

당뇨병성 신증에서 Pioglitazone이 Transforming Growth Factor (TGF)- β 1과 Fibronectin의 발현에 미치는 영향

관동대학교 의과대학 내과학교실, 연세대학교 의과대학 내과학교실*

윤수영 · 허종호* · 유동열* · 차봉수* · 강신욱* · 최규현* · 이호영* · 한대석*

〈요약〉

목적 : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 는 지방세포의 분화 및 지방 대사 조절에 관여하고, 인슐린 저항성을 감소시키는 것 외에 세포의 분화와 세포주기의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PPAR- γ 가 당뇨병성 신증의 발생과 진행에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 제 2형 당뇨 모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐에서 pioglitazone 투여 후 TGF- β 1과 fibronectin의 발현 정도를 관찰하였다.

방법 : 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에 pioglitazone을 10주간 투여한 뒤 단백뇨와 신장의 형태학적 변화 및 사구체 내 TGF- β 1과 fibronectin의 발현 정도를 관찰하였다.

결과 : Pioglitazone 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 혈당과 중성지방 농도가 유의하게 감소되어 있었고, 24시간 요단백 배설도 의미있게 감소하였다 ($p<0.05$). 조직검사 결과, 당뇨군에서는 사구체 크기의 증가, 메산지움의 결절성 확장과 더불어 사구체 기저막의 비후 소견을 관찰할 수 있었으나, 이러한 변화는 pioglitazone 투여로 현저하게 호전되었다. 신장 조직 내 TGF- β 1과 fibronectin의 단백 발현은 당뇨군에서 대조군에 비해 각각 2.8배와 2.4배 증가되어 있는 것으로 나타났고 pioglitazone 투여로 각각 80.6%와 92.0% 감소되었다 ($p<0.05$). TGF- β 1과 fibronectin의 mRNA 발현 또한 당뇨군에서 대조군에 비해 각각 2.1배와 2.4배 증가되어 있었고 이러한 증가는 pioglitazone 투여로 의미있게 감소되었다 ($p<0.05$).

결론 : OLETF 쥐에서 pioglitazone이 신장 조직 내 TGF- β 1 및 fibronectin의 단백과 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인하였으며, 결론적으로 제 2형 당뇨병에서 PPAR- γ 촉진제가 당뇨병성 신증의 치료에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

서 론

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 는 부신피질호르몬, 갑상선호르몬, retinoids, 비타민 D 수용체 등을 포함하는 핵수용체군

(nuclear receptor superfamily) 중 하나로¹⁾, 지방세포의 분화 및 지방 대사 조절에 관여하고, 인슐린 저항성을 개선시키는 것 외에 세포의 분화 및 세포주기의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다. Asano 등은 쥐의 메산지움에서 활성화된 PPAR- γ 가 메산지움 세포의增식을 억제하는 것을 보고하였는데²⁾, 이는 신장에서도 PPAR- γ 의 활성화가 세포의 성장을 억제시키는 기능이 있음을 시사한다.

당뇨병성 신증은 병리학적으로 사구체와 세뇨관의 비후, 기저막의 비후, 그리고 세포 외 기질의 축적 등

접수: 2004년 12월 10일, 승인: 2006년 2월 1일
책임저자: 한대석 서울시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel : 02)2228-1937, Fax : 02)393-6884
E-mail : dshan@yumc.yonsei.ac.kr

의 소견을 보이며, 이 중 사구체의 비후는 메산지움의 팽창이 가장 두드러진 특징이라고 할 수 있다. 이러한 메산지움의 팽창이 PPAR- γ 촉진제에 의해 억제될 수 있다는 가정 하에 여러 연구가 진행되어 왔으며, Nicholas 등은 실험적 당뇨 쥐에서 troglitazone이 메산지움의 증식을 억제하여 당뇨병성 신증의 진행이 억제되었다고 보고하였다³⁾, Buckingham 등은 Zucker 비만 쥐에서 PPAR- γ 촉진제인 rosiglitazone이 단백뇨의 발현 및 당뇨병성 신증의 진행을 억제시켰다고 보고하였다⁴⁾.

최근에 소개된 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐는 제 2형 당뇨병의 동물 모델이다. OLETF 쥐는 18주부터 고혈당이 나타나기 시작하며, 요즘 일부만 배설이 증가한다. 22주에는 사구체 영역과 메산지움의 확장이 시작되며, 36주가 되면 메산지움의 경화가 일어나기 시작하는데⁵⁾, 흥미롭게도 사람의 당뇨병성 신증과 거의 동일한 신장 내 병리 소견을 보인다. Uriu 등은 10개월된 OLETF 쥐에서 신장의 과여과와 함께 메산지움의 확장과 국소성 분절성 사구체경화를 발견하였는데, 이것은 사구체 여과율이 감소한 후에야 경화 병변이 나타나는 Zucker 비만 쥐나 Wistar 비만 쥐 등 다른 당뇨 동물들과는 다른 특이한 현상으로, 사람에 있어 비교적 이환 기간이 길지 않은 제 2형 당뇨병 환자에서도 사구체경화를 볼 수 있는 것과 연관지어 볼 때, OLETF 쥐가 제 2형 당뇨병의 신장 합병증을 연구하는데 가장 적절한 모델이 될 수 있다고 하였다⁶⁾.

OLETF 쥐에서도 사람에서와 같이 angiotensin 전환효소 억제제인 enalapril이 단백뇨를 감소시키고 신장을 보호하는 작용이 있는 것으로 보고되었으나⁷⁾, 아직까지 PPAR- γ 촉진제가 당뇨병성 신증에 미치는 영향에 대한 연구는 보고되지 않았으며, 더욱이 PPAR- γ 촉진제가 당뇨병성 신증의 주요 매개체인 TGF- β 1 및 세포 외 기질의 주요 성분인 fibronectin의 발현에 미치는 영향에 대한 보고는 없는 실정이다.

이에 본 저자 등은 사람의 제 2형 당뇨병과 가장 유사한 당뇨 모델인 OLETF 쥐를 이용하여 PPAR- γ 촉진제인 pioglitazone이 당뇨병성 신증의 발생 및 진행에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

1) 약물 투여

모든 동물 실험은 승인된 기안서에 따라 시행되었다. 실험 동물로는 당뇨군으로서 30주된 무게 350-400 g의 웅성 OLETF 쥐 18마리와 이에 대한 비당뇨 대조군 (control)으로 동일 주령의 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐 16마리를 사용하였다. 당뇨군은 다시 2군으로 나누어 9마리는 표준 식이를 투여하였고 (DM군), 나머지 9마리는 이전의 다른 연구자들의 방법대로 표준 식이에 pioglitazone을 10 mg/kg/day 용량으로 섞어 10주간 투여하였다 (DM + Pio군)^{8,9)}. 쥐들은 자동 온도 조절 시설에서 사육되었으며 실험 기간 동안 물과 표준 실험 식이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 모든 쥐들은 생후 40주에 희생시켰으며, 쥐를 희생시킬 때 신장의 무게와 복부의 피하 지방을 분리하여 무게를 측정하였다.

