

## OLETF 쥐에서 Lithospermate B의 당뇨병성신증에 대한 보호 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실 내분비내과, 이화여자대학교 약학대학<sup>1</sup>, 연세대학교 이과대학 화학과<sup>2</sup>이현주·이근택<sup>1</sup>·강은석·허규연·조정산·안철우·하헌주<sup>1</sup>·정만길<sup>2</sup>·차봉수·이현철

Protective Effects of Lithospermate B on Diabetic Nephropathy in OLETF Rat

Hyun Joo Lee, Geun Taek Lee<sup>1</sup>, Eun Seok Kang, Kyu Yeon Hur, Zheng Shan Zhao,  
Chul Woo Ahn, Hun Joo Ha<sup>1</sup>, Man Kil Jung<sup>2</sup>, Bong Soo Cha, Hyun Chul Lee

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul Korea

Ewha Womans University College of Pharmacy<sup>1</sup>, Seoul KoreaDepartment of Chemistry, Yonsei University College of Science<sup>2</sup>, Seoul, Korea

- Abstract -

**Background:** Magnesium lithospermate B (LAB), an active component isolated from *Salvia miltiorrhizae*, has been reported to have renoprotective effects in type 1 diabetic animal model. The purpose of this study was to examine the effects of LAB on the prevention of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat which is regarded as an animal model of type 2 diabetes.

**Methods:** Ten microgram of LAB/kg or Vehicle (PBS) was given orally once daily to 10-week-old male OLETF rats and LETO rats for 40 weeks. Intra-peritoneal glucose tolerance test was performed at 50 weeks. 24 hr urinary protein excretion amounts were measured. Lipid peroxidation, TGF- $\beta$ 1 and ED-1 of renal cortex were measured.

**Results:** The mean body weight of LAB+OLETF was not significantly different from that of OLETF rats. LAB treatment decreased proteinuria, lipid peroxidation, and free fatty acid in OLETF rats without decrease in the plasma glucose concentration. Also, LAB inhibited the progression of glomerular hypertrophy and mesangial expansion. LAB effectively decreased ED-1 positive cells, ECM expansion, and TGF- $\beta$ 1 level in the renal cortex of OLETF rats.

**Conclusions:** These results suggest that the beneficial effects of LAB on the diabetic renal damage in the OLETF rats may depend on a mechanism of decreasing oxidative stress. LAB might be a new therapeutic agent for the prevention of nephropathy in type 2 diabetes as well as type 1 diabetes (*J Kor Diabetes Assoc* 29:322 ~ 332, 2005).

**Key Words:** Lithospermate B, OLETF rats, Diabetic nephropathy

## 서 론

당뇨병성신증은 사구체나 신세뇨관 간질에서 세포외 기질이 점차적으로 축적되고 사구체경화증이 진행하면서 궁극적으로 단백뇨와 신부전에 이르게 되는 질병으로 말기신부전의 가장 흔한 원인으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 이러한 당뇨병

성 신증은 고혈당으로 인해 유발되는 복잡한 생화학적 경로와 혈액동학적 이상의 상호작용으로 발생한다<sup>3)</sup>. 여러 연구 결과에 따르면, 최종당화산물 (advanced glycation end products; AGEs), 폴리올 (polyol) 등의 대사적 산물이나 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF),

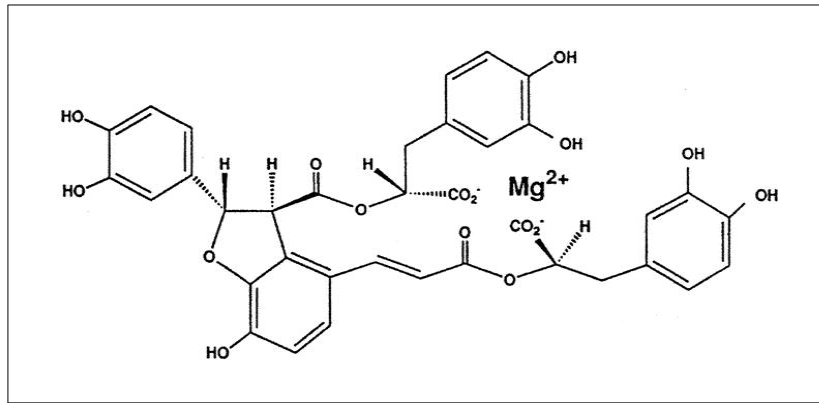


Fig. 1. Structural formula of lithospermate B (LAB).

vascular endothelial growth factor (VEGF) 등의 성장인자, angiotensin II (AG II), nitric oxide (NO) 등의 혈류역동학적 인자들이 당뇨병성 신증의 진행에 관여한다고 알려져 있다<sup>4-6)</sup>. 이러한 여러 인자들이 사구체간질 세포의 증식, 사구체 비후, 세포외 기질의 과다생성 및 사구체 혈류역동학의 변화를 초래하게 된다.

*Salvia miltiorrhizae* radix는 당뇨병성 합병증의 치료로 중국에서 전통적으로 사용되는 약제로 알려져 있다. Magnesium lithospermate B (LAB) (Fig. 1)는 최근 *S. miltiorrhizae*에서 분리한 성분으로 부분적 신장절제술을 시행한 쥐에서 신기능에 유용한 효과를 나타내는 것으로 보고되었고, 이는 reactive oxygen species (ROS) 생성의 감소로 인한 항산화 효과로 설명되어진다<sup>7-8)</sup>. 본 저자들은 *in vitro* 실험으로 사구체간질 세포에 LAB를 처리한 결과, 알도스 환원효소 (aldose reductase) 활성도와 fibronectin 양의 증가가 억제되는 것을 관찰하였으며, 제1형 당뇨병 동물모델인 스트랩토조토신을 투여한 쥐에서 LAB의 단기투여로 신기능의 개선을 확인한 바 있다<sup>9,10)</sup>. Otsuka Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF) 쥐는 자연적으로 제2형 당뇨병이 발생하여 서서히 당뇨병성 사구체경화증이 발생하는 동물 모델이다<sup>11)</sup>. 본 연구는 제2형 당뇨병 동물 모델인 OLETF 쥐에서 신기능과 산화성스트레스 상태에 대한 LAB의 효과를 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험대상

제2형 당뇨병 및 인슐린 저항성 동물모델인 수컷 OLETF 쥐와 대조군으로 사용한 수컷 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐를 오츠카 제약회사로부터 공급받았다. 생후 10주령 된 OLETF 쥐와 LETO 쥐를 우리당 2~3 마리씩 분리하여 온도 23 ± 2°C, 습도 55 ± 5%에서 12시간 밤

