

원저

가시五加皮藥鍼이 糖尿誘發抑制 및 腎臟保護活性에 미치는 영향

정중운 · 이윤호 · 강성길

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Preventive Effect on Development of Diabetes and Renoprotective Effect of *Acanthopanax Senticosus* Aqua-acupuncture in Multiple Low-dose Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Chung Chong-un, Lee Yun-ho and Kang Sung-keel

Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine Kyung-Hee University

Objective : The aim of the study was to investigate the preventive effect on the development of diabetes and the renoprotective effect of *Acanthopanax senticosus*(AS) aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) of the multiple low-dose streptozotocin(STZ)-induced diabetic rats.

Methods : The experimental animals were divided into 4 groups : normal group of rats, control group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats, NSAA group with 0.4ml normal saline(NS) aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats, and ASAA group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats. Each of AS and NS aqua-acupuncture was done subcutaneously into both loci of Sinsu taking turns everyday for 3 weeks. Thereafter the levels of serum glucose, body weight, index of kidney hypertrophy, urine glucose, urinary albumin excretion, creatinine clearance, mesangial cell and TGF- β 1 expression in glomeruli and tubular cells were measured on the determined day.

- 접수 : 2003년 3월 22일 · 수정 : 2003년 4월 5일 · 채택 : 2003년 5월 17일
· 교신저자 : 강성길, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 02-958-9193 E-mail : kskacu@orgio.net

Conclusions :

1. Both ASAA and NSAA groups decreased the serum glucose levels in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats as compared to the control group, and ASAA group showed more significant decreases than NSAA group.
2. Both ASAA and NSAA groups prevented the development of diabetes in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats as compared to the control group, and ASAA group prevented more markedly the development of diabetes than NSAA group.
3. Both ASAA and NSAA groups prevented the reduction of body weight in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats as compared to the control group, and ASAA group showed the same as the normal group.
4. Both ASAA and NSAA groups did not show any changes of the creatinine clearance in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats.
5. Both ASAA and NSAA groups prevented the excretion of urinary glucose and albumin in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats as compared to the control group, and ASAA group showed more significant prevention than NSAA group.
6. Both ASAA and NSAA groups prevented the expansion of glomerular mesangial cells and the protein expression of transforming growth factor- β 1 in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats as compared to the control group, and ASAA group prevented more significantly than NSAA group.

Key words : *Acanthopanax senticosus*, diabetes, aqua-acupuncture, mesangial cell, TGF- β 1, STZ.

I. 緒 論

당뇨병은 高血糖 상태를 나타내는 여러 질환을 말하는 것으로 이것의 병태생리는 매우 다양하지만 일반적으로 인슐린 분비의 절대적 또는 상대적 부족이나 인슐린 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과 감소로 인하여 발생하는 고혈당 및 이에 수반되는 대사 장애가 장기간 지속되는 질환이다¹⁾. 당뇨에 의한 대사 장애의 장기간의 지속은 급성 또는 만성 합병증을 발생하게 되며 당뇨병성 腎臟病證의 특징은 사구체의 경화와 세뇨관의 肥厚가 나타나 신장의 크기가 커지게 되며 血中 creatinine은 신피질 간질의 섬유화에 비례하여 높아지고, laminin B1 및 TGF- β 1의 발현이 높아진다²⁾.

한의학에서 당뇨병은 消渴에 해당된다고 하여, 韓藥, 鍼, 灸, 電鍼, 藥鍼 및 laser鍼을 이용한 당뇨에 미치는 실험 연구가 보고되고 있다³⁾. 특히 藥鍼연구로는 이⁴⁾와 문⁵⁾은 人蔘을, 김⁶⁾은 白蔘 및 紅蔘을, 이⁷⁾는 地骨皮를, 이⁸⁾는 가시五加皮를, 유⁹⁾는 紫河車藥鍼液을 실험동물에 藥鍼하여 高血糖을 조절하는 효과가 있음을 보고하였다.

가시五加皮(*Acanthopanax senticosus*)는 強壯, 強精, 神經痛, 中風, 당뇨 등에 사용되고 있으며, 임상에서는 補腎安神, 益氣健脾의 효능이 있어 風濕痺痛, 腰膝軟弱, 小便頻數, 불면, 무기력 및 식욕부진 등에 널리 활용되고 있다. 또한 Brekhmann 등은 ad aptogenic activity가 있다고 보고하였으며, 최근 면역계의 기능조절, 항알러지, 항산화 및 지방대사조절 효과가 있다고 하였다^{10),11)}.

腎俞(BL23)는 腎의 背俞穴로 腎臟炎, 虛勞, 眩暈,

水腫, 腰痛, 消渴, 尿頻, 尿貯留 및 利水 등에 활용되며 腎臟질환 및 당뇨병에 중요한 경혈이다^{12)~14)}.

이상과 같은 보고를 토대로 가시五加皮藥鍼이 糖尿誘發抑制 및 腎臟保護活性에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SD rat에 multiple low-dose streptozotocin(STZ)으로 高血糖을 유발시킴과 동시에 가시五加皮藥鍼液을 腎俞(BL23)에 일정한 방법으로 藥鍼하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 동물 및 재료

1) 동물

(주)대한바이오링크(충북 음성, 대한민국)로부터 구입한 4주령의 수컷 SD rat로 습도 50%, 온도 24~26℃로 유지되는 동물사육장에서 1주간 적응시킨 5주령의 rat를 사용하였으며 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다.

2) 시약 및 기기

Trinder glucose 측정 kit, creatinine 측정 kit, STZ, Tris-HCl, SDS는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. BUN 측정 kit 및 urine albumin 측정을 위한 albustrate 용액은 영동제약(서울, 대한민국)에서 구입하였고 그외 다른 시약은 특급 또는 일급을 사용하였다. 실험에 사용한 기기 및 모델명은 다음과 같다. Homogenizer(Mazala A-1100, EYELA, Japan), microcentrifuge(5417R, Eppendorf, Germany), UV Spectrophotometer(U-3210, Hitachi, Japan), electrophoresis system(Mini-Pro-tean 3 cell, Bio-Rad, USA), light microscope(ULWCD 0.30, Olympus, Japan), freezing dryer

(E20, Eyela, Japan).

