

## OLETF쥐에서 Amlodipine, Losartan과 비교한 Lithospermic Acid B의 당뇨병성 신증 예방효과

연세대학교 의과대학 내과학교실 내분비내과<sup>1</sup>, BK21 연세대학교 의과대학<sup>2</sup>, 연세대학교 의과대학 내분비연구소<sup>3</sup>, 연세대학교 의과대학 내과학교실 신장내과<sup>4</sup>, 연세대학교 의과대학 약리학교실<sup>5</sup>, 이화여자대학교 약학대학<sup>6</sup>, 연세대학교 이과대학 화학과<sup>7</sup>  
 강은석<sup>1,2,3</sup> · 김범석<sup>4</sup> · 김철훈<sup>2,5</sup> · 서기호<sup>2,5</sup> · 한승진<sup>1</sup> · 전성완<sup>1</sup> · 허규연<sup>1</sup> · 안철우<sup>1,2,3</sup> · 하현주<sup>6</sup> · 정만길<sup>7</sup>  
 차봉수<sup>1,2,3</sup> · 이현철<sup>1,2,3</sup>

Protective Effects of Lithospermic Acid B on Diabetic Nephropathy in OLETF Rats Comparing with Amlodipine and Losartan

Eun Seok Kang<sup>1,2,3</sup>, Beom Seok Kim<sup>4</sup>, Chul Hoon Kim<sup>2,5</sup>, Gi Ho Seo<sup>2,5</sup>, Seung Jin Han<sup>1</sup>, Sung Wan Chun<sup>1</sup>, Kyu Yeon Hur<sup>1</sup>, Chul Woo Ahn<sup>1,2,3</sup>, Hunjoo Ha<sup>6</sup>, Mankil Jung<sup>7</sup>, Bong Soo Cha<sup>1,2,3</sup>, Hyun Chul Lee<sup>1,2,3</sup>

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine<sup>1</sup>;  
 Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine<sup>2</sup>;  
 Institute of Endocrine Research, Yonsei University College of Medicine<sup>3</sup>;  
 Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine<sup>4</sup>;  
 Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine<sup>5</sup>;  
 Ewha Womans University College of Pharmacy and Center for Cell Signaling and Drug Discovery Research<sup>6</sup>; and  
 Department of Chemistry, Yonsei University College of Science<sup>7</sup>

### Abstract

**Background:** Lithospermic acid B (LAB), an active component isolated from *Salvia miltiorrhizae*, has been reported to have renoprotective effects in type 1 and type 2 diabetic animal models. We examined the effects of LAB on the prevention of diabetic nephropathy compared with amlodipine, a calcium channel blocker, and losartan, an angiotensin receptor blocker, in Otsuka Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF) rats, an animal model of type 2 diabetes.

**Methods:** LAB (20 mg/kg), amlodipine (10 mg/kg), or losartan (10 mg/kg) was given orally once daily to 10-week-old male OLETF rats for 28 weeks.

**Results:** None of LAB, losartan, and amlodipine exhibited effects on blood glucose levels. Treatment with amlodipine or losartan resulted in similar reductions in blood pressure; however, LAB was less effective in lowering blood pressure. Albuminuria was markedly suppressed by losartan and LAB, but not by amlodipine. LAB treatment decreased levels of renal lipid peroxidation, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).

**Conclusion:** These results suggest that LAB has beneficial effects on the diabetic nephropathy in OLETF rats by decreasing oxidative stress and inflammation as potent as losartan. (KOREAN DIABETES J 32:10~20, 2008)

**Key Words:** Lithospermic acid B, Amlodipine, Losartan, OLETF rats, Diabetic nephropathy

## 서 론

당뇨병성 신증은 제2형 당뇨병에서 중요한 합병증이며 말기신질환에 이르는 가장 중요한 원인이다. 당뇨병성 신증은 사구체간질과 세뇨관간질에 점진적인 세포외기질의 축적이 특징적이며 결국 단백뇨와 신부전에 이르는 특징이 있다<sup>1)</sup>.

당뇨병성 신증의 발생기전은 복잡하여 여러 매개체들이 관련되어 있다. 여러 연구에 따르면 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin-like growth factor-1, platelet-derived growth factor (PDGF), angiotensin II, vascular endothelial growth factor (VEGF), advanced glycation end products (AGEs) 등의 인자가 당뇨병성 신증 발생에 역할을 한다고 보고되었다<sup>2-4)</sup>. 이러한 인자들이 사구체간질세포의 증식, 사구체비후, 세포외기질의 과다생성 및 사구체의 혈류역동학적 변화를 초래하게 된다. 이러한 인자들 중 reactive oxygen species (ROS)는 당뇨병성 신증 발생에 있어서 중추적인 역할을 할 것으로 사료되고 있다. 고농도의 포도당은 ROS<sup>5,6)</sup> 발생을 촉진하고 사구체간질세포에서 TGF- $\beta$ 1과 세포외기질의 발현을 증가시킨다<sup>7,8)</sup>. 항산화제 투여는 고농도의 포도당에 의한 TGF- $\beta$ 1과 fibronectin의 증가를 효과적으로 억제<sup>6,9)</sup>하여 고농도의 포도당에 의한 신장손상에 ROS가 중요한 역할을 하는 증거를 제시해 주고 있다. 적극적인 혈당조절과 고혈압치료에도 불구하고 당뇨병성 신증은 임상에서 중요한 문제이며 안지오텐신전환효소억제제와 안지오텐신수용체길항제가 널리 쓰이고 있지만 당뇨병에 의한 말기신부전환자는 증가추세이다. 따라서 새로운 당뇨병성 신증의 예방 및 치료제의 개발이 절실하다고 할 수 있다.

*Salvia miltiorrhizae* (단삼)의 뿌리는 우리나라를 비롯해 중국, 일본에서 오래 전부터 당뇨병의 합병증 치료에 사용해 오던 약제로 최근 여기에서 추출한 활성성분인 lithospermic acid B (LAB)는 부분신장제거술을 받은 쥐에서 신기능유지에 좋은 효과를 보여주었으며 ROS감소와 혈관확장작용이 있음이 보고되었다<sup>10,11)</sup>.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)쥐는 자발적으로 제2형 당뇨병이 발생하고 점차 당뇨병성 사구체경화증으로 진행되는 동물모델로 경도의 비만과 18주령 이후에 발생하는 고혈당 및 당뇨병의 만성합병증 등 사람의 제2형 당뇨병과 비슷한 경과를 취하는 동물로 알려져 있다<sup>12-14)</sup>.