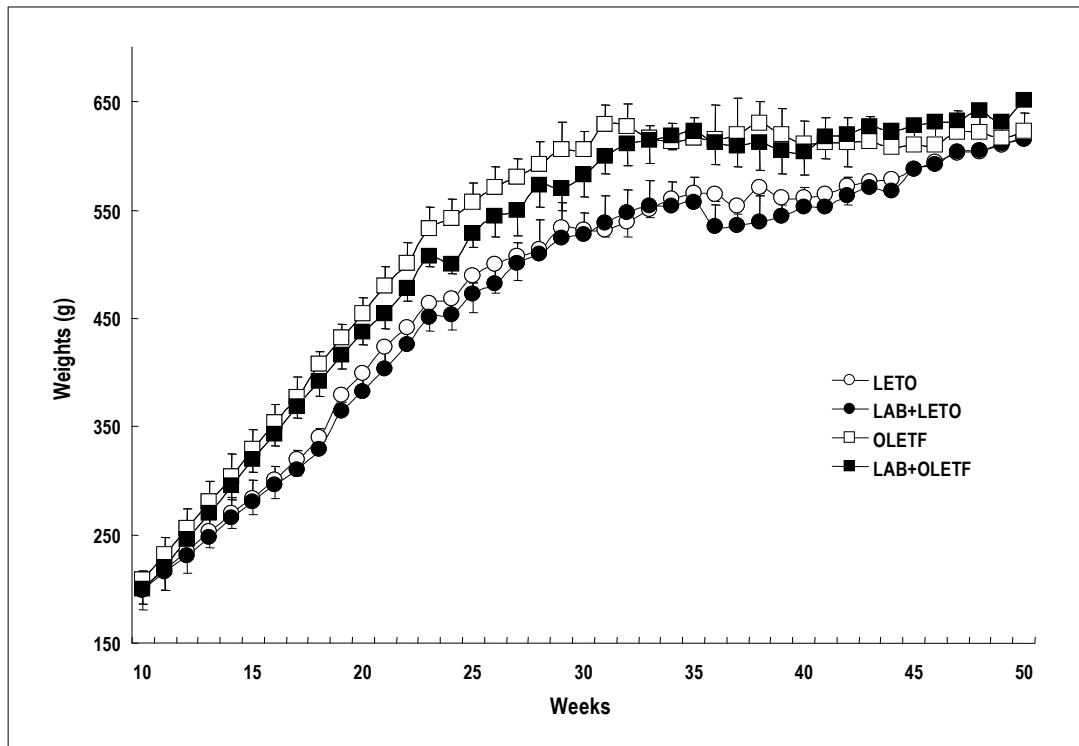
낮의 주기로 사육하였다. 모든 쥐는 정상식을 투여하였고 먹이와 물의 섭취를 자유롭게 하였다. LAB는 *S. miltiorrhizae*에서 정제하여 추출하였으며<sup>10)</sup>, 매일 10 mg/kg의 용량으로 40주 동안 경구로 투여하였다. 예비실험에서 OLETF 쥐에 1, 10, 20 mg/kg/day의 다양한 농도로 LAB를 투여하여 단백뇨에 대한 효과를 비교한 결과, 10 mg/kg/day 농도의 LAB를 투여한 경우에서 1 mg/kg/day의 농도보다는 효과적으로 단백뇨가 감소하였고 20 mg/kg/day의 농도에서의 단백뇨 감소효과와 유사하였다. 대조군 OLETF 쥐 (n=10), LAB 투여 OLETF 쥐 (n=10), 대조군 LETO 쥐 (n=10), LAB 투여 LETO 쥐 (n=10)의 총 4개의 군으로 나누었다. LAB를 투여하는 동안 매주 체중의 변화를 관찰하였다.

### 2. 생화학적 분석

혈액을 채취한 즉시 5분 동안 5,000 g에서 원심분리하였다. 혈청 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (sCr)과 소변내 creatinine (uCr)을 Hithachi 911 automatic analyzer (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다. 24시간 동안 모든 소변은 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액에서 단백질을 측정하였다. 소변내 단백질량은 Bio-Rad protein assay (Hercules, CA)를 이용하여 Coomassie quantitative reaction 방법으로 측정하였다. 모든 검체는 세 번씩 측정하여 그 평균값을 계산하였다.

### 3. 복강내 당부하검사 (Intraperitoneal glucose tolerance test : IPGTT)

50주령의 OLETF 쥐와 LETO 쥐를 16시간 동안 금식시킨 후 복강 내로 2 g/kg의 glucose를 투여하였다. 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300분째 혈당을 측정하였다. 혈당의 측정은 혈당측정기 (Sure-Step, Lifescan Inc., CA)를 사용하였다.



**Fig. 2.** Body weight of OLETF rats treated for 40 weeks starting at 10 weeks of age. No significant differences were observed between LAB treatment and control PBS group. Values are means  $\pm$  SD. LETO: control rats treated with PBS, LAB + LETO: control rats treated with LAB, OLETF: OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.

#### 4. 사구체의 형태학적 분석

신장을 분리하여 10% 포르말린 용액에 고정시킨 후, 문(hilum)을 통과하도록 가로 방향으로 3- $\mu$ m 두께로 조직절편을 만들었다. 각각의 조직절편을 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 하여 표피층의 피질을 따라 시계방향으로 스캔하면서 30개의 서로 다른 표피층의 사구체를 관찰하였다<sup>12)</sup>. 각각의 사구체에 대해 다음 항목을 분석하였다. 1) Total glomerular profile area; 2) Glomerular tuft area; 3) Mesangial matrix area (PAS 양성)<sup>12)</sup>. 파라핀으로 고정된 조직을 Masson's Trichrome 염색법을 통하여 collagen을 염색하였다. 사구체 관찰 및 Collagen 축적의 정도는 MetaMorph software (version 4.6, Universal Imaging Co., PA)를 이용하여 분석하였다.

#### 5. 신피질의 ED-1에 대한 면역조직화학적 염색

신피질로부터 얻은 3- $\mu$ m 조직 절편을 광학현미경으로 관찰한 후 37°C에서 1시간 동안 ED-1에 대한 다클론성 항체 (Serotec, Oxford, UK) 와 반응시켰다. ED-1 다클론성 항체는 1% bovine serum albumin (BSA)과 1 : 100으로 희석시켜 사용하였다. ED-1 양성으로 염색되는 면적의 비율을 computer-assisted image analysis software (MetaMorph,

version 4.6, Universal Imaging Co., PA)를 이용하여 측정하였다. 각각의 신장에 대하여 30개 이상의 사구체를 관찰하였다.