3) 재료

(1) 약물

전라북도 장수지방에서 재배되고 있는 가시五加皮(Acanthopanax senticosus, 이하 AS)를 중앙대학교 인삼산업연구센터에서 공급받아 사용하였다.

(2) 藥鍼注入器

1.0ml의 약침주입기(주사침 26 gauge, 녹십자의료공업사, 한국)를 사용하였다.

2. 방법

1) 藥鍼液의 조제

陰乾하여 잘 말린 200g의 가시五加皮를 끓는 물로 10시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman type 2)로 여과한 것을 감압 건조한 후 freezing dryer로 동결 건조시켜 얻은 분말(yield : 22%)을 normal saline으로 20%의 가시五加皮藥鍼液을 만들어 사용하였다¹⁵⁾.

2) 取穴

인체와 상응하는 부위의 腎俞(BL23)를 骨度分寸에 의거하여 취혈하였다¹²⁾.

3) 실험군 설정

각 군에 실험동물을 8마리씩 배정하고, 실험실에서 1주간 적응시킨 후 하루를 절식시킨 5주령 SD rat에 STZ(10mM citrate buffer, pH 4.5에 녹임) 20mg/kg을 복강으로 매일 총 5일간 투여하였으며(multiple low-dose STZ-induced diabetes)¹⁶⁾ 각 실험군의 처치는 STZ 투여와 동시에 가시五加皮 혹은 생리식염수를 일정한 방법으로 藥鍼하였다.

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치를 하지 않은 군
- ② 대조군(Control) : 5일간 STZ 20 mg/kg을 복

강내 주사하여 糖尿誘發時 다른 처치를 하지 않은 群

③ 생리식염수藥鍼群(NSAA) : STZ 糖尿誘發과 동시에 腎俞(BL23)에 1일 1회 3주간 좌우혈을 번갈아가며 생리식염수 0.4ml씩 皮下로 약침한 群

④ 가시五加皮藥鍼群(ASAA) : STZ 糖尿誘發과 동시에 腎俞(BL23)에 1일 1회 3주간 좌우穴을 번갈아가며 20% 가시五加皮藥鍼液 0.4ml씩 皮下로 약침한 群

4) 혈액지표 분석

혈액지표 분석을 위한 혈액 채취는 안와 정맥을 통해 채혈하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 얻어진 혈장을 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose oxidase method(Trinder method)¹⁷⁾를 이용하여 측정하였고, 혈중 creatinine은 creatinine 측정 kit를 사용하여 측정하였다.

5) 체중 및 腎臟肥大지표 분석

체중은 3~4일마다 한번씩 측정하였고, 腎臟의 무게는 7일마다 측정하였다. 腎臟肥大지표를 알아보기 위하여 體重 대비 腎臟무게의 비율을 7일 간격으로 다음과 같이 산정하였다.

$$[\text{腎臟肥大지표}(\%)] = \text{腎臟무게} / \text{체중}(\text{g}) \times 100$$

6) 尿지표 분석

본 실험에서는 metabolic cage에서 24시간 동안 얻어진 尿를 사용하여 尿지표를 분석하였다. 尿糖은 尿를 20배 희석한 후 glucose oxidase method(Trinder method)¹⁷⁾를 이용하여 측정하였으며, 尿中 albumin 배설량은 albustrate 용액을 사용하여 측정하였다.

7) Creatinine clearance 측정과 glomerular filtrate rate(GFR)

尿中 creatinine은 20배 희석한 후 creatinine 측

정 kit를 사용하여 측정하였다. 실험기간 중의 GFR (ml/24h)은 공식($Uc \times V$)/Pc에 따라 계산하였다(Uc : urinary creatinine concentration, V : 24시간 뇨량, Pc : plasma creatinine concentration)¹⁸⁾.

8) PAS staining

고정액에 고정된 신장 조직을 탈수시킨 후 파라핀을 침투시켜 굳힌 다음 5 micron으로 박절하여 silicone으로 coating된 슬라이드에 붙였다. 염색을 하기 위해 슬라이드를 수화(hydration)시킨 후 periodic acid와 hematoxylin 염색을 순서대로 시행하였다. 염색된 슬라이드를 dehydration시킨 후 mounting하여 morphology를 관찰하였고 mesangial area를 측정하였다^{19),20)}.

9) Western blot

신장조직에서 TGF- β 1 단백질의 발현을 살펴보기 위해 근육조직을 ice-cold lysis buffer(250mM sucrose, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1% protease inhibitor mixture, pH7.4)로 균질화한 후, 10,000g에서 20분 동안 원심분리하였다. 상등액을 150,000g에서 60분 동안 초원심분리한 후, 침전물인 total post-nuclear membranes를 lysis buffer와 동량의 RIPA buffer(50mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, pH7.4)에 용해시켰다. 100,000g에서 60분 동안 다시 초원심분리한 후, 상등액인 total muscle protein extract를 얻어 Lowry method¹⁵⁾에 의해 protein 정량을 한 후 western blot에 사용하였다.

Protein sample(10 μ g)을 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하고 nitrocellulose membrane(Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, England)에 transfer하였다. Blot을 5% nonfat dry milk로 blocking한 후 primary antibody에 3시간

동안 incubation하였고 다시 1시간 동안 secondary antibody와 incubation하였다. Enhanced chemiluminescence system(Pierce, Rockford, U.S.A)으로 peroxidase의 luminescence detection을 실시하여 얻어진 immunoreactive protein의 상대량을 GS-700 imaging densitometer를 이용하여 분석하였다²¹⁾.

