

OLETF 쥐에서  
N-acetylcysteine, Quercetin 및  
Apocynin이  
당뇨병성 신증에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

남 수 민

OLETF 쥐에서  
N-acetylcysteine, Quercetin 및  
Apocynin이  
당뇨병성 신증에 미치는 영향

지도 정춘희 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 7월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

남 수 민

# 남수민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2006년 7월 일

## 감사의 글

항상 아낌없는 관심과 격려를 하시며 논문이 완성될 수 있도록 이끌어 주신 정춘희 교수님과 예병일 교수님, 이은영 교수님께 제일 먼저 감사드리고 싶습니다. 실험하는 동안 동물 실험실과 중앙 연구실을 바삐 돌아다니면서 도와주신 연구원 김경희 선생님과 천안에서 물심양면으로 도와주신 연구원 김정현 선생님에게 고맙다는 말로는 너무나 부족합니다. 또한 동물실험실의 여러 선생님들께도 이 지면을 빌어 감사의 뜻을 전합니다. 예방의학교실의 고상백 교수님과 박준호 선생님, 그리고 제가 실험 및 논문에 열중하는 동안 힘과 용기를 불어 넣어 주었던 내과 의국의 동기, 후배들과 논문을 준비하면서 어려움에 빠졌을 때 의논 해주신 전임의 고장현 선생님과 이미영 선생님께도

진심으로 감사드립니다.

마지막으로 저를 마음 속으로 응원해주는 사랑하는  
가족들에게 감사의 인사를 드립니다.

남수민 씬

## 논문 목차

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 방법	6
가. 기초 자료 수집	6
나. 신 적출	7
다. 신장의 조직병리학적 소견 관찰 및 사구 체 용적 산출	7
라. 50주 24시간 소변에서 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine(8-OHdG) & malondialde- hyde (MDA)의 측정	8

(1) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) -----	8
(2) Malondialdehyde -----	9
마. 신조직에서 VEGF 면역조직화학 검사	10
바. 통계분석 -----	10
<b>III. 결과</b> -----	12
1. 기초 자료의 비교 -----	12
가. 체중의 변화 -----	12
나. 혈당의 변화 -----	13
다. 24시간 소변 단백양의 변화 -----	14
2. 사구체의 병리조직학적 소견 및 용적 산출	15
3. 50주에서 측정된 24시간 소변 8-hydroxy-	

2'-deoxyguanosine (8-OHdG) & malodialdehyde(MDA) -----	17
4. 신조직에서 VEGF 면역조직화학 검사 ---	19
IV. 고찰 -----	21
V. 결론-----	25
참고문헌 -----	26



## 표 목 차

Table 1. Changes of body weight in 5 groups -----	12
Table 2. Changes of blood glucose in 5 groups -----	13
Table 3. Changes of 24-hour urine protein in 5 groups -----	14

## 그림 목 차

Figure 1. Hematoxylin and eosin staining of glomeruli in 5 groups -----	15
Figure 2. Glomerular volume in 5 groups-----	16
Figure 3. Twenty four hours urinary 8-OHdG at 50th wk in 5 groups -----	17
Figure 4. Twenty four hours urinary malondialdehyde(MDA) at 50th wk in 5 groups-----	18
Figure 5. Immunohistochemical staining of VEGF in glomerular area -----	19
Figure 6. Comparison of optical density on VEGF Immunohistochemic- al staining-----	20

## 국문요약

### OLETF 쥐에서

### N-acetylcysteine, Quercetin 및 Apocynin이

### 당뇨병성 신증에 미치는 영향

산화적 스트레스가 당뇨병의 미세혈관 합병증에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 항산화제를 사용함으로써 당뇨병성 합병증을 호전시키기 위한 여러 가지 연구가 진행되었는데 본 연구자들은 N-acetylcysteine(NAC)과 quercetin, apocynin이 당뇨병성 신증에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 본 연구자는 비당뇨 대조군인 LETO 쥐, 약제를 투여하지 않은 당뇨군 OLETF 쥐 및 생후 28주부터 OLETF군에 각각 N-acetylcysteine(NAC), quercetin, apocynin을 투여한 총 5군으로 구분하여 50주까지 사육하면서 15, 25, 35, 50주의 몸무게, 혈당, 24시간 요단백 배설량을 측정하였고, 50주에 신장을 적출하여 신장의 사구체용적과 Vascular endothelial growth factor(VEGF) 면역조직화학검사의 발현 및 50주 24시간 요중 malondialdehyde(MDA) 및 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)를 비교하였다. 기초자료에서 50주의 OLETF 쥐들의 체중이 감소하는 추세를 보였으나 NAC을 투여한

쥐에서는 오히려 증가하였고 DM 군에 비해 의미있게 혈당이 감소하였다. 24시간 요단백은 Apocynin군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며 MDA와 8-OHdG의 값은 NAC, Quercetin, Apocynin 군에서 모두 감소되었다. 면역조직화학을 통한 VEGF의 발현은 DM 군과 NAC군에서 증가, Quercetin군과 Apocynin군에서 감소되어 있었다.