#### 6. 신피질의 lipid peroxide (LPO)의 생성 측정

LPO의 측정은 modified thiobarbituric acid method 방법을 이용하였다<sup>13,14)</sup>. 신피질은 잘라서 추출용액 (iNtron, Seoul, Korea)으로 분쇄하였다. 80  $\mu$ L의 분쇄된 조직을 80  $\mu$ L의 8% SDS에 넣고 120  $\mu$ L의 0.8% 2-thiobarbituric acid와 120  $\mu$ L의 20% acetic acid의 혼합용액과 섞은 후 95°C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 15,000 g에서 5분간 원심분리 하여 침전된 불순물을 제거하였다. 형성된 malondialdehyde (MDA)의 양은 spectrofluorometry (SPF-500C; SLM Instruments, Inc; Urbana, IL)를 이용하여 excitation/emission 파장 515/553 nm에서 측정하였다.

#### 7. 신피질의 TGF- $\beta$ 1 단백질 분석: ELISA

신피질에 존재하는 TGF- $\beta$ 1의 양을 측정하기 위해 신피질 분쇄조직을 실온에서 30분간 HCl (최종농도 0.2 M)로 반응시키고 같은 농도의 NaOH로 중화시키면 활성화된 형태로 전환된다. TGF- $\beta$ 1의 양은 TGF- $\beta$ 1 E<sub>max</sub><sup>TM</sup> Immuno-Assay System (Promega, Madison, WI)을 이용하여 quanti-

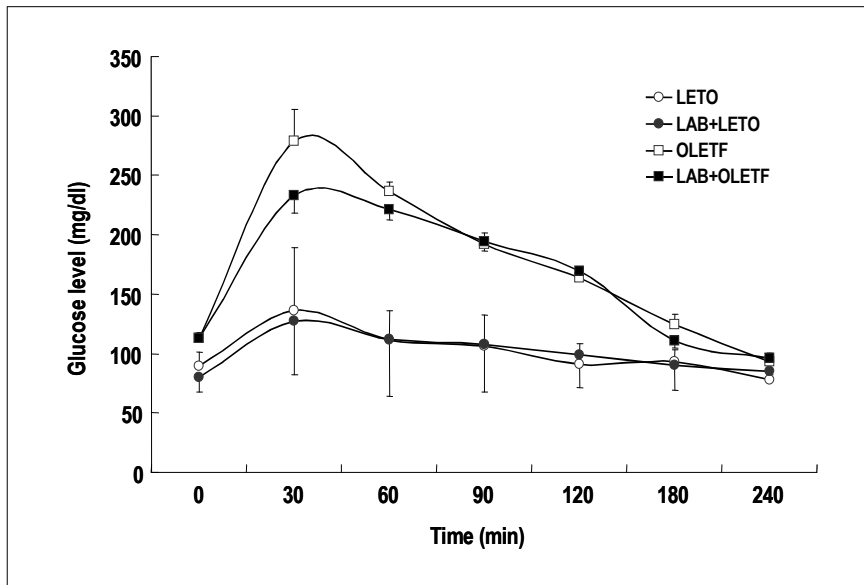


Fig. 3. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) profile of LETO and OLETF rats. Plasma glucose levels of OLETF, LAB + OLETF, LETO, and LAB + LETO at 50 week by IPGTT. Values are means  $\pm$  SD, n = 5. LETO: control rats treated with PBS, LAB + LETO: control rats treated with LAB, OLETF: OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.

Table 1. General Characteristics and the Effects of LAB in OLETF Rats

	LETO	LAB+LETO	OLETF	LAB+OLETF
Plasma glucose (mg/dL) - 50 week	89.8 $\pm$ 5.5	96.9 $\pm$ 8.2	131.1 $\pm$ 20.5*	131.8 $\pm$ 17.1*
AST (IU/L)	123.0 $\pm$ 21.0	118.3 $\pm$ 7.5	145.5 $\pm$ 19.6*	143.2 $\pm$ 36.3*
ALT (IU/L)	41.6 $\pm$ 3.1	40.5 $\pm$ 1.9	48.5 $\pm$ 12.37	47.8 $\pm$ 11.2
Total cholesterol (mg/dL)	102.8 $\pm$ 7.3	110.0 $\pm$ 10.2	180.8 $\pm$ 27.1*	160.1 $\pm$ 22.6* <sup>†</sup>
Free fatty acid (uEq/L)	662.4 $\pm$ 185.1	612.7 $\pm$ 81.8	2065.5 $\pm$ 215.7*	1442.1 $\pm$ 299.6* <sup>†</sup>
Urine volume (mL/24 hour)	14.8 $\pm$ 4.7	13.8 $\pm$ 4.7	10.7 $\pm$ 3.0*	10.3 $\pm$ 2.7*
Kidney weight (g)	1.42 $\pm$ 0.08	1.45 $\pm$ 0.13	2.25 $\pm$ 0.24*	1.93 $\pm$ 0.20* <sup>†</sup>
Kidney weight / 100 g body weight	0.39 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.14*	0.69 $\pm$ 0.08* <sup>†</sup>
Serum creatinine (mg/dL)	0.64 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.08	0.59 $\pm$ 0.07

Values are means  $\pm$  SE. LETO: control rats treated with PBS, LAB + LETO: control rats treated with LAB, OLETF: OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB. \* $P$  < 0.05 compared to LETO; <sup>†</sup> $P$  < 0.05 compared to OLETF. AST; Aspartate aminotransferase, ALT; Alanine aminotransferase.

tative sandwich enzyme immunoassay로 측정하였다. 이러한 TGF- $\beta$ 1 E<sub>max</sub><sup>TM</sup> ImmunoAssay System은 32 pg/ml 농도의 TGF- $\beta$ 1까지 측정 가능하다.

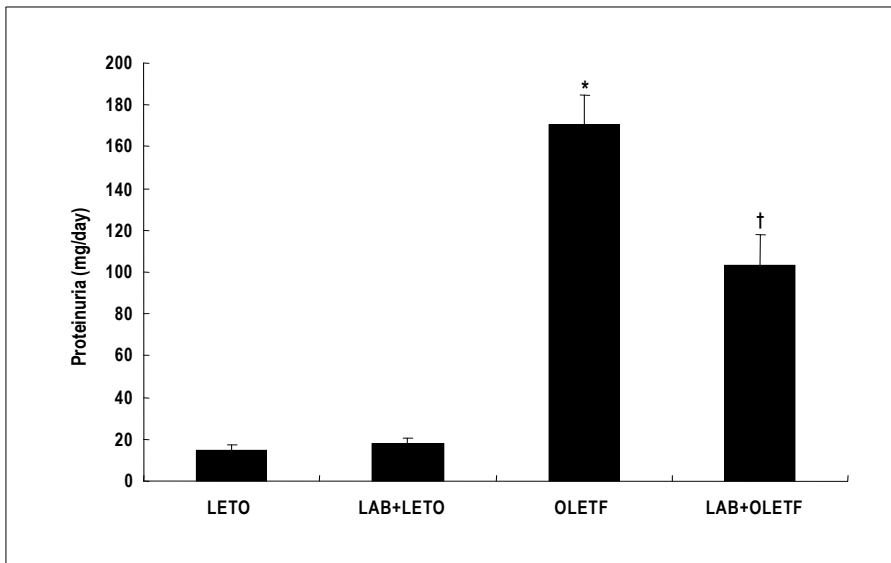
#### 8. 통계학적 분석

모든 자료는 평균값  $\pm$  표준편차로 표시하였다. 실험 결과들의 통계처리는 Student's t-test와 analysis of variance (ANOVA)로 하였으며  $P$ 값은 0.05 미만을 통계학적으로 유의한 것으로 판단하였다.