본 실험에 사용된 antibody의 종류는 다음과 같다.

TGF-β1 : primary antibody ; rabbit polyclonal IgG(Santa Cruz, U.S.A), secondary antibody ; Goat anti-Rabbit IgG(H+L) HRP-conjugate (ZYMED, U.S.A)

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS Window program(Ver. 7.0)을 이용하였으며, 측정값은 평균값±표준오차(mean ±standard error)로 나타내었고, 유의성 판정은 p < 0.05로 하였다. 각 실험군간의 통계학적 분석은 A NOVA와 Duncan's multiple range test 검정을 실시하였다.

Ⅲ. 成 積

1. 혈중 glucose 농도에 미치는 영향

혈중 glucose농도는 제7일에 대조군은 411±27.6 mg/dl로 상승하여 당뇨가 유발되었으며, 생리식염수藥群은 254±37.7mg/dl로 대조군과 유의한(p < 0.05) 차이를 나타내었고, 가시五加皮藥群은 171±20.5mg/dl를 나타내어 대조군 및 생리식염수藥群에 비하여 유의한(p < 0.05) 차이가 있었다. 제14일에도 대조군은 387±22.0mg/dl, 생리식염수藥群은 323±23.5mg/dl, 가시五加皮藥群은 233±22.5mg/dl로 각각 유의한(p < 0.05) 차이를 나타내었으나 가시五加皮藥群이 대조군 및 생리식염수藥群에 비하여 혈당강하활성이 높았다. 제21일에는 대조군이 428±16.7mg/dl, 생리식염수藥群이 361±41.2mg/dl, 가시五加皮藥群이 234±43.5mg/dl로 각각 유의한(p < 0.05) 차이를 나타내어 가시五加皮藥群은 대조군 및 생리식염수藥群에 비하여 제21일까지 혈당강하활성이 높게 나타났다<Table I>.

Table I. Effects of Sinsu AS Aqua-acupuncture on the Serum Glucose in Multiple Low-dose STZ-Induced Diabetic Rats

Groups	Serum glucose (mg/dl)					
	1st day	4th day	7th day	11th day	14th day	21st day
Normal	131±2.3 ^a	150±3.5 ^a	146±5.1 ^a	121±8.7 ^a	156±7.4 ^a	143±11.5 ^a
Control	132±5.4 ^a	226±19.8 ^b	411±27.6 ^b	405±40.5 ^b	387±22.0 ^b	428±16.7 ^b
NSAA	137±8.5 ^a	231±14.1 ^b	254±37.7 ^c	310±37.6 ^c	323±23.5 ^c	361±41.2 ^c
ASAA	128±4.6 ^a	136±12.5 ^a	171±20.5 ^d	197±33.5 ^d	233±22.5 ^d	234±43.5 ^d

Data are mean±SEM of serum glucose of eight animals examined. The means with the same letter in each day is not significantly different(Duncan's multiple range test, a=0.05).

AS ; Acanthopanax senticosus, STZ ; streptozotocin

Normal ; normal group

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

2. 당뇨유발 억제에 미치는 영향

당뇨유발은 대조군에서 제4일까지 8마리 중 2마리(25%)가, 제7일에는 8마리 모두(100%)에서 당뇨가 유발되었다. 생리식염수藥鍼群은 제4일에 8마리 중 1마리(15%)에서 당뇨가 유발되었으며, 제7일에 50%, 제11일에 80%의 비율로 당뇨가 유발되었다. 가시五加皮藥鍼群은 제7일까지 당뇨가 유발되지 않다가 제11일에 25%, 제14일에 50%에서 당뇨가 유발되었으나 제21일까지 50%이상 당뇨가 유발되지 않았다(Figure 1).

3. 체중 감소에 미치는 영향

체중은 제21일에 대조군이 128g으로 정상군과 유의한 차이를 나타내어 체중감소를 나타내었다. 가시五加皮藥鍼群은 제21일에 163g, 생리식염수藥鍼群은 166g으로 대조군에 비하여 각각 유의한($p < 0.05$)

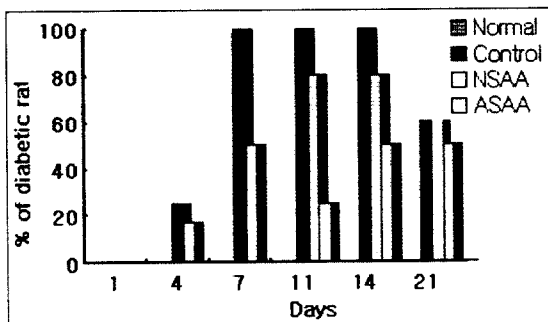


Figure 1. Effects of AS acupuncture on the development of diabetes in multiple low-dose STZ-induced SD rats.

Values are percentages of diabetic rats.

Normal ; normal group(open bar)

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

차이를 나타내어 체중 감소가 억제되었다(Figure 2).

4. 腎臟肥大지표에 미치는 영향

體重대비 腎臟 무게의 비율을 7일 간격으로 측정 한 결과, 제7일부터 대조군은 정상군에 비해 腎臟肥大가 나타나기 시작하였으며, 제14일 및 21일에는 110% 및 160%로 腎臟肥大지표의 유의한($p < 0.05$) 상승을 보였다. 제7일 및 14일에서 가시五加皮藥鍼群과 생리식염수藥鍼群은 정상군과 유의한 차이가 없었다. 제21일에 생리식염수藥鍼群은 대조군에 비해서 腎臟肥大지표가 17% 감소하였고, 가시五加皮藥鍼群은 대조군에 비해 34%의 유의한($p < 0.05$) 腎臟肥大抑制活性을 보였고 정상군과는 유의한 차이가 없었다 <Table II>.