결론적으로, 항산화제의 치료는 OLETF 쥐에서 산화적 스트레스를 감소시키고 이 중 NAC은 혈당을 개선시켰으며 apocynin은 당뇨병성 신증의 진행을 호전시킬 수 있었다. 또한 quercetin과 apocynin은 면역조직화학을 통한 VEGF의 발현을 감소시킬 수 있었다.

---

핵심단어: 당뇨병, 당뇨병성 신증, VEGF, N-acetylcysteine, quercetin, apocynin, OLETF

OLETF 쥐에서  
N-acetylcysteine, Quercetin 및 Apocynin이  
당뇨병성 신증에 미치는 영향

지도교수 정 춘 희

연세대학교 대학원 의학과

남 수 민

I. 서론

당뇨병성 신증은 당뇨병의 미세혈관 합병증의 하나로 고혈당에 의한 대사적인 요소와 혈액동학적 요소의 상호작용에 의해 발생하는 것으로 생각된다<sup>1</sup>. 대사적인 요소로 고혈당은 mesangial cell에서 hydrogen peroxide를, 사구체에서 lipid peroxidation을 증가시켜 산화적 스트레스를 형성하고 세포 내외 단백질의 advanced glycosylation end-products(AGE)를 합성한다<sup>2,3</sup>.

혈액동학적 요소로 renin-angiotensin system과 endothelin을 포함한 혈관활성 호르몬의 경로의 활성화를 가져오며 이는 또한

protein kinase C나 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 등이차적 신호전달의 활성을 통해서도 산화적 스트레스를 일으킨다고 알려져 있다<sup>4,5</sup>. 또한 산화적 스트레스는 NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현을 증가시켜 사구체의 알부민 여과를 증가시키고 세포 외 기질의 축적을 통해 단백뇨, 사구체 경화 및 간질의 섬유화를 유발한다<sup>1</sup>.

따라서 혈당과 혈압의 조절 뿐만 아니라 산화적 스트레스를 줄임으로써 당뇨병성 신증의 진행을 지연시켜보려는 연구들이 진행되었다. N-acetylcysteine과 그 대사물인 cysteine and inorganic sulfite는 세포내의 항산화 역할을 하는 글루타치온(glutathione)의 농도를 증가시키고, 직접적인 자유 라디칼 제거제로서 작용하여<sup>6</sup> 조영제에 의한 신기능저하 및 허혈성 신부전의 회복에 기여한다<sup>7</sup>. Quercetin(3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)은 식물에 많이 들어있는 flavonoids의 일종으로 자유 라디칼 제거제의 역할 및 lipid peroxidation으로부터 세포를 보호하고, 금속 이온을 킬레이트화하여 췌장의 베타세포를 보호한다는 보고가 있었다<sup>8</sup>. NAD(P)H (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase는 활성 산소 생성에 가장 중요한 역할을 하는 효소로 당뇨병성 신증에서 NAD(P)H oxidase의 발현이 증가되어있다<sup>9</sup>. NAD(P)H oxidase의

inhibitor인 apocynin은 당뇨병성 신증의 예방에 도움을 줄 수 있을 가능성이 제기되었다.

이에 본 연구자는 N-Acetylcysteine(NAC), quercetin과 apocynin이 당뇨병성 신증에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에서는 비만형을 동반한 유전성의 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) 수컷 쥐 36마리와 비당뇨 대조군인 LETO(Long-Evans Tokushima Fatty, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) 수컷 쥐 9마리를 이용하였다. 이 쥐들을 생후 5주령부터 키우기 시작하였고 생후 28주부터 다음과 같이 5군으로 나누었다. (1) LETO (n=9), LETO 쥐; (2) DM군 (n=7), 투약하지 않은 OLETF 쥐; (3) NAC군 (n=9), 증류수에 N-acetylcysteine(300 mg/kg/day)을 섞어 투약한 OLETF 쥐; (4) Quercetin군 (n=9), quercetin (15 mg/kg/day)을 위장관 튜브로 투여한 OLETF 쥐; (5) Apocynin군 (n=9), 증류수에 apocynin (16 mg/kg/day)을 섞어 투약한 OLETF 쥐로 나누었다.

### 2. 방법

#### 가. 기초 자료 수집

15, 25, 35, 50 주에 총 4번 체중을 측정하였고 15주, 25주, 28주 이후 2주마다 자가 혈당 측정 기기 (Surestep, Lifescan Inc,



Milford, MA, USA)로 혈당을 측정하였다. 또한 15, 25, 35, 50 주의 총 4회 대사우리에서 24시간 소변을 채취하여 소변 단백을 측정하였다.

#### 나. 신 적출

생후 50주 쯤 모든 OLETF와 LETO 쥐를 ketamine으로 마취하여 희생한 후 복부 절개하여 왼쪽 신장을 clipping한 후 인산 완충 용액으로 신장을 관류시켜 혈액을 제거한 뒤 양측 신장을 적출하여 왼쪽 신장은 형태학적 분석 및 면역조직 염색을 위해 4% paraformaldehyde 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 파라핀에 포매하여 보존하고 오른쪽 신장은 바로 액화질소 용액으로 급속냉동시켜 보존하였다.