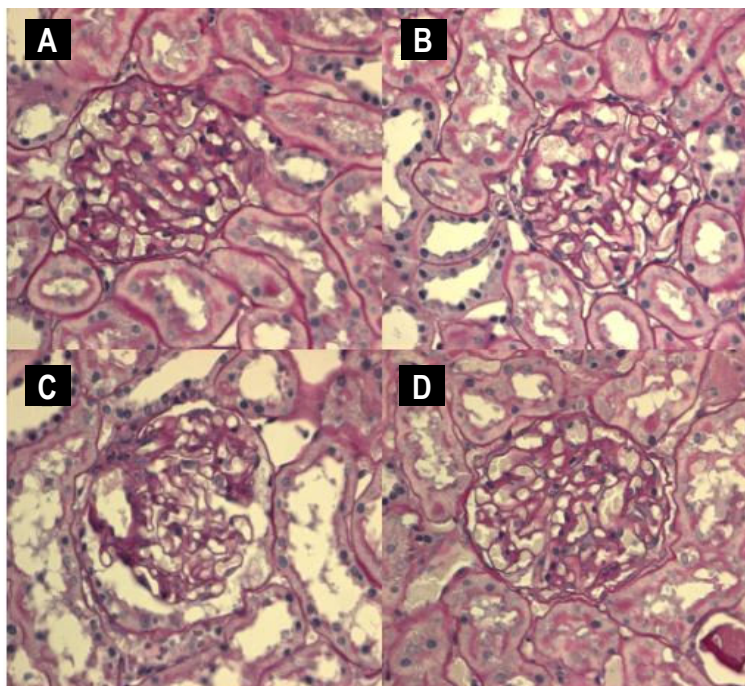
## 결 과

### 1. 체중의 변화

10주령부터 40주 동안 OLETF 군, LAB + OLETF 군, LETO 군 및 LAB + LETO 군의 체중의 변화를 Fig. 2에 표시하였다. 같은 주령에서는 OLETF 쥐가 LETO 쥐보다 체중이 크게 나타났지만, OLETF 군과 LAB + OLETF 군 및 LETO 군과 LAB + LETO 군간에는 거의 체중의 차이는 보이지 않았다. 투여 전후의 평균체중은 OLETF 군은 391  $\pm$  22g에서 651  $\pm$  43g, LETO 군은 340  $\pm$  12g에서 617  $\pm$  17g으로 증가하였다.



**Fig. 4.** Effects of LAB on proteinuria in LETO and OLETF rats. Proteinuria was measured by Bredford assay, as described in Methods. \*  $P < 0.05$  compared with corresponding normal control rats at 16 weeks, †  $P < 0.05$  compared with the corresponding diabetic rats. LETO: control rats treated with PBS, LAB + LETO: control rats treated with LAB, OLETF: OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.



**Fig. 5.** Effects of LAB on renal histology (PAS staining). A. LETO: control rats treated with PBS. B. LAB + LETO: control rats treated with LAB. C. OLETF: OLETF rats treated with PBS. D. LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.  $\times 400$ .

2. 복강내 당부하검사 (intraperitoneal glucose tolerance test : IPGTT)

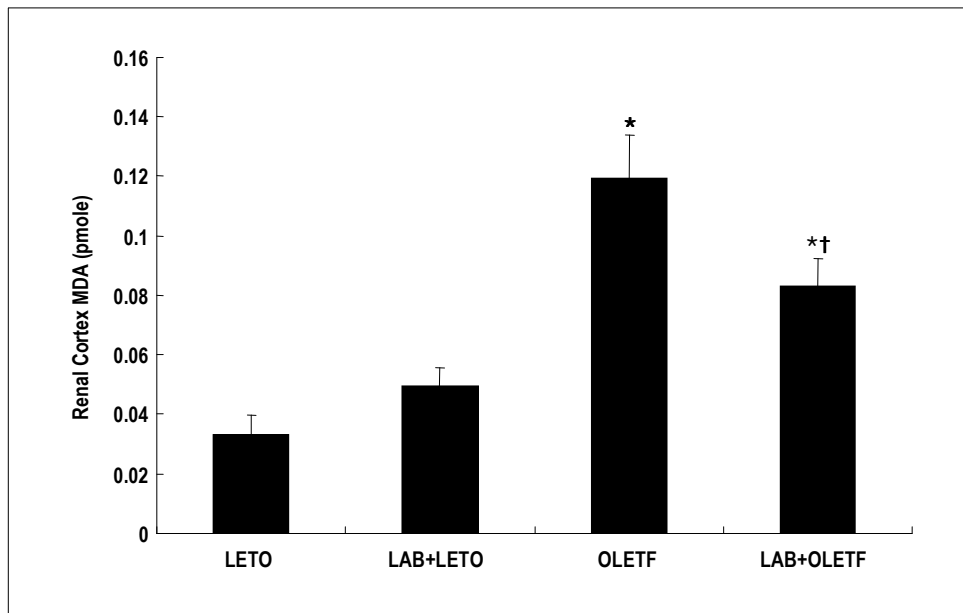
OLETF 및 LETO 쥐에서 복강내 glucose 투여 후 30분째 가장 높은 혈당을 나타냈고 이후 서서히 혈당이 감소하

여 LETO 쥐에서는 120분째 거의 공복 시 혈당 수준으로 회복되었지만 OLETF 쥐의 경우는 혈당의 감소 정도가 서서히 나타나 4시간까지 지속되는 것을 관찰하였다 (Fig. 3). OLETF 쥐와 LETO 쥐 모두에서 10 mg/kg/day 용량의 LAB 투여로는 당부하검사 상의 혈당의 변화는 통계학적으로