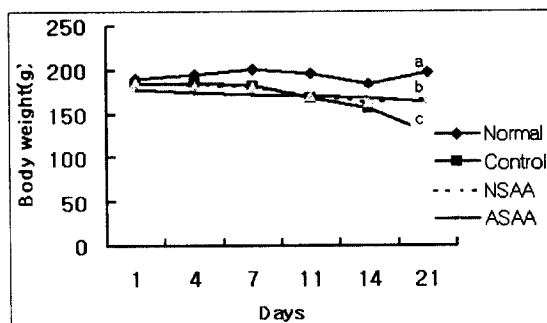


Figure 2. Changes of body weight in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats. Values are the mean \pm SEM of body weight of eight animals examined. The means with the same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, $\alpha = 0.05$).

Normal ; normal group

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

Table II. Effects of Sinsu AS Aqua-acupuncture on the Ratio of Kidney to Body Weight in Multiple Low-dose STZ-Induced Diabetic Rats

Groups	Body weight (g)	Kidney weight(g)	Kidney/Body weight(%)
7th day(n=2)			
Normal	197.5±11.5	0.88±0.03	0.45±0.01 ^a
Control	193.5±0.5	1.07±0.05	0.55±0.02 ^b
NSAA	187.3±0.0	0.85±0.00	0.45±0.00 ^a
ASAA	172.5±0.0	0.73±0.00	0.42±0.00 ^a
14th day(n=2)			
Normal	187.5±4.9	0.91±0.07	0.48±0.02 ^a
Control	158.9±10.0	0.87±0.09	0.54±0.02 ^b
NSAA	155.5±3.4	0.78±0.10	0.50±0.05 ^a
ASAA	163.8±3.2	0.81±0.02	0.49±0.00 ^a
21st day(n=2)			
Normal	211.1±7.2	0.95±0.04	0.45±0.03 ^a
Control	120.3±18.6	0.87±0.16	0.72±0.02 ^b
NSAA	176.0±2.0	1.06±0.01 [*]	0.60±0.00 ^c
ASAA	163.4±8.9	0.78±0.01	0.48±0.01 ^a

Data are mean±SEM. The means with the same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, a=0.05).

Normal ; normal group

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

5. 尿糖에 미치는 영향

尿糖은 대조군에서 제14일 및 21일에 각각 4.9 및 4.0g/24hrs를 나타내었고 생리식염수藥群은 2.5 및 2.1g/24hrs로 대조군에 비해 약 50%의 尿糖을 나타내었으나 가시五加皮藥群은 각각 0.5 및 0.6g/24hrs로 생리식염수藥群에 비해 각각 약 20% 및 29%의 尿糖을 나타내었다(Figure 3).

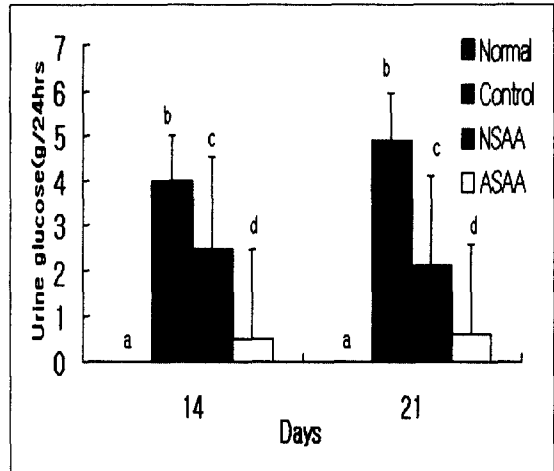


Figure 3. Changes of urine glucose in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats. Values are the mean±SEM of urine glucose of eight animals examined. The means with the same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, a=0.05)

Normal ; normal group (open bar)

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

6. 尿中 albumin 배설량에 미치는 영향

尿中 albumin은 제14일에 대조군은 정상군에 비해 40.85±8.51mg/24hrs로 증가하였으나 생리식염수藥群은 32.05±14.01 mg/24hrs로 정상군에 비해 유의하게(p<0.05) 감소하였고, 가시五加皮藥群은 24.32±8.84mg/24hrs로 정상군과 같이 유의하게(p<0.05) 회복되었다. 제21일에도 제14일에서와 같은 양상의 유의한(p<0.05) 차이가 나타나 尿中 albumin의 감소를 나타내었다(Table III).

Table III. Effects of Sinsu AS Aqua-acupuncture on Urinary Albumin Excretion in Multiple Low-dose STZ-Induced Diabetic Rats

Groups	Urinary albumin mg/24 hrs	
	14th day	21st day
Normal	16.85±4.42 ^a	13.98±3.37 ^a
Control	40.85±8.51 ^b	67.37±13.01 ^b
NSAA	32.05±14.01 ^c	33.09±2.85 ^c
ASAA	24.32±8.84 ^a	16.38±6.32 ^a

Data are mean±SEM. The means with the same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, a=0.05).

Normal ; normal group

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

7. 혈중 creatinine 및 creatinine clearance에 미치는 영향

Creatinine clearance는 제14일에는 대조군이 178.65±155.47ml/24hrs 였으며 생리식염수藥鍼群과 가시五加皮藥鍼群은 각각 110±48.56 및 104±44.14ml/24hrs로 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. 제21일에도 생리식염수藥鍼群과 가시五加皮藥鍼群은 각각 35.03±7.17 및 25.36±7.49ml/24hrs로 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다<Table IV>.

8. Mesangial cell expansion에 미치는 영향

Mesangial cell expansion을 densitometry로 측정한 결과 대조군은 정상군에 비해 2.5배(0.06 vs 0.15)의 mesangial cell hyperplasia가 일어났고 생리식염수藥鍼群은 2배(0.06 vs 0.12)의 변화를 보였으며, 가시五加皮藥鍼群은 정상군과 유의한 차이가 나타나지 않았다<Table V>.