본 연구진은 이전에 스트렙토조토신에 의한 제1형 당뇨병 쥐에서 LAB의 신장 보호효과를 보고한바 있으며<sup>15)</sup> 제2형 당뇨병 쥐에서도 보고한 바가 있다<sup>16)</sup>. 본 연구에서는 선행연구의 결과를 바탕으로<sup>15,16)</sup> LAB투여가 혈압, 레닌-인지오텐신계, 알부민뇨, 산화스트레스, 신장 염증지표에 미치는 영향을 임상에서 널리 고혈압치료제로 쓰이고 있는 칼슘채널차단제인 amlodipine과 신기능보호제로 널리 사용되고 있는 안지오텐신수용체길항제인 losartan과 비교하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험대상

10주령된 수컷 OLETF쥐와 동일한 주령의 대조군 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO)쥐를 Tokushima연구기관(Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan)으로부터 공급 받았다. 모든 동물은 AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)인증 사육실에서 우리당 1마리씩 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ 에서 12시간 밤낮의 주기로 사육하였다. 모든 쥐는 정상식을 하였고 먹이(삼양사, Seoul, Korea)와 물의 섭취는 자유롭게 하였다. OLETF쥐는 임의로 LAB (20 mg/kg, n = 6)투여군, amlodipine (10 mg/kg, n = 6)투여군, losartan (10 mg/kg, n = 6)투여군, phosphate buffered saline (PBS)투여군으로 분류하였다. Amlodipine과 losartan의 용량은 이전의 연구논문의 결과를 기초로 설정하였다<sup>17-20)</sup>. 약물투여는 10주령부터 매일 경구로 28주간 투여하였다. LAB는 *Salvia miltiorrhizae*로부터 이전에 보고된 바와 같은 방법으로 추출 하였다<sup>21)</sup>. 체중은 매달 측정하였으며 24시간 요알부민 배설량은 LAB투여 12주와 26주에 측정하였다. 수축기혈압(SBP)은 매달 tail-cuff photoplethysmography (MK-1100, Muromachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 의식이 있는 상태에서 측정하였다. 각 측정 당 5회의 혈압을 측정하여 평균값을 구하였다. 38주령에 쥐를 희생하여 신장을 추출하여 액화질소에 동결하여 다음 분석까지 보존하였다. 모든 실험은 연세대학교 의과대학 동물실험관리 지침을 따라서 시행되었다.

### 2. 생화학적 분석

혈액은 동물을 희생할 때 대동맥에서 채취하여 즉시 5,000 g에서 5분간 원심분리하였다. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), 혈청 creatinine농도는 Hitachi 911 automatic analyzer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)를 이용하여 측정하였다. 총콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산농도는 Vitros 250 Chemistry Analyzer (Johnson & Johnson, Rochester, NY)를 이용하여 측정하였다. 24시간 동안 모은 소변은 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액에서 Nephrot microalbumin assay kit (Exocell, Philadelphia PA)을 이용한 ELISA법으로 알부민양을 측정하였다. 모든 검체는 세번씩 측정하여 그 평균값을 계산하였다.

### 3. 당부하검사

38주령에 16시간 금식시킨 후 오전 8시에 복강 내로 포도당 2 g/kg을 투여한 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기(Roche-Diagnostic, Pleasanton, CA)를 이용하여

혈당을 측정하였다.

4. 신피질에서 Malondialdehyde (MDA) 측정

Lipid peroxidation의 정도는 Ohkawa 등<sup>22)</sup>이 보고한대로 변형된 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법을 이용하여 측정하였다. 요약하면, 신피질을 잘라서 추출 용액(iNtron, Seoul, Korea)과 혼합하여 분쇄하였다. 80 µL의 분쇄물을 80 µL의 8% SDS에 넣고 120 µL의 0.8% 2-thiobarbituric acid와 120 µL의 20% acetic acid를 혼합한 용액을 수조에 넣고 95°C에서 60분간 반응시켰다. 얼음으로 차갑게 하여 반응을 정지시킨 후 15,000 g로 5분간 원심분리하여 불순물을 침전시켜 제거하였다. 생성된 MDA의 양은 spectrofluorometry (SPF-500C, SLM Instruments, Urbana, IL)를 이용하여 553 nm 파장에서 emission을 515 nm 파장에서 excitation을 측정하여 tetraethoxypropane 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

5. 신피질에서 Renin, Angiotensinogen, MCP-1 mRNA 발현 측정

신피질로부터 TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 총 RNA를 추출하고 역전사 중합효소연쇄 반응 분석을 할 때까지 영하 80°C에서 보관하였다. RT-PCR은 Qiagen사의 제품을 사용하여 renin, angiotensinogen, MCP-1, β-actin mRNA 발현을 반정량적으로 분석하였다. Angiotensinogen은 정방향시발체 5'-GCT TCT CCC AGC TGA CTG GG-3'와 역방향시발체 5'-GGT TGG TGT CAC CCA TCT TGC C-3'를 이용하여 중합효소연쇄반응을 진행하였고 renin은 정방향시발체 5'-TTG TGT GAG GAG GGC TGT AT-3'와 역방향시발체 5'-TGC TGA GAG TGT AGG TCC TG-3'를 이용하여 중합효소연쇄반응을 진행하였으며 MCP-1은 정방향시발체 5'-CAC CTG CTG CTA CTC ATT CAC T-3'와 역방향시발체 5'-GTT CTC TGT CAT ACT GGT CAC TTC T-3'를 이용하여 중합효소연쇄반응을 진행하였고 β-actin은 정방향시발체 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3'와 역방향시발체 5'-GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3'를 이용하여 중합효소연쇄반응을 진행하였다. 50의 RNA에 각각 0.6 µM의 목표전사체에 대한 시발체와 0.3 µM의 β-actin에 대한 시발체를 사용하여 50°C에서 30분간 역전사반응을 시킨 후 renin과 angiotensinogen에 대해서는 예비변성을 95°C에서 15분간 시행 후 변성 94°C에서 30초, 결합 57°C에서 30초, 신장 72°C에서 1분으로 이루어진 중합효소연쇄반응을 30회 진행하였으며 이후 신장반응을 72°C에서 10분간 진행하였다. β-actin과 MCP-1에 대한 중합효소연쇄반응은 초기변성 95°C에서 5분, 변성 95°C에서 30초, 결합 60°C에서 30초, 신장 72°C에서 30초로 된 cycle을 β-actin의 경우

25회, MCP-1의 경우 30회 진행하였고 이후 신장반응을 72°C에서 10분간 진행하였다. 중합효소연쇄반응산물을 1.5% 아가로스젤에서 전기영동시킨 후 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다. GENE GENIUS image analyzer (Synoptics, Cambridge, UK)를 이용하여 densitometry를 시행하였다. 결과는 β-actin 발현량에 대한 상대적인 값으로 표현하였다.

