): 599-622.
20. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science 1986; 232(4758): 1629-1632.
21. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch Biochem Biophys 2003; 419(1): 31-40.
22. Viberti G, Slama G, Pozza G, Czyzyk A, Bilous RW, Gries A, Keen H, Fuller JH, Menzinger G; Steering Committee. Safety Committee. Early closure of European Pimagedine trial. Lancet 1997; 350(9072): 214-215.
23. Pari L, Saravanan G. Antidiabetic effect of cogent db, a herbal drug in alloxan-induced diabetes mellitus. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2002; 131(1): 19-25.
24. Zhao F, Wang L, Liu K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. J Ethnopharmacol 2009; 122(3): 457-462.
25. Maruta Y, Kawabata J, Niki R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). J Agric Food Chem 1995; 43(10): 2592-2595.
26. Chan YS, Cheng LN, Wu JH, Chan E, Kwan YW, Lee SM, Leung GP, Yu PH, Chan SW. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). Inflammopharmacology 2011; 19(5): 245-254.
27. Kim M, Lee Y, Sohn H. Anti-thrombosis and anti-oxidative activity of the root of *Arctium lappa* L. Korean J Food Preserv 2014; 21(5): 727-734.
28. de Almeida AB, Luiz-Ferreira A, Cola M, Di Pietro Magri L, Batista LM, de Paiva JA, Trigo JR, Souza-Brito AR. Anti-ulcerogenic mechanisms of the sesquiterpene lactone onopordopicrin-enriched fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulfhydryls and nitric oxide. J Med Food 2012; 15(4): 378-383.
29. Sugiura Y, Torii T, Matsuda K, Yamada Y. Anti-allergic effects of extracts from commercial products of cooked burdock. Food Sci Technol Res 2009; 15(4): 423-426.
30. Wu J, Hsieh C, Wang H, Chen H. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. Food Chem 2009; 113: 78-84.
31. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. Biochemistry 1995; 34(11): 3702-3709.
32. Yeboah FK, Alli I, Yaylayan VA. Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. J Agric Food Chem 1999; 47(8): 3164-3172.
33. Münch G, Taneli Y, Schraven E, Schindler U, Schinzel R, Palm D, Riederer P. The cognition-enhancing drug tenilsetam is an inhibitor of protein crosslinking by advanced glycosylation. J Neural Transm Park Dis Dement Sect 1994; 8(3): 193-208.
34. Ledesma-Osuna AI, Ramos-Clamont G, Vázquez-Moreno L. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. Acta Biochim Pol 2008; 55(3): 491-497.
35. Kontogianni VG, Charisiadis P, Margianni E, Lamari FN, Gerothanassis IP, Tzakos AG. Olive leaf extracts are a natural source of advanced glycation end product inhibitors. J Med Food 2013; 16(9): 817-822.
36. Hori M, Yagi M, Nomoto K, Shimode A, Ogura M, Yonei Y. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. Anti Aging Med 2012; 9(6): 135-148.
37. Jariyapamornkoon N, Yibchok-anun S, Adisakwattana S. Inhibition of advanced glycation end products by red grape skin extract and its antioxidant activity. BMC Complement Altern Med 2013; 13(1): 171-179.
38. Mesías M, Navarro M, Gökmen V, Morales FJ. Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts: inhibition of AGE formation and carbonyl-trapping abilities. J Sci Food Agric 2013; 93(8): 2037-2044.
39. Predes FS, Ruiz AL, Carvalho JE, Foglio MA, Dolder H. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. BMC Complement Altern Med 2011; 11(1): 25-29.
40. Kim J, Jeong IH, Kim CS, Lee YM, Kim JM, Kim JS. Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking. Arch Pharm Res 2011; 34(3): 495-500.
41. Gugliucci A, Bastos DH, Schulze J, Souza MF. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex* paraguariensis extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. Fitoterapia 2009; 80(6): 339-344.