Table IV. Effects of Sinsu AS Aqua-acupuncture on Creatinine Clearance in Multiple Low-dose STZ-Induced Diabetic Rats

Groups	Creatinine clearance ml/24 hrs	
	14th day	21st day
Normal	45.0±9.42 ^a	30.24±12.91 ^a
Control	178.68±155.47 ^a	110.40±48.56 ^a
NSAA	110±48.56 ^a	35.03±7.17 ^a
ASAA	104±44.14 ^a	25.36±7.49 ^a

Data are mean±SEM. The means with the same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, a=0.05).

Normal ; normal group

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

Table V. Changes in Mesangial Matrix Fraction after Periodic Acid Schiff Staining of Kidney in Multiple Low-dose STZ-Induced Diabetic Rats

Groups	Mesangial matrix fraction
Normal	0.06±0.02 ^a
Control	0.15±0.02 ^b
NSAA	0.12±0.02 ^c
ASAA	0.08±0.01 ^a

Data are mean±SEM. The means with the same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, a=0.05).

Normal ; normal group

Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

대조군 및 생리식염수藥鍼群은 정상군에 비해 사구체내 dark pink로 염색된 mesangial cell이 많이 보이는 반면 가시五加皮藥鍼群은 정상군과 유의한 차이를 보이지 않았다<Figure 4>.

9. Western blot

腎臟조직내 TGF-β1 단백질의 발현은 대조군 및 생리식염수 藥鍼群에서 각각 정상군에 비해 증가되었으나, 가시五加皮藥鍼群에서는 대조군 및 생리식염수藥鍼群에 비해 감소하였다<Figure 5>.

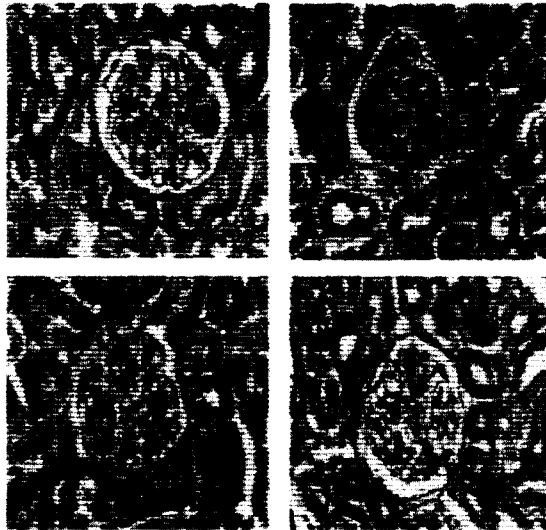


Figure 4. Representative photograph of mesangial matrix area after periodic acid schiff(PAS) staining of kidney in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

- A : Normal ; normal group
- B : Contro l ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats
- C : NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats
- D : ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats



Figure 5. Photographic expression of TGF-β1 protein in kidney of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

Normal ; normal group
Control ; group of multiple low-dose STZ-induced diabetic rats.

NSAA ; group with 0.4ml normal saline aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

ASAA ; group with 0.4ml of 20% AS aqua-acupunctured subcutaneously into Sinsu(BL23) in multiple low-dose STZ-induced diabetic rats

IV. 考 察

糖尿病은 高血糖 및 이에 수반되는 代謝障碍를 특징으로 하는 疾患群으로 인슐린의 절대적인 양이 적거나 혹은 insulin이 분비되나 생리작용이 충실하지 못해 尿 중에 glucose가 검출되는 현상을 말한다¹⁾. 당뇨병은 이환기간이 길어짐에 따라 腎臟질환 및 뇌허혈 질환, 심장질환 등의 동맥경화성 혈관질환의 합병증을 일으키게 되는데 糖尿病性 腎症은 당뇨병 환자에게 있어 중요한 사망 원인이 된다.

糖尿病性腎症은 腎臟에서 발생하는 모든 病變을 포함하는데, 주로 사구체 병변으로서 조직학적으로는 결절성 또는 미만성 사구체 경화가 나타나고 세뇨관 및 간질의 변화를 관찰할 수 있으며 경증의 무증상 단백뇨, 신증후군, 진행성 신부전증 그리고 고혈압 등 다양한 임상징후를 보인다^{22),23)}. 糖尿病性 腎症의 위험인자로는 당뇨병의 유병기간, 불량한 혈당 조절, 고혈압, 신동맥내 혈류 역동학적 변화, 비효소

적인 당화, polyp 대사, 산화성 스트레스, TGF- β 1, 유전적 감수성을 들 수 있다²⁴⁾. 한편 조직학적 특징은 사구체 간질세포의 증식과 세포외 기질의 축적으로 인한 사구체 경화증과 세뇨관의 肥厚로 인한 腎臟의 肥大이다. 사구체 간질(mesangium)은 족세포와 더불어 모세혈관의 지주 역할을 할 뿐만 아니라 면역 복합체나 여러 거대분자의 포식작용을 하는 것으로 알려져 있다^{21,24)}.

당뇨병은 口渴, 多飲, 多食, 多尿 등의 諸症狀을 보이므로 한의학의 消渴病에 해당된다고 할 수 있는데 원인은 黃帝內經 陰陽別論에 「二陽結 謂之消」로 기술된 이래 燥·熱·火로 보았다. 이후 역대 문헌에 鬲消, 風消, 高消, 肺消, 腎消, 焦消, 上消, 中消, 消中, 下消 등의 명칭으로 기록되었으나 최근에는 주로 上·中·下消로 분류되며, 上消는 渴而多飲, 口乾, 舌赤脣紅, 煩渴太多하고, 中消는 消穀善飢, 瘦瘠, 변비가 있고, 下消는 小便이 頻數하고 濁하여 기름같고 끈끈하며 달아 糖尿病으로 인한 腎症의 증상을 消渴의 병발증으로 인식하고 있다²⁵⁾.

