

Lithospermate B 가 당뇨 백서
사구체에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과
최 훈 영

Lithospermate B 가 당뇨 백서 사구체에 미치는 영향

지도 한 대 석 교수

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과
최 훈 영

최훈영의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 사랑으로 이끌어 주신 은사 한대석 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 실험의 모든 것을 계획하시고 시작부터 끝까지 같이 고민하시며 문제점을 지적하여 주신 강신욱 교수님과 허종호 선생님께 감사드립니다. 실험의 기반을 제공하여 주신 이현철 교수님과 차봉수 교수님, 긴 기간동안 너그럽고도 자상한 지도를 아끼지 않으신 김덕희, 정현주 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

실험을 진행하는 데 있어 많은 힘이 되어주신 신장내과 교수님들과 동료들, 그리고 이수현, 정동섭, 김진주, 곽승재 선생님에게도 감사드립니다.

항상 저를 위해 걱정해주시는 부모님과 동생, 그리고 늘 부족한 며느리를 너그럽게 이해해 주시는 시부모님께 깊은 사랑과 감사를 드리며 모든 것을 이해해주고 늘 힘이 되어주고 있는 사랑하는 남편과 더할 수 없는 기쁨을 안겨 주는 지인, 진표에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 동물	7
가. 약물 투여	7
나. 신장 적출 및 사구체 분리	8
2. RT-PCR 분석	8
가. 총 RNA 추출	9
나. 역전사 (reverse transcription, RT)	9
다. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction)	10
3. 단백 추출 및 Western blot 분석	12
4. 면역조직화학염색 (immunohistochemical staining)	14
5. 통계 및 분석	15
III. 결과	16
1. 동물 자료	16
2. LAB가 사구체 TGF- β 1 mRNA와 단백질의 발현에 미치는 영향	17
3. LAB가 사구체 fibronectin mRNA의 발현에 미치는 영향	18
4. 대조군, 당뇨군, LAB 투여 당뇨군에서 TGF- β 1과 fibronectin에 대한 면역조직화학염색	22
IV. 고찰	25
V. 결론	32
참고문헌	34
영문요약	45

그림 차례

Figure 1. Glomerular TGF- β 1 mRNA expression in control, DM, and DM+ LAB rats assessed by RT-PCR.....	19
Figure 2. Glomerular TGF- β 1 protein expression in control, DM, and DM+ LAB rats assessed by Western blot.....	20
Figure 3. Glomerular fibronectin mRNA expression in control, DM, and DM+ LAB rats assessed by RT-PCR.....	21
Figure 4. Immunohistochemical staining for TGF- β 1 in control, DM, and DM+ LAB glomeruli after 12 weeks	23
Figure 5. Immunohistochemical staining for fibronectin in control, DM, and DM+ LAB glomeruli after 12 weeks.....	24

표 차례

Table 1. Primers of rat TGF- β 1, fibronectin, and GAPDH.....	12
Table 2. Glucose, body weight, kidney weight/body weight, and 24hr-urinary protein excretion after 12 weeks	17

국문요약

Lithospermate B가 당뇨 백서 사구체에 미치는 영향

당뇨병성 신병증은 전세계적으로 말기 신부전증의 원인 질환 중 가장 많은 빈도를 차지하고 있으며, 이의 발생 및 진행 기전은 수많은 노력에도 불구하고 아직 명확히 정립되어 있지 않다. 대규모의 임상 연구들을 통해 고혈당뿐만 아니라 전신적인 고혈압 역시 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 되어 있으나, 혈당을 엄격하게 조절하고 안지오텐신 전환효소 (angiotensin-converting enzyme) 억제제나 안지오텐신 II 수용체 길항제와 같은 항 고혈압제를 사용하여 혈압을 철저히 조절함에도 불구하고 당뇨병성 신병증은 점차 증가하고 있는 추세이다. 따라서, 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행에 관한 치료 방법에 대한 새로운 시각이 요구 되고 있는 실정이다.

Magnesium lithospermate B (LAB)는 당뇨병성 합병증의 치료에 쓰여 온 민간 약제인 *Salvia miltiorrhizae Radix*에서 새롭게 추출해낸 합성제로서 신 절제로 유발된 신부전 백서에서 신기능 및 형태학적 소견의 호전 효과를 나타내며, 활성 산소족 생성을 감소시키는 것으로 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 LAB 투여가

당뇨병성 신병증에서 신비대 및 요단백 배설 등에 미치는 영향에 대해 조사함과 동시에 당뇨병성 신병증의 중요 매개인자인 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)과 세포외 기질의 주요 성분인 fibronectin의 사구체내 발현에 미치는 영향을 알아보고자 streptozotocin (STZ)으로 당뇨가 유발된 백서에서 LAB를 12주간 투여한 후 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체중 당 신장 무게는 당뇨군에 비해 LAB 투여 당뇨군에서 유의하게 적었으며 ($1.79 \pm 0.11\%$ vs. $1.14 \pm 0.06\%$, $p < 0.05$), 24시간 요단백 배설량도 LAB 투여로 유의있게 감소되었다 (90.6 ± 11.3 mg/day vs. 31.6 ± 5.1 mg/day, $p < 0.05$).
2. 사구체내 TGF- β 1 mRNA와 단백 발현은 대조군에 비해 당뇨군에서 각각 190%와 140% 증가되었으며 ($p < 0.05$), LAB 투여로 당뇨 사구체내 TGF- β 1 mRNA와 단백 발현 증가가 각각 89%와 73% 억제되었다 ($p < 0.05$).
3. Fibronectin mRNA 발현은 대조군에 비해 당뇨군에서 180% 증가되었으며 ($p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 사구체내 fibronectin mRNA의 발현 증가가 61% 억제되었다.

4. 면역조직화학 염색을 시행한 결과, 당뇨군에서 대조군에 비해 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin 단백질 발현이 유의하게 증가되어 있었으며 (2.1 ± 0.3 vs. 0.7 ± 0.1 ; 2.3 ± 0.2 vs. 0.8 ± 0.1 , $p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 TGF- β 1과 fibronectin 단백질 발현의 증가가 유의있게 감소된 소견을 보였다.