#### 다. 신장의 조직병리학적 소견 관찰 및 사구체 용적 산출

파라핀에 포매된 조직을 7 $\mu$ m 두께로 절편을 만들어 hematoxylin and eosin(H& E)염색을 한 후 신장의 조직병리학적 소견을 관찰하였다. Charged coupled device camera(Pulnix, Milford, MA, USA)를 부착시킨 광학현미경 하에서 관찰된 사구체의 화상을 컴퓨터의

모니터로 전송하고 Image analyzer를 이용하여 사구체의 면적을 측정한 다음 평균면적을 이용하여 Weibel과 Gomez의 방법<sup>10</sup>에 의하여 각 쥐의 사구체 용적을 다음의 공식으로 산출하였다.

$$\text{Glomerular volume (V}_G\text{)} = \text{Area}^{1.5} \times 1.38/1.01$$

(1.38: shape coefficient, 1.01: size distribution coefficient)

라. 50주 24시간 소변에서 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) & malondialdehyde (MDA)의 측정

(1) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

50주 24시간 소변은 고체상 추출법을 이용하여 정제하였다. 카트리지(Sep-Pak<sup>®</sup> Catridges, Waters Inc, Milford, MA, USA)에 5ml의 40% methanol(J.T.Baker, Phillisburg, New Jersey, USA)과 5 ml의 증류수로 고체상의 활성화와 평형상태를 유지한 후 시료를 적용하여 5mM boric acid 4ml 및 증류수 5ml로 세척하여 40 % methanol이 포함되어 있는 5mM boric acid 1ml로 용출, 건조 후 200 $\mu$ l로 재용해 후 HPLC로 분석하였다. HPLC system(Waters Inc, Milford, MA, USA)으로 Symmetry C18 컬럼(5 $\mu$ m particle size, 4.6x150nm)을 연결하여 Waters 2465 Electrochemical detector로 검출하였다. 이

동상으로는 10mM potassium phosphate buffer(pH 3.0)와 1% acetonitrile을 사용하였으며 유량은 1ml/min가 되도록 설치한 후 컬럼온도 30℃에서 시료 20  $\mu$ l를 주입하여 분석을 실시하였다.

## (2) Malondialdehyde

4mg의 DNPH(2,4-dinitrophenylhydrazine)를 1M HCl 50ml에 용해한 후 분별깔대기에 chloroform 50ml를 넣어 흔든 후 아래의 유기층을 버리는 일을 3번 반복하여 실온상태의 암실에서 보관하였고 사용 전 10분간 자기 교반기를 이용하여 교반하여 사용하였으며 PTFE(Polytetrafluoroethylene)-lined screw cap이 있는 2ml의 pyrex glass bottle에 소변 500 $\mu$ l, 증류수 300 $\mu$ l와 DNPH 200 $\mu$ l를 넣은 후 40℃에서 40분간 반응시킨 다음 상온으로 냉각하여 HPLC(High performance liquid chromatography)-UV Detector(Waters Inc, Milford, MA, USA)로 분석하였다. 8-OHdG를 측정할 것과 같은 HPLC system과 컬럼을 사용하여 UV-VIS(Ultraviolet-visible spectrophotometer) detector(Waters Inc, Milford, MA, USA)로 검출하였다. 이동상으로는 5mM boric acid와 35% acetonitrile을 사용하였으며 유량은 1ml/min으로 컬럼온도 40℃에서 시료 20  $\mu$ l를 주입하여 분석을 실시하였다.

#### 마. 신조직에서 VEGF 면역조직화학 검사

신장 조직을 얻은후 4% paraformaldehyde에 고정한 후 수세, 탈수, 파라핀 포매 과정을 거친 후 7 $\mu$ m두께로 자른 다음 6.0의 10mm/L citrated buffer로 옮긴 후 증류수로 세척하고 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol을 15분간 처리한 후 1차 항체인 monoclonal anti-VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., SC, USA)를 실온에서 1:1000으로 희석하여 첨가하였다. Rat ABC staining system(Santa Cruz Biotechnology Inc., SC, USA)에 있는 biotinylated secondary antibody를 첨가한 뒤 avidin and biotinylated horseradish peroxidase(ABC reagents)를 첨가하였다. 이후 peroxidase substrates내에서 incubation하였다. 염색된 조직은 charged-coupled devices camera(Pulnix, Milford, MA, USA)를 부착시킨 광학 현미경하에서 관찰하여 사구체의 화상을 컴퓨터의 모니터로 전송하고 image analyzer를 이용하여 사구체에서 염색된 VEGF의 optical density를 측정하였다.

#### 바. 통계분석

실험 성적은 평균±표준편차(mean±S.D)로 표시하였다. 통계분석은

윈도우즈용 SPSS 12.0을 사용하여 oneway ANOVA, Tukey test(multiple comparison)방식으로 분석하였으며  $p$ 값이 0,05 미만 일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

### III. 결과

#### 1. 기초 자료의 비교

##### 가. 체중의 변화

15주에는 DM, NAC, Quercetin, Apocynin군들이 LETO군에 비해 유의하게 체중이 증가되어 있었으며, 35주에서 50주로 진행하면서 이들의 체중이 감소하는 모습을 보였다. 그러나, N-acetylcysteine을 투여한 쥐에서 오히려 다른 쥐들에 비해 유의하게 체중의 증가를 보였다(Table 1).