**Table 2.** Morphometric Studies for Kidney Cortex of LETO and OLETF Rats Before and After Treatment of LAB

	LETO	LAB+LETO	OLETF	LAB + OLETF
Mesangial matrix fraction (%)	15.2 ± 4.3	16.4 ± 4.3	21.7 ± 5.3*	18.4 ± 4.2 <sup>†</sup>
Glomerular volume (10 <sup>6</sup> μ <sup>3</sup> )	1.50 ± 0.25	1.43 ± 0.20	1.70 ± 0.31*	1.56 ± 0.28 <sup>†</sup>
Glomerular collagen	4.78 ± 2.23	4.22 ± 2.42	12.94 ± 3.78*	4.91 ± 2.75 <sup>†</sup>
Tubulointerstitial collagen	3.48 ± 1.50	2.69 ± 1.11	10.45 ± 3.41*	3.60 ± 1.77 <sup>†</sup>
Glomerular ED-1	2.26 ± 0.18	3.68 ± 0.40	9.83 ± 1.05*	6.92 ± 1.01 <sup>†</sup>
Tubulointerstitial ED-1	1.82 ± 0.13	3.86 ± 0.39	5.03 ± 0.51*	4.05 ± 0.52 <sup>*†</sup>

Values are means ± SE. LETO; control rats treated with PBS, LAB + LETO; control rats treated with LAB, OLETF; OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF; OLETF rats treated with LAB. \*P < 0.05 compared to LETO; <sup>†</sup>P < 0.05 compared to OLETF.



**Fig. 6.** Effect of LAB on renal cortex MDA in LETO and OLETF rats. Values are means ± SE. \* P < 0.05 compared with LETO control rats, <sup>†</sup>P < 0.05 compared with diabetic rats. LETO: control rats treated with PBS, LAB + LETO: control rats treated with LAB, OLETF: OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.

로 유의한 차이를 보이지 않았다.

### 3. 혈청학적 분석 결과

OLETF 쥐의 경우 LETO 쥐에 비해 혈액내 총 콜레스테롤 및 유리지방산의 농도가 증가하였고, LAB 를 투여한 경우 통계학적으로 유의하게 감소하는 소견을 관찰할 수 있었다(Table 1). 10 mg/kg/day의 용량의 LAB 투여로 AST, ALT는 큰 변화가 관찰되지 않아 간세포독성은 나타나지 않았다(Table 1).

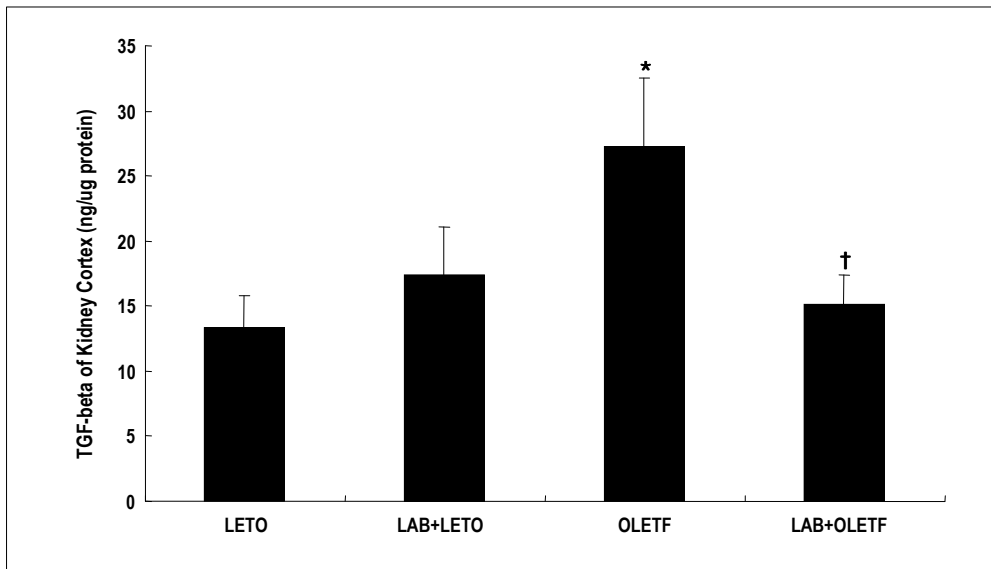
### 4. OLETF 쥐에서 사구체 과여과와 단백뇨에 대한 LAB의 효과

40주 동안 LAB를 투여한 후 OLETF 쥐의 신장의 무게

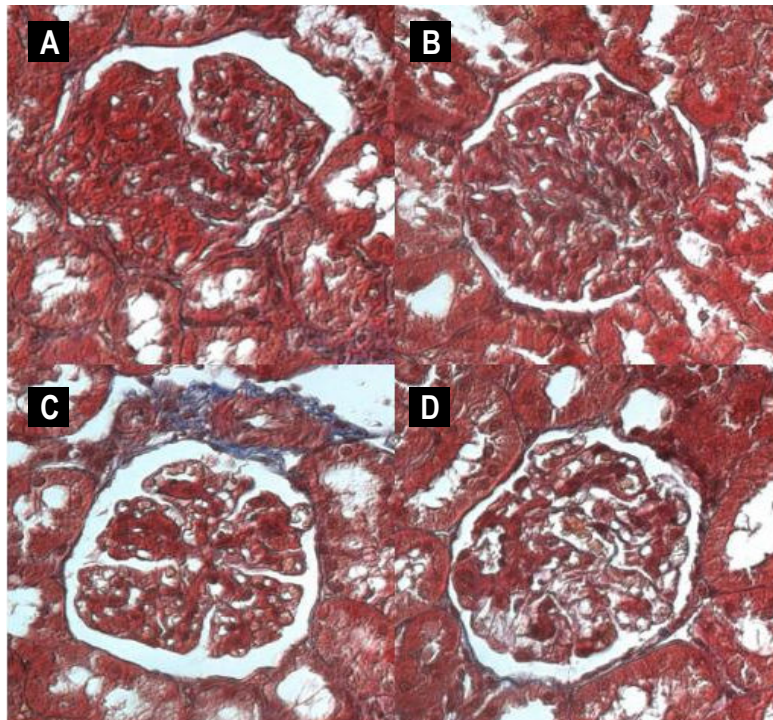
와 단백뇨의 정도는 통계학적으로 유의하게 감소하였다(P < 0.05) (Table 1, Fig. 4). LETO 쥐에서는 LAB 투여 전후로 차이를 보이지 않았다.

### 5. 사구체의 형태학적 분석

Automated image analysis를 이용하여 신장의 간질 팽창 정도와 사구체 용적을 측정하였다(Fig. 5, Table 2). OLETF 쥐에서 간질의 용적은 1.4배, 사구체 용적은 1.3배 증가하였다(P < 0.05). OLETF 쥐에 LAB 투여한 경우 이러한 사구체비후와 간질의 팽창정도가 감소된 것을 관찰하였다 (Table 2).