6. 신장피질에서 TGF-β1 단백질 발현 측정

신피질에 존재하는 TGF-β1의 양을 측정하기 위해 신피질분쇄물을 HCl (final concentration, 0.2 M)로 처리하여 활성화시킨 후 30분간 실온에 둔 후 같은 농도의 NaOH를 처리하여 중화시킨다. TGF-β1의 양은 TGF-β1 E<sub>max</sub><sup>TM</sup> ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI)을 이용하여 측정하였다. 이러한 E<sub>max</sub><sup>TM</sup> ImmunoAssay System은 32 pg/mL농도의 TGF-β1까지 측정할 수 있고 본 방법의 sensitivity는 94%이며 TGF-β2와 TGF-β3와의 교차반응은 10 ng/mL에서 5% 미만의 특이도를 보였다.

7. 통계분석

모든 자료는 특별한 언급이 없는 한 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 각 군 간의 차이는 분산분석을 이용하여 분석하였다. P값은 0.05 미만을 통계학적으로 유의한 것으로 판단하였다.

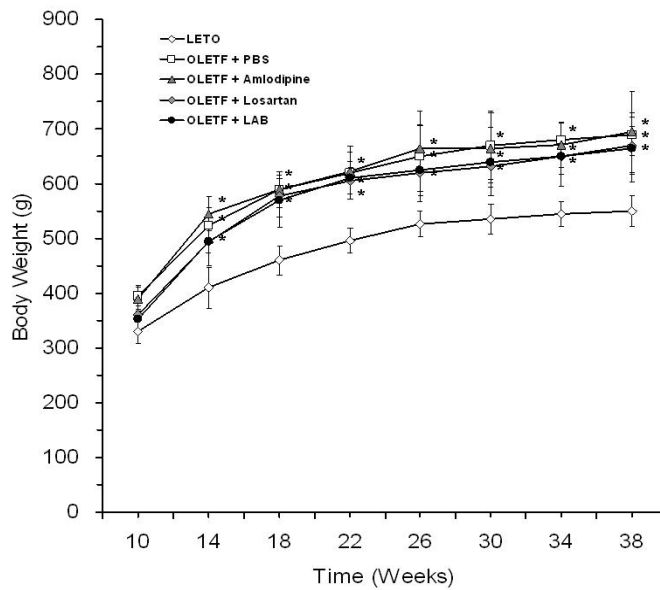
결 과

1. 체중 및 혈압에 대한 효과

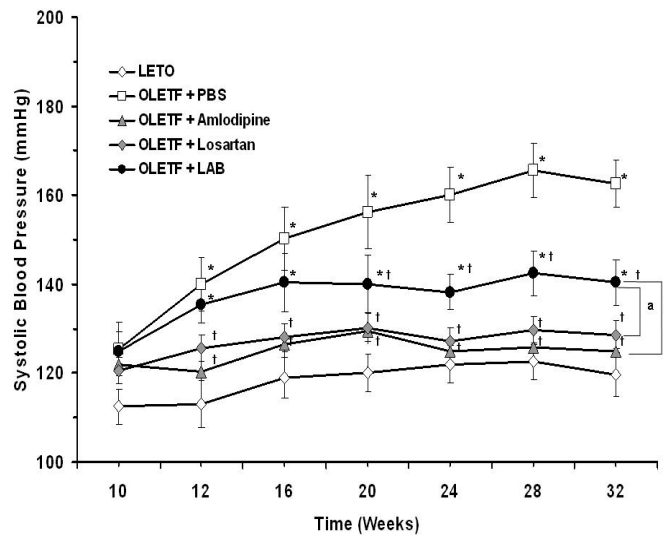
Fig. 1은 LETO쥐, PBS투여 OLETF쥐, LAB투여 OLETF 쥐, amlodipine투여 OLETF쥐, losartan투여 OLETF쥐에서의 체중 변화를 나타내었다. LAB, amlodipine, losartan투여 군에서는 PBS투여군과 비교해서 유의한 체중변화는 없었다. OLETF 쥐에서는 점차 고혈압이 발생하였으나 amlodipine, losartan, LAB투여군에서는 유의하게 수축기혈압이 감소하였다(Fig. 2). Losartan투여군에서는 amlodipine투여군과 비슷한 정도의 혈압강하효과를 보였으나 LAB 투여군에서는 혈압강하효과가 적었다(P < 0.05). 신장의 무게도 LAB투여군과 losartan투여군에서 OLETF대조군에 비해 유의하게 적었다(Table 1).

2. 신장에서 Renin, Angiotensinogen, MCP-1 mRNA 발현에 대한 효과

38주령에서 OLETF쥐는 LETO쥐 보다 높은 신장의 renin mRNA 발현과 angiotensinogen mRNA 발현을 보였다(Fig. 3A, B). Losartan투여는 유의하게 renin mRNA level을 상승시켰으나 angiotensinogen mRNA level에는 영향이 없었다. Amlodipine투여나 LAB투여는 OLETF쥐의 신장에



**Fig. 1.** Body weight change over time. Treatment with LAB (n = 6), losartan (n = 6), or amlodipine had no effect on the body weight gain compared with PBS treated OLETF control rats (n = 6). \*  $P < 0.05$  compared with LETO (n = 6).