2) 생화학적 검사

모든 쥐들은 생후 30주와 40주에 체중, 혈압, 혈당, 혈청 크레아티닌, 총콜레스테롤 및 중성지방을 측정하였고, metabolic cage를 이용하여 24시간 요단백을 측정하였다. 또한 희생시키기 직전에 경구 내당뇨검사를 시행하였다.

3) 신장 적출 및 사구체 분리

쥐를 thiopental sodium 50 mg/kg 마취 하에 단두한 후 신장을 적출하였다. 형태학적 검사를 위하여 신장 조직을 10% neutral-buffered formalin에 고정한 후 표준적 방법으로 처리하고 5 μm 절편으로 잘랐다. 사구체 분리는 sieve를 이용하여 하였다. 적출된 신장을 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 후 가위로 괴질만을 분리하여 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 완충용액에 옮긴 다음, 체공이 200, 150 및 75 μm 인 stainless sieve를 차례로 통과시켜 75 μm 소공에 걸린 사구체를 실험에 이용하였다.

2. 형태학적 분석

5 μm 신장 절편은 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 실시하여 관찰하였다. 사구체 경화의 정도는 반경량적 사구체 경화 지수 (sclerosis index, SI)를 사용하여 나타내었는데, 단일 사구체 내에서 경화된

부분이 없으면 0, 25% 미만이면 1+, 25~50% 사이는 2+, 50~75% 사이는 3+, 75% 이상이면 4+로 정의하였다. 하나의 절편에 보이는 모든 사구체로부터 얻은 점수를 평균하여 전체 신장의 평균 SI를 구하였다¹⁰⁾. 평균 사구체 부피는 Image-Pro software를 이용하여 사구체의 면적을 계산한 후, 사구체가 구형이라는 가정 하에 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{사구체 부피 } (\mu\text{m}^3) = (\text{사구체의 면적})^{1.5} \times 0.74 + 0.21^{11)}$$

모든 조직 절편은 치료 여부를 알지 못한 상태에서 분석하였다.

3. 단백 추출 및 Western blot 분석

200 μL의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μg/mL leupeptin)를 이용하여 세포 균질액을 만들고 4°C 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 분석에 이용하였다. Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA)를 이용한 Bradford 방법으로 단백을 정량한 후 동량의 단백을 SDS와 β-mercaptoethanol이 포함된 sample buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓이고, 10~15% polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후 Hoeffer semidry blotting apparatus (Hoeffer Instruments, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 Hybond-ECL 흡착지 (American Life Science Inc, Arlington Heights, IL, USA)에 이전시켰다. Blocking buffer A (1× PBS, 0.1% Tween-20, 8% nonfat milk)에서 1시간 동안 처리한 후, 1:1,000으로 희석한 TGF-β1과 fibronectin에 대한 일차 항체 (다중 클론 rabbit anti-TGF-β1 antibody와 단일 클론 mouse anti-fibronectin antibody; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 다음, 세척하고 이차 항체를 이용하여 반응시켰다. 세척을 반복한 후 signal은 enhanced chemiluminescence 시약 (ECL; Amersham Life Science Inc, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 가시화 하였으며, densitometer로 optical density (O.D.)를 측정하였다.

4. RT-PCR 분석

1) 총 RNA의 추출

총 RNA를 추출하기 위해 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test Inc, Friendswood, TX, USA)를 사용하였다. RNA STAT-60 reagent 100 μL로 사구체를 처리하고, 동결과 해동을 3회 반복하여 용해시켰다. 여기에 700 μL의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 vortex한 후 상온에서 5분간 두었다. 400 μL의 chloroform을 첨가한 후 30초간 손으로 세게 섞어 주고, 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취한 다음 400 μL의 isopropanol을 첨가하고, 다시 4°C 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 70% ethanol로 세척한 후 Speed Vac으로 건조시키고, diethyl pyrocarbonate로 처리한 증류수로 침전물을 적절한 농도로 희석시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 RNA 농도를 측정하였다.

2) 역전사 (reverse transcription)

RNA 1 μg, 8 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L dNTP, 25 U RNase inhibitor, 40 U AMV reverse transcriptase, 10 μmol/L의 random hexamer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 함유한 20 μL 반응 용액으로부터 Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific Inc, Westbury, NY, USA)를 이용하여 first-strand c-DNA를 합성하였다. 총 20 μL의 반응 혼합물을 30°C에서 10분, 그리고 42°C에서 60분간 incubation 한 후 99°C에서 5분간 가열하여 효소를 비활성화시켰고, 역전사가 끝난 검체는 PCR 전까지 -70°C에 보관하였다.

3) 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

쥐의 GAPDH, TGF-β1 및 fibronectin에 대한 primer를 설계한 후 Invitrogen™ Life Technologies 사 (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제작하였다 (Table 1). GAPDH와 fibronectin의 PCR은 10 ng RNA에 해당하는 cDNA, Taq DNA polymerase 1.25 U, dNTP 0.2 mmol/L, sense 및 antisense primers 각각 25 pmol/L, 1.5 mmol/L MgCl₂를 함유한 50 μL 반응 혼합물을 이용하여 시행하였고, TGF-β1의 경우는 Taq-Gold DNA polymerase 2.5 U과 sense 및 antisense primers 각각 30 pmol/L 와 다른 조성은 동일하게 함유한 반응 혼합물을 사용

Table 1. Primers of Rat TGF- β 1, Fibronectin, and GAPDH

		Sequence (5'→3')
TGF- β 1	Sense	CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC C
	Antisense	GCT CCA CCT TGG GCT TGC GAC C
Fibronectin	Sense	GCA AGC CTA AAC CTG AAG AGA CC
	Antisense	CCT GGT GTC CTG ATC ATT GCA TC
GAPDH	Sense	GAC AAG ATG GTG AAG GTC GG
	Antisense	CAT GGA CTG TGG TCA TGA GC

하였다. PCR은 95°C에서 3분간 가열한 후 94°C에서 30초, 각각의 annealing 온도인 62°C에서 30초, 그리고 72°C에서 1분간 36 cycles 시행하였으며, 이후 72°C에서 7분간 더 반응시키는 방법으로 하였다.

mRNA의 발현은 역전사 효율의 차이를 보정하기 위해 모든 검체의 PCR 산물의 O.D.를 GAPDH의 O.D.로 보정하였다. 이를 위해 실험에서 얻은 PCR 산물과 GAPDH 비의 예민도가 가장 높은 cDNA의 양과 PCR cycle의 수를 결정한 후 본 실험을 실행하였다. House keeping 유전자인 GAPDH는 다른 시험관에서 동시에 시행하였으며, PCR이 끝난 후 개개의 증폭된 PCR 산물 중 30 μL를 취하여 0.05 μg/mL의 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동하였다. PCR 산물의 O.D.는 TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 측정하였으며, GAPDH의 O.D.로 보정하였다.