Table 1. Changes of body weight in 5 groups (g)

	15wk	25wk	35wk	50wk
LETO	367±12	451±18	518±15	553±25
DM	461±24*	589±30*	663±74*	577±115
NAC	474±37*	610±49*	665±47*	709±54*
Quercetin	467±36*	608±34*	662±52*	636±61
Apocynin	452±35*	580±59*	640±79*	630±98

The values are mean ± S.D, \*: p<0.01 compared with LETO

## 나. 혈당의 변화

LETO군에 비해 DM군이 50주경 혈당이 의미있는 차이를 보여주었으며, Quercetin 및 Apocynin군에서 혈당의 증가 폭이 완만하였으나 통계적인 의미를 보이지는 않았다. 반면 NAC군에서는 DM군에 비해 혈당이 의미있게 감소하였다(Table 2).

Table 2. Changes of blood glucose in 5 groups (mg/dL)

	15wk	25wk	35wk	50wk
LETO	97.2±5.1	96.4±11.3	101.7±8.0	99.2±5.4
DM	96.3±12.9	148.6±32.8	231.0±140.6	297.0±168.4 <sup>*</sup>
NAC	101.9±17.4	146.0±29.8	149.3±15.0	149.9±15.1 <sup>†</sup>
Quercetin	108.0±15.3	153.7±20.1	179.8±92.4	171.0±124.3
Apocynin	102.6±7.9	146.3±57.3	191.0±90.1	178.1±57.3

Data express mean ± SD

<sup>\*</sup>: p<0.05 compared with LETO, <sup>†</sup>: p<0.05 compared with DM

다. 24시간 소변 단백양의 변화

15, 25, 35주에서 각 군의 24시간 소변 단백양의 차이는 없었으나 50주에서 24시간 소변 단백양은 Apocynin군이 DM군에 비하여 유의하게 감소되어 있었다 (Table 3).

Table 3. Changes of 24-hour urine protein in 5 groups(mg/mgCr)

	15wk	25wk	35wk	50wk
LETO	0.19±0.08	0.10±0.03	0.12±0.08	0.07±0.06
DM	0.26±0.13	0.37±0.28	0.57±0.40	3.15±4.30
NAC	0.24±0.06	0.31±0.19	0.28±0.10	0.87±0.50
Quercetin	0.25±0.09	0.32±0.16	0.39±0.14	1.00±0.79
Apocynin	0.26±0.10	0.40±0.24	0.66±0.86	0.67±0.48*

\*: p<0.05 compared with DM



## 2. 사구체의 병리조직학적 소견 및 용적 산출

DM 군에서 다른 군보다 현저한 사구체 경화 및 신세뇨관 비후가 관찰되었고 NAC과 Apocynin군에서는 이러한 변화가 적었다(Figure 1). DM과 LETO 군에서 사구체 용적의 유의한 차이를 보이지는 않았으며 Quercetin 군, Apocynin군, NAC군이 DM & LETO군에 비해 유의한 증가를 보여주었다(Figure 2).

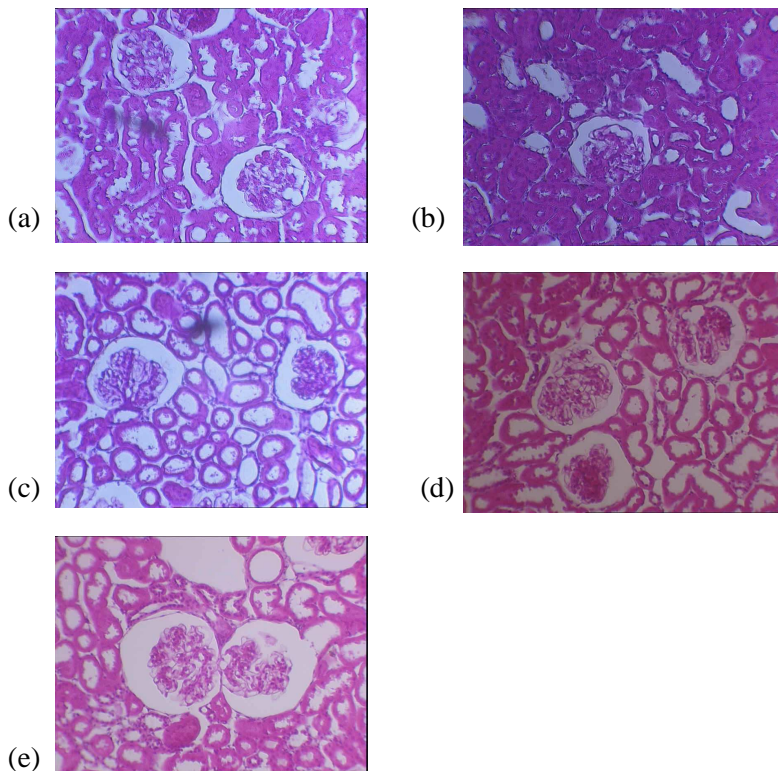


Figure 1. Hematoxylin and eosin staining of glomeruli in 5 groups. (a) LETO, (b) DM, (c) NAC, (d) Quercetin, (e) Apocynin.