**Fig. 7.** ELISA results for TGF- $\beta$ 1 protein expression in the kidney cortex. Values are means  $\pm$  SE. ELISA for TGF- $\beta$ 1 was performed after 40 weeks of LAB treatment. \*  $P < 0.05$  compared with LETO control, †  $P < 0.05$  compared with OLETF control rats. LETO: control rats treated with PBS, LAB + LETO: control rats treated with LAB, OLETF: OLETF rats treated with PBS, and LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.

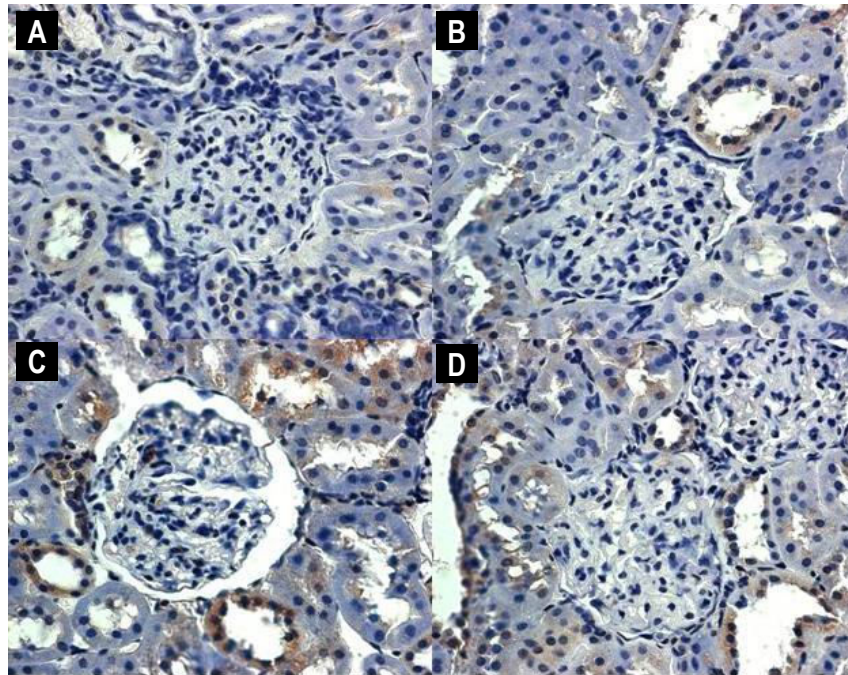


**Fig. 8.** Effects of LAB on renal collagen protein expression in OLETF rats. Masson's trichrome staining for collagen was performed after 40 weeks of LAB. A. LETO: control rats treated with PBS. B. LAB + LETO: control rats treated with LAB. C. OLETF: OLETF rats treated with PBS. D. LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.  $\times 400$ .

6. OLETF 쥐에서 신피질 LPO 형성에 대한 LAB의 효과

신피질의 LPO 형성 정도를 반영하는 MDA는 LETO 쥐

보다는 OLETF 쥐에서 3배 가량 높게 측정되었다( $P < 0.05$ ) (Fig. 6). OLETF 쥐에서 LAB를 투여한 경우 대조군에 비해 MDA가 유의하게 감소하였지만 LETO 쥐에서보다



**Fig. 9.** Immunohistochemistry staining for ED-1 was performed after 40 weeks of LAB treatment. A. LETO: control rats treated with PBS. B. LAB + LETO: control rats treated with LAB. C. OLETF: OLETF rats treated with PBS. D. LAB + OLETF: OLETF rats treated with LAB.  $\times 400$ .

는 높게 측정되었다 ( $P < 0.05$ ).

#### 7. OLETF 쥐에서 신피질 TGF- $\beta 1$ 발현에 대한 LAB의 효과

LETO와 OLETF 쥐에서 신피질 TGF- $\beta 1$ 의 양은 ELISA 방법으로 측정하였는데, OLETF 쥐에서 증가된 신피질의 TGF- $\beta 1$ 의 발현 정도는 LAB의 투여로 억제되는 것을 관찰하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7).

#### 8. OLETF 쥐에서 신피질 collagen 형성에 대한 LAB의 효과

Massons Trichrome 염색결과, OLETF 쥐의 사구체 및 세관 사이질에 collagen의 침착이 증가된 소견을 보였다 (Fig. 8). 사구체와 세관에 대한 반정량적 분석 결과는 Table 2에 요약하였다. LAB를 투여한 후 신피질에서 collagen의 축적을 효과적으로 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

#### 9. OLETF 쥐에서 LAB의 신장에서 대식세포 침착에 대한 효과

OLETF 쥐에서 ED-1에 대한 면역조직화학적 염색결과, 사구체 및 세관 사이질 내에서 대식세포의 증가가 관찰되었고, LAB 투여한 OLETF 쥐에서 이러한 ED-1 양성 대식세포는 통계학적으로 유의하게 감소한 것을 알 수 있었다 (Fig. 9, Table 2).

### 고찰

본 저자들은 사구체간질 세포에 LAB를 처리한 결과 알도스 환원효소의 활성도와 fibronectin 침착의 감소를 보고한 바 있다<sup>9)</sup>. 또한, 스트렙토조토신으로 유도한 제1형 당뇨병 동물모델에서는 고혈당으로 인해 ROS 생성이 증가하게 되고 이러한 산화성 스트레스가 신피질의 사구체간질 세포에서 PKC의 활성화, TGF- $\beta$  및 fibronectin을 분비하여 세포의 기질이 축적되는데, LAB의 투여로 인해 이러한 일련의 과정이 호전되는 양상을 나타내어 당뇨병성신증의 발생을 예방하는 데 효과적임을 보고한 바가 있다<sup>10)</sup>. 이전의 많은 *in vivo* 연구 결과들에서도 산화성 스트레스로 인해 임상적으로 당뇨병 합병증이 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>.

본 연구에서는 제2형 당뇨병 동물모델인 OLETF 쥐를 이용하여 LAB의 당뇨병성신증에 대한 효과를 규명하고자 하였다. 본 저자들은 당뇨병이 발생하기 전단계인 10주령부터 LAB를 투여하였는데, LAB는 체중감소나 혈당강하 효과는 나타내지 않았다. 따라서, LAB는 섭식 및 당대사에는 개선의 효과는 없는 것으로 판단된다.