당뇨병에 대한 鍼, 灸, 電鍼, 藥鍼 및 lazer침 치료에 관한 근래의 연구를 살펴보면, 당뇨병 환자에게 침과 뜸을 같이 사용한 보고¹⁴⁾와 저주파 電鍼으로 유의한 결과를 얻었다는 보고가²⁶⁾ 있다. 腎症候群 및 당뇨병 환자에게 腎俞에 灸치료만으로 호전을 보였고²⁷⁾, 鍼灸治療로 지질대사를 조절하여 당뇨환자의 혈관벽의 변화를 개선시켰고²⁷⁾, 五加皮²⁸⁾, 黃芪²⁹⁾, 香丹注射液³⁰⁾ 등을 靜脈滴注하여 각각 蛋白尿의 배설율을 감소시키고, 혈장과 尿에서의 皮내세포를 감소시켜 皮내세포를 보호하여 腎臟기능을 유지시켰다는 보고도 있다.

가시五加皮(Acanthopanax senticosus)는 두릅나무과에 속한 落葉灌木인 五加皮[Acanthopanax sessiliflorus(Rupr. et Max) Seem]의 一種으로 약 35종류가 동남아시아에 분포하고 있으며 性味는 溫, 無毒, 辛微苦하고 脾腎經에 歸經하며, 益氣健脾, 補

腎安神하는 효능이 있어 임상에서는 風濕痺痛, 腰膝軟弱, 小便頻數, 불면, 무기력, 식욕부진 등에 널리 사용되고 있다. 황³²⁾은 가시五加皮 熱水 추출물의 경구투여가 혈중 glucose, cholesterol, triglyceride를 감소시키며 rat의 수영시간을 연장한다고 보고하였고, 成³³⁾은 가시五加皮 熱水 추출물이 혈중 LDL, VLDL 농도는 감소시키고 HDL 농도를 증가시키며, 糞便을 통한 담즙산과 triglyceride 배설량의 증가 및 지방간의 개선 효과가 있음을 관찰하여 가시五加皮 熱水 추출물의 경구투여가 고지방식에 의한 비만을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다.

이상의 결과들은 가시五加皮가 항당뇨작용 및 항지질작용이 우수하고 특히, 가시五加皮 熱水 추출물의 경구투여가 혈중 glucose 농도를 감소시키며 고지방식으로 인한 비만을 억제하는 효과 및 total cholesterol과 triglyceride 농도를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

腎俞(BL23)는 腎의 背俞穴로 腎臟機能과 밀접한 관련성을 지니며, 滋補腎陰, 振氣化, 益水壯火, 培元固本, 利水滲濕의 穴性으로 腎臟炎, 虛勞, 眩暈, 水腫, 腰痛, 疎肝, 尿頻, 尿貯留, 利水 등에 상용되어 腎臟 질환의 진단과 치료에 중요한 穴位이다¹²⁾.

위와 같은 보고를 토대로 가시五加皮藥鍼의 抗糖尿와 腎臟保護活性을 알아보기 위하여 흰쥐에 streptozotocin(STZ)을 투여하여 糖尿病性腎症을 유발시키면서¹⁶⁾ 腎俞(BL23)에 가시五加皮를 藥鍼하여 혈당, 당뇨유발, 체중, 腎肥大지수, 尿糖, 尿中 albumin 배설량, 혈중 creatinine 및 BUN 농도의 변화를 관찰하고, 조직학적 염색을 통하여 mesangial cell의 expansion 및 이에 관여하는 것으로 알려진 TGF- β 1의 발현을 RT-PCR을 이용하여 당뇨유발 억제 및 腎臟보호 활성을 관찰하였다.

지속적인 고혈당은 糖尿病性腎症의 중요한 요인 중의 하나인데²⁾, 본 실험에서 STZ 20mg/kg을 5일간 투여한 대조군은 급격히 혈당이 상승하여 실험 제

7일에 411mg/dl에 이른 이후 큰 변동없이 제21일에는 428mg/dl을 나타내었다. 생리식염수藥鍼群은 제7일에 혈당이 254mg/dl를 나타냈으며 제21일에는 361mg/dl로 대조군에 비하여 유의한 차이로 혈당강하활성을 나타내었다. 가시五加皮藥鍼群은 혈당강하활성이 즉시 나타났으며 대조군 및 생리식염수藥鍼群에 비하여 실험 기간내내 유의한 차이로 혈당강하활성이 나타났다.

糖尿誘發抑制에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 STZ 糖尿誘發 제7일에 실험동물 모두(100%)에서 당뇨가 유발되었으나 생리식염수藥鍼群에서는 제4일에 15%, 제7일에 50%, 제11일에 80%의 비율로 당뇨가 유발되어 당뇨유발 억제효과를 보였으며, 가시五加皮藥鍼群은 제7일까지 당뇨가 유발되지 않다가 제11일에 25%, 제14일에 50%에서 당뇨가 유발되었으며 제21일까지 50% 이상 당뇨가 유발되지 않아 현저한 당뇨유발 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 생리식염수藥鍼群이 대조군에 비하여 유의한 혈당강하활성 및 당뇨유발 억제를 보인 것은 가시五加皮藥鍼 뿐만 아니라 腎俞 穴位の 혈당강하활성을 시사하는 것으로 보아 약침요법은 藥鍼液과 穴位の 선택을 잘 조화시키는 것이 중요하다고 사료된다.

糖尿病性腎症이 유발하게 되면, 체중의 감소와 함께 腎臟의 肥大가 나타나서 腎肥大지수(kidney weight/body weight)가 증가하게 된다^{2),24)}. 본 실험에서 대조군은 체중의 감소와 腎臟의 비대가 발생하여 腎肥大지수가 정상군에 비하여 증가하였으나 가시五加皮藥鍼群과 생리식염수藥鍼群 모두 대조군에 비하여 체중의 감소를 억제하였다. 가시五加皮藥鍼群과 생리식염수藥鍼群 이 모두 체중의 감소를 억제하였으나 腎肥大지수는 생리식염수藥鍼群이 대조군보다는 증가를 억제하는 것으로 나타났으나 정상군보다는 증가하였고, 가시五加皮藥鍼群은 정상군과 유의한 차이가 관찰되지 않아 가장 현저한 체중

감소억제 및 腎臟肥大抑制活性을 보이는 것으로 나타났다.