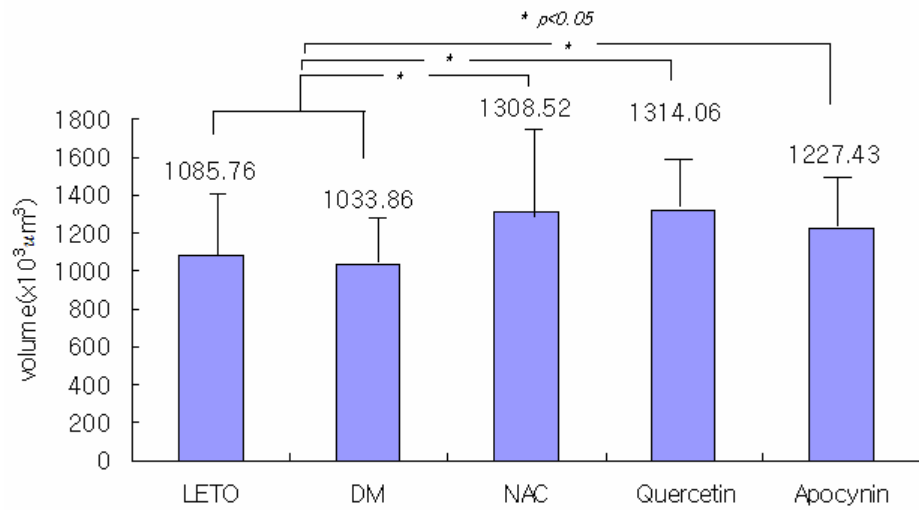


Figure 2. Comparison of glomerular volume in 5 groups. \*:  $p < 0.01$ .

3. 50주에서 측정된 24시간 소변 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) & malodialdehyde(MDA)

DM군에 비해 NAC, Quercetin, Apocynin군에서 통계적으로 의미 있게 8-OHdG와 MDA가 감소되었다(Figure 3, 4).

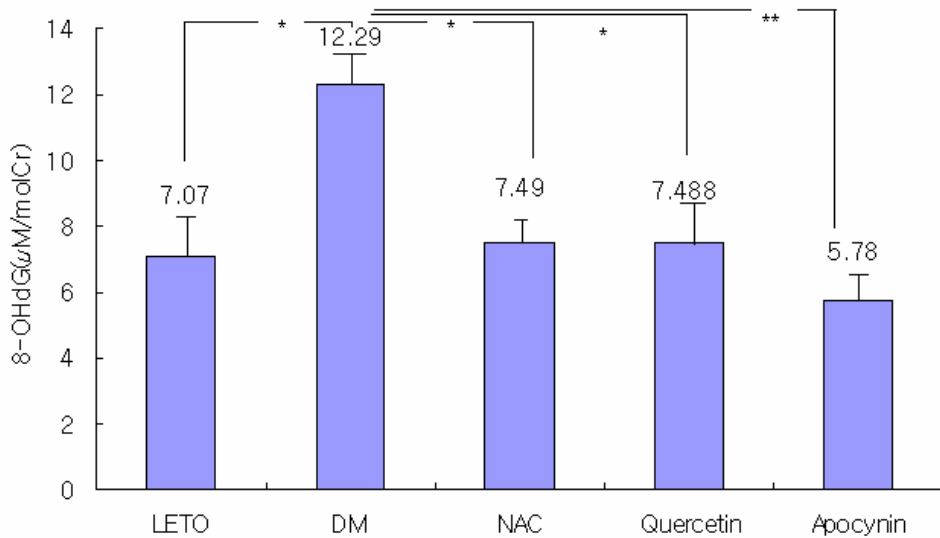


Figure 3. Twenty four hours urinary 8-OHdG at 50th wk in 5 groups. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

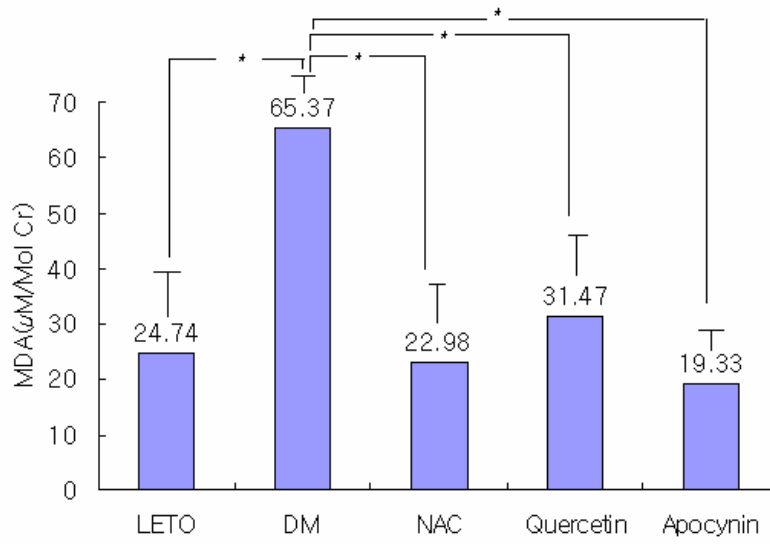


Figure 4. Twenty four hours urinary malodialdehyde (MDA) at 50th wk in 5 groups. \*:  $p < 0.05$ .

