

단삼이 당뇨병성 신병증 Rat의 신기능 및 조직학적 변화에 미치는 영향

김영석, 이병철, 안세영, 두호경, 안영민
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Effects of *Salvia Miltiorrhiza* on Renal Function and Histopathological Changes in Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Rat Model

Young-seok Kim, Byung-cheol Lee, Se-young Ahn, Ho-kyung Doo, Young-min Ahn

Dept. of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea.

ABSTRACT

Objective : Diabetic nephropathy is the most common cause of end stage renal disease. AGE, TGF- β 1, type IV collagen, and macrophage/monocyte infiltration are the main factors of diabetic nephropathy. We investigated the effects of *Salvia miltiorrhiza* on renal function and histopathological changes in streptozotocin(STZ)-induced diabetic nephropathy rat model.

Methods : Diabetes was induced in male Sprague-Dawley rats(290 \pm 10g) by injecting STZ(45mg/kg) into the tail vein. Rats were divided into 3 groups(n=6): normal, control, and salvia. After 8 weeks of administration of *Salvia miltiorrhiza* extract on the Salvia group, we checked 24 hrs urine, blood biochemistry and renal tissue to evaluate renal function and histopathological changes by examining parameters including albuminuria, BUN, creatinine, cholesterol, LDL, TG, macrophage/monocyte antigen(ED-1), TGF- β 1, AGE, and type IV collagen.

Results : *Salvia miltiorrhiza* decreased the amount of 24hrs proteinuria, and inhibited histopathological changes of diabetic nephropathy including the expression and accumulation of various factors which could promote development of diabetic nephropathy.

Conclusion : These findings suggest that *Salvia miltiorrhiza* might protect the renal function and inhibit the development of renal injury by regulating factors including AGE, TGF- β 1, Type IV collagen, macrophage and monocyte infiltration. So *Salvia miltiorrhiza* can be used for diabetic patients to prevent the progression of diabetic nephropathy.

Key words : Diabetic Nephropathy, *Salvia Miltiorrhiza*, Streptozotocin, AGE, Type IV collagen, ED-1, TGF- β 1

1. 서론

당뇨병(Diabetes)은 전 세계적으로 그 유병율이

꾸준히 증가하고 있고, 치료방법의 발전으로 당뇨병성 혼수와 감염증 등 급성 대사성 합병증으로 인한 사망률은 감소하였으나 유병기간의 연장에 따른 만성 혈관 합병증의 발생은 오히려 증가하는 중요한 질환 중의 하나이다¹⁻⁷. 만성 혈관 합병증은 크게 대혈관 합병증과 미세혈관 합병증으로 나뉘어 지고 이중 미세혈관 합병증인 신증(nephropathy)과 망막병증(retinopathy) 그리고 신경병증(neuropathy)

- 교신저자: 안영민 서울특별시 동대문구 회기동 1 경희의료원 부속한방병원 한방 6내과
TEL: 02-958-9097 FAX: 02-958-9158
E-mail : omdan@hanmail.net
- 이 연구는 2007년도 경희대학교 연구비지원에 의한 결과임 (KHU-20070640).

은 조기에 발견하여 적절한 치료를 하면 병변의 진행을 정지 또는 완화시킬 수 있으므로 임상적으로 중요한 의의를 가진다^{1,4,5}.

당뇨병성 신증은 말기 신부전(End Stage Renal Failure : ESRF) 환자의 가장 중요한 원인 질환으로 알려져 있고 전체 투석환자의 원인질환 중 40%를 차지하고 있으며, 그 임상적인 특징은 당뇨병 환자에서의 지속적인 단백뇨 발생과 혈압 상승, 신기능 저하 등이다³⁻⁵.

이러한 당뇨병성 신증에서는 지속되는 고혈당으로 형성된 진행성 당화 종말 생성물들(Advanced Glycosylation End-products : AGEs)이 각종 성장인자(growth factor)와 싸이토카인(cytokine) 등의 생성을 증가시켜 염증이 유발되며 세포외기질(Extracellular Matrix : ECM)의 과잉 생산과 부적절한 분해를 일으켜 콜라겐(collagen)과 면역세포들이 사구체내부에 침착된다. 이는 결국 모세혈관의 밀도(density)와 사구체의 여과 포면적을 감소시키고 사구체여과율(Glomerular Filtration Rate : GFR)을 떨어뜨려서 섬유화(fibrosis)를 진행시키고 결국 신부전(renal failure)을 유발한다³⁻⁶.

한의학적으로 당뇨병성 신증은 消渴 傳變證 中 水腫, 小便白濁, 關格, 虛勞 등의 범주에 속하며 肝腎陰虛, 脾腎陽虛, 瘀血, 濕濁 등의 병리기전으로 발병하는데, 이에 대한 다양한 치법 및 처방 중에서 당뇨병성 신증의 치료에 많이 사용된 약제로 단삼이 보고된 바 있다⁸⁻¹⁰.