5. 면역조직화학염색 (immunohistochemical stain)

5 μm 신장 조직 절편을 파라핀 제거 후 에탄올로 적시고 세척하였다. Black and Decker vegetable steamer를 이용하여 10 mM/L sodium citrate buffer에서 20분간 antigen retrieval을 시행한 후, 3% H₂O₂로 처리하여 endogenous peroxidase 활성을 제거하였다. Fibronectin 염색을 위해 단일 클론 mouse anti-fibronectin antibody를 1:100으로 희석하여 상온에서 하룻밤 동안 incubation시켰다. 세척 후 biotinylated link anti-mouse and anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)로 30분간 처리하여 세척하고 streptavidin-HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)로 30분간 처리하였다. Diaminobenzidine 을 처리하고 세척한 후 표본을 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

6. 통계 분석

모든 결과는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 11.0판 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 결과들은 Analysis of variance (ANOVA) 검정 또는 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 분석하였으며, ANOVA 검정상 의미있는 차이는 Student's t-test로, Kruskal-Wallis 검정상 의미있는 차이는 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. p값이 0.05 미만인 경우 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 동물 자료

모든 군에서 실험 기간 중 체중 증가를 보였다. 당뇨군에서의 체중 증가는 대조군에 비해 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, pioglitazone 투여 당뇨군에서는 대조군이나 당뇨군에 비해 의미있게 체중이 증가하였다 ($p<0.05$). 쥐를 희생시킬 때 신장의 무게를 측정하였으며, 체중 당 신장의 무게는 당뇨군에서 대조군에 비해 높은 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았고, pioglitazone 투여 당뇨군에서는 대조군이나 당뇨군에 비해 의미있게 감소된 것으로 나타났다 ($p<0.05$). 복부 피하지방의 무게를 측정한 결과, 대조군이나 당뇨군에 비해 pioglitazone 투여 당뇨군에서 체중 당 피하지방의 무게 비가 유의하게 높았다 ($p<0.05$) (Table 2).

생후 40주에 측정한 혈압은 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 높았으며 (DM vs. control, 119 ± 7 vs. 108 ± 9 mmHg, $p<0.05$), pioglitazone 투여는 혈압에는 영향을 미치지 않았다 (DM vs. DM+Pi, 119 ± 7 vs. 118 ± 6 mmHg, $p>0.05$). 혈당은 생후 30주에 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 높았고,

Table 2. Body Weight, Kidney Weight, and Subcutaneous Fat Weight at 40 Weeks of Age*

	Control (N=16)	DM (N=9)	DM + Pio (N=9)
Body weight (g)	492±13	546±17 [†]	722±28 ^{†, †}
Weight gain (%)	40.1	46.7	86.5 ^{†, †}
Kidney weight (g)	1.3±0.1	1.5±0.1	1.7±0.1 ^{†, †}
Kidney weight/body weight (mg/g)	2.7±0.3	2.7±0.1	2.4±0.1 ^{†, †}
Subcutaneous fat (g)	14.1±0.8	20.2±2.1 [†]	39.0±4.4 ^{†, †}
Subcutaneous fat/body weight (%)	2.9±0.2	3.8±0.3	5.3±0.5 ^{†, †}

*Data are expressed as mean±SEM, [†]p<0.05 vs. control, [‡]p<0.05 vs. DM

Table 3. Basic Characteristics in Control, DM, and DM + Pio Rat Groups*

	Control (N=16)		DM (N=9)		DM + Pio (N=9)	
Age (weeks)	30	40	30	40	30	40
Weight (g)	351±13	492±13	372±12 [†]	546±17 [†]	387±14 [†]	722±28 ^{†, †}
MBP (mmHg)	111±10	108±9	116±10 [†]	119±7 [†]	117±8	118±6 [‡]
Glucose (mg/dL)	100±7	96±2	153±8 [†]	162±5 [†]	143±16 [†]	114±3 [‡]
sCr (mg/dL)	0.4±0.01	0.5±0.05	0.4±0.01	0.5±0.06	0.5±0.02	0.6±0.03
Cholesterol (mg/dL)	73±7	77±3	80±4	84±4	88±11	90±4
Triglyceride (mg/dL)	69±21	76±8	90±25 [†]	152±27 [†]	94±13 [†]	115±12 ^{†, †}
uPro/Cr (mg/mg)	1.1±0.2	0.9±0.9	4.2±0.7 [†]	9.8±1.1 [†]	4.1±0.6 [†]	7.0±1.7 ^{†, †}

Abbreviations : MBP, mean blood pressure; sCr, serum creatinine; uPro/Cr, 24-hour urine protein/creatinine

*Data are expressed as mean±SEM, [†]p<0.05 vs. control, [‡]p<0.05 vs. DM

pioglitazone을 10주간 투여한 후 의미있게 감소하였다 (DM vs. DM+Pio, 162±5 vs. 114±3 mg/dL, p<0.05). 혈청 크레아티닌 및 총콜레스테롤은 세 군에서 차이가 없었으나, 중성지방의 경우 당뇨군에서 대조군에 비해 높은 농도를 보였고, pioglitazone 투여로 유의하게 감소한 것을 알 수 있었다 (DM vs. DM+Pio, 152±27 vs. 115±12 mg/dL, p<0.05).

생후 30주에 24시간 요단백 배설은 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 많았고 (DM vs. control, 4.2±0.7 vs. 1.1±0.2 mg/mg, p<0.05), pioglitazone을 10주간 투여한 결과 의미있게 감소하였다 (DM vs. DM+Pio, 9.8±1.1 vs. 7.0±1.7 mg/mg, p<0.05) (Table 3).

모든 쥐들은 회생시키기 전에 경구 내당뇨검사를 시행하였는데, 당뇨군에서는 당부하 후 30분, 60분, 90분에서 모두 200 mg/dL를 초과한 반면, pioglitazone 투여 당뇨군에서는 당부하 30분 후에 198.1±7.6 mg/dL로 증가하였다가 60분부터는 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 1).