이상의 결과로, STZ로 당뇨가 유발된 백서에서 관찰되는 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin mRNA와 단백질 발현 증가가 LAB 투여로 유의하게 억제됨을 확인하였다. 따라서 LAB가 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행 예방에 유용한 약제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 당뇨병성 신병증, lithospermate B, transforming growth factor- β 1, fibronectin

Lithospermate B가 당뇨 백서 사구체에 미치는 영향

<지도교수 한 대 석>

연세대학교 대학원 의학과

최 훈 영

I. 서 론

당뇨병성 신병증은 말기 신부전증의 원인 질환 중 가장 많은 빈도를 차지하고 있으며, 이의 발생 및 진행 기전은 수많은 노력에도 불구하고 아직 명확히 정립되어 있지 않다. 기존의 보고들에 의하면 당뇨병성 신병증은 병리학적으로 신 비대, 기저막 비후, 사구체내 점진적 세포의 기질 축적 등이 특징적인 소견으로 알려져 있는데^{1, 2}, 초기에는 주로 사구체와 세뇨관의 비후로 인한 신 비대가 주요한 구조적 변화로 나타나고, 진행된 당뇨병성 신병증에서는 전반적인 사구체경화가 동반되면서 때로는 사구체경화의 결절성 형태가 나타나기도 한다고 알려지고 있으나^{2, 3}, 그 확실한 기전은 아직 밝혀져 있지 않은 실정이다.

대부분의 당뇨병 환자는 진단 당시 이미 신장 크기의 증가를 동반하는데 이는 사구체와 세뇨관의 비후가 주요한 요인이며, 사구체의 비후는 주로 메산지움의 팽창에 의해 나타나게 된다^{1, 2}. 이러한 신 비대와 메산지움의 팽창, 그리고 세포외 기질 축적에는 고혈당뿐만 아니라 사구체내 고혈압이 관여하는 것으로 되어 있으며, 중요한 매개 인자로는 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)과 안지오텐신 II가 널리 알려져 있다⁴⁻⁹. 이러한 이유에서 당뇨병성 신병증의 예방 및 치료로 철저한 고혈당 조절과 함께 안지오텐신 전환 효소 억제제 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, 이하 ACEi)나 안지오텐신 II 수용체 차단제를 이용한 고혈압 치료가 근간을 이루게 되었다. 그러나 정상 수준의 혈당과 혈압에도 불구하고 당뇨병성 신병증은 점차 증가되고 있는 추세이다¹⁰⁻¹⁵. 따라서 당뇨병성 신병증의 예방 및 치료에 대한 새로운 대책이 요구되고 있는 실정이다.

Magnesium lithospermate B (이하 LAB)는 당뇨병성 합병증의 치료에 사용되어 온 민간 약제인 *Salvia miltiorrhizae Radix*로부터 새롭게 추출한 물질로서 신기능 호전의 효과를 나타내며, 활성 산소족 생성을 감소시키는 것으로 보고되고 있다¹⁶⁻²¹. Yokozawa 등은 LAB를 백서에 투여한 결과 신혈류량이 증가하고 소변내 prostaglandin E2의 배설과 kallikrein 활성도가 증가하는 등

신장의 혈액순환이 개선되었다고 보고하였으며¹⁶, 신부전 동물 모델에서는 LAB에 의해 혈압이 의미있게 감소되었다고 하였다¹⁷.

Lee 등은 streptozotocin (STZ)으로 당뇨가 유발된 백서에 당뇨 유발 8주 후부터 LAB를 경구로 8주간 투여한 결과 비당뇨병 대조군에 비해 신장내 malondialdehyde (MDA) 농도, 미세알부민뇨, 그리고 사구체 비대 및 메산지움 팽창이 감소되었으며, 신장조직 내 TGF- β 1, fibronectin 및 collagen 단백질의 발현 증가가 억제되었다고 보고하였다. 또한 메산지움 세포에서 고농도 포도당으로 유도된 세포내 활성 산소종 생성과 protein kinase C (PKC)의 활성이 LAB에 의해 억제되는 결과를 보여 당뇨병성 신병증의 새로운 치료 약제로서의 가능성을 제시하였다¹⁸. 그러나 Lee 등은 신장 전체를 이용한 연구를 하였으며, TGF- β 1과 fibronectin mRNA의 발현 변화에 대한 실험을 시행하지 않았다. 최근까지도 LAB가 당뇨병에 의한 사구체 병변에 미치는 영향을 따로 분석한 보고는 없는 실정이다.

이에 본 연구자는 LAB가 당뇨병성 신병증, 특히 사구체 병변의 발생에 미치는 영향을 알아보기로 당뇨 유발과 동시에 LAB를 투여하였으며, LAB에 의한 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin mRNA와 단백질의 발현 변화를 중심으로 LAB의 효과를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

가. 약물 투여

모든 동물 실험은 승인된 기안서에 따라 시행되었다. 실험 동물로는 무게 200-250 g의 웅성 Sprague-Dawley 백서 18마리를 당뇨군 12마리와 비당뇨 대조군 (control) 6마리로 나누어 사용하였다. 당뇨군은 다시 2군으로 나누어 6마리는 표준 식이를 투여하였고 (DM군), 나머지 6마리는 표준 식이를 투여하면서 경관으로 LAB를 10 mg/kg/day 용량으로 12주간 투여하였다 (DM+ LAB군).

당뇨는 STZ 65 mg/kg를 백서 복강 내에 주사하여 유발시켰으며, 대조군은 같은 부피의 위약을 투여하였다. 당뇨 유발은 STZ 투여 72시간 후 commercial enzymatic test strip을 이용한 glucometer로 혈당을 측정하여 확인하였다. 모든 백서는 자동 온도 조절 시설에서 사육되었으며, 실험 기간 동안 물과 표준 실험 식이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 모든 백서는 당뇨 유발 12주 후에 희생시켰으며, 희생시키기 직전에 체중, 혈당, 그리고

24시간 요단백 배설량을 측정하였다. 혈당은 glucometer로 측정하였으며, 24시간 요단백 배설량은 Bio-Rad Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용한 Bradford 방법으로 측정하였다.

나. 신장 적출 및 사구체 분리

백서를 thiopental sodium 50 mg/kg 마취 하에 단두한 후 신장을 적출하여 무게를 측정하였다. 형태학적 검사를 위하여 일부 신장 조직은 10% neutral-buffered formalin으로 고정한 후 표준적 방법으로 처리하고 5 μ m 절편으로 잘랐다. 사구체는 sieve를 이용하여 분리하였다. 적출된 신장을 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 후 가위로 피질만을 분리하여 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 완충용액에 옮긴 다음, 체공이 200, 150 및 75 μ m인 stainless sieve에 차례로 통과시켜 75 μ m 소공에 걸린 사구체를 실험에 이용하였다.

2. RT-PCR 분석

가. 총 RNA 추출

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

나. 역전사 (reverse transcription, RT)

RNA 1 μ g, 8 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L dNTP, 25U RNase inhibitor, 40U AMV reverse transcriptase, 10 μ mol/L의 random hexamer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 함유한 20 μ L 반응 용액으로부터 Eppendorf Mastercycler

gradient (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA)를 이용하여 first-strand c-DNA를 합성하였다. 총 20 μ L의 반응 혼합물을 30°C에서 10분, 그리고 42°C에서 60분간 incubation 한 후 99°C에서 5분간 가열하여 효소를 비활성화시켰다. 역전사가 끝난 검체는 PCR 전까지 -70°C에 보관하였다.

다. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

백서의 GAPDH, TGF- β 1 및 fibronectin에 대한 primer를 설계한 후 invitrogenTM Life Technologies사 (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 μ L 반응 혼합물을 이용하여 시행하였으며, TGF- β 1의 경우 Taq-Gold DNA polymerase 2.5U와 sense 및 antisense primer 각각 30 pmol/L 외 다른 조성은 동일하게 함유한 반응 혼합물을 사용하였다. PCR은 95°C에서 3분간 가열한 후 94°C에서 30초, annealing 온도인 62°C에서 30초, 그리고 72°C에서 1분간 36 cycles 시행하였으며, 이후 72°C에서 7분간 더 반응시켰다.

mRNA의 발현은 역전사 효율의 차이를 보정하기 위해 모든 검체의 PCR 산물의 optical density (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 시행하였다. House keeping 유전자인 GAPDH는 다른 시험관에서 동시에 시행하였다. PCR이 끝난 후 개개의 증폭된 PCR 산물 중 30 μ L를 취하여 0.05 μ g/mL의 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel 에서 전기영동하였다. PCR 산물의 O.D.는 TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 측정하였으며, GAPDH의 O.D.로 보정하였다.

Table 1. Primers of rat TGF- β 1, fibronectin, and GAPDH

Sequence (5' → 3')	
TGF-β1	
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

3. 단백질 추출 및 Western blot 분석

200 μ L의 lysis buffer (50 mM Tris-HCL pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/mL leupeptin)를 이용하여 세포 균질액을 만들고 4°C에서 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 분석에

이용하였다. Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., 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 전기영동한 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)로 1시간 동안 처리한 후, 1:1000으로 희석한 TGF- β 1과 fibronectin에 대한 일차 항체 (다중 클론 rabbit anti-TGF- β 1 항체와 단일 클론 mouse anti-fibronectin 항체; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 다음, 세척하고 이차 항체를 이용하여 반응시켰다. 세척을 반복한 후 발현은 enhanced chemiluminescence 시약 (ECL; Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 가시화하였으며, densitometer로 O.D.를 측정하였다.

4. 면역조직화학염색 (immunohistochemical staining)

5 μm 신장 조직 절편의 파라핀을 제거한 후 에탄올로 적시고 세척하였다. Black and Decker vegetable steamer를 이용하여 10 mM/L sodium citrate buffer에서 20분간 antigen retrieval을 시행한 후 3% H_2O_2 로 처리하여 endogenous peroxide 활성을 제거하였다. TGF- β 1과 fibronectin 염색을 위해 각각 다중 클론 rabbit anti-TGF- β 1 항체와 단일 클론 mouse anti-fibronectin 항체를 1:100으로 희석하여 상온에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 세척 후 biotinylated linked anti-rabbit and anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 30분간 처리한 다음 세척하고 streptoavidin-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 30분간 처리하였다. Diaminobenzidine으로 처리하고 세척한 후 표본을 hematoxylin으로 대조염색하였다. 절편 내 혈관극 (vascular pole)이 포함된 사구체 30개에서 TGF- β 1과 fibronectin의 면역조직화학 염색 정도는 0~+ 4까지의 점수로 반정량화하였다.

5. 통계 및 분석

모든 결과는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램 SPSS 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 Students' t-test로, Kruskal-Wallis 검정상 의미있는 차이는 Mann-Whitney U-test로 확인하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에 의미있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 동물 자료

모든 군에서 실험 12주 후 체중 증가를 보였으나, 대조군에 비해 당뇨군과 LAB 투여 당뇨군에서 통계적으로 유의하게 체중이 적었다 ($p < 0.01$). 실험 12주 후 백서를 희생시킬 때 신장의 무게를 측정하였으며, 체중 당 신장 무게는 대조군에 비해 당뇨군과 LAB 투여 당뇨군에서 유의있게 높았으며, LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 유의하게 낮았다 ($p < 0.01$) (Table 2).

12주 후 평균 혈당은 대조군에서 104.0 ± 8.5 mg/dL로 당뇨군과 LAB 투여 당뇨군에 비해 의미있게 낮았으며 (각각 438.4 ± 7.1 와 420 ± 9.4 mg/dL, $p < 0.01$), 24시간 요단백 배설량은 대조군에 비해 당뇨군에서 유의하게 증가되어 있었고, LAB 투여 당뇨군에서 당뇨군에 비해 요단백 배설량이 유의있게 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Glucose, body weight, kidney weight/body weight, and 24hr-urinary protein excretion after 12 weeks

	Control	DM	DM + LAB
Glucose (mg/dL)	104.0 ± 8.5	438.4 ± 7.1*	420.0 ± 9.4*
Body weight (g)	546.7 ± 8.8	247.6 ± 7.9*	261.6 ± 5.5*†
Kidney/body weight (×10 ⁻²)	0.58 ± 0.03	1.79 ± 0.11*	1.14 ± 0.06*†
Proteinuria (mg/day)	19.8 ± 3.2	90.6 ± 11.3*	31.6 ± 5.1*†

¹ Data are expressed as mean ± SEM.

* p<0.01 vs. Control

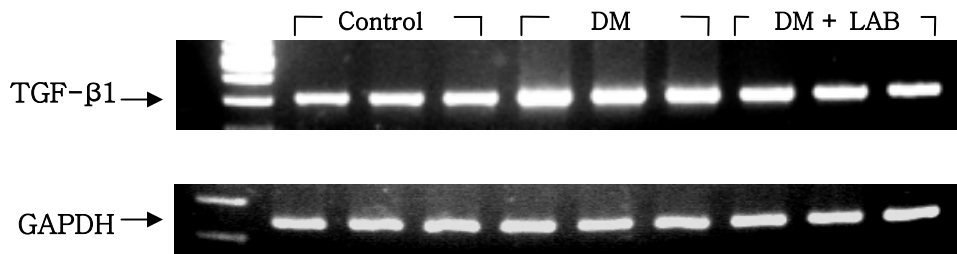
† p<0.05 vs. DM

2. LAB가 사구체 TGF-β1 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향

당뇨 유발 12주 후 추출한 사구체내 TGF-β1 mRNA의 발현은 당뇨군에서 대조군에 비해 1.9배 증가되었으며 (p<0.05), 당뇨 유발 직후부터 12주간 LAB를 투여한 군에서의 TGF-β1 mRNA 발현은 당뇨군에 비해 73% 억제되었다 (p<0.05) (Figure 1). TGF-β1 단백질의 발현도 대조군에 비해 당뇨군에서 1.4배 증가되었으며 (p<0.05), LAB 투여로 TGF-β1 단백질 발현의 증가가 89% 억제되었다 (p<0.05) (Figure 2).