尿酸은 糖尿의 특징적인 소견의 하나인데^{2),24)} 생리식염수藥鍼群은 대조군에 비하여 糖尿誘發을 억제하였으며 가시五加皮藥鍼이 가장 현저한 糖尿抑制活性을 보이는 것으로 나타났다.

蛋白尿는 腎臟 사구체의 이상으로 糖尿病性腎症의 지표^{2),24)} 인데 본 실험에서 대조군은 정상군에 비하여 뚜렷한 albumin의 증가를 나타내어 상당 부분 腎臟에 문제가 있음을 시사하였으나 가시五加皮藥鍼群과 생리식염수藥鍼群에서는 대조군에 비해 albumin 배설억제활성을 보였고 특히 가시五加皮藥鍼群은 정상군과 통계적인 차이를 보이지 않아 albumin 배설을 억제하였다.

血中 creatinine 농도와 BUN은 腎臟 기능이상의 지표인데³⁴⁾ creatinine clearance에 미치는 영향을 관찰한 결과 각 실험군은 대조군에 비하여 creatinine clearance의 증가를 억제하는 경향이 있었으나 유의성은 없었다.

STZ는 심각한 高血糖을 유발하는 동시에 주로 고혈당에 기인하는 것으로 보이는 腎臟病變을 유발한다¹⁶⁾. 血中の 높은 포도당은 diacylglycerol의 de-novo synthesis를 증가시키고, 만성적으로는 단백질糖化를 촉진하기도 하여 중국에는 protein kinase C를 활성화시킨다^{22),35)}. 이로 인해 초기에는 transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)를 통한 extracellular matrix(ECM) protein 발현 증가로 사구체가 비대해지고 사구체 여과속도가 빨라지고 小蛋白尿가 나타난다³⁶⁾. STZ 투여로 尿中 albumin 배설량이 증가한 것으로 볼 때 腎臟에 병변이 나타난 것으로 사료된다. 腎臟에 병변이 나타나기 시작하면 점차적으로 腎臟肥大가 나타나는데 이는 사구체 내의 mesangial cell의 expansion이 주원인이다. 따라서 본 실험에서는 사구체내 mesangial cell을 특이하게 염색하는 PAS 염색을 실시하여 그룹간 사구

체 비대 정도를 mesangial cell expansion으로 관찰하고 densitometry로 염색성을 측정한 결과 대조군과 생리식염수藥鍼群은 정상군에 비해 두배 이상의 mesangial cell hyperplasia가 나타난 반면 가시五加皮藥鍼群은 정상군과 유의한 차이를 보이지 않아 가장 현저한 mesangial cell expansion 억제활성을 보이는 것으로 나타났다.

糖尿病性 腎臟병변의 사구체내 mesangial cell expansion의 인자 중의 하나인 TGF- β 는 세포증식과 분화, 세포외 기질의 생산과 integrin 수용체를 조절하는 등 다양한 기능을 지닌 蛋白質이다. TGF- β 는 세포외 기질단백의 유전자를 직접 상향 조절하여 단백질의 합성을 증가시키고 plasmin이나 collagen과 같은 단백 분해 효소의 생산을 억제하는 동시에 단백질 분해효소 억제인자의 합성을 증가시킴으로써 세포외 기질 단백질분해를 억제하고 세포표면의 intergrin 수용체 표현을 조절하여 새로 생산된 세포외 기질에 부착하는 것을 촉진하고 TGF- β 의 생산을 증가시켜 활동을 증폭한다²⁴⁾. 본 실험에서 TGF- β 1 단백질 발현에 대하여는 대조군은 정상군에 비하여 단백질 발현이 증가하였고 가시五加皮 및 생리식염수藥鍼群에서 TGF- β 1 단백질 발현이 감소되었다.

이상의 결과를 종합하면 腎俞에 대한 가시五加皮藥鍼은 multiple low-dose STZ 당뇨유발時 흰쥐의 혈당, 체중, 腎肥大지수, 尿糖, 尿中 albumin 배설량 등을 감소시켜 당뇨유발을 억제하였으며 腎臟조직에서 TGF- β 1의 발현을 억제하여 mesangial cell expansion을 억제하는 기전으로 腎臟보호활성이 있었다. 한편 생리식염수藥鍼群도 가시五加皮藥鍼群에 비해서 약하지만 糖尿誘發抑制 및 腎臟保護活性이 있음을 확인하였다. 따라서 당뇨병 환자에게 가시五加皮를 위시한 다양한 藥鍼제제를 적절한 經穴을 선택하여 응용할 경우 만성적인 경과로 발전할 수 있는 당뇨병의 관리 및 예방에 도움이 될 것으로 기대되며 임상활용을 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

가시五加皮藥鍼이 糖尿誘發抑制 및 腎臟保護活性에 미치는 영향을 규명하기 위해 SD rat에 multiple low-dose streptozotocin으로 高血糖을 유발시키면서 인체의 腎俞(BL23)에 상응하는 부위에 일정한 방법으로 가시五加皮藥鍼후 혈중 glucose, 당뇨유발, 체중, 腎肥大지수, 尿糖, 尿中 albumin, creatinine clearance의 변화를 관찰하고, mesangial cell expansion과 TGF- β 1의 발현양상을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

1. 가시五加皮藥鍼은 혈중 glucose의 상승을 억제하였다.
2. 가시五加皮藥鍼은 당뇨유발을 억제하였다.
3. 가시五加皮藥鍼은 체중감소를 억제하였으며 腎肥大지수를 감소시켰다.
4. 가시五加皮藥鍼은 혈중 creatinine과 creatinine clearance에 영향을 미치지 않았다.
5. 가시五加皮藥鍼은 尿糖 및 尿中 albumin 배설량의 상승을 억제하였다.
6. 가시五加皮藥鍼은 糖尿病性腎臟조직내 TGF- β 1 단백질 발현을 억제시켜 mesangial cell expansion을 억제하였다.