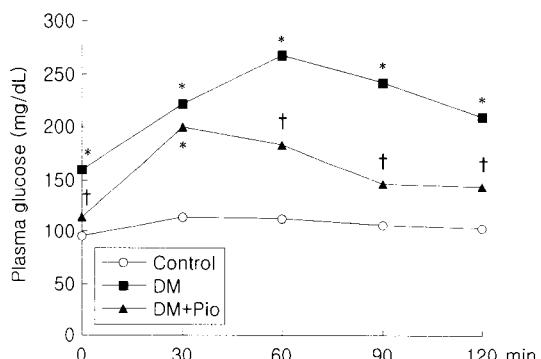


Fig. 1. Results of oral glucose tolerance test performed at 40 weeks of age. *p<0.05 vs. control, †p<0.05 vs. DM.

2. 형태학적 분석

각 군에서 PAS 염색을 시행한 결과, 당뇨군에서는 대조군에 비해 사구체 크기의 증가, 메산지움의 결절성 확장 소견과 더불어 사구체 기저막의 비후 소견이 관찰되었으나, pioglitazone 투여 당뇨군에서는 이러한

변화가 현저히 감소된 것을 알 수 있었다. 사구체 경화의 중증도는 대조군에서 SI 0.01 ± 0.01 , 당뇨군에서 SI 1.87 ± 0.22 , pioglitazone 투여군에서 SI 0.53 ± 0.51 로 pioglitazone 투여군에서 의미있게 감소하였다. 또한 사구체의 부피는 당뇨군 ($1.4 \pm 0.3, \times 10^6 \mu\text{m}^3$)에서 대조군 ($0.8 \pm 0.2, \times 10^6 \mu\text{m}^3$)에 비해 유의하게 증가되었으며 ($p < 0.05$), pioglitazone으로 치료한 당뇨군 ($1.1 \pm 0.2, \times 10^6 \mu\text{m}^3$)에서는 당뇨군에 비해 사구체의 비후가 유의하게 억제되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

3. PPAR- γ 촉진제가 사구체 TGF- β 1 단백과 mRNA의 발현에 미치는 영향

40주에 추출한 사구체 내 TGF- β 1 단백의 발현은 당뇨군에서 대조군에 비해 약 2.8배 증가되었으며

($p < 0.05$), 10주간 PPAR- γ 촉진제인 pioglitazone을 투여한 OLETF 쥐에서는 TGF- β 1 단백의 발현이 대조군의 1.3배로 치료를 하지 않은 당뇨군에 비해 80.6% 억제되었다 ($p < 0.05$). 또한 TGF- β 1 mRNA의 발현도 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 증가되어 있었고 ($p < 0.05$), pioglitazone 치료 당뇨군에서는 치료하지 않은 당뇨군에 비해 TGF- β 1 mRNA의 발현이 78.4% 억제되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

4. PPAR- γ 촉진제가 사구체 fibronectin 단백과 mRNA의 발현에 미치는 영향

사구체 내 fibronectin 단백의 발현 역시 당뇨군에서 대조군에 비해 약 2.4배 증가되어 있었으며 ($p < 0.05$), pioglitazone을 투여한 당뇨군에서는 치료를 하

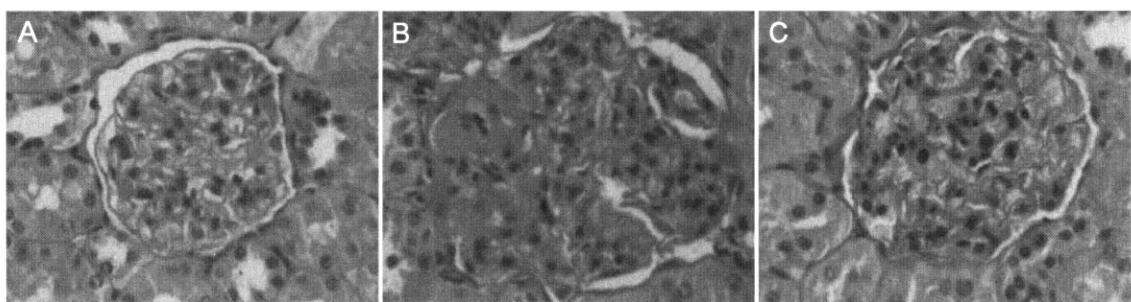


Fig. 2. Light microscopic findings of glomeruli in control (A), DM (B), and DM + Pio (C) rats at 40 weeks of age (PAS staining, $\times 400$). In DM group, glomerular hypertrophy, mesangial expansion, nodular sclerosis, and glomerular basement membrane thickening were observed. But in DM + Pio group, these changes were attenuated.

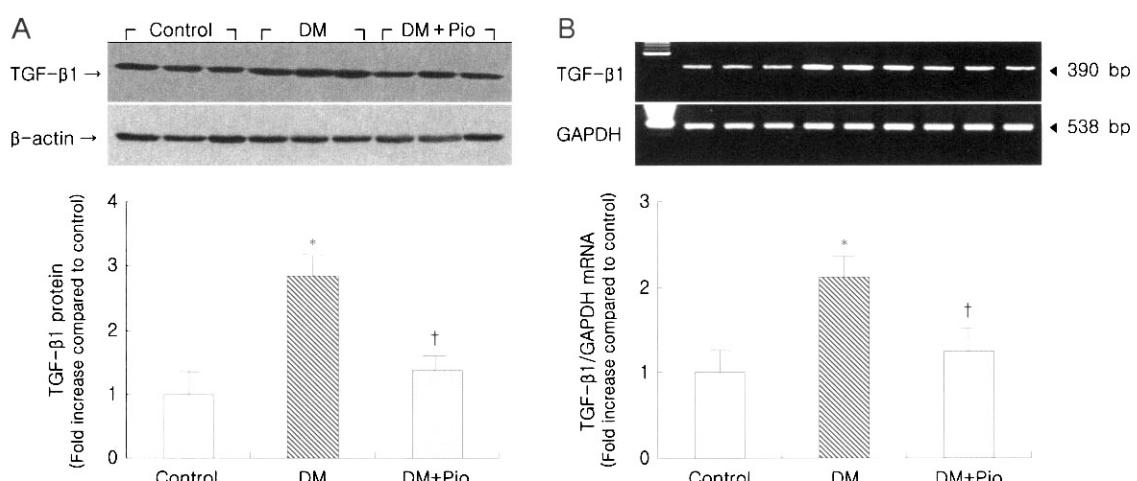


Fig. 3. Glomerular TGF- β 1 protein (A) and mRNA (B) expression in control, DM, and DM + Pio rats.
* $p < 0.05$ vs. control, † $p < 0.05$ vs. DM.