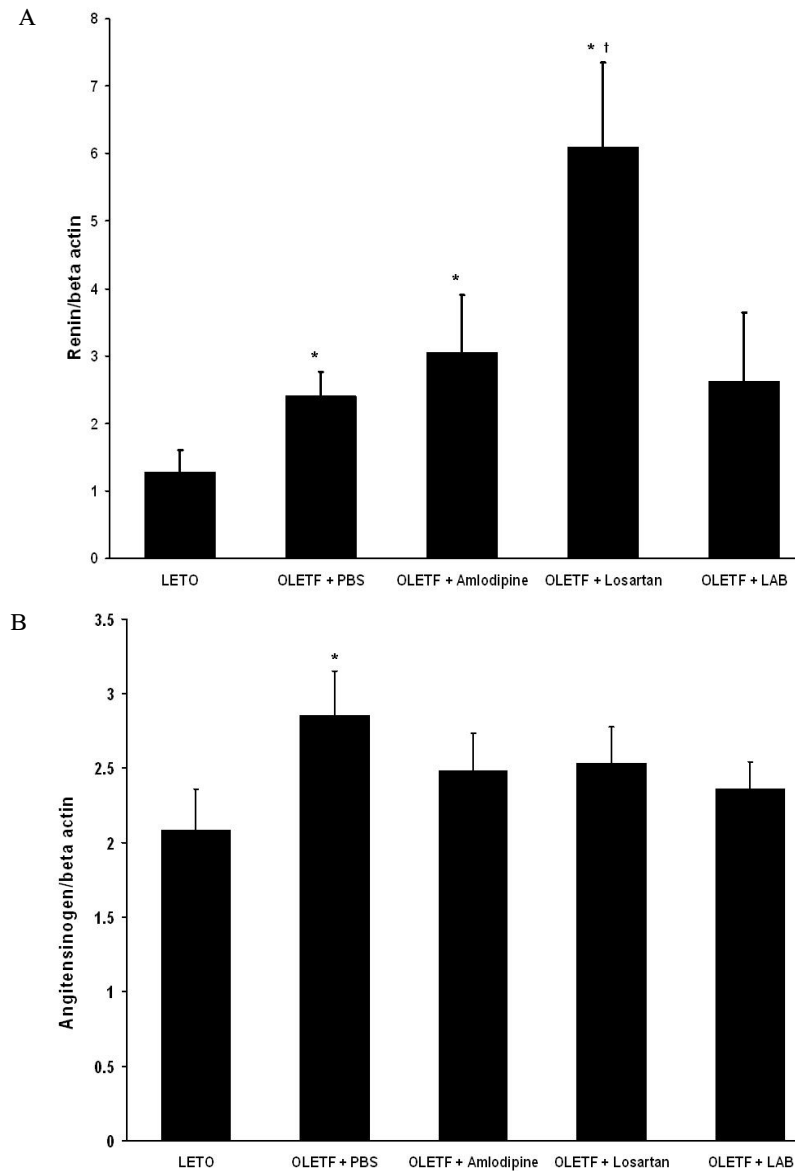


**Fig. 2.** Profiles of systolic blood pressure change. OLETF rats progressively developed hypertension, whereas treatment with either losartan (n = 6), amlodipine (n = 6), or LAB (n = 6) reduced systolic blood pressure significantly. Treatment with losartan and amlodipine resulted in similar reductions in SBP, while treatment with LAB had a less potent effect on lowering blood pressure. \*  $P < 0.05$  compared with LETO (n = 6), †  $P < 0.05$  compared with PBS treated OLETF (n = 6). a and b represent  $P < 0.05$ .

**Table 1.** Characteristics of experimental groups at 38 weeks

	LETO	OLETF	Amlodipine	Losartan	LAB
AST (IU/L)	83.2 ± 4.8	97.1 ± 5.1*	104.3 ± 11.8*	116.5 ± 12.4*	110.5 ± 11.5*
ALT (IU/L)	70.8 ± 3.4	82.1 ± 5.7	86.4 ± 5.5	87.5 ± 15.1	80.9 ± 6.8
Total cholesterol (mg/dL)	95.6 ± 6.4	152.4 ± 19.3*	154.4 ± 21.7*	147.7 ± 8.4*	146.3 ± 10.5*
Triglyceride (mg/dL)	105.3 ± 21.5	251.2 ± 40.5*	303.0 ± 50.4*	240.8 ± 26.2*	254.9 ± 27.1*
Free fatty acid (uEq/L)	624.5 ± 36.4	1313.2 ± 110.5*	1297.8 ± 125.6*	1126.5 ± 109.3*	1105 ± 85.7*
Serum creatinine (mg/dL)	0.75 ± 0.04	0.65 ± 0.01	0.66 ± 0.03	0.68 ± 0.03	0.60 ± 0.04
Kidney weight (g)	1.38 ± 0.13	2.64 ± 0.31*	2.23 ± 0.26*	1.96 ± 0.32*†	1.90 ± 0.150*†

Values are means ± SE. AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase. \*  $P < 0.05$  compared to LETO; †  $P < 0.05$  compared to OLETF.



**Fig. 3.** A. Renin mRNA expression profile. B. Angiotensinogen mRNA expression profile. At 38 weeks of age, OLETF rat showed higher renal renin and angiotensinogen mRNA levels than LETO rats. Treatment with losartan (n = 6) significantly increased renin mRNA levels but had no effect on angiotensinogen mRNA levels in OLETF rats. Treatment with amlodipine (n = 6) or LAB (n = 6) had no significant effects on renin and angiotensinogen mRNA expression level in OLETF rats. Values are means ± SE. \*  $P < 0.05$  compared with LETO (n = 6), †  $P < 0.05$  compared with PBS treated OLETF (n = 6).

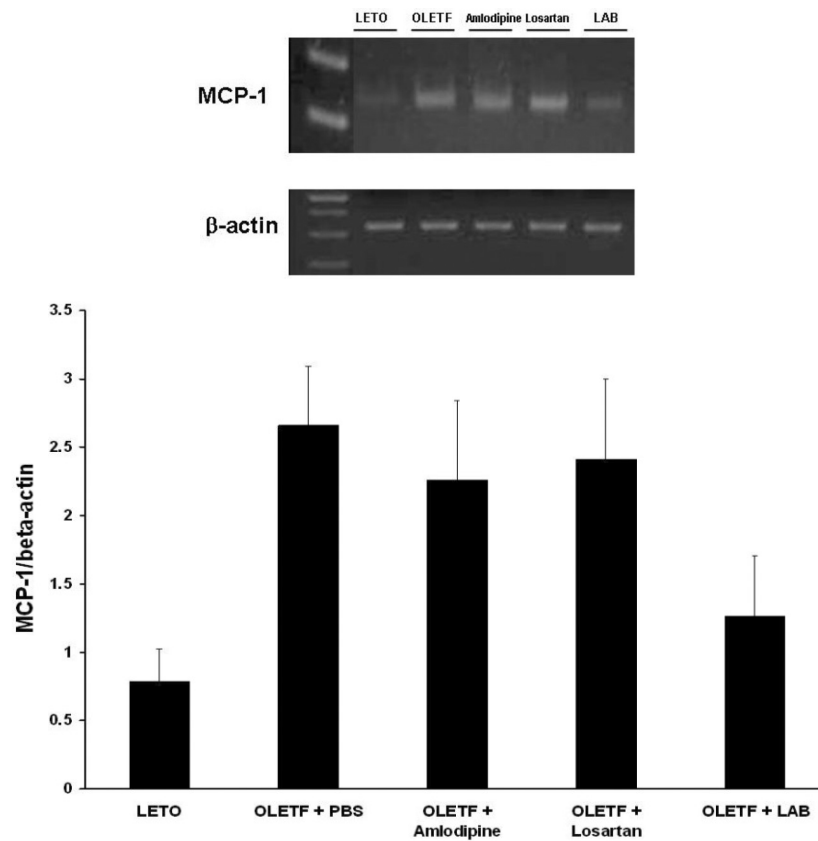
서 renin과 angiotensinogen mRNA 발현정도에 유의한 영향은 없었다. 신장에서의 MCP-1 mRNA 발현은 OLETF쥐에서 LETO쥐와 비교해서 증가되었다(Fig. 4). LAB투여군에서만 신피질에서 MCP-1 mRNA 발현을 감소시켰다. LAB 투여는 OLETF대조군에 비해서 MCP-1발현을 약 57% 정도로 감소시켰다(Fig. 4).