3. LAB가 사구체 fibronectin mRNA의 발현에 미치는 영향

Fibronectin mRNA의 발현은 당뇨군에서 대조군에 비해 1.8배 증가되었으며 ($p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군의 fibronectin mRNA 발현은 당뇨군에 비해 61% 억제되었다 ($p < 0.05$) (Figure 3).



오류!

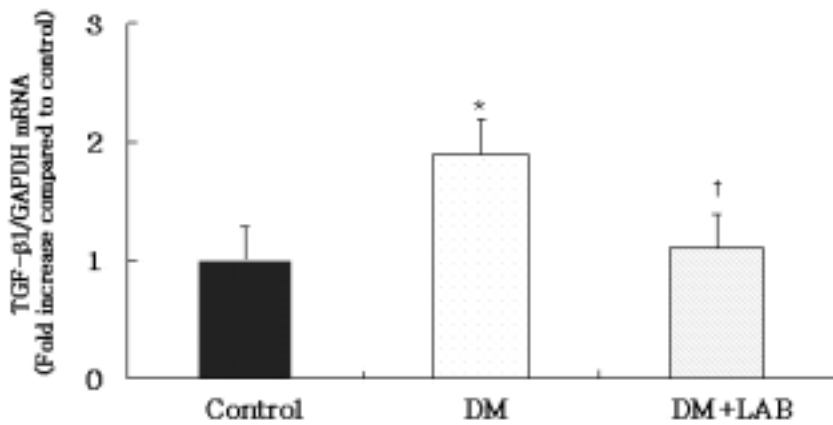


Figure 1. Glomerular TGF-β1 mRNA expression in control, DM, and DM+ LAB rats assessed by RT-PCR

* p<0.05 vs. Control

† p<0.05 vs. DM

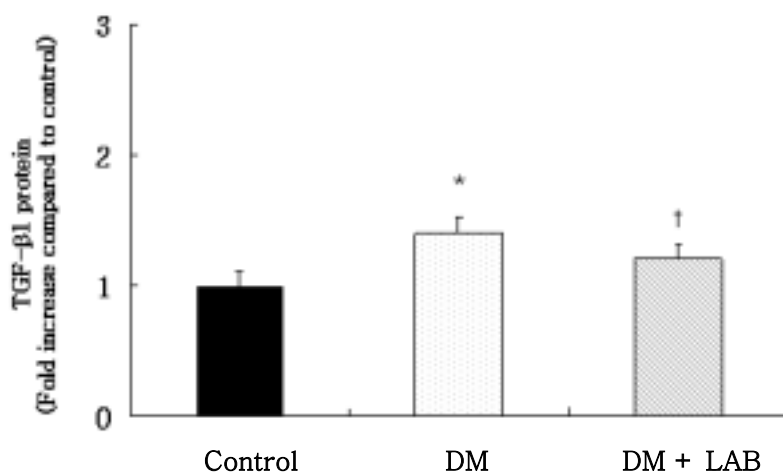
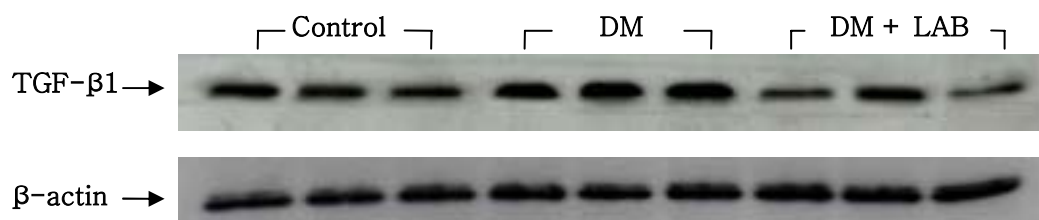


Figure 2. Glomerular TGF- β 1 protein expression in control, DM, and DM+LAB rats assessed by Western blot

* $p < 0.05$ vs. Control

† $p < 0.05$ vs. DM

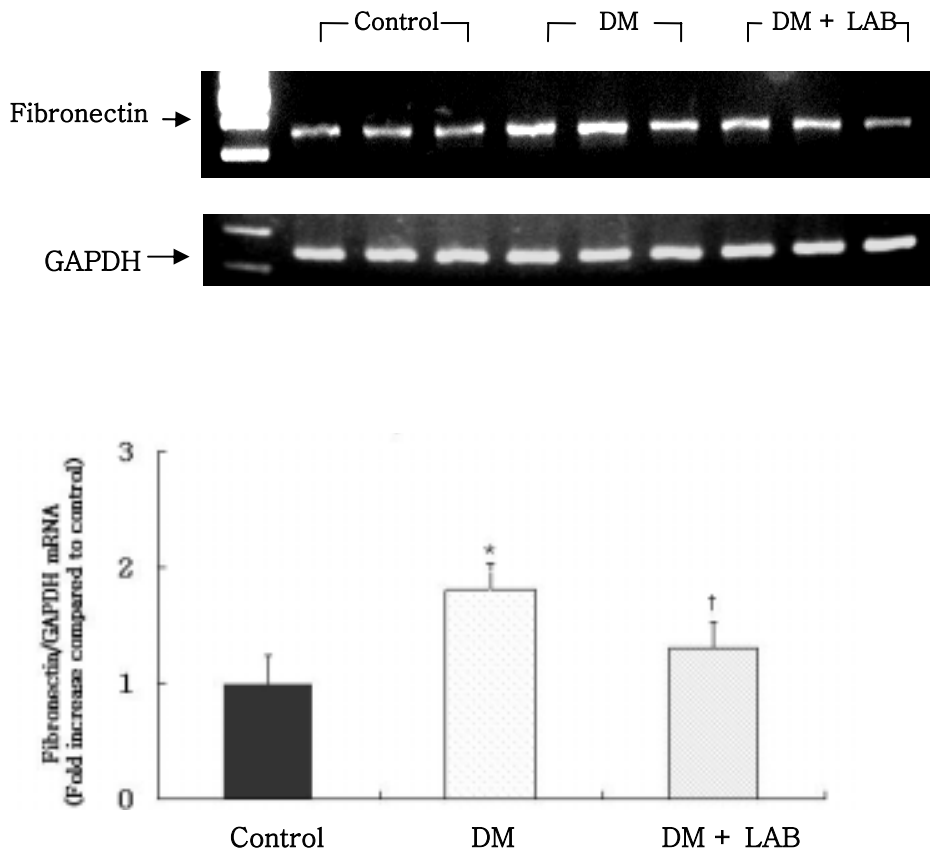


Figure 3. Glomerular fibronectin mRNA expression in control, DM, and DM+ LAB rats assessed by RT-PCR