지 않은 당뇨군에 비해 fibronectin 단백의 발현이 93.1% 억제되어 ($p<0.05$) 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 또한 fibronectin mRNA의 발현도 당뇨군에서 대조군에 비해 약 2.4배로 의미있게 증가되어 있었고 ($p<0.05$), pioglitazone 치료 당뇨군에서는 치료하지 않은 당뇨군에 비해 fibronectin mRNA의 발현이 98.6% 억제되었다 ($p<0.05$) (Fig. 4).

5. 대조군, 당뇨군, PPAR- γ 촉진제 투여 당뇨군에서 fibronectin에 대한 면역조직화학염색

각 군에서 fibronectin에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과, 당뇨군에서 대조군에 비해 사구체 내 fibronectin 단백의 발현이 유의하게 증가되어 있었으

며, pioglitazone 치료군에서는 당뇨군에 비해 의미있게 감소된 소견을 보였다 (Fig. 5).

고 칠

당뇨병성 신증은 당뇨병의 심각한 합병증 중 하나로 전세계적으로 투석이나 이식이 필요한 말기 신부전의 주요 원인이 되어 왔다. 당뇨병성 신증은 임상적으로는 단백뇨 및 신부전의 양상으로 나타나고, 병리적으로는 사구체의 비후, 사구체 기저막의 비후, 세포의 기질의 축적 등의 특징적인 소견을 보이는데, 이러한 임상과 병리 소견이 최근 소개된 당뇨 약제인 thiazolidinediones (TZDs)에 의해 예방되거나 호전

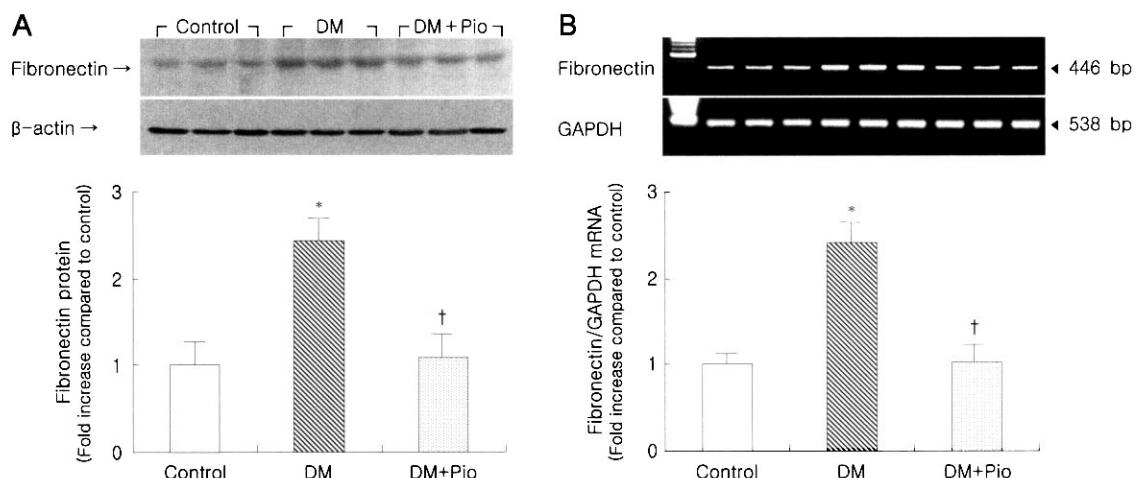


Fig. 4. Glomerular fibronectin protein (A) and mRNA (B) expression in control, DM, and DM+Pio rats. * $p<0.05$ vs. control, † $p<0.05$ vs. DM.

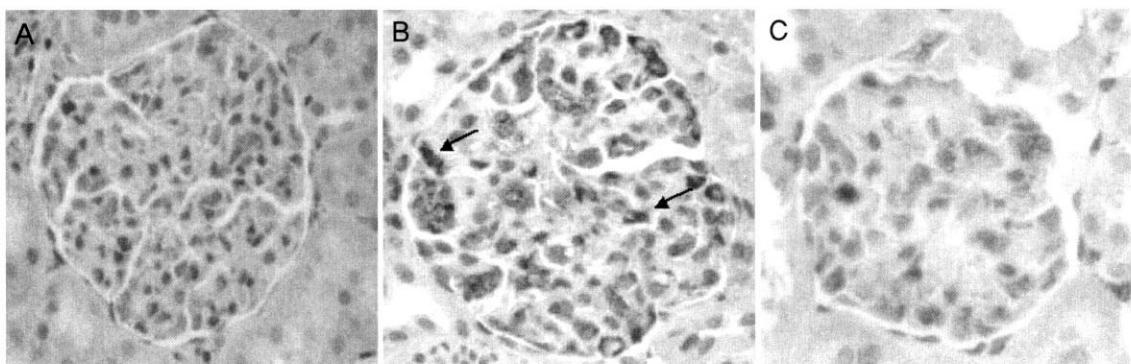


Fig. 5. Immunohistochemical staining of glomeruli for fibronectin in control (A), DM (B), and DM+Pio (C) rats at 40 weeks of age ($\times 400$). Expression of fibronectin protein (arrows) in DM glomeruli was increased compared to that of control and this increment was ameliorated by pioglitazone treatment.

되는 것이 보고되고 있다^{3, 4)}.

PPAR- γ 는 TZDs의 표적이 되는 핵수용체로 리간드와 결합하여 특이 유전자의 전사를 조절함으로써 작용을 나타낸다. PPAR- γ 는 생체 내에서 다양한 기능을 하는데, 인슐린 저항성을 호전시키는 것 외에 세포의 분화 및 증식, 세포주기의 조절, 염증 반응, 세포의 기질의 생성 등에 관여하는 것으로 보고되고 있다^{2, 12-16)}.

기존의 연구들에서와 마찬가지로 본 연구에서도 pioglitazone을 투여한 당뇨군에서 치료를 하지 않은 당뇨군에 비해 급식시 혈당이 유의하게 낮았고, 경구 당부하검사상 내당능이 현저히 개선된 것을 알 수 있었다. 또한 pioglitazone은 혈압이나 혈청 크레아티닌, 총콜레스테롤에는 영향을 미치지 않았으나, 중성지방과 소변으로의 단백 배출을 의미있게 감소시키는 것을 알 수 있었다. Uriu 등은 생후 40주의 OLETF 쥐에서 총콜레스테롤과 중성지방 모두 LETO 쥐에 비해 높은 것을 관찰한 바 있어⁶⁾ 이번 실험의 결과는 이전의 보고들과는 다소 차이를 보였다.