丹參(*Salvia miltiorrhiza* BGE.)은 活血祛瘀, 涼血消癰, 除煩安神的 효능이 있으며¹⁰, 최근의 연구에서는 허혈성 심장질환이나 동맥경화예방, 혈액순환 개선, 항혈전작용, 통증경감, 혈관확장, 간보호, 항산화 등의 작용이 있음이 밝혀져 폭넓게 사용되고 있다¹².

최근 단삼의 한 성분만을 이용하여 당뇨병성 신증 모델 rat의 신손상에 미치는 영향을 관찰한 연구가 있었으나 단일 성분의 연구였고 조직학적 변화 요인이나 신증 진행을 가속시키는 인자에 대한

전체적인 관찰이 미비하였다¹³.

이에 저자는 단삼이 당뇨병성 신증에서 신기능과 신장의 조직학적 변화에 미치는 영향을 알아보고자 Streptozotocin(STZ)으로 유발시킨 당뇨병성 신증 모델 rat에 대하여 8주간의 단삼투여 후 체중, 혈액분석, 24시간 단백뇨 배출 등의 기능적 지표와 함께 macrophage/monocyte antigen(ED-1)과 AGE, Type IV collagen, TGF- β 1 등 조직학적 변화에 영향을 주는 지표를 통하여 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 검체의 제조

경희의료원 한방병원 약제부에서 구입하여 정선한 총량 200g의 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)을 1500ml의 증류수에 넣어 4시간 동안 가열추출한 후 여과한 여액을 Rotary evaporator(Model NE-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 감압 농축한 다음 동결건조기(Model FD-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 건조시켰다. 동결 건조된 약제의 1차 추출물 1g씩을 10ml의 증류수로 용해시키고, 95°C 수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출하였으며, 이 추출물을 원심분리용 시험관에 담아 14,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 이 상층액을 직경 0.2 μ m의 필터에 통과시킨 후 여과 멸균하여 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 단삼의 최종 수거율은 35.3%이었다.

2. 당뇨병성 신증 동물 모델의 제작

280~300g의 수컷 Sprague-Dawley rat(중앙실험동물, Korea)을 구입하여 실온의 cage에서 40~70%의 습도를 유지하며 12시간씩 낮과 밤이 교대되는 환경에서 실험 전 1주일간 사육하여 적응기를 거쳤다. 적응기간을 마친 후 pH 4.5의 citrate buffer(2.5ml/kg)에 녹인 streptozotocin(STZ, Sigma, USA)을 rat의 꼬리 정맥을 통해 45mg/kg의 용량으로 1회 주사하였다. 반면 정상군은 citrate buffer

(2.5ml/kg)만을 rat의 꼬리 정맥으로 주사하였다.

STZ 정맥주사 3일 후 당뇨병 유발여부를 확인하기 위해 rat의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기(SureStep, LIFESCAN INC., USA)를 이용하여 혈당을 측정하였고, 측정값이 300mg/dl 이상인 rat만을 본 실험에 사용하였다.

3. 실험군의 배정 및 연구 과정

본 연구의 실험군은 각 군당 6마리씩 정상군(Normal group), 대조군(Control group), 단삼 투여군(Salvia group)의 3군으로 나누어 진행하였다.

정상군은 STZ 없이 citrate buffer만을 정맥 주사하였고 연구기간 동안 다른 어떤 약물도 투여하지 않았다. 대조군과 단삼 투여군은 STZ 투여 3일 후 측정된 혈당이 300mg/dl 이상인 rat을 대상으로 하였고, 연구기간동안 insulin 투여는 이루어지지 않았다. 대조군은 생리식염수 5ml/kg만을 경구 투여하였고, 단삼 투여군은 단삼을 생리식염수에 현탁하여 500mg/kg-용량으로 1일 1회 oral zonde를 이용하여 8주간 경구 투여하였다.

4. 혈액학적 분석

8주간의 경구투여가 끝난 후 클로로포름으로 마취시킨 rat의 심장에서 직접 혈액을 채취하여 혈청 glucose, albumin, BUN(Blood urea nitrogen) 및 creatinine, total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglyceride 등의 생화학적 분석을 시행하였다.

5. 체중 및 24시간 요중 단백 배출량 측정

체중은 STZ 투여 4일째부터 실험 종료시까지 1주일 간격으로 총 9회 측정하였다. 24시간 요중 단백 배출량의 측정은 약물 투여 4주째와 8주째에 rat을 metabolic cage에 넣고 24시간 동안의 소변을 수거하여 소변에 포함된 알부민의 양을 측정하였다.