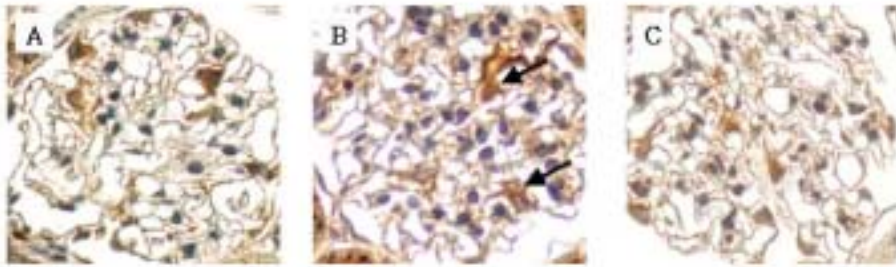
* p<0.05 vs. Control

† p<0.05 vs. DM

4. 대조군, 당뇨군, LAB 투여 당뇨군에서 TGF- β 1과 fibronectin에 대한 면역조직화학염색

각 군에서 TGF- β 1에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 결과, 당뇨군에서 대조군에 비해 사구체내 TGF- β 1 단백질 발현이 유의하게 증가되어 있었으며, LAB 투여 당뇨군에서는 투여하지 않은 당뇨군에 비해 유의있게 감소된 소견을 보였다 (Figure 4). TGF- β 1에 대한 면역조직화학 염색의 정도를 0~+4까지의 점수로 반정량화하였을 때, 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 높았으며 (2.1 ± 0.3 vs. 0.7 ± 0.1 , $p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 의미있게 점수가 낮았다 (1.1 ± 0.2 , $p < 0.05$).

Fibronectin에 대한 면역조직화학 염색 결과 역시 대조군에 비해 당뇨군에서 사구체내 fibronectin 단백질 발현이 의미있게 증가되어 있었으며, LAB 투여 당뇨군에서 당뇨군에 비해 유의하게 감소되었다 (Figure 5). 면역조직화학 염색의 정도를 0~+4까지 반정량적 점수로 점수화하였을 때, 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 높았으며 (2.3 ± 0.2 vs. 0.8 ± 0.1 , $p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 의미있게 점수가 낮았다 (1.0 ± 0.1 , $p < 0.05$).



D

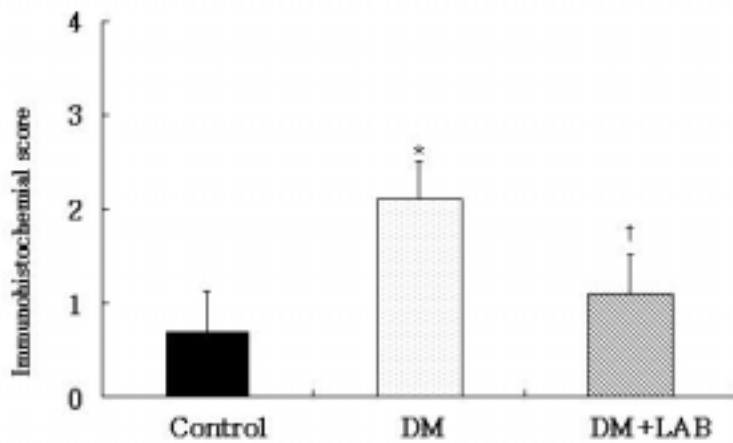
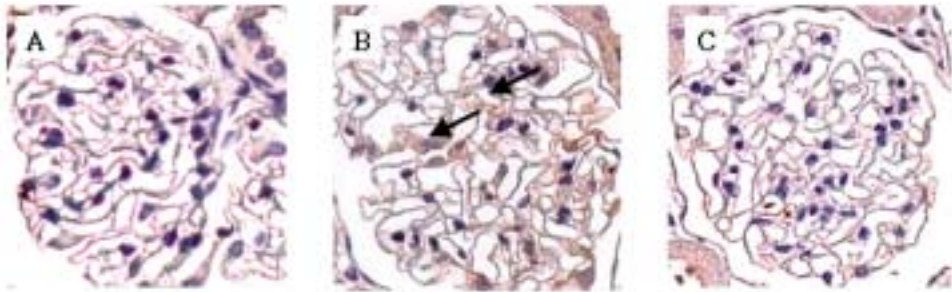


Figure 4. Immunohistochemical staining for TGF- β 1 in control (A), DM (B), and DM+LAB (C) glomeruli after 12 weeks. Expression of TGF- β 1 protein (arrows) in DM glomeruli was increased compared to that of control and this increment was ameliorated by LAB treatment. Semiquantitative immunohistochemical score of control, DM and DM+LAB glomeruli (D)

* $p < 0.05$ vs. Control

† $p < 0.05$ vs. DM



D

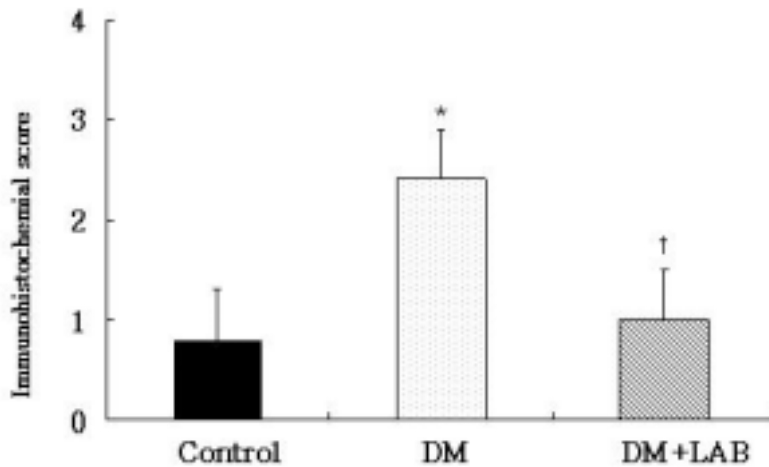


Figure 5. Immunohistochemical staining for fibronectin in control (A), DM (B), and DM+LAB (C) glomeruli after 12 weeks. Expression of fibronectin protein (arrows) in DM glomeruli was increased compared to that of control and this increment was ameliorated by LAB treatment.