#### 4. 신조직에서 VEGF 면역조직화학 검사

면역조직화학 염색을 통한 신장 사구체의 VEGF 발현은 LETO군에 비해 DM과 NAC군에서 증가되어 있었고 DM군에 비해 Quercetin군과 Apocynin군에서 VEGF 발현이 감소되어 있었다(그림 5, 6).

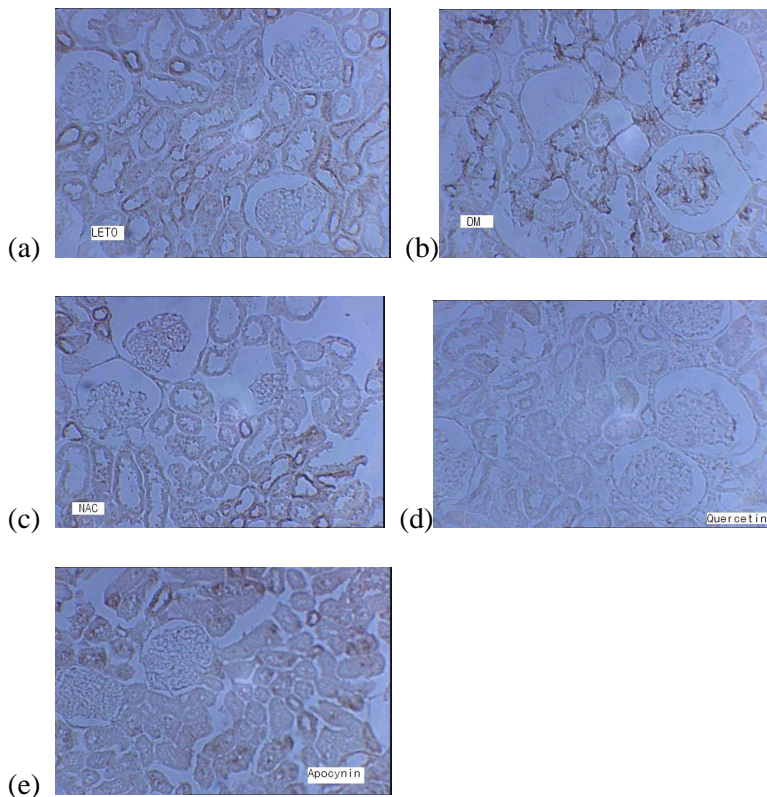


Figure 5. Immunohistochemical staining of VEGF in glomerular area. (a)

LETO, (b) DM, (c) NAC, (d) Quercetin, (e) Apocynin.

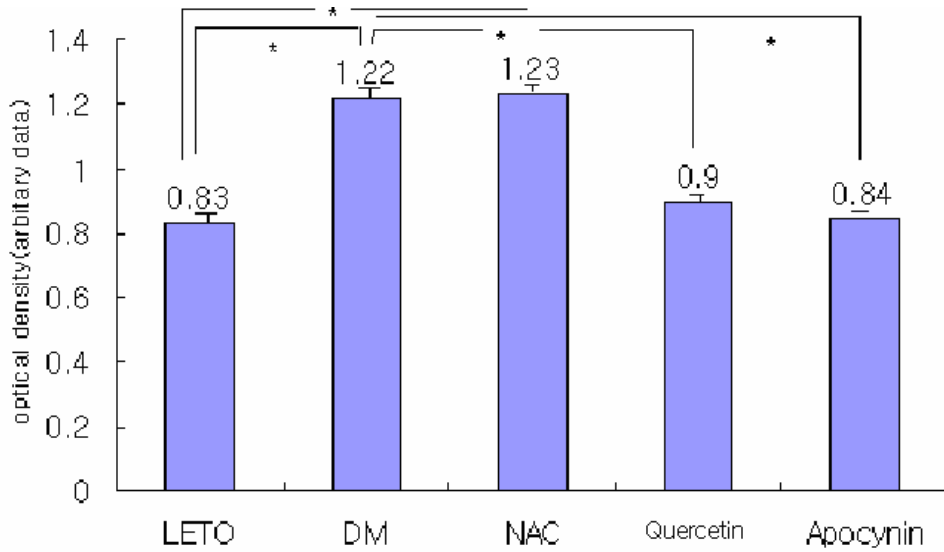


Figure 6. Comparison of optical density on VEGF Immunohistochemical staining. \*:  $p < 0.01$ .

#### IV. 고찰

당뇨병성 신증은 말기 신부전의 가장 흔한 원인으로 신장의 세포의 기질의 축적이 특징이다. 만성고혈당으로 인한 산화적 스트레스의 상승은 세포의 손상에 관계되는 NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , VEGF(vascular endothelial growth factor) 등을 활성화하고 신 실질의 구조를 변화시킨다<sup>13</sup>. 신장의 reactive oxygen species(ROS)의 축적은 신장 내 존재하는 산화효소인 NADPH oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase(GPx), thioredoxin 및 peroxiredoxin에 의해 조절되며<sup>14</sup> 항산화제 및 산화효소 억제제와 당뇨병성 신증의 관계에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서 우리는 N-acetylcysteine, quercetin 및 apocynin이 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 당뇨병성 신증에 미치는 영향을 연구하였다.