Pioglitazone을 투여한 당뇨군은 대조군이나 치료하지 않은 당뇨군에 비해 유의하게 체중이 증가하였는데, PPAR- γ 촉진제가 체중 증가를 유발하는 것에 대해서는 지방 생성 (adipogenesis)의 유발¹⁷⁾, leptin의 감소^{18, 19)}, 수분 저류^{20, 21)} 등이 기전으로 제시되고 있으며, Kelly 등은 PPAR- γ 촉진제가 복강 내 지방 무게는 감소시켰지만 전신 지방이나 체중에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다²²⁾. 본 연구에서도 수분 저류 및 부종의 가능성을 배제할 수는 없으나, 피하지방의 무게를 측정한 결과 PPAR- γ 촉진제를 투여한 군에서 체중에 대한 피하지방의 무게 비율이 유의하게 높은 것으로 보아 복부 지방은 감소되고 피하지방은 증가되는 지방 조직의 재분포가 이뤄진 것이 체중 증가에 기여하였다고 생각할 수 있었다.

메산지움의 확장과 사구체 기저막의 비후는 당뇨병 성 신증의 가장 뚜렷한 초기 병변이다²³⁾. 광범위한 메산지움의 변화는 당뇨병성 신증의 후기 변화인 사구체경화의 주요 기여 인자로 여겨지고 있다²⁴⁾. OLETF 쥐에서는 메산지움의 확장 및 국소성 분절성 경화, 사구체 기저막의 비후 등 당뇨병성 신증의 전형적인 소견이 모두 나타나는 것으로 보고되었고⁵⁾, 본 연구에서도 40주된 OLETF 쥐에서 사구체의 비후, 메산지움의 결절성 확장, 사구체 기저막의 비후, 사구체경화

등 당뇨병성 신증의 특징적인 소견들을 관찰할 수 있었다. 그러나 pioglitazone을 10주간 투여한 OLETF 쥐에서는 이러한 신장의 변화가 현저하게 감소되어, pioglitazone이 당뇨병성 신증의 형태학적 변화를 지연시키거나 호전시키는 것을 확인하였다.

TGF- β 1은 당뇨병성 신증에서 신장의 비후와 메산지움의 확장에 있어 마지막 단계의 공통 매개체로 알려져 있고, fibronectin은 세포 외 기질의 생성을 반영하는데²⁵⁾, 이 두 물질 모두 고농도의 포도당 하 메산지움 배양 세포에서 합성이 증가하는 것으로 보고되어 있다²⁶⁾. 이 중 fibronectin은 단백뇨가 현저한 경우에 증가되는 경우가 많으나, TGF- β 1의 경우는 당뇨병성 신증의 초기 단계에서도 증가하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 최근에 Zheng 등은 메산지움 배양 세포를 이용한 실험에서 PPAR- γ 촉진제가 TGF- β 1의 발현뿐 아니라 그 작용도 억제하였다고 보고하였고²⁸⁾, Ma 등은 5/6 신장 적출술을 시행한 백서와 같은 비당뇨성 사구체경화 모델에서도 PPAR- γ 촉진제가 신장 보호 역할을 한다고 보고하여²⁹⁾, 신장 질환에 있어서 PPAR- γ 의 역할은 점차 중요한 문제로 대두되고 있다. 본 실험에서도 당뇨군에서 대조군에 비해 신장 내 TGF- β 1과 fibronectin 단백 및 mRNA의 발현이 증가되었으며 pioglitazone 투여로 유의하게 감소되었던 것으로 보아 pioglitazone 투여로 인한 TGF- β 1 발현 억제에 의해 당뇨병성 신증의 진행이 지연되었을 것으로 생각된다.

그러나 본 연구에는 몇 가지의 한계점이 있는데, 우선 pioglitazone을 투여한 당뇨군에서 TGF- β 1과 fibronectin의 발현이 억제되는 것이 PPAR- γ 에 의한 직접적인 작용인지를 입증하는 데에는 부족함이 있다. 본 실험에서 pioglitazone을 투여한 군의 혈당 및 단백뇨가 의미있게 감소하였으므로, 이러한 혈당 및 단백뇨의 호전이 TGF- β 1과 fibronectin의 발현에 영향을 미쳤을 가능성은 배제할 수 없다.

TZDs가 신장을 보호하는 기전에 대해서는 여러 가지 의견이 제시되고 있다. 1998년에 Buckingham 등은 TZDs가 fibronectin에 대한 단백 분해능의 감소로 유발된 섬유아세포의 부착과 이동성 항진을 개선시키고^{30, 31)}, 고지혈증을 호전시키거나³²⁻³⁴⁾, 또는 PPAR- γ 의 직접적인 작용에 의해 신장이 보호된다고 주장하였다⁴⁾. 이들 중 특히 PPAR- γ 의 직접 작용에 의해 신장이 보호된다는 것을 뒷받침하는 몇 가

지 보고들이 있는데, Routh 등은 배양된 메산지움 세포에서 troglitazone이 고농도의 포도당에 의해 증가된 제 1형 콜라겐의 분비를 억제하는 것을 발견하였고, PPAR- γ 의 길항제인 bisphenol A diglycidyl ether (BADGE)를 투여하였을 때에는 감소하지 않는 것으로 보아 PPAR- γ 에 의한 직접 작용임을 주장하였고³⁵⁾, 이 외에도 일부민뇨증을 동반한 제 2형 당뇨환자에서 troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone 등의 TZDs를 sulfonylurea, metformin, voglibose 등 다른 당뇨 약제와 비교하여 실험한 결과 혈당 조절의 정도는 비슷했던 반면, PPAR- γ 리간드를 투여한 군에서 일부민 배설이 더욱 감소한 것으로 보아 PPAR- γ 리간드가 대사 또는 혈역동학적 변화와 상관없이 직접적으로 사구체에 영향을 미치는 것으로 생각된다는 보고들도 있다³⁶⁻³⁸⁾.

Isshiki 등은 TZDs가 diacylglycerol (DAG)-protein kinase C (PKC)-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 경로를 억제함으로써 사구체 기능부전을 호전시킨다고 보고하였으나³⁹⁾, Wilmer 등은 15d-PGJ₂가 메산지움 세포에서 ERK 활성을 항진시키고, 이것이 사구체경화에 중요한 역할을 하기는 하지만 이 과정이 PPAR- γ 를 통해 일어나는 것은 아니라고 하였다⁴⁰⁾. 그밖에도 메산지움 세포의 비분화 (dedifferentiation) 억제⁷⁾, 세포주기의 조절⁴¹⁾ 등의 기전들도 제시되고 있다.