6. 신장의 조직병리학적 평가

8주간의 투약이 끝난 다음 체중 측정과 채혈을 마친 후 회복하여 rat의 좌심실에 바늘을 꽂아 0.05M phosphate buffered saline(PBS)과 4% paraformaldehyde(PFA)를 perfusion pump로 주입하여 신장의 붉은 색이 없어질 때까지 관류시켰다. 이후 좌측 신장을 절제하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 담가 고정시키고, 70%, 80%, 95%, 100% 에탄올에 차례로 담가 탈수시킨 다음 파라핀 용액에 담가 파라핀 블록을 만들었다. 이후 microtome을 이용하여 4 μ m의 두께로 각 신장조직을 관상으로 절편을 만들어 gelatin coated slide에 부착시켰다. 이렇게 만들어진 조직절편들은 조직염색을 위해 xylene에 담가 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올, 그리고 증류수에 차례로 담가 재수화(rehydration)시켰다. 재수화된 조직을 Periodic Acid-Schiff Stain(PAS)으로 염색하여 컴퓨터와 연결된 고해상도 카메라가 부착된 광학 현미경(Olympus BX-50, Olympus Optical, Tokyo, Japan)을 이용하여 각각의 디지털 영상을 얻었다. 이러한 과정으로 얻은 영상을 통한 사구체 내 메산지움 기질의 팽창정도의 평가에는 이미지 분석 프로그램인 MetaVue(Molecular devices, USA)를 이용하였다. 무작위로 각 rat당 10개의 사구체를 선정하여 디지털 영상 상 메산지움 기질의 염색된 분홍색에 대한 RGB값의 하한값과 상한값을 입력하고 외곽선 기능을 이용하여 사구체 안쪽만을 선택한 후 각각의 사구체 내에서 메산지움 기질이 차지하는 비율을 백분율로 계산하였다.

7. Macrophage/monocyte antigen(ED-1), Transforming growth factor(TGF)- β 1, Type IV collagen의 면역조직화학염색

신장 조직 절편을 1% H₂O₂/methanol에 15분간 반응시킨 후 1% bovine serum albumin(BSA, Sigma-Aldrich)과 10% normal horse serum(Vector Laboratories, Inc.)을 혼합하여 만든 protein blocking agent를 분주하고 1시간동안 배양하였다.

이후 slide상 조직절편에 해당하는 각각의 primary antibody를 분주하고 실온에서 overnight시켰다. 이때 사용한 primary antibody는 ED-1의 경우 mouse anti-rat monocyte/macrophage antigen (Chemicon International Inc., Temecula, CA, U.S.A.), TGF- β 1은 polyclonal rabbit anti-rat TGF- β 1 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를, Type IV collagen은 goat anti-type IV collagen (SouthernBiotech)를 이용하여 시행하였다. 50mM PBS로 3회 세척한 후 secondary antibody인 biotinylated anti-mouse/rabbit/goat IgG(H+L), (Vector Laboratories, Inc.)와 1시간 동안 반응시키고, 다시 50mM PBS로 3회 세척한 후 Vectastain ABC ELITE kit(Rat IgG)(Vector Laboratories)를 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. Diaminobenzidine (DAB)을 이용하여 갈색으로 염색하고 hematoxylin으로 대조 염색한 후 증류수, 70%, 80%, 95%, 100% 에탄올, 그리고 xylene에 차례로 담가 탈수화(dehydration)시키고 permount로 mounting하여 컴퓨터와 연결된 고해상도 카메라를 부착한 광학 현미경(Olympus BX-50, Olympus Optical, Tokyo, Japan)을 이용하여 각각의 디지털 영상을 얻었다. 이러한 과정으로 얻은 영상은 이미지 분석 프로그램인 MetaVue(Molecular devices, USA)를 이용하였다. 무작위로 각 rat당 10개의 사구체를 선정하여 디지털 영상 상 조직내 ED-1, TGF- β 1, Type IV collagen이 염색된 갈색에 대한 RGB값의 하한값과 상한값을 입력하고 외곽선 기능을 이용하여 사구체 안쪽만을 선택한 후 각각의 사구체 내에서 차지하는 비율을 백분율로 계산하였다.

8. Transforming Growth Factor(TGF)- β 1 및 AGE의 ELISA측정

혈청 TGF- β 1 발현은 TGF- β 1 E_{max} ImmunoAssay System(Promega, USA)를 이용하여 측정하였다. 마지막 투약 다음날 rat의 심장에서 채혈한 혈액에서 혈청을 분리한 후 분리된 각각의 혈청과 표준

TGF- β 1용액 200 μ l씩을 recombinant TGF- β 1 sRII이 coating된 microplates에 넣고, 순서대로 200 μ l의 TGF- β 1 conjugate, 200 μ l의 substrate solution, 50 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응시킨 후 450nm에서 ELISA reader를 이용하여 TGF- β 1을 정량측정하여 pg/ml로 표시하였다.