당뇨병성신증의 표지인자인 단백뇨는 50주령 OLETF 쥐에서 뚜렷하게 관찰되는데, 이러한 단백뇨는 40주 동안의 LAB 투여로 인해 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 또한, 당뇨병성신증으로 인한 사구체 과여과로 인해 OLETF 쥐의 경우 신장의 무게가 LETO 쥐에 비해 증가하였는데,



이는 체중으로 보정하여도 유의한 차이를 보였다. 이러한 신장의 무게가 LAB의 투여로 유의하게 감소하는 조건을 보여 LAB가 사구체 과여과의 감소 효과를 나타냄을 알 수 있다. 이러한 상기 결과들은 혈당이 높은 경우에도 당뇨병 성신증에 대한 보호효과를 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

여태까지 알려진 바에 의하면, 고혈당에 의해 유발되는 비효소적 당화와 당산화 반응을 통한 AGE 생성의 증가<sup>16,17)</sup>, 알도스 환원효소에 의한 소르비톨의 축적에 의한 폴리올 경로의 활성화<sup>18,19)</sup>, 헥소사민(hexosamine) 경로의 활성화를 통한 protein kinase C (PKC) 활성화<sup>20,21)</sup> 및 산화스트레스의 증가는 당뇨병성 신증의 발생에 중요한 기전이다. 알도스 환원효소는 비가역적으로 포도당을 소르비톨로 전환시켜 세포의 산화환원전위(redox potential)로 변화되어 세포손상을 일으키며, NADPH oxidase를 통한 ROS의 생성을 일으키게 되므로 알도스 환원효소의 활성화는 당뇨병성 신증과 밀접한 연관관계가 있다. 이렇게 고혈당으로 유도된 미토콘드리아의 ROS 과다생성은 당뇨병성 합병증의 발생기전에 있어 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. ROS 생성으로 증가된 산화 스트레스는 PKC, mitogen-activated protein kinases (MAP kinase), JAK/STAT 경로를 통한 NF- $\kappa$ B, AP-1 등의 전사인자 활성화에 의해 TGF- $\beta$ 1과 세포의 기질 상층을 증가시키게 된다<sup>22)</sup>. 이전에 본 연구자들은 LAB가 사구체간질 세포에서 알도스 환원효소의 활성화를 억제시키는 현상과 LAB에 의해 PKC의 활성화가 억제되는 것을 발견하였다<sup>10)</sup>. 하지만, 고혈당으로 인해서도 ROS가 증가하지만, 지방산의 증가에 의해서도 ROS가 증가하게 되고 이러한 ROS의 증가가 PKC를 포함한 여러가지 신호 전달에 의해 TGF- $\beta$ 를 증가시키게 되어 결국 세포외 기질의 생성을 촉진시킬 수 있다.

본 실험의 결과에서, OLETF 쥐에서 혈중 총 콜레스테롤과 유리지방산이 LETO 쥐에 비해 상당히 높게 관찰되었으나 LAB의 투여로 인해 통계학적으로 유의하게 감소되었는데, 이러한 유리지방산의 감소가 결국 산화성 스트레스의 감소를 일으키게 되고 이로 인해 ROS 생성이 감소되면서 결국 당뇨병성 신증의 호전을 일으켰을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 본 연구에서 산화성 스트레스는 신피질에서 LPO 생성을 반영하는 MDA로 평가하였는데, OLETF 쥐의 신피질에 존재하는 MDA는 LETO 쥐에 비하여 높게 나타났고, OLETF 쥐에 LAB를 투여한 경우 MDA가 감소하는 조건을 보여 LPO 생성이 감소한 것을 알 수 있었다.

대식세포는 사구체질환의 급성형태에서 주로 볼 수 있는 중요한 세포이지만 이들 세포는 수많은 사이토카인과 성장인자를 분비하여 사구체간질 세포의 증식을 자극하거나 사구체경화증을 유도하는 데도 관여한다<sup>23~28)</sup>. 대식세포는 ED-1에 대한 면역세포화학 염색에 의해 관찰되었듯이 OLETF 쥐의 신피질에서 사구체와 세관사이질 내에서 증가

되어 있다. LAB 투여가 OLETF 쥐에서 ED-1 양성세포를 효과적으로 감소시키는 것으로 볼 때, LAB는 신피질에서 대식세포의 침착의 억제효과를 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 대식세포의 침착이 감소하면서 당뇨병성신증에 관여하는 사이토카인과 성장인자 분비를 감소시켜 당뇨병성 신증에 대한 예방효과를 나타내는 것으로 생각된다.

이러한 관점에서 당뇨병성신증에는 고혈당 그 자체로 인한 여러가지 경로의 활성이 중요하지만, 다른 경로를 통한 산화성 스트레스 역시 중요한 역할을 할 것으로 생각해 볼 수 있다. 즉, 본 실험에서 LAB의 당뇨병성신증의 개선 효과는 지방산의 증가를 억제함으로써 산화성 스트레스를 감소시키고 또한 대식세포의 침착을 억제함으로써 결국 TGF- $\beta$ 1, 사구체비후 및 세포외 기질의 감소를 일으켜 당뇨병성신증의 예방에 기여한 것으로 사료된다.

고혈당과 마찬가지로 유리지방산의 증가는 인슐린저항성과 베타세포 기능장애와 밀접한 연관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 유리지방산의 증가는 또한 ROS를 형성하는 데도 관여하므로, 산화적 스트레스와 유리지방산은 당뇨병의 만성합병증에 관련되고 따라서 중요한 원인이 된다고 할 수 있다. 당뇨병 상태에서는 혈중 포도당 농도뿐만 아니라 혈중 유리지방산의 농도가 증가되어 있으며 지질대사의 이상이 당뇨병성 신증에서 관찰되는 사구체 경화증의 병태생리에 중요한 역할을 할 것이라는 보고들이 증가하고 있는데, 이는 자연발생적 사구체 경화증이 동반되는 실험동물인 Zucker rat에서도 잘 증명되고 있다<sup>29)</sup>. 병리학적으로 사구체 경화증의 초기병변은 죽상경화증의 초기병변과 매우 유사하며, 두 가지 질환에서 혈관의 내피세포의 손상이 초기병변의 기본이 된다는 공통점을 가지고 있다. 죽상경화증에서의 세포손상의 기전이 지질과산화 현상에 의할 것이라는 것은 잘 알려져 있으나, 지질산화의 증가가 죽상경화증이나 사구체 경화증의 발생에 있어서 세포손상에 어떠한 영향을 미치는가에 관하여는 아직은 잘 알려져 있지 않다. LAB는 총 콜레스테롤과 유리지방산을 감소시키고, 또한 이러한 고지질혈증은 신손상을 유발하는 것으로 알려져 있어 총 콜레스테롤 및 유리지방산의 감소는 당뇨병성신증의 진행에 대한 LAB의 예방효과에 부분적으로 기여하는 것으로 사료된다. LAB가 총콜레스테롤과 유리지방산을 감소시키는 기전은 정확하게 설명하기는 어려우나 아마도 LAB가 지질대사의 효소 활성과 관련된 ROS 생성이나 알도스 환원효소 억제에 영향을 미치기 때문으로 생각된다. 향후에는 이에 관련된 정확한 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 LAB는 세포독성을 나타내지는 않았다. 따라서, 본 실험에서 사용한 LAB의 용량은 안전하다고 할 수 있지만 다른 장기나 기능에 영향을 미치는지 여부에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, LAB는 당대사에는 영향을 미치지 않지만