N-acetylcysteine은 잘 알려진 항산화제로 직접적으로 OH<sup>-</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 감소시키고, 간접적으로 세포 내 항산화 작용을 하는 글루타치온의 합성을 촉진하여 산화적 스트레스를 감소시킨다<sup>15</sup>. 당뇨병 동물 모델에서 N-acetylcysteine이 당뇨병의 발생을 막는 데 도움을 준다는 연구들이 보고되고 있는데 Tanaka 등<sup>16</sup>은 N-

acetylcysteine이 부분적으로 고혈당 및 인슐린 저항성, 감소된 인슐린 분비능을 호전시킬 수 있음을 기술하였으며, Takatori, Kaneto 등<sup>6,17</sup>은 췌장 베타 세포의 기능을 보호하여 당뇨의 진행을 막을 수 있음을 보여주었다. 또한 Tepel 등<sup>18</sup>은 조영제로 인한 신기능 저하를 예방하는데 N-acetylcysteine이 효과적임을 보여주었다. 본 연구에서 N-acetylcysteine은 OLETF에서 의미있게 혈당을 낮춤과 더불어 다른 쥐에게서 관찰되었던 체중의 감소 또한 보이지 않았다. 결과를 제시하지는 않았으나 혈당과 체중은 음의 상관관계를 보이고 있어( $r^2=-0.438$ ) 혈당이 조절되면서 체중 감소를 호전시킨 것으로 생각된다. 단백뇨는 DM군에 비해 통계적인 차이를 보이지는 않았으나 약간 감소하는 경향을 보였다.

Quercetin은 강력한 flavonoids로 lipid peroxidation을 감소시키고 nitric oxide synthetase의 발현을 억제하며, NF-kB (nuclear transcription factor-kB)의 DNA 결합 능력을 떨어뜨린다<sup>19</sup>. Anjaneyulu 등은 quercetin이 당뇨병성 신증 및 신경병증을 호전시킨다고 보고하였다<sup>20,21</sup>. 본 연구에서 8-OHdG 및 MDA의 감소를 보였으나 의미있는 혈당 및 단백뇨의 변화를 보이지는 못하였다. 그 이유로는 quercetin의 약동학상 경구 흡수량의 93.3%가 장에서 흡수되고 나머지 3.1%만이 간에서 대사되며 섭취량의 5.3%정도밖에



효과가 없기 때문으로 생각된다<sup>22</sup>.

Apocynin은 NADPH oxidase의 p47phox를 세포막으로 전위하는 것을 막아 산화효소의 활성을 저해하여 NO를 생성하고, 산화적 스트레스 및 단백뇨를 막는데 여기에 angiotensin II, II-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 억제도 포함된다. Apocynin은 신장에서 대사되면서 활성화된다<sup>9,23-25</sup>. 본 연구에서 apocynin은 유의하게 단백뇨를 감소시켰으며 이것은 혈당과는 무관하게 산화스트레스의 감소와 연관이 있으리라 생각된다.

본 연구에서 측정된 사구체 용적은 LETO군과 DM군에 비해 NAC, Quercetin, Apocynin군에서 증가되어 있었는데, 오히려 DM군에서 사구체 용적이 감소한 이유는 당뇨병이 오래 지속되어 사구체 경화 및 세뇨관 간질의 섬유화가 진행되어 나타나는 현상으로 사료된다.

VEGF는 사구체 혈관투과성을 높이며 단핵구의 화학주성 및 tissue factor의 생성을 촉진하여 당뇨병성 신증에서 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 VEGF의 발현이 단백뇨의 원인이라 하기에는 아직 논란이 있으나<sup>26,27</sup> 실제로 당뇨병성 신증의 초기에서 VEGF의 발현이 증가되어 있으며 VEGF 항체를 이용하여 단백뇨의 발현을 감소시킬 수 있다는 연구 결과도 있었다<sup>28,29</sup>. 차등은 25-37주령의 OLETF쥐에서 VEGF의 증가가 초기 당뇨병성

신증의 변화에서 단백뇨와 양의 상관관계를 보였다고 보고하였다<sup>30</sup>. 본 연구에서 면역조직화학검사를 통한 VEGF의 발현은 DM군과 NAC군에서 증가되어 있었으며 Apocynin과 Quercetin군에서 유의하게 감소되어 있었다.

요약하면 본 연구에서 NAC은 혈당을 의미있게 호전시켰고 apocynin 치료가 OLETF 쥐에서 단백뇨를 유의하게 낮추었으며 사구체 경화 및 신세뇨관의 변형을 방지할 수 있었다. NAC, Quercetin, Apocynin를 투여한 쥐에서 산화적 스트레스의 지표인 8-OHdG와 MDA의 수치가 DM군에 비해 모두 감소하였다. 면역조직화학검사를 통한 VEGF의 발현은 quercetin과 apocynin에서 감소하였다. Apocynin이 NAC, quercetin과 비교했을 때 당뇨병성 신증에 이로운 효과를 가져온 것은 혈당과는 관계없이 VEGF 및 산화적 스트레스의 감소로 인한 효과로 여겨지나 다른 혈액동화적인 경로 및 이차적 신호전달체계의 변화에 대한 연구가 더욱 필요하겠다.