AGE는 Indirect ELISA방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 glutar-aldehyde(100 μ l/10ml PBS) 200 μ l를 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation하고 washing buffer로 3회 세척하였다. 이후 PBS 90 μ l와 rat의 혈청 10 μ l를 희석시켜서 각 well plate에 넣고 shaker에서 2시간 shaking하고 washing buffer로 3회 세척하였다. 그런 다음 blocking buffer 200 μ l를 넣고 shaker에서 1시간 다시 shaking하고 washing buffer로 3회 세척한 후, primary antibody인 rabbit polyclonal AGE antibody(Novus Biologicals, Inc) 4 μ l를 dilution buffer 10ml에 넣고 shaker에서 1시간 shaking한 후 washing buffer로 3회 세척하였다. Secondary antibody인 goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase(Abcam) 4 μ l를 dilution buffer 10ml에 넣고 shaker에서 1시간 shaking하고 washing buffer로 3회 세척하였다. Substrate A와 B를 1:1로 섞어서 200 μ l씩 처리하여 실온에서 15분간 incubation하고 1M H₂SO₄ 50 μ l로 반응을 정지시킨 후 450nm에서 ELISA reader를 이용하여 AGE를 정량 측정하여 optical density(O.D.)로 표시하였다.

9. 통계분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical package(ver 4.03, Graphpad software inc., San Diego, USA)를 이용하였으며, 각 군간의 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 사후 검증하였다. 표(Table)와 그림(Fig)에서의 각 항목의 수치는 평균 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 표시하였으며,

양방 검정 유의도(Two-tailed P value)는 P값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 결 과

1. 단삼 추출액 투여가 체중과 24시간 요단백 배출량에 미치는 영향

단삼이 STZ로 유발한 당뇨병성 신증 모델 rat의 체중 및 24시간 요단백 배출량 변화에 미치는 영향을 관찰하였다. 체중은 4주째에 정상군(389.00 ± 25.67g)에 비해 대조군(335.17 ± 35.18g)과 단삼 투여군(333.17 ± 43.59) 모두 유의하게 감소하였고 (P<0.05), 8주째 역시 정상군(463.17 ± 45.74g)에 비해 대조군(341.33 ± 44.64g) (P<0.01)과 단삼 투여군(374.2 ± 63.43g) (P<0.05)에서 역시 유의하게 감

소하였다. 단삼 투여군과 대조군간의 비교에서는 두 군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (P>0.05)(Table 1).

24시간 요단백 배출량변화는 실험 4주째에는 정상군(11.35 ± 3.75mg)에 비해 대조군(14.69 ± 9.74 mg)에서 소량 증가하였으나 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 8주째에는 정상군(11.12 ± 4.45mg)에 비해 대조군(24.26 ± 3.49mg)에서 현저한 증가를 나타내었다(P<0.001). 단삼 투여군에서는 4주째에는 17.63 ± 3.31mg으로 대조군에 비해 약간 증가하였으나, 8주째에는 15.96 ± 2.44mg으로 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다(P<0.05)(Table 1). 8주 뒤 단삼 투여군과 정상군 사이에서는 24시간 요단백 배출량에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05).

Table 1. The Body Weight and 24hrs Urinary Protein Excretion of Each Experimental Group after 8 Weeks.

	Normal(n=6)	Control(n=6)	Salvia(n=6)
Body weight(g) - 4 weeks	389.00 ± 25.67	335.17 ± 35.18*	333.17 ± 43.59
Body weight(g) - 8 weeks	463.17 ± 45.74	341.33 ± 44.64**	374.2 ± 63.43*
Urinary protein excretion (mg/kg/day) - 4weeks	11.35 ± 3.75	14.69 ± 9.74	17.63 ± 3.31
Urinary protein excretion (mg/kg/day) - 8weeks	11.12 ± 4.45	24.26 ± 3.49***	15.96 ± 2.44†

*, **, *** Significantly different from normal group(* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001), † Significantly different from control group(† P<0.05)

Table 2. The Biochemistry Index of Each Experimental Group after 8 Weeks.