### 3. 혈당, 지질, 알부민뇨에 대한 효과

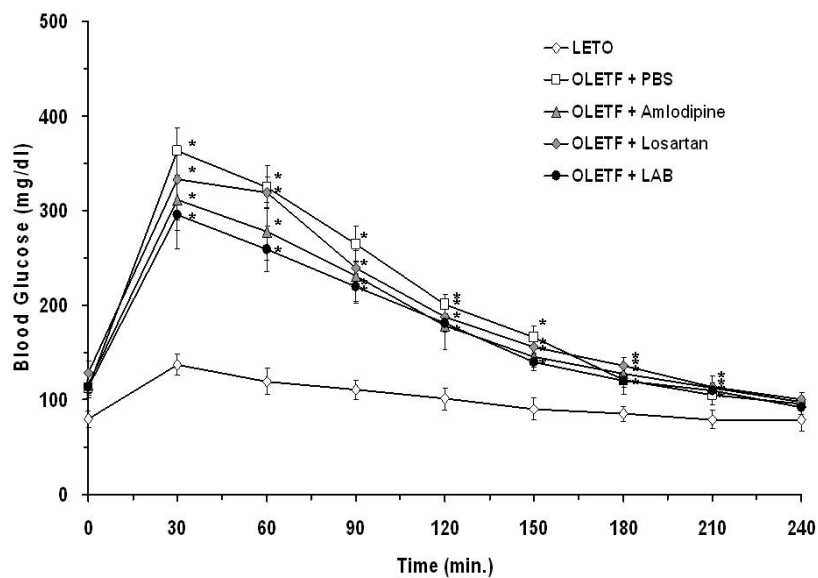
모든 동물에서 복강 내 포도당 주입 30분 후에 가장 높

은 혈당을 보였고 이 후 서서히 감소하는 양상을 보였다. LETO쥐에서는 120분째 거의 공복혈당으로 회복되었으나 OLETF쥐에서는 240분 후에도 공복혈당수준으로 감소하였다. LAB, amlodipine, losartan투여군 모두에서 유의한 공복 또는 식후 혈당강하효과는 없었다(Fig. 5). 더불어 각 군 간에 lipid profiles에 있어서 유의한 차이는 없었다(Table 1).

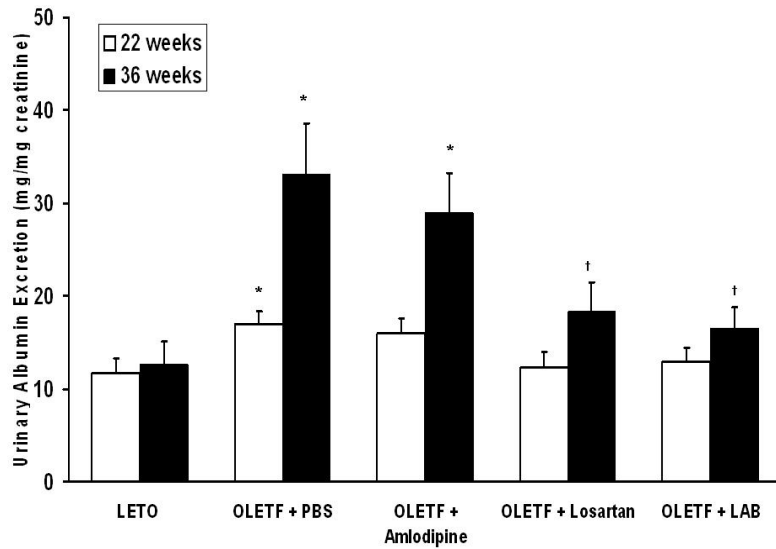
알부민뇨의 양은 22주령(약물투여 12주)에는 대조군에 비해 각 약제투여에서 큰 차이를 보이지 못하였으나 36주령(약물투여 26주)에는 losartan투여군과 LAB투여군에서는



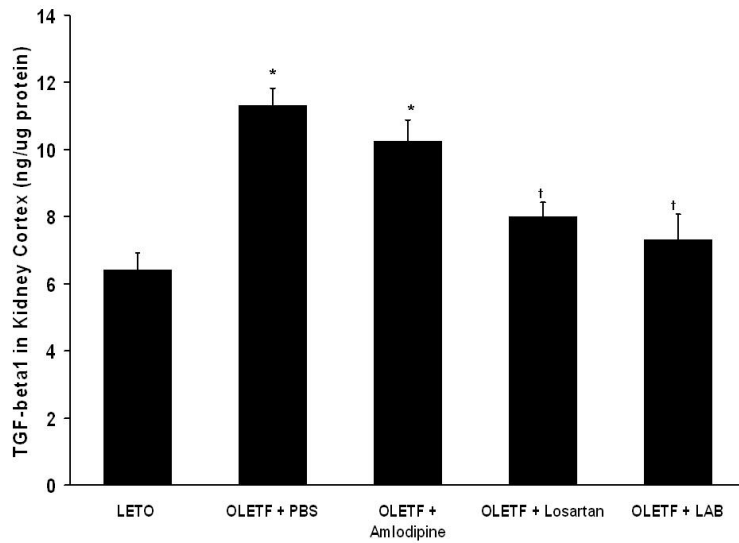
**Fig. 4.** Profile of renal MCP-1 levels by relative PCR. MCP-1 level in creased in OLETF rats compared with LETO rats. Only treatment with LAB caused a decrease in renal cortical MCP-1 mRNA expression levels. LAB decreased amount of MCP-1 expression to the 57% level of PBS treated OLETF control (n = 6).



**Fig. 5.** Profiles of glucose tolerance test at 38 weeks. Blood glucose levels were the greatest 30 min after the intraperitoneal glucose injection in all animals, which was followed by a distinct disposal phase. There was a delay in blood glucose disposal in OLETF rats. Treatment with LAB (n = 6), losartan (n = 6), or amlodipine (n = 6) did not significantly influence fasting and postprandial plasma glucose levels. \*  $P < 0.05$  compared with LETO (n = 6).



**Fig. 6.** Effects on albuminuria. The amount of albuminuria was markedly suppressed by treatment with losartan (n = 6) and LAB (n = 6), but not with amlodipine (n = 6). Values are means ± SE. \* P < 0.05 compared with LETO (n = 6), † P < 0.05 compared with OLETF (n = 6).