최근에 Haffner 등은 rosiglitazone이 제 2형 당뇨환자들의 혈청에서 C reactive protein (CRP)과 matrix metalloproteinase (MMP)-9의 농도를 감소시킨다고 보고하였는데⁴²⁾, CRP는 제 2형 당뇨병에서 미세 알부민뇨 및 혈관 질환과 관련이 있다고 알려져 있고⁴³⁾, MMP-9은 신장의 발생에 중요한 효소인 동시에 다양한 사구체 질환에서 그 발현이 변화되는 것으로 보고되어⁴⁴⁻⁴⁷⁾, 이러한 물질들의 감소가 신장 질환의 진행 억제에도 영향을 미칠 것으로 생각된다.

본 연구에서는 OLETF 쥐에서 TGF- β 1과 fibronectin의 신장 내 발현이 증가함과 동시에, PPAR- γ 촉진제가 이러한 증가를 억제한다는 것을 확인하였다. 앞서 언급한 여러 보고들에서도 알 수 있듯이, PPAR- γ 촉진제는 인슐린 저항성을 개선시켜 혈당을 조절하는 효과 외에도 여러 기전으로 당뇨병성 신증의 발생 및 진행을 억제하는 것으로 생각되나, 본 연구에서는 당뇨군에서 pioglitazone을 복용한 군과 같이 혈당

조절을 하지 못하였기 때문에 혈당 조절에 의한 신장 보호 작용 가능성을 배제할 수 없다는 한계가 있다.

또한 pioglitazone이 직접적으로 TGF- β 1과 fibronectin의 발현을 감소시킬 수 있다고 하더라고 본 연구에서 그 기전에 대해서는 확인할 수 없었는데, 이에 대해 Guo 등은 쥐의 메산지움 세포를 이용하여 pioglitazone이 activator protein-1의 활성화를 억제하여 TGF- β 1에 의한 fibronectin의 발현을 억제한다고 보고하였고⁴⁸⁾, Maeda 등은 사람의 메산지움 세포를 배양하여 실험한 결과 pioglitazone이 TGF- β 1에 의해 증가된 fibronectin 및 extradomain (ED)A+ fibronectin의 발현을 용량 의존적으로 억제한다고 보고한 바 있다⁴⁹⁾. 그러나 이 두 보고는 당뇨병성 신증 모델이 아닌 TGF- β 1을 외부에서 투여하여 실험한 연구이고, Routh 등의 보고³⁵⁾와 같은 세포배양 실험들의 경우도 고농도의 포도당 배지를 이용한 실험으로, 이렇듯 배양세포를 이용한 실험은 제 2형 당뇨병과 동반된 대사증후군의 조건을 만족시킬 수가 없다는 제한점이 있어 앞으로 이 분야에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각한다.

요약하면, 제 2형 당뇨 모델인 OLETF 쥐에서 TGF- β 1과 fibronectin의 발현이 증가하는 것을 PPAR- γ 촉진제가 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. 이러한 결과들로부터 PPAR- γ 가 당뇨병성 신증의 발생 및 진행에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다⁵⁰⁾.

= Abstract =

The Effect of Pioglitazone on the Expression of Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 and Fibronectin in Diabetic Nephropathy

Soo Young Yoon, M.D., Zhong Gao Xu, M.D.*
Dong Ryeol Ryu, M.D.*
Shin Wook Kang, M.D.*
Ho Yung Lee, M.D.* and Dae Suk Han, M.D.*

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kwandong University, Goyang,
Department of Internal Medicine*, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ is a member of the nuclear receptor superfamily. PPAR- γ plays an important role

in numerous cellular processes including adipogenesis, insulin sensitivity, cell cycle progression, cell differentiation, inflammation, and extracellular matrix production. This study investigated the effect of a PPAR- γ agonist on the progression of diabetic nephropathy in OLETF rats.

Methods : 30 week-old male OLETF rats were treated for 10 weeks as follows: diabetic control (DM), no treatment: pioglitazone therapy (DM+Pio). LETO rats were used as non-diabetic control (control). Body weight, blood pressure, blood sugar, creatinine, total cholesterol, triglyceride, and urinary protein excretion were measured. Histological analysis was taken with light microscope. Glomerular protein and mRNA expression of transforming growth factor (TGF)- β 1 and fibronectin were estimated by Western blot and RT-PCR. Kidney sections were stained for fibronectin by immunohistochemistry.

Results : Serum glucose, triglyceride and urinary protein excretion were decreased in DM+Pio rats compared to DM rats ($p<0.05$). PAS staining showed glomerular hypertrophy, mesangial expansion, nodular sclerosis, and glomerular basement membrane thickening in glomeruli of DM rats, but these changes were attenuated in glomeruli of pioglitazone-treated rats. Treatment with pioglitazone resulted in a significant decrease in TGF- β 1 protein and mRNA expression in diabetic glomeruli (80.6% and 78.4%, respectively). Glomerular expression of fibronectin protein and mRNA were also decreased in pioglitazone treatment group compared with DM group (93.1% and 98.6%, respectively). Immunohistochemical staining for fibronectin showed similar results.

Conclusion : Increased TGF- β 1 and fibronectin mRNA and protein expressions in diabetic rat glomeruli were significantly ameliorated by pioglitazone treatment. These data suggest that activation of PPAR- γ may play an important role in prevention and treatment of diabetic nephropathy. (Korean J Nephrol 2006;25(3):353-364)

Key Words : Diabetic nephropathy, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, Transforming growth factor- β 1, Fibronectin, OLETF rat

참 고 문 헌

- 1) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839, 1995
- 2) Asano T, Wakisaka M, Yoshinari M, Iino K, Sonoki K, Iwase M, Fujishima M: Peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) expresses in rat mesangial cells and PPAR γ agonists modulate its differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1497:148-154, 2000
- 3) Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR, Hsueh WA: Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in mesangial cells. *Hypertension* 37:722-727, 2001
- 4) Buckingham RE, Al-Barazanji KA, Toseland CD, Slaughter M, Connor SC, West A, Bond B, Turner NC, Clapham JC: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes* 47:1326-1334, 1998
- 5) Fukuzawa Y, Watanabe Y, Inaguma D, Hotta N: Evaluation of glomerular lesion and abnormal urinary findings in OLETF rats resulting from a long-term diabetic state. *J Lab Clin Med* 128: 568-578, 1996
- 6) Uriu K, Kaizu K, Qie YL, Kai K, Ito A, Ikeda M, Hashimoto O, Sun XF, Morita E, Eto S: Renal hemodynamics in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat, a model rat of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus with obesity. *J Lab Clin Med* 134:483-491, 1999
- 7) Sugimoto K, Tsuruoka S, Fujimura A: Effect of enalapril on diabetic nephropathy in OLETF rats: the role of an anti-oxidative action in its protective properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 826-830, 2001
- 8) Yoshida Y, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Kobayashi M, Ichimaru Y, Shimazoe T, Watanabe S, Funakoshi A, Miyasak K: A peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist influenced daily profile of energy expenditure in genetically obese diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 88:279-284, 2002
- 9) Kim SK, Zhao ZS, Lee YJ, Lee KE, Kang SM, Choi D, Lim SK, Chung N, Lee HC, Cha BS: Left-ventricular diastolic dysfunction may be prevented by chronic treatment with PPAR-alpha or -gamma agonists in a type 2 diabetic animal model. *Diabetes Metab Res Rev* 19:487-493, 2003
- 10) Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J: Activation of NF- κ B in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria. Role of angiotensin II and endothe-