	Normal(n=6)	Control(n=6)	Salvia(n=6)
Glucose(mg/dl)	78.66 ± 8.98	393.16 ± 105.12***	409 ± 167.70***
Albumin(mg/dl)	2.28 ± 0.19	1.77 ± 0.35*	2.1 ± 0.18
BUN(mg/dl)	19.56 ± 2.04	33.64 ± 4.97***	28.52 ± 6.68**
Creatinine(mg/dl)	0.53 ± 0.03	0.65 ± 0.04**	0.61 ± 0.05*
Total-cholesterol(mg/dl)	73.16 ± 9.66	59.00 ± 18.83	80.8 ± 3.27†
LDL-cholesterol(mg/dl)	11.83 ± 3.43	14.40 ± 2.51	13 ± 2.55
Triglyceride(mg/dl)	67.50 ± 31.48	54.40 ± 20.86	90.4 ± 39.13

*, **, *** Significantly different from the normal group (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

† Significantly different from the control group(† P<0.05)

2. 단삼 투여가 혈청 생화학 지표에 미치는 영향

단삼이 STZ로 유발한 당뇨병성 신증 모델 rat의 혈청 생화학 지표에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에서는 glucose농도(P<0.001), BUN (P<0.001)과 creatinine 농도(P<0.01)는 유의하게 증가하였고, albumin농도는 유의한 감소를 나타내었다(P<0.05). total-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride의 농도는 정상군과 대조군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 단삼 투여 후 total-cholesterol가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고(P<0.05), 이외의 측정 항목에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 2).

3. 단삼 투여가 신장의 조직 병리학적 변화에 미치는 영향 - PAS 염색으로 살펴본 Mesangial matrix

단삼이 STZ로 유발한 당뇨병성 신증 모델 rat의 신장에 미치는 조직학적 변화를 알아보기 위하여 PAS 염색을 시행하였다. 표본의 광학 현미경 관찰에서 정상군은 사구체의 크기와 보우만씨 막(Bowman's capsule)과 내강(space)이 정상 크기를 보였고, 보우만씨 막 내부 사구체에서의 내피세포(endothelial cell), 외피세포(epithelial cell), 그리고 메산지움 세포(mesangial cell)들의 세포밀도(cellularity)가 정상범위에서 잘 유지되고 있었으며, 기저막(basement membrane)의 비후나 메산지움 기질(mesangial matrix)을 포함한 세포외기질(extracellular matrix : ECM)의 팽창이나 축적, 그리고 결합 조직의 증식이나 섬유화 역시 관찰되지 않았다(Fig. 1).

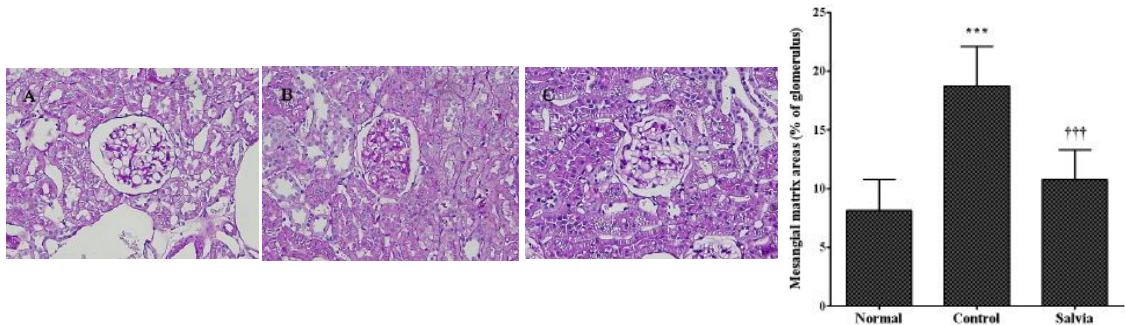


Fig. 1. Morphological profiles and morphometric studies of the kidney cortex from the rats with diabetic nephropathy experimentally induced by STZ.

(A) Normal group, (B) Control group, (C) Salvia group. Original magnification $\times 400$. (D) The proportion of mesangial matrix area within glomerulus(% of positive area).

*** Significantly different from the normal group(*** P<0.001).

††† Significantly different from the control group(††† P<0.001).

대조군에서는 미만성(diffuse)의 사구체 비후와 함께 이로 인한 보우만씨 내강의 축소가 관찰되었으며 보우만씨 막 내부 사구체에서는 모세혈관 내강(capillary lumen)의 축소와 함께 메산지움 세포의 과다 증식으로 인한 세포밀도의 증가가 보였다. 사구체 기저막은 비후되고, 메산지움 기질을 포함한 세포외기질의 팽창이 관찰되었으며, 분절성

(segmental)으로 사구체와 보우만씨 낭의 유착과 함께 반월형(crescent)의 경화성(sclerosis) 변화도 관찰되었다(Fig. 1).