## V. 결론

본 연구에서 항산화제인 N-acetylcysteine, quercetin 및 apocynin이 당뇨병성 신증에 미치는 영향들을 확인하고자 하였다.

이들은 모두 산화적 스트레스 지표인 MDA 및 8-OHdG를 모두 감소시킬 수 있었다. N-acetylcysteine은 혈당의 상승을 유의하게 낮출 수 있었고 apocynin은 단백뇨를 유의하게 감소시키는 효과를 보여주었으며 quercetin과 apocynin에서 면역조직화학검사를 통한 VEGF의 발현이 감소되었다. Apocynin이 NAC 및 quercetin과 비교했을 때 당뇨병성 신증에 이로운 효과를 가져온 것은 혈당과는 관계없이 VEGF 및 산화적 스트레스의 감소로 인한 효과로 생각된다.

## 참고문헌

1. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001;44:1957-1972.
2. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-412.
3. Makino H, Shikata K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H, et al. Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995;48:517-526.
4. Studer R, Craven P, DeRubertis F. Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism* 1997;46:918-925.
5. Park S, Choi H, Lee J, Woo C, Kim J, Han H. High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF-beta 1. *Kidney Int* 2001;59:1695-1705.
6. Takatori A, Ishii Y, Itagaki S, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Amelioration of the beta-cell dysfunction in diabetic APA hamsters by antioxidants and AGE inhibitor treatments. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:211-218.
7. Ng TM, Shurmer SW, Silver M, Nissen LR, O'Leary EL, Rigmainden RS, et al. Comparison of N-acetylcysteine and fenoldopam for preventing contrast-induced nephropathy (CAFCIN). *Int J Cardiol* 2006;109:322-328.

8. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005;51:117-123.
9. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:1890-1898.
10. Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* 1962;17:343-348.
11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-160
12. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245:161-166
13. Ohshiro Y, Takasu N. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Nippon Rinsho* 2006;64:997-1003.
14. Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ. Recent Insights into Experimental Mouse Models of Diabetic Nephropathy. *Nephron Exp Nephrol* 2006;104:57-62
15. Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 1997;38:205-227.
16. Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by

- antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:10857-10862.
17. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999;48:2398-2406.
18. Tepel M, Van der Giet M, Schwartzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 2000;343:180-184.
19. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2005;135:2299-2304.
20. Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:244-248.
21. Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:1001-1005.
22. Chen X, Yin OQ, Zuo Z, Chow MS. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm Res* 2005;22:892-901.
23. Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Greimers R, Havard L, Merville MP, et al. Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol*

Cell Biol 1999;19:1950-1960.

24. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griending KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998;329:653-657.

25. Jaimes EA, Galceran JM, Rajj L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 1998;54:775-784.

26. Webb NJ, Watson CJ, Roberts IS, Bottomley MJ, Jones CA, Lewis MA, et al. Circulating vascular endothelial growth factor is not increased during relapses of steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1999;55:1063-1071

27. Klanke B, Simon M, Rockl W, Weich HA, Stolte H, Grone HJ. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) on haemodynamics and permselectivity of the isolated perfused rat kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:875-885.

28. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039.

29. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-1545.

30. Cha DR, Kang YS, Han SY, Jee YH, Han KH, Han JY, et al. Vascular

endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats. *J Endocrinol* 2004;183:183-194.



**Abstract**

**Effects of N-acetylcysteine, Quercetin and Apocynin  
on diabetic nephropathy**

**Soo Min Nam**

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Choon Hee Chung)

Oxidative stress plays a role in the development of diabetic nephropathy. The object of this study was to assess whether N-acetylcysteine, quercetin and apocynin have protective roles in diabetic nephropathy on OLETF rats. Five groups of rats were used: LETO as non-diabetic controls, DM group as non-treated OLETF rats, NAC group as N-acetylcysteine-treated OLETF rats, Quercetin group as quercetin-treated OLETF rats, Apocynin group as apocynin-treated OLETF rats. At the 15, 25, 35, 50th week, we measured their body weight and blood glucose level and collected 24 hour urine protein level. Also, we measured 50th week 24 hour urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) & Malodialdehyde (MDA) level. On the 50th

week, we extracted kidneys of all the rats to assess the histopathologic findings, and to measure the glomerular volume, optical densities of the VEGF expression.

NAC could prevent weight loss, and decreased serum glucose level. Twenty four hour urinary protein level was decreased in Apocynin group. Apocynin and NAC could prevent progression of glomerulosclerosis and tubular thickening. NAC, quercetin and apocynin could reduce the concentration of 24 hour urinary 8-OHdG and MDA. Quercetin and apocynin decreased optical density of glomerulus in immunohistochemical stain significantly. In conclusion, NAC, quercetin and apocynin could decrease oxidative stress. NAC could improve glycemic control, and apocynin could prevent progression of diabetic nephropathy. We suggest apocynin can play roles through antioxidative and VEGF inhibitory effect.

---

**Keywords:** Diabetes mellitus, diabetic nephropathy, VEGF, N-acetylcysteine, quercetin, apocynin, OLETF