**Fig. 7.** ELISA results for TGF-β1 protein expression in the kidney cortex. Quantitative analyses of TGF-β1 showed that losartan (n = 6) and LAB (n = 6) strongly inhibited TGF-β1 protein expression in the renal cortex of OLETF rats. Values are means ± SE. \* P < 0.05 compared with LETO (n = 6), † P < 0.05 compared with PBS treated OLETF (n = 6).

대조군에 비해 유의하게 감소하였으나 amlodipine투여군에서는 유의한 감소가 없었다(Fig. 6).

**4. 신장피질에서 TGF-β1 단백질 발현에 대한 효과**

TGF-β1의 정량적 분석결과 losartan과 LAB투여는 강력하게 신피질의 TGF-β1 단백질발현을 감소시켰으나 amlodipine투여군에서는 유의한 효과를 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

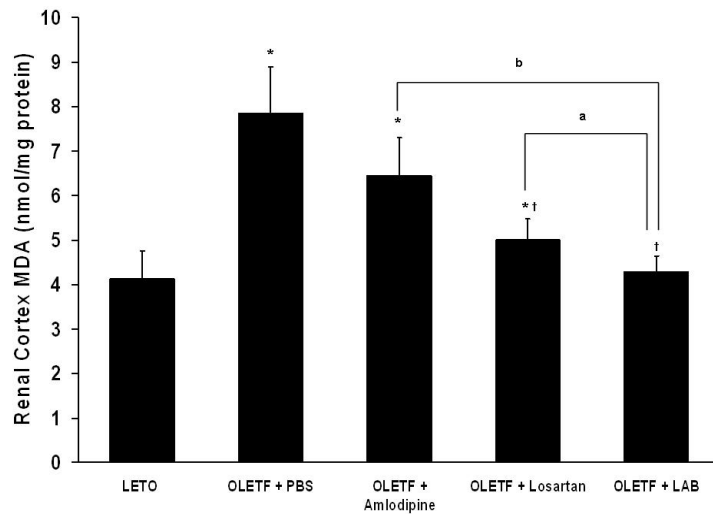
**5. 신장피질에서 MDA농도에 대한 효과**

OLETF쥐는 LETO쥐에 비해 유의하게 신피질의 MDA

함량이 높았고 amlodipine투여는 신피질의 MDA함량을 유의하게 감소시키지 못했다. Losartan과 LAB는 모두에서 MDA농도를 감소시켰으나(Fig. 8) LAB투여가 정량적으로 losartan투여보다 신피질의 MDA감소효과가 컸다(P < 0.05).

**6. 세포독성**

20 mg/kg/day의 LAB투여에서는 AST와 ALT의 유의한 상승을 유발하지 않았다. Amlodipine투여군이나 losartan투여군에서도 AST와 ALT의 유의한 상승은 관찰되지 않았다 (Table 1).



**Fig. 8.** Effect of treatments on renal cortex MDA levels. OLETF rats showed higher levels of renal cortical MDA contents compared with LETO rats. Treatment with amlodipine (n = 6), losartan (n = 6) or LAB (n = 6) decreased the renal cortical MDA concentration. Values are means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$  compared with LETO (n = 6), †  $P < 0.05$  compared with PBS treated OLETF (n = 6). a and b represent  $P < 0.05$ .

## 고찰

본 연구진은 이전에 LAB가 제1형 당뇨병 동물모델<sup>15)</sup>과 제2형 당뇨병 동물모델<sup>16)</sup>에서 신장보호효과가 있음을 보고한바 있다 이러한 효과는 고혈당으로 인해 ROS 생성이 증가하여 산화스트레스가 신장조직에서 세포외기질의 축적 및 protein kinase C (PKC)의 활성을 촉진하는 데 LAB가 이러한 과정을 억제하며 upstream에서 ROS를 억제하는 효과에서 기인하였다<sup>15)</sup>. 많은 생체 내 연구 결과 고혈당에 의한 산화스트레스 증가가 임상적인 당뇨병의 합병증발생에 선행한다고 알려져 있다<sup>23)</sup>.

본 연구에서는 OLETF쥐를 사용하여 LAB가 당뇨병성 신증의 예방에 미치는 영향을 본 연구진의 이전 연구의 후속연구로 임상에서 널리 사용되고 있는 고혈압치료제로 칼슘채널차단제인 amlodipine과 신기능 보호제로 쓰이고 있는 안지오텐신수용체길항제인 losartan과 비교하고자 하였다. OLETF쥐는 서서히 발생하는 고혈당, 만성적인 당뇨병의 경과, 당뇨병 합병증의 발생을 특징으로 하여 사람의 제2형 당뇨병과 유사하다<sup>24)</sup>. 거의 모든 수컷 OLETF쥐는 25주령에 당뇨병이 발생하며 더욱 당뇨병이 진행하면 신장 합병증은 필연적으로 나타난다. 안지오텐신수용체길항제가 당뇨병에서 신보호기능이 있다는 것은 널리 알려져 있어서 본 연구에서 비교약물로 선정하였고 LAB의 신장보호효과가 단지 혈압강하에 의한 효과인지를 보기 위해 칼슘채널차단제인 amlodipine을 비교약제로 선정하였다.

Losartan투여와 LAB투여에 의해 감소된 알부민뇨는 혈당수준과는 무관하였으며 LAB투여는 혈중 지질치에는 큰 영

향을 주지 않았다. LAB의 신보호효과가 혈압강하에 의한 것인지 알기 위해 혈압측정 및 신장에서의 renin, angiotensinogen mRNA의 발현정도를 보았다. Amlodipine투여와 losartan투여는 서로 비슷한 정도의 혈압강하효과를 보였으며 LAB투여군에서는 상기 군보다는 덜하지만 대조군에 비해서는 유의하게 혈압강하가 있었다. LAB는 이전 연구에서 저항성이 있는 동맥에서 내피세포에 의존적으로 혈관확장작용을 통하여 혈압강하효과가 있음이 보고되었다<sup>25)</sup>. Amlodipine 투여군에서는 유의한 혈압강하가 나타났으나 뇨 알부민 배설량 감소는 관찰되지 않았다. 또한 LAB나 amlodipine은 신장의 renin, angiotensinogen mRNA 발현 정도에는 영향이 없었다. Losartan투여군에서는 유의한 신장 renin mRNA의 증가가 있었다. 종합해 볼 때 본 결과는 LAB의 혈압강하효과는 안지오텐신수용체를 차단하는 효과가 아니라 주로는 이전에 보고되었던 혈관확장작용에 기인했을 것으로 사료된다<sup>25)</sup>.