단삼 투여군에서는 사구체와 보우만씨 내강의 크기가 정상군과 비슷한 정도를 유지하고 있었고, 정도의 메산지움 세포의 증식으로 인한 세포밀도의 증가가 보였으나 그 정도가 현저히 낮았다. 사

구체 기저막과 내피세포, 외피 세포들 역시 약간의 비후가 관찰되었으나 정상군과 비슷한 정도를 유지하고 있었고, 메산지움 기질을 포함한 세포외 기질에서는 일부 침착이 있었으나 미미하였으며, 기타 반월형(crescent)의 경화성(sclerosis) 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

또한 메산지움 기질의 팽창정도를 평가하기 위해 사구체내에서 메산지움 기질이 차지하는 비율을 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석한 결과, 정상군(8.13 ± 3.35%)에 비해 대조군은 18.74 ± 3.36%로 유의하게 증가하였으나(P<0.001), 단삼 투여군에서는(9.46 ± 3.91%) 현저한 증식 억제효과를 나타내었다(P<0.001).(Fig. 1) 정상군과 단삼 투여군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05).

4. 단삼 투여가 Macrophage/monocyte antigen(ED-1), TGF-β1과 Type IV collagen의 면역조직화학염색의 변화에 미치는 영향

단삼이 STZ로 유발한 당뇨병성 신증 모델 rat의 사구체에서 ED-1, TGF-β1과 Type IV collagen의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 각각의 항목에 대한 면역조직화학염색 및 이미지 분석을 시행하였다.

대식세포와 단핵구의 사구체 내 침윤정도를 평가하기 위해 시행한 ED-1 면역조직화학염색에서 대조군(Fig. 2B)의 사구체내 ED-1 양성 면적은 10.48 ± 2.99%로 정상군(0.55 ± 0.27%)(Fig. 2A)에 비해 현저하게 증가하였고(P<0.001), 단삼 투여군(Fig. 2C)에서는 2.43 ± 3.81%로 유의하게 감소하였다(P<0.001). 정상군과 단삼 투여군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05)(Fig. 2).

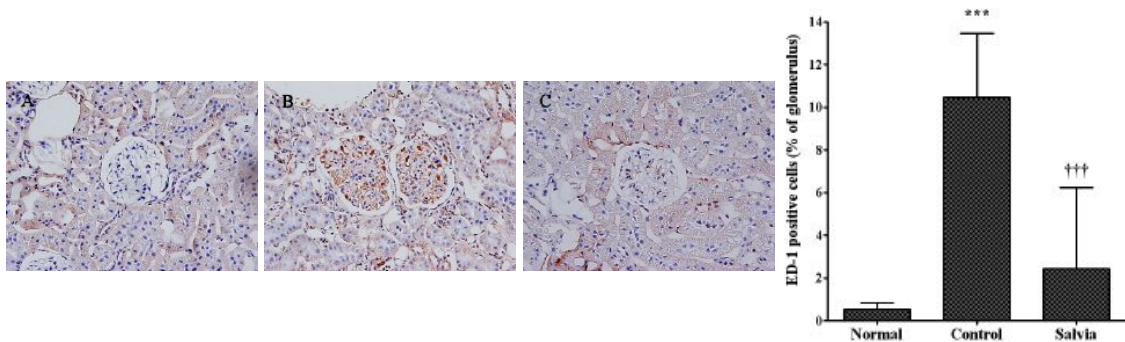


Fig. 2. Effects of Salvia on renal macrophage/monocyte antigen(ED-1) expression in STZ-induced diabetic nephropathy rats.

(A) Normal group, (B) Control group, (C) Salvia group. Original magnification ×400. (D) The proportion of ED-1 positive area within glomerulus(% of positive area).

*** Significantly different from the normal group(*** P<0.001).

††† Significantly different from the control group(††† P<0.001).

당뇨병성 신증에서 사구체내 비후를 매개하는 주요 증식인자인 TGF-β1에 대한 평가에서 대조군(Fig. 3B)의 사구체내 TGF-β1 양성 면적은 12.46 ± 1.98%로 정상군(Fig. 3A)의 1.68 ± 1.38%에 비해 유의하게 증가하였고(P<0.001), 단삼 투여군

(Fig. 3C)에서는 6.06 ± 0.93%로 대조군에 비해 현저하게 감소하였다(P<0.001)(Fig. 3).

메산지움 팽창을 매개하는 주된 병리인자인 Type IV collagen에 대한 평가에서 대조군(Fig. 4B)의 사구체내 Type IV collagen 양성 면적은

10.81 ± 2.52%로 정상군(Fig. 4A)의 2.93 ± 2.63%에 비해 현저하게 증가하였고(P<0.001), 단삼 투여

군(Fig. 4C)에서는 6.29 ± 3.86%로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.001)(Fig. 4).