LPO 생성을 감소시킴으로써 신보호 효과를 나타낸다고 할 수 있다. 즉, OLETF 쥐에서 당뇨병성 신손상에 대한 LAB의 효과는 산화성 스트레스의 감소 기전에 기인한 것으로 생각할 수 있다. 이러한 효과는 LAB의 투여로 OLETF 쥐에서 유리지방산의 감소, ROS 생성의 감소, 대식세포의 감소 및 알도스 환원효소 활성화 억제를 통해 신기능을 향상시키는 데 기여한다고 사료된다. LAB는 제1형 당뇨병에서 뿐만 아니라 제2형 당뇨병에서도 당뇨병성신증의 새로운 치료약제로 사용되어 질 수 있겠다. LAB의 당뇨병성신증 모델에서의 예방효과는 당뇨병성 합병증의 치료에 있어 *S. miltiorrhizae* radix의 전통적인 사용에 대한 과학적인 증거를 제시하고 있다.

### 요 약

연구배경: Magnesium lithospermate B (LAB)는 *Salvia miltiorrhizae*에서 추출한 활성화된 성분으로 제1형 당뇨병 동물모델에서 신보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 목적은 제2형 당뇨병의 동물모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐에서 LAB의 당뇨병성신증 예방에 대한 효과를 규명하고자 하였다.

방법: 10주령 수컷 OLETF 쥐와 LETO 쥐에 40주 동안 10 ug/kg 용량의 LAB 및 Vehicle (PBS)를 경구 투여하였다. 복강내 당부하검사 및 24시간 소변내 단백량을 측정하였고, 신피질에서 LPO, TGF-β1, ED-1 발현 및 collagen 침착 정도를 평가하였다.

결과: OLETF 및 LETO 쥐의 각 그룹간에 평균 체중 변화의 차이는 없었다. OLETF 쥐에서 LAB의 투여로 혈당 강하효과는 없었지만, 총 콜레스테롤과 유리지방산의 감소를 보였다. LAB의 투여로 인한 신장에 대한 효과는 단백뇨를 감소시키고, 사구체비후 및 간질팽창을 억제시켰다. 신피질에서 LPO 생성과 TGF-β1 및 세포외기질의 팽창이 감소되었고, ED-1 양성세포를 감소시키는 효과를 나타내었다.

결론: OLETF 쥐에서 당뇨병성 신손상에 대한 LAB의 유용한 효과는 산화성 스트레스의 감소에 기인하는 것으로 생각되며, 향후 LAB는 제1형 당뇨병 뿐만 아니라 제2형 당뇨병에서 당뇨병성신증을 예방할 수 있는 새로운 약제로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 연세대학교 의과대학 2003년 교수연구비 (과제번호 8-2003-0003)와 2004년 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 (과제번호 0405-OD00-0815-0013)의 지원을 받았습니다.

### 참 고 문 헌

- Ritz E, Keller C, Bergis K, Strojek K: *Pathogenesis and course of renal disease in IDDM/IDDM: Differences and similarities. Am J Hypertens 10:S202-S7, 1997*
- Yokoyama H, Okudaira M, Otani T, Sato A, Miur J, Takaike H, Yamada H, Muto K, Uchigata Y, Ohashi Y, Iwamoto Y: *Higher incidence of diabetic nephropathy in type 2 than in type 1 diabetes in early-onset diabetes in Japan. Kidney Int 58:302-11, 2000*
- Mauer SM, Steffers MW, Ellis EN, Sutherland ED, Brown DM, Goetz FC: *Structural, functional relationships in diabetic nephropathy. J Clin Invest 74: 1143-55, 1984*
- Ziyadeh FN: *Mediators of diabetic renal disease: The case for TGF-beta as the major mediator. J Am Soc Nephrol 15(Suppl. 1):S55-7, 2004*
- Brosius FC 3rd: *Trophic factors and cytokines in early diabetic glomerulopathy. Exp Diabetes Res 4: 225-33, 2003*
- Whiteside CI, Thompson J: *The role of angiotensin-II in progressive diabetic glomerulopathy in the rat. Endocrinology 125:1932-40, 1989*
- 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*
- 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*
- 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*
- 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) 50:1135-36, 2002*
- 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
12. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-de la Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K: *Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- $\beta$  antibody in db/db diabetic mice. Proc Nat Acad Sci USA 97: 8015-20, 2000*
  13. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95:351-8, 1979*
  14. Ha H, Yoon SJ, Kim KH: *High glucose can induce lipid peroxidation in the isolated rat glomeruli. Kidney Int 46:1620-6, 1994*
  15. 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*
  16. CW Yang, H Vlassara, EP Peten, CJ He, GE Striker and LJ Striker: *Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. Proc Nat Acad Sci USA 91:9436-40, 1994*
  17. T Doi, H Vlassara, M Kirstein, Y Yamada, GE Striker and LJ Striker: *Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 89:2873-7, 1992*
  18. G Pugliese, F Pricci, F Pugliese, P Mene, L Lenti, D Andreani, G Galli, A Casini, S Bianchi, CM Rotella and U Di Mario: *Mechanisms of glucose-enhanced extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells. Diabetes 43:478-90, 1994*
  19. H Ishii, H Tada and S Isogai: *An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor- $\beta$  and protein kinase C activity in cultured human mesangial cells. Diabetologia 41: 362-4, 1998*
  20. RK Studer, PA Craven and FR DeRubertis: *Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. Diabetes 42:118-26, 1993*
  21. D Koya and GL King: *Perspectives in diabetes: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes 47:859-866, 1998*
  22. DeRubertis FR, Craven PA, Melhem MF, Salah EM: *Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. Diabetes 53:762-8, 2004*
  23. Di Mario U, Pugliese G: *15th Golgi lecture: from hyperglycaemia to the dysregulation of vascular remodeling in diabetes. Diabetologia 44:674-92, 2001*
  24. 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*
  25. 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*
  26. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I, Egido J: *Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. Kidney Int 57: 147-58, 2000*
  27. Tesch GH, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ: *Role of interleukin-1 in mesangial cell proliferation and matrix deposition in experimental mesangioproliferative nephritis. Am J Pathol 151:141-150, 1997*
  28. Diamond JR: *Macrophages and progressive renal disease in experimental hydronephrosis. Am J Kidney Di 26:133-40, 1995*
  29. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, Brabant G, Floege J: *Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. Kidney Int 57:167-8, 2000*