Semiquantitative immunohistochemical score of control, DM and DM+LAB glomeruli (D)

* $p < 0.05$ vs. Control

[†] p<0.05 vs. DM

IV. 고찰

당뇨병의 중요한 합병증 중 하나인 당뇨병성 신병증은 말기 신부전증의 가장 많은 원인으로 전 세계적으로 투석 치료가 필요한 환자의 약 40%를 차지하는 것으로 보고되고 있다²². 당뇨병성 신병증의 병인을 밝히고 병태생리적 기전뿐만 아니라 분자생물학적인 기전까지 알아내고자 하는 수많은 연구가 있어 왔으며, 임상적으로도 대규모의 연구들이 활발히 이루어지고 있고, 새로운 치료법을 제시하고자 하는 많은 연구들이 진행 중이다.

당뇨병성 신병증의 발생 및 진행에 있어 사구체 경화와 세뇨관-간질 섬유화의 중요성이 대두되면서 세포외 기질의 생성 증가 또는 분해 감소의 기전을 규명하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 당뇨병성 신병증과 연관된 이러한 병태생리학적 변화를 매개하는 것으로 알려진 여러 인자 중 가장 중요한 인자가 TGF- β 1이다. TGF- β 1의 활성화는 고혈당²³⁻²⁵, 단백질의 nonenzymatic glycation 증가^{26, 27}, diacylglycerol 생성 및 PKC의 활성화 증가²⁸, 안지오텐신 II^{29, 30}, 그리고 thromboxane³¹ 등에 의해 활성화되는 것으로 보고되고 있다. 이렇게 활성화된 TGF- β 1은 세포외 기질을 구성하는 성분 중 type I collagen, type IV collagen, fibronectin,

그리고 laminin 등의 mRNA와 단백질 발현을 증가시키며³², 기질을 분해하는 각종 효소 중 plasminogen activator, collagenase, 그리고 stromelysin 등의 생성은 억제하고, 기질 분해효소 억제제인 plasminogen activator inhibitor를 활성화시켜 세포외 기질의 축적을 촉진한다³³. TGF- β 1은 세포외 기질 수용체인 integrin의 발현을 조절하여 특히 기질 단백질과의 작용을 강화시키기도 하며³⁴, 강력한 화학주성 성질을 보유하고 있어 섬유모세포의 작용을 증강시키는 역할을 하기도 한다³⁵. 당뇨병성 신병증에서 이와 같은 TGF- β 1의 역할을 증명한 연구들을 보면, 고농도 포도당이 함유된 배지로 배양한 메산지움 세포와 근위세뇨관 세포에서 TGF- β 1의 발현이 정상 포도당이 함유된 배지에 비해 증가되었다는 보고가 있으며^{23, 24}, Kolm-Litty 등은 고농도 포도당 배지에서 배양된 메산지움 세포에서 포도당 대사로부터 생성되는 세포내 glucosamine이 TGF- β 1의 발현을 증가시켰다고 보고하였다²⁵. 안지오텐신 II, endothelin, thromboxane과 같은 여러 혈관작용 인자들도 TGF- β 1의 이차적 유도를 통해 당뇨병성 신병증의 병태생리로 알려져 있는 성장 자극과 profibrogenic action에 관여하는 것으로 보고되고 있으며²⁹⁻³¹, 사구체 모세혈관압 상승으로 인한 신장내 혈액학적 변화도 TGF- β 1 생성을 자극한다는 연구 결과들도 있다³⁶.

이외에도 TGF- β 에 대한 중화항체 (neutralizing anti-TGF- β antibody)가 메산지움 세포와 사구체 상피세포에서 각각 고농도 포도당으로 유도된 collagen 합성과 fibronectin 생성을 감소시켰다는 연구 결과들도 있다^{37, 38}. Oh 등은 고농도 포도당 (30 mM)이 fibronectin의 생성에 앞서 매우 초기에 TGF- β 1을 자극할 뿐만 아니라 고농도 포도당으로 유도된 fibronectin 생성이 TGF- β 1에 의해 매개됨을 보고하여 TGF- β 1이 고농도 포도당 조건 하의 메산지움 세포에 의한 세포외 기질 축적을 매개한다는 사실을 증명하였다³⁹. 이러한 연구들을 통해 당뇨병성 신병증에서 TGF- β 1이 매우 중요한 매개 인자임을 알 수 있다.

Fibronectin (; high molecular weight α_2 glycoprotein)은 사구체내 세포외 기질의 내인성 구성 인자로서 주로 간에서 생산되지만 혈관 내피세포와 혈소판으로부터도 생성이 되는 것으로 알려져 있다⁴⁰. Fibronectin은 혈관 내피세포와 적혈구의 부착을 강화시키고 당뇨병 환자에서는 적혈구의 변성과 여과 감소를 일으키는 등 당뇨병성 말초혈관 변성의 병인에도 중요한 역할을 한다. Davies 등은 처음으로 당뇨병 환자에서 혈장 fibronectin 농도가 증가되었다고 보고하였으며⁴¹, Ozata 등은 혈장 fibronectin 농도가 당뇨병성 신병증의 지표로 이용될 수 있다는 가능성을 제시하기도 하였다⁴². 당뇨병성 신병증의 경우 사구체내 TGF- β 1의

발현이 초기부터 증가하는 반면에 fibronectin 발현은 주로 현저한 단백뇨가 동반되는 시기에 증가하는 것으로 보고되고 있다.

따라서 TGF- β 1이나 fibronectin과 같은 인자들의 생성을 억제시키는 물질을 사용할 경우 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행이 예방될 수 있을 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되어 왔으며, 그 중에서도 ACEi가 당뇨병성 신병증에서 TGF- β 1이나 fibronectin의 발현을 억제시켰다는 연구가 보고되어 왔다⁴⁴.

Magnesium lithospermate B (LAB)는 전통적으로 당뇨병의 합병증에 사용되어 온 한약제로 알려진 *Salvia miltiorrhizae Radix*로부터 추출한 물질로서 신장에 미치는 영향에 대한 몇몇 연구 결과들이 보고되었다¹⁶⁻²¹. Yokozawa 등은 총 신장 부피의 5/6를 절제한 백서에서 70일 동안 LAB를 경구 투여한 결과 신 절제에 의한 메산지움 증식, 세노관-간질 조직의 병변, 그리고 사구체 경화 등이 호전되었다고 하였다¹⁹. 또한 Yokozawa 등은 총 신장 부피의 2/3를 절제한 백서에서 나타나는 혈중 superoxide dismutase (SOD)와 catalase의 활동성 감소와 hydroxyl radical의 증가가 30일간 LAB를 경구로 투여한 후 거의 정상으로 회복되는 결과를 나타내어 scavenging radical에 의한 신부전증으로의 진행을 예방하는데 LAB가 도움이 될 수 있을 것이라고 하였다²⁰.