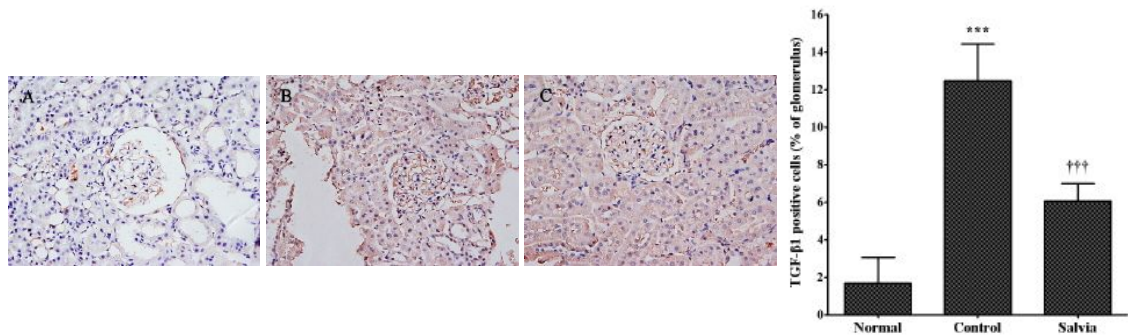


Fig. 3. Effects of Salvia on renal Transforming Growth Factor(TGF-β1) expression in STZ-induced diabetic nephropathy rats.

(A) Normal group, (B) Control group, (C) Salvia group. Original magnification ×400. (D) The proportion of TGF-β1 positive area within glomerulus(% of positive area).
 *** Significantly different from the normal group(*** P<0.001).
 ††† Significantly different from the control group(††† P<0.001).

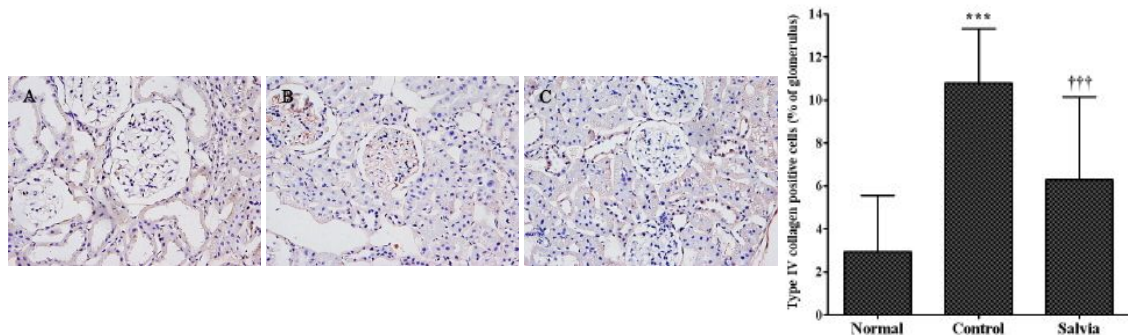


Fig. 4. Effects of Salvia on renal type IV collagen expression in STZ-induced diabetic nephropathy rats.

(A) Normal group, (B) Control group, (C) Salvia group. Original magnification ×400. (D) The proportion of Type IV collagen positive area within glomerulus(% of positive area).
 *** Significantly different from the normal group(*** P<0.001).
 ††† Significantly different from the control group(††† P<0.001).

5. 단삼 투여가 혈청 advanced glycosylation end-product(AGE)와 Transforming Growth Factor(TGF)-β1농도에 미치는 영향
 단삼이 STZ로 유발한 당뇨병성 신증 모델 rat에

서 당뇨병성 신증을 포함한 당뇨병성 혈관합병증의 주요 병리 인자인 혈청 AGE와 TGF-β1의 농도에 미치는 영향을 관찰하기 위해 ELISA를 통한 정량분석을 시행하였다.

우선 혈청 AGE에 분석에서 대조군에서는 3.94 ± 0.06 (O.D.)로 정상군의 3.77 ± 0.13 (O.D.)에 비해 유의한 증가를 나타내었으나(P<0.05), 단삼 투여군에서는 3.92 ± 0.06 (O.D.)으로 정상군과의 비교에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 3).

TGF-β1에 대한 분석에서 대조군에서는 62.10 ± 8.10 pg/ml로 정상군의 37.91 ± 5.68 pg/ml에 비해 유의한 증가가 관찰되었고(P<0.01), 단삼 투여군에서는 41.07 ± 10.99 pg/ml로 대조군에 비해 유의한 감소효과를 나타내었다(P<0.05)(Table 3).

Table 3. Effects of Salvia on the Level of Glycosylation End-product(AGE) and Transforming Growth Factor(TGF-β1) in Serum of STZ-induced Diabetic Nephropathy Rats.