IV. 參考文獻

1. Susan AE, Jhon WL, Debbie EG, George A

- K, Susan PH, Jukka TS, Timo AL. Diabetes Care. 1998 ; 21 : 1637-1643.
2. 김웅진 외. 당뇨병학. 서울 : 고려의학. 1998 ; 259-265.
 3. 曹少鳴. 鍼刺. 艾灸. 鍼加灸治療糖尿病的比較研究. 中國鍼灸. 1997 ; 17(10) : 586.
 4. 이혜정, 최용태. Alloxan 糖尿病家兎에 對한 人蔘水鍼의 效果 및 Horseradish peroxidase의 軸突逆輸性에 關한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1987 ; 10 : 169-187.
 5. 문병우, 김기현. 人蔘水鍼이 糖尿白鼠의 血管收縮과 弛緩, 構造 및 血液에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1993 ; 10(1) : 353-370.
 6. 김웅시, 고희균, 강성길. 白蔘水鍼 및 紅蔘水鍼이 Alloxan糖尿病 흰쥐에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1989 ; 6(1) : 1-13.
 7. 이장재. 地骨皮 Hexane 藥鍼이 鎮痛 및 血糖變化에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 1997.
 8. 이경근, 최도영, 강성길. 가시오가피약침이 항당뇨 및 신장보호 활성에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2002 ; 19(2) : 1-13.
 9. 유진호, 최도영, 강성길. 자하거약침이 당뇨유발 흰쥐의 신장보호기능에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2002 ; 19(4) : 152-166.
 10. Brekhman II, Dardymov IV. Pharmacological investigation of glycosides from Ginseng and Eleutheroside. Lloydia ; 32(1) : 1969 : 46-51.
 11. Hacker B et al. Jour. of Pharma. Sci. 1984 ; 73(2) : 270-272.
 12. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 編著. 鍼灸學. 서울. 集文堂. 1988 ; 489-490, 1174, 1323.
 13. 陳貴延. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울 일증사. 1992 : 527-530.
 14. 馬少群 外. 馬氏溫灸法. 北京 : 北京科學技術出版社. 1994 : 218-220, 235-238.
 15. Shan BE, Yoshita Y et al. Suppressive effect of Chinese medicinal herb, Acanthopanax gracilistylus, extract on human lymphocytes in vitro, Clin Exp Immunol. 1999 ; 118 : 41-48.
 16. Takamura T, Ando H, Nagai Y et al. Pioglitazone prevents mice from multiple low-dose streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract. 1999 ; 99 : 107-114.
 17. Kakkar R, Subrahmanyam V, Mantha et al. Antioxydant defense system diabetic kidney : A time course study. Life Sciences. 1997 ; 60 : 667-679.
 18. Joyce M, Afrcsi, Kelly C et al. Pravastatin, A 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion, J. Sug. Res. 2001 ; 101 : 79-84.
 19. Fuad NZ, Brenda BH, Han DC et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- β antibody in db/db diabetic mice, PNAS. 2000 ; 97 : 8015-8020.
 20. Cohen M, Sharma K et al. Prevention of diabetic nephropathy in db/db mice with glycyated albumin antagonists. A novel treatment strategy., J. Clin. Invest. 1995 ; 95 : 2338-2345.
 21. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic com-

- plication. Diabetes. 1998 ; 47 : 859-866.
22. 민현기. 임상내분비학. 서울 : 고려의학. 1999 : 409-410.
 23. Flint MA, Clements RS. Prevention of the complications of diabetes. Prim. Care. 1988 ; 15(2) : 277-284.
 24. 연세대학교 신장질환연구소. 신장학. 서울 의학 문화사. 1999 : 591-612.
 25. 두호경. 동의신계학연구. 서울 : 경희대학교 출판국. 1994 : 408-412.
 26. 金宏柱 外. 近年來國內中醫藥治療 糖尿病 臨床及機理研究進展. 南京中醫藥大學學報. 2001 ; 17(1) : 63-66.
 27. 李石良 外. 鍼刺. 艾灸改善 NIDDM 大鼠 脂代謝紊亂的作用機理. 鍼灸臨床雜誌. 1995 ; 11(2) : 19.
 28. 羅蘇生 外. 刺五加注射液對早期糖尿病腎臟病變及血漿. 尿內皮素的影響. 中國中西醫結合雜誌. 2001 ; 21(2) : 105-107.
 29. 劉志强 外. 黃芪注射液對早期糖尿病腎病患者血小板功能和血漿內皮素的影響. 中國中西醫結合雜誌. 2001 ; 21(4) : 274-276.
 30. 中國中醫藥學會內科腎病專業委員會. 糖尿病腎病的中醫治療及用藥經驗談. 上海中醫藥雜誌. 2001 ; 5 : 15-18.
 31. 全國韓醫科大學教授共編著. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 283.
 32. 황완균, 최수부, 김일혁. 가시오가피 및 두충 혼합엑기스의 생리활성. Kor. J. Pharmacogn. 1996 ; 27(1) : 65-74.
 33. 成泰洙. 靈芝, 五加皮 및 川芎의 熱水抽出液이 高脂肪食餌에 의한 肥滿誘導 白鼠의 脂肪蓄積에 미치는 影響. 嶺南大學校 大學院. 1991.
 34. 이귀녕, 권오현. 임상병리 파일. 서울 : 의학문화사. 1990 : 73-75, 77-78.
 35. 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. 2000 ; 49 : 1022-1032.
 36. Sharma K, Fuad NZ. Hyperglycemia and diabetic kidney disease : The case for transforming growth factor- β as a key mediator. Diabetes. 1995 ; 44 : 1139-1146.