산화스트레스는 당뇨병성 신증에 중요한 역할을 한다고 알려져 있어<sup>26-28)</sup> 본 연구진은 신피질에서 lipid peroxide의 함량을 MDA-TBAR법으로 측정함으로써 산화스트레스를 측정하고자 하였다. 비록 MDA가 ROS양을 측정하는 직접적인 방법은 아니지만 널리 생체 내에서 간접적으로 ROS를 측정하는 방법으로 인정되어 있다<sup>29-31)</sup>. OLETF쥐의 신피질에서 MDA는 LETO쥐보다 약 2배 가량 높았으며 amlodipine, losartan, LAB투여로 모두 감소하였지만 LAB투여군에서 가장 많은 감소효과를 보였다( $P < 0.05$ ).

다음으로 LAB의 염증지표에 대한 영향을 보았다. 여러 세포에서 산화스트레스는 MCP-1의 발현을 증가시킨다고 보고되었고<sup>5,32,33)</sup>, MCP-1은 선택적인 단백질의 유도과 활성



회를 통한 염증성 신장 질환에 중요한 역할을 한다고 보고 되었다<sup>34-36</sup>. MCP-1은 대식세포의 중요한 chemokine이며 혈관사이세포(mesangial cell)의 증식, 사구체경화, 신섬유화에 중요한 역할을 한다<sup>37-39</sup>. 또한 MCP-1은 신장에서 대식 세포축적에 필요한 물질로 알려져 있다<sup>40,41</sup>. LAB투여는 신장의 MCP-1 mRNA발현을 유의하게 낮추었으나 이러한 효과는 amlodipine이나 losartan투여군에서는 관찰되지 않았다. 비록 losartan은 사구체에서 MCP-1 mRNA의 발현을 낮춘다고 보고되었으나<sup>42</sup>, 본 연구에서는 이러한 효과가 관찰되지 않았는데 이는 실험동물의 차이일 수 있을 것으로 사료된다.

다음으로 신장피질에서 TGF-β1을 측정하였다. TGFβ1은 혈관사이세포에서 MCP-1 발현을 촉진하고<sup>43</sup>, MCP-1을 통해 콜라겐축적을 촉진한다<sup>44</sup>. 또한 TGF-β1은 당뇨병성 신증에서 세포외기질의 확장, 콜라겐 침착, 신섬유화의 최종 매개물질로 사료되고 있다<sup>45,46</sup>. 본 연구에서는 losartan과 LAB만이 신피질의 TGF-β1을 감소시켰다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 LAB는 신장의 MCP-1발현 및 TGF-β1발현을 억제하는 것을 알 수 있었다.

*S. miltiorrhizae*는 중국, 한국, 일본에서 오래 전부터 심장질환과 뇌혈관질환의 치료제로 사용되어 왔으며 현재까지 심각한 부작용은 보고되지 않았으며 여러 임상자료들은 *S. miltiorrhizae*가 일반적으로 안전함을 제시하고 있다<sup>47</sup>. 본 연구에서도 LAB는 AST와 ALT의 유의한 상승을 유발하지 않았다.

결론적으로 본 연구진은 LAB가 제2형 당뇨병성 신증 동물모델인 OLETF쥐에서 당뇨병성 신증의 발생을 예방하였고 이 효과는 임상에서 쓰이고 있는 안지오텐신 수용체길항제인 losartan과 유사하였다. 이러한 LAB의 신보호효과는 혈압강하 효과 외에도 항산화효과와 항염증효과에 의한 것으로 사료된다. LAB는 당뇨병성 신증의 예방에 있어서 제1형 당뇨병뿐 아니라 제2형 당뇨병의 치료약제로서의 가능성을 제시하였다.

## 요 약

**연구배경:** Lithospermic acid B (LAB)는 *Salvia miltiorrhizae* (단삼)에서 추출한 활성성분으로 제1형 및 제2형 당뇨병 동물모델에서 신장보호효과가 있음이 보고되었다. 본 연구에서는 제2형 당뇨병 동물모델인 OLETF rats에서 당뇨병성 신증 보호효과를 안지오텐신수용체길항제와 칼슘채널차단제와 비교하고자 하였다.

**방법:** LAB (20 mg/kg), losartan (10 mg/kg), amlodipine (10 mg/kg)을 10주령 수컷 OLETF쥐에 매일 경구로 28주간 투여하였다.

**결과:** LAB, amlodipine, losartan 투여는 혈당에는 모두

영향을 주지 못했다. Losartan이나 amlodipine투여군에서는 비슷한 정도의 유의한 혈압강하효과가 있었으나 LAB투여군에서는 혈압강하효과가 상대적으로 적었다. 요알부민 배설량은 losartan과 LAB투여군에서 관찰되었고 amlodipine 투여군에서는 관찰되지 않았다. LAB투여는 안지오텐신수용체 길항작용은 보이지 않았고 신장의 산화스트레스 및, MCP-1발현정도, TGF-β1발현은 유의하게 감소시켰다.

**결론:** 이러한 결과는 LAB가 OLETF쥐의 신장에서 산화스트레스를 감소시켜주고 염증을 감소시켜주며 혈압강하효과를 보여서 향후 당뇨병성 신증의 예방에 안지오텐신수용체 길항제인 losartan과 비슷하게 신장보호효과가 있음을 제시해준다.

## 참 고 문 헌

1. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC: *Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. J Clin Invest* 74:1143-55, 1984
2. Ziyadeh FN: *Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-β as the major mediator. J Am Soc Nephrol* 15 Suppl 1:S55-7, 2004
3. Brosius FC 3rd: *Trophic factors and cytokines in early diabetic glomerulopathy. Exp Diabetes Res* 4:225-33, 2003
4. Whiteside CI, Thompson J: *The role of angiotensin-II in progressive diabetic glomerulopathy in the rat. Endocrinology* 125:1932-40, 1989
5. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Kitamura M, Lee HB: *Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. J Am Soc Nephrol* 13:894-902, 2002
6. Ha H, Lee HB: *Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. Kidney Int Suppl* 77:S19-25, 2000
7. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G: *Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. J Clin Invest* 93:536-42, 1994
8. Oh JH, Ha H, Yu MR, Lee HB: *Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. Kidney Int* 54:1872-8, 1998
9. Ha H, Lee SH, Kim KH: *Effects of rebamipide in a*