	Normal(n=6)	Control(n=6)	Salvia(n=6)
AGE	3.77 ± 0.13	3.94 ± 0.06*	3.92 ± 0.06
TGF-β1	37.91 ± 5.68	62.10 ± 8.10**	41.07 ± 10.99†

*, ** Significantly different from the normal group

(* P<0.05, ** P<0.01)

† Significantly different from the control group(† P<0.05)

IV. 고찰

당뇨병(Diabetes)은 치료법의 발전으로 급성 대사성 합병증으로 인한 사망률은 감소하였으나 합병기간의 연장에 의한 만성 혈관 합병증의 발생은 오히려 증가하고 있는 중요한 질환 중의 하나이다¹⁻⁷.

당뇨병의 대표적인 당뇨병성 신증에서는 지속되는 고혈당이 진행성 당화 종말 생성물(AGEs)을 형성하여 사구체 표면의 AGE 수용체(RAGE)와 결합하거나 protein kinase C(PKC)를 활성화시켜 각종 성장인자와 사이토카인의 생성을 촉진하고 염증을 유발시키며 세포외기질(ECM)의 지나친 생산과 부적절한 분해를 일으키게 된다. 이는 사구체 기저막(GBM)과 메산지음 영역에 축적과 확장을 유발하고 이 과정은 모세혈관의 농도와 사구체의 여과 표면적을 감소시키게 되어 이로 인해 여과장벽의 투과성이 떨어져 사구체여과율(GFR)이 감소한다. 또한 세포외기질(ECM)이 세뇨관기저막과 간질부에 축적되고 점진적인 세뇨관 간질의 섬유화가 진행되어 네프론의 파괴와 신부전을 유발

하게 되는데, 이러한 사구체여과율의 감소는 사구체의 변화보다는 간질(interstitial)의 변화와 더욱 밀접하게 연관되어 있다고 알려져 있다^{3-6,14,18,19}.

한의학에서는 당뇨병성 신증의 임상경과 중 단백뇨와 관련한 소변의 정상변화에 대한 언급 중에는 소변이 달고(尿恬) 소변색이 탁하고(尿濁), 거품이 많다(泡沫狀)는 등의 표현이 나온다. 또한 소갈이 오래되면 下消가 발생하여 소변이 혼탁해지는데, 이는 上消와 中消에서 肺胃의 열이 腎脂를 태워서 말리기 때문으로 보며, 당뇨병성 신증에서 사구체 기저막의 기능적, 구조적 손상으로 인해 단백뇨가 나타난다는 서양의학적 견해와 유사한 것으로 볼 수 있다. 따라서 소갈 전변증에서 나타나는 水腫과 尿濁如膏, 소변이 달고, 소변에 거품이 많다는 등의 표현은 당뇨병성 신증의 임상증상을 설명하는 것으로 해석된다^{8,15}.

본 연구에서 사용한 '丹蔘'은 꿀풀과에 속한 다년생 본초인 *Salvia miltiorrhiza* BGE.의 뿌리와 根莖을 건조한 것으로 그 효능은 活血祛瘀, 涼血消癰, 除煩安神으로 알려져 있다¹¹. 또한 고전 한의학 서적과 중의학 서적에서 당뇨병성 신증에 사용하

는 처방을 분석한 결과 가미약재로 가장 많이 사용된 것이 단삼이었다는 보고가 있었으며⁹, 최근 논문에서는 단삼이 허혈성 심장질환이나 동맥경화 예방, 혈액순환 개선, 항혈전, 통증 경감, 혈관확장, 항산화, 간보호 등의 효과를 가지고 있다고 보고되어 임상에서 널리 사용되고 있으며 지속적인 연구가 진행 중이다¹².

본 연구에서 사용한 Streptozotocin(STZ)으로 유발한 당뇨병 신증 모델 rat은 1963년에 처음 도입된 이후 당뇨병 및 당뇨 합병증 연구에 가장 널리 사용되고 있다^{7,19}. 본 실험에서도 STZ 주사 이후 대조군에서 당뇨병의 특징인 고혈당, 체중의 감소와 함께, 혈액학적 지표에서도 정상군에 비해 혈중 알부민이 감소하고 BUN과 혈중 Creatinine 레벨이 증가하는 변화가 나타났으며, 당뇨병성 신증과 관련된 단백뇨의 배출과 함께 사구체의 조직학적 변화가 나타나 당뇨병성 신증의 진행과 작용기전, 그리고 치료에 대한 연구에 유용한 모델임을 확인할 수 있었다^{7,14,16}.

당뇨병성 신증 진행의 기능적인 지표로는 지속되는 단백뇨의 배출을 들 수 있는데 미세알부민뇨의 지속적인 배출이 당뇨병성 신증의 초기 발생과 연관이 있으며, 심한 단백뇨는 심각한 사구체의 손상을 알려주는 지표로서의 역할 이외에 당뇨병성 신증을 비롯한 단백뇨를 배출하는 신장병의 진행을 가속화시키는 작용을 한다고 보고되고 있다¹⁷. 또한 세뇨관 세포가