- lin-1. *Hypertension* **37**:1171-1178, 2001
- 11) Hannken T, Schroeder R, Stahl RAK, Wolf G: Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. *Kidney Int* **54**:1923-1933, 1998
- 12) Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B: Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **273**:25573-25580, 1998
- 13) Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**:82-86, 1998
- 14) Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM: PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* **7**:48-52, 2001
- 15) Altok S, Xu M, Spiegelman BM: PPAR γ induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev* **11**:1987-1998, 1997
- 16) Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE: Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**:22435-22441, 2000
- 17) Parulkar AA, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA: Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Ann Intern Med* **134**:61-71, 2001
- 18) Kallen CB, Lazar MA: Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:5793-5796, 1996
- 19) De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J: Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Clin Invest* **98**:1004-1009, 1996
- 20) Yoshimoto T, Naruse M, Nishikawa M, Naruse K, Tanabe A, Seki T, Imaki T, Demura R, Akikawa E, Demura H: Antihypertensive and vascular- and renoprotective effects of pioglitazone in genetically obese diabetic rats. *Am J Physiol* **272**:E989-996, 1997
- 21) Gorson DM: Significant weight gain with rezzulin therapy. *Arch Intern Med* **159**:99, 1999
- 22) Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME: Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **22**:288-293, 1999
- 23) Adler S: Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* **5**:1165-1172, 1994
- 24) Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* **74**:1143-1155, 1984
- 25) Hong CY, Chia KS: Markers of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* **12**:43-60, 1998
- 26) Oh JH, Ha H, Yu MR, Lee HB: Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor- β 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int* **54**:1872-1878, 1998
- 27) Fagerudd JA, Groop PH, Honkanen E, Teppo AM, Gronhagen-Riska C: Urinary excretion of TGF- β 1, PDGF-BB and fibronectin in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Kidney Int* **63**(Suppl):S195-S197, 1997
- 28) Zheng F, Formoni A, Elliot SJ, Guan Y, Breyer MD, Striker LJ, Striker GE: Upregulation of type I collagen by TGF- β in mesangial cells is blocked by PPAR γ activation. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**:F639-648, 2002
- 29) Ma IJ, Marcantoni C, Linton MF, Fazio S, Foggo AB: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats. *Kidney Int* **59**:1899-1910, 2001
- 30) Paczek L, Teschner M, Schaefer RM, Heidland A: Intraglomerular fibronectin accumulation and degradation in obese Zucker rats. *Diabetologia* **34**:786-789, 1991
- 31) Gauss-Muller V, Kleinman HK, Martin GR, Schiffmann E: Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. *J Lab Clin Med* **96**:1071-1080, 1980
- 32) Kamanna VS, Kirschenbaum MA: Association between very-low-density lipoprotein and glomerular injury in obese Zucker rats. *Am J Nephrol* **13**:53-58, 1993
- 33) Fried LF, Orchard TJ, Kasiske BL: Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int* **59**:260-269, 2001
- 34) O'Donnell MP, Kasiske BL, Kim Y, Schmitz PG, Keane WF: Lovastatin retards the progression of established glomerular disease in obese Zucker

- rats. *Am J Kidney Dis* 22:83-89, 1993
- 35) Routh RE, Johnson JH, McCarthy KJ : Troglitazone suppresses the secretion of type I collagen by mesangial cells in vitro. *Kidney Int* 61:1365-1376, 2002
- 36) Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Hori M : Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 21:2135-2139, 1998
- 37) Wolffenbuttel BH, Gomis R, Squatrito S, Jones NP, Patwardhan RN : Addition of low-dose rosiglitazone to sulphonylurea therapy improves glycaemic control in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 17:40-47, 2000
- 38) Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Hayashi K, Ebihara I, Koide H : Comparative effects of pioglitazone, glibenclamide, and voglibose on urinary endothelin-1 and albumin excretion in diabetes patients. *J Diabetes Complications* 14: 250-254, 2000
- 39) Isshiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R : Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 49:1022-1032, 2000
- 40) Wilmer WA, Dixon C, Lu L, Hilbelink T, Rovin BH : A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPAR γ . *Biochem Biophys Res Commun* 281:57-62, 2001
- 41) Wakino S, Kintscher U, Kim S, Jackson S, Yin F, Nagpal S, Chandraratna RA, Hsueh WA, Law RE : Retinoids inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells by modulating cell cycle regulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:746-751, 2001
- 42) Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI : Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106:679-684, 2002
- 43) Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM : Inflammation and microalbuminuria in nondiabetic and type 2 diabetic subjects : The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Kidney Int* 58:1703-1710, 2000
- 44) Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM : Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med* 193:793-802, 2000
- 45) Lelongt B, Ronco P : Role of matrix metalloproteinases in kidney development and glomerulopathy : lessons from transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 17(Suppl 9):S28-S31, 2002
- 46) McMillan JI, Riordan JW, Couser WG, Pollock AS, Lovett DH : Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *J Clin Invest* 97:1094-1101, 1996
- 47) Martin J, Eynstone L, Davies M, Steadman R : Induction of metalloproteinases by glomerular mesangial cells stimulated by proteins of the extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 12:88-96, 2001
- 48) Guo B, Koya D, Isono M, Sugimoto T, Kashiwagi A, Haneda M : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta 1-induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells. *Diabetes* 53:200-208, 2004
- 49) Maeda A, Horikoshi S, Gohda T, Tsuge T, Maeda K, Tomino Y : Pioglitazone attenuates TGF-beta(1)-induction of fibronectin synthesis and its splicing variant in human mesangial cells via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma. *Cell Biol Int* 29:422-428, 2005
- 50) Guan Y : Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 15:2801-2815, 2004