- model of experimental diabetes and on the synthesis of transforming growth factor-beta and fibronectin, and lipid peroxidation induced by high glucose in cultured mesangial cells. J Pharmacol Exp Ther* 281:1457-62, 1997
10. Yokozawa T, Dong E, Oura H, Kashiwagi H, Nonaka G, Nishioka I: Magnesium lithospermate B suppresses the increase of active oxygen in rats after subtotal nephrectomy. *Nephron* 75:88-93, 1997
  11. Kamata K, Iizuka T, Nagai M, Kasuya Y: Endothelium-dependent vasodilator effects of the extract from *Salviae Miltiorrhizae radix*. A study on the identification of lithospermic acid B in the extracts. *Gen Pharmacol* 24:977-81, 1993
  12. Uehara Y, Hirawa N, Numabe A, Kawabata Y, Nagoshi H, Negoro H, Fujiwara S, Gomi T, Ikeda T, Goto A, Omata M: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Delays Onset of Glucosuria With Regression of Renal Injuries in Genetic Rat Model of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 3:327-36, 1998
  13. Koga K, Yamagishi S, Takeuchi M, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T, Saga T, Makita Z, Yoshizuka M: CS-886, a new angiotensin II type 1 receptor antagonist, ameliorates glomerular anionic site loss and prevents progression of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Mol Med* 8:591-9, 2002
  14. Okada M, Takemura T, Yanagida H, Yoshioka K: Response of mesangial cells to low-density lipoprotein and angiotensin II in diabetic (OLETF) rats. *Kidney Int* 61:113-24, 2002
  15. Lee GT, Ha H, Jung M, Li H, Hong SW, Cha BS, Lee HC, Cho YD: Delayed treatment with lithospermate B attenuates experimental diabetic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14:709-20, 2003
  16. Kang ES, Lee GT, Kim BS, Kim CH, Seo GH, Han SJ, Hur KY, Ahn CW, Ha H, Jung M, Ahn YS, Cha BS, Lee HC: Lithospermic acid B ameliorates the development of diabetic nephropathy in OLETF rats. *Eur J Pharmacol* 579:418-25, 2008
  17. Khattab M, Ahmad M, Al-Shabanah OA, Raza M: Effects of losartan on blood pressure, oxidative stress, and nitrate/nitrite levels in the nitric oxide deficient hypertensive rats. *Receptors Channels* 10:147-57, 2004
  18. Naelten G, Liu KL, Chapuis B, Lo M: Persistent effects on blood pressure and renal function of perindopril alone or combined with losartan in Lyon hypertensive rats. *Am J Hypertens* 18:699-706, 2005
  19. Zhou MS, Jaimes EA, Raij L: Inhibition of oxidative stress and improvement of endothelial function by amlodipine in angiotensin II-infused rats. *Am J Hypertens* 17:167-71, 2004
  20. Yu G, Liang X, Xie X, Su M, Zhao S: Diverse effects of chronic treatment with losartan, fosinopril, and amlodipine on apoptosis, angiotensin II in the left ventricle of hypertensive rats. *Int J Cardiol* 81:123-9; discussion 129-30, 2001
  21. Jung M, Lee HC, Ahn CW, Park W, Choi S, Kim H, Cho D, Lee GT, Li HR: Effective isolation of magnesium lithospermate B and its inhibition of aldose reductase and fibronectin on mesangial cell line. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 50:1135-6, 2002
  22. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-8, 1979
  23. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
  24. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41:1422-8, 1992
  25. Kamata K, Noguchi M, Nagai M: Hypotensive effects of lithospermic acid B isolated from the extract of *Salviae miltiorrhizae Radix* in the rat. *Gen Pharmacol* 25:69-73, 1994
  26. Chander PN, Gealekman O, Brodsky SV, Elitok S, Tojo A, Crabtree M, Gross SS, Goligorsky MS: Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen. *J Am Soc Nephrol* 15:2391-403, 2004
  27. Ha H, Yoon SJ, Kim KH: High glucose can induce lipid peroxidation in the isolated rat glomeruli. *Kidney Int* 46:1620-6, 1994
  28. Ha H, Lee HB: Oxidative stress in diabetic nephropathy: basic and clinical information. *Curr Diab Rep* 1:282-7, 2001

29. Piconi L, Quagliaro L, Ceriello A: *Oxidative stress in diabetes. Clin Chem Lab Med* 41:1144-9, 2003
30. Lykkesfeldt J: *Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. Clin Chim Acta* 380:50-8, 2007
31. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N: *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15:316-28, 2005
32. Takaishi H, Taniguchi T, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M: *High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun* 305:122-8, 2003
33. Tanifuji C, Suzuki Y, Geot WM, Horikoshi S, Sugaya T, Ruiz-Ortega M, Egido J, Tomino Y: *Reactive oxygen species-mediated signaling pathways in angiotensin II-induced MCP-1 expression of proximal tubular cells. Antioxid Redox Signal* 7:1261-8, 2005
34. Tejera N, Gomez-Garre D, Lazaro A, Gallego-Delgado J, Alonso C, Blanco J, Ortiz A, Egido J: *Persistent proteinuria up-regulates angiotensin II type 2 receptor and induces apoptosis in proximal tubular cells. Am J Pathol* 164:1817-26, 2004
35. Viedt C, Orth SR: *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? Nephrol Dial Transplant* 17:2043-7, 2002
36. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH: *Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. Kidney Int* 69:73-80, 2006
37. Di Mario U, Pugliese G: *15th Golgi lecture: from hyperglycaemia to the dysregulation of vascular remodelling in diabetes. Diabetologia* 44:674-92, 2001
38. Ikezumi Y, Hurst LA, Masaki T, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ: *Adoptive transfer studies demonstrate that macrophages can induce proteinuria and mesangial cell proliferation. Kidney Int* 63:83-95, 2003
39. Ceol M, Vianello D, Schleicher E, Anglani F, Barbanti M, Bonfante L, Bertaglia G, Graziotto R, D'Angelo A, Del Prete D, Gambaro G: *Heparin reduces glomerular infiltration and TGF-beta protein expression by macrophages in puromycin glomerulosclerosis. J Nephrol* 16:210-8, 2003
40. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR: *Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. J Exp Med* 190:1813-24, 1999
41. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, Lan HY, Rollins BJ, Kelley VR: *Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. J Clin Invest* 103:73-80, 1999
42. Wolf G, Schneider A, Helmchen U, Stahl RA: *AT1-receptor antagonists abolish glomerular MCP-1 expression in a model of mesangial proliferative glomerulonephritis. Exp Nephrol* 6:112-20, 1998
43. Cheng J, Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Gray CE, Nath KA, Grande JP: *TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process. Am J Physiol Cell Physiol* 289:C959-70, 2005
44. Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA: *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. Kidney Int* 56:135-44, 1999
45. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR: *Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. Faseb J* 13:1774-86, 1999
46. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG: *Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol* 11:25-38, 2000
47. Zhou L, Zuo Z, Chow MS: *Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. J Clin Pharmacol* 45:1345-59, 2005