Jung 등은 *Salvia miltiorrhizae Radix*로부터 효과적인 추출 방법을 이용해 magnesium lithospermate B를 합성하였으며, LAB가 메산지움 세포에서 aldose reductase 활성도를 억제시킬 뿐만 아니라 fibronectin 축적도 용량 의존적으로 억제시키는 효과가 있었다고 보고함으로써 당뇨병성 신병증에서 새로운 치료 약제로서의 가능성을 제시하였다²¹. 본 연구에서도 in vivo 실험을 통해 당뇨 사구체에 비해 LAB를 투여한 당뇨 백서 사구체에서 fibronectin mRNA의 발현과 단백 축적이 의미있게 억제되었음을 확인하였다.

Lee 등은 STZ 투여로 당뇨가 유발된 백서에서 LAB를 당뇨 유발 8주 후부터 8주간 투여한 결과 신조직내 TGF- β 1과 fibronectin 단백질의 발현이 의미있게 감소되었다고 보고하였다¹⁸. 이들은 대조군과 LAB를 투여한 대조군, 당뇨군, 그리고 LAB를 투여한 당뇨군 등 4군으로 나누어 여러 항목을 비교하였는데, 대조군과 LAB를 투여한 대조군에 비해 당뇨군과 LAB를 투여한 당뇨군에서 혈당, 체중 당 신장 무게, 사구체 부피, 그리고 24시간 요알부민 배설량이 의미있게 증가되었으며, LAB를 투여한 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 체중 당 신장 무게와 24시간 요알부민 배설량이 의미있게 감소되었다. 또한 TGF- β 1, fibronectin, 그리고 collagen에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과 당뇨군의 신장

피질내 사구체와 세뇨관-간질에 증가되었던 TGF- β 1, fibronectin, 그리고 collagen의 단백 발현이 LAB 투여로 억제되었으며, TGF- β 1과 fibronectin의 변화는 ELISA와 Western 분석을 통해 재확인되었다. 본 연구에서도 Lee 등의 보고에서와 같이 LAB 투여 당뇨군에서 당뇨군에 비해 체중 당 신장 무게와 요단백 배설량이 유의하게 감소된 결과를 나타내었다. Lee 등의 연구에서는 신장 피질 전체를 이용한 반면 본 연구에서는 사구체만 분리하여 실험에 이용하였는데, Western 분석 결과 TGF- β 1 단백 발현이 대조군에 비해 당뇨군에서 의미있게 증가되었으며, 이러한 증가가 LAB 투여로 유의하게 억제되어 LAB가 신장 피질의 주요 구조인 신세뇨관뿐만 아니라 사구체내 TGF- β 1 단백질 발현 증가도 억제시킴을 알 수 있었다. 본 연구에서는 TGF- β 1과 fibronectin 단백질 발현 증가가 mRNA 수준에서의 변화에 기인한 것인 지를 증명하기 위해 RT-PCR을 시행하였는데, 대조군에 비해 당뇨군에서 TGF- β 1과 fibronectin mRNA 발현이 증가되었으며, 이러한 발현 증가가 LAB 투여로 유의하게 억제된 결과를 보여 LAB의 효과가 mRNA 수준에서 나타남을 처음으로 증명하였다.

LAB가 당뇨 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin의 발현 증가를 억제시키는 기전에 대해서는 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않으나, 메산지움 세포에서 LAB가 활성 산소종 생성과 PKC 활성을 억제한

것으로 미루어 보아 생체내에서도 이와 관련이 있을 것으로 추정되나 향후 이에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

이상으로 본 연구에서는 STZ로 당뇨가 유발된 백서에서 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin의 발현이 증가되었으며, 이러한 발현 증가가 LAB에 의해 억제됨을 확인하였다. 따라서 LAB가 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행 예방에 유용한 약제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 LAB가 당뇨병성 신병증의 중요 매개인자인 TGF- β 1과 세포외 기질의 주요 성분인 fibronectin의 사구체내 mRNA 및 단백 발현에 미치는 영향을 알아보기로 STZ로 당뇨가 유발된 백서에서 LAB를 12주간 투여한 후 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체중 당 신장 무게는 당뇨군에 비해 LAB 투여 당뇨군에서 유의하게 적었으며 ($1.79 \pm 0.11\%$ vs. $1.14 \pm 0.06\%$, $p < 0.01$), 24시간 요단백 배설량도 LAB 투여로 유의있게 감소되었다 (90.6 ± 11.3 mg/day vs. 31.6 ± 5.1 mg/day, $p < 0.01$).
2. 사구체내 TGF- β 1 mRNA와 단백 발현은 대조군에 비해 당뇨군에서 각각 190%와 140% 증가되었으며 ($p < 0.05$), LAB 투여로 당뇨 사구체내 TGF- β 1 mRNA와 단백 발현 증가가 각각 89%와 73% 억제되었다 ($p < 0.05$).
3. Fibronectin mRNA 발현은 대조군에 비해 당뇨군에서 180% 증가되었으며 ($p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 사구체내 fibronectin mRNA의 발현 증가가 61% 억제되었다.

4. 면역조직화학 염색을 시행한 결과, 당뇨군에서 대조군에 비해 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin 단백질 발현이 유의하게 증가되어 있었으며 (2.1 ± 0.3 vs. 0.7 ± 0.1 , 2.3 ± 0.2 vs. 0.8 ± 0.1 , $p < 0.05$), LAB 투여 당뇨군에서는 당뇨군에 비해 유의있게 TGF- β 1과 fibronectin 단백질 발현 증가가 감소된 소견을 보였다.

이상의 결과로, STZ로 당뇨가 유발된 백서에서 관찰되는 사구체내 TGF- β 1과 fibronectin mRNA와 단백질 발현의 증가가 LAB 투여로 억제됨을 확인하였다. 따라서 LAB가 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행 예방에 유용한 약제로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ziyadeh FN. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis 1993;22:736-744.
2. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. Kidney Int 1999;56:393-405.
3. Kimmelstiel P, Wilson C. Inter-capillary lesions in glomeruli of the kidney. Am J Pathol 1936;12:830-97.
4. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. Semin Nephrol 2003;23:532-43.
5. Mogensen CE, Andersen MJ. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. Diabetes 1973;22:706-712.

6. Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med* 1976;51:551-555.
7. Osterby R, Gundersen HJG. Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities. *Diabetologia* 1975;11:225-229.
8. Osterby R. Morphometric studies of the peripheral glomerular basement membrane in early juvenile diabetes. I. Development of initial basement membrane thickening. *Diabetologia* 1972;8:84-92.
9. Ritz E, Stefanski A. Diabetic nephropathy in type II diabetes. *Am J Kidney Dis* 1996;27:167-194.
10. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986.

11. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-853.

12. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;28:103-117.

13. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:1456-1462.

14. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al: RENAAL Study Investigators. Effects of

- losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-869.
15. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB R, et al. Collaborative Study Group: Renoprotective effect of the angiotensin receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:851-860.
 16. Yokozawa T, Oura H, Lee TW, Nonaka G, Nishioka I. Augmentation of renal response by magnesium lithospermate B. *Nephron* 1991;57:78-83.
 17. Yokozawa T, Lee TW, Oura H, Nonaka G, Nishioka I. Effect of magnesium lithospermate B in rats with sodium-induced hypertension and renal failure. *Nephron* 1992;60:460-465.
 18. Lee GT, Ha HJ, Jung MK, Li HR, Hong SW, Cha BS, et al. Delayed treatment with lithospermate B attenuates

- experimental diabetic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 709–720.
19. Yokozawa T, Zhou JJ, Hattori M, Inaba S, Okada T, Oura H et al. Effects of a Dan Shen component, magnesium lithospermate B, in nephrectomized rats. *Jpn J Nephrol* 1995;37:105–111.
20. 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* 1997;75:88–93.
21. Jung M, Lee HC, Ahn CW, Park W, Choi S, Kim H, et al. Effective isolation of magnesium lithospermate B and its inhibition of aldose reductase and fibronectin on mesangial cell line. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2002;50:1135–1136.
22. Kikkawa R, Koya D, Haneda M. Progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2003;41(3 Suppl 1):S19–21.

23. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int* 1992;42:647- 656.
24. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN. Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 1992;41:107-114.
25. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor β 1 production is mediated by the hexoseamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;101:160-169.
26. Ziyadeh FN, Han DC, Cohen JA, Guo J, Cohen MP. Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor-beta system. *Kidney Int* 1998;53:631-638.

27. Yang CW, Vlassara H, Peten EP, He CJ, Striker GE, Striker LJ. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;27;91:9436-9440.
28. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 1997;100:115-126.
29. Wolf G, Mueller E, Stahl RAK, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1993;92:1366-1372.
30. Wolf G, Ziyadeh FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am J Kidney Dis* 1997;29:153-63.

31. Negrete H, Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Role for transforming growth factor β in thromboxane-induced increases in mesangial cell fibronectin synthesis. *Diabetes* 1995;44:335-339.
32. Sharma K, Ziyadeh FN. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 1997;17:80-92.
33. Ziyadeh FN, Sharma K. Role of transforming growth factor- β in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney Int* 1995;51: S7-S11.
34. Heino J, Igotz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 1989;264:380-388.
35. Reibman J, Meixler S, Lee TC, Gold LI, Cronstein BN, Haines KA, et al. Transforming growth factor beta 1, a potent

- chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:6805-6809.
36. Riser BL, Cortes P, Heilig C, Grondin J, Ladson-Wofford S, Patterson D, et al. Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor- β isoforms in cultured rat mesangial cells. Am J Pathol 1996;148:1915-1923.
37. Ziyadeh FN, Sharma K, Erichen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by activation of transforming growth factor- β . J Clin Invest 1994;93: 536-542.
38. van Det NF, Verhagen NAM, Tamsma JT, Berden JHM, Broijn JA, Daha MR, et al. Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor- β by high glucose, not by angiotensin II. Diabetes 46: 834-840, 1997

39. Oh JH, Ha HJ, Yu MR, Lee HB. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor- β 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int* 1998;54: 1872-1878.
40. Hong CY, Chia KS. Markers of diabetic nephropathy. *J Diab Comp* 1998;12:43-60.
41. Davies TME. Plasma fibronectin concentrations in diabetes and the effect of short term, improved glucose control. *Diabetologica* 1981;21:262.
42. Ozata M, Kurt I, Azal O, Bolu E, Corakci A, Beyhan Z et al. Can we use plasma fibronectin levels as a marker for diabetic nephropathy. *Endocrinol J* 1995;42:301-305.
43. Fagerudd JA, Groop PH, Honkanen E, Teppo AM, Gronhagen-Riska C. Urinary excretion of TGF-beta 1, PDGF-BB and fibronectin in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Kidney Int* 1997;63:S195-197.

44. Gross ML, El-Shakmak A, Szabo A, Koch A, Kuhlmann A, Munter K, et al. ACE-inhibitors but not endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2003;46:856-68.

The effect of lithospermate B (LAB) on the expression of
TGF- β 1 and fibronectin in diabetic glomeruli

Hoon Young Choi

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dae-Suk Han)

Background: Lithospermate B (LAB) is an active component isolated from *Salvia miltiorrhizae*, a Chinese herbal medicine traditionally used for the treatment of diabetic complications. Previous study reported that LAB suppressed TGF- β 1 and fibronectin protein expression in diabetic kidney. This study was performed to see whether LAB inhibits TGF- β 1 and fibronectin mRNA as well as protein expression in diabetic glomeruli.

Methods: Eighteen male Sprague-Dawley rats weighing 220-250g were used. Six were injected with diluent (C) and 12 with 65mg/kg streptozotocin (STZ) intraperitoneally. STZ-induced diabetic rats were left untreated (DM, n=6) or were treated with 10mg/kg/day LAB by gavage for 12 weeks (DM+LAB, n=6).

Glomeruli were isolated by sieving technique. RT-PCR, Western blot, and immunohistochemistry were performed.

Results: The ratio of kidney weight to body weight in DM ($1.79 \pm 0.11\%$) was significantly higher than C ($0.58 \pm 0.03\%$) and DM+LAB ($1.14 \pm 0.06\%$). Compared to C, 24-hour urinary protein excretion was significantly higher in the DM (19.8 ± 3.2 mg/day vs. 90.6 ± 11.3 mg/day, $p < 0.05$), and LAB treatment inhibited the increase in proteinuria in DM (31.6 ± 5.1 mg/day, $p < 0.05$). TGF- β 1 mRNA and protein expressions in 12-week DM glomeruli were increased significantly (140%, 190% compared to C, respectively, $p < 0.05$). LAB treatment inhibited the increase in TGF- β 1 mRNA expression by 89%, and TGF- β 1 protein expression by 73% ($p < 0.05$). Fibronectin mRNA expression in DM+LAB glomeruli were also significantly reduced by 61% compared with DM glomeruli (180% compared to C, $p < 0.05$). LAB treatment significantly ameliorated increased glomerular TGF- β 1 and fibronectin protein expression in DM as assessed by immunohistochemistry ($p < 0.05$).

Conclusion: TGF- β 1 and fibronectin mRNA and protein expressions were increased in DM glomeruli and this increment was effectively ameliorated by LAB treatment. Our data suggest that LAB may be used as a new therapeutic agent for the treatment of diabetic nephropathy.

Key Words: diabetic nephropathy, lithospermate B, TGF- β 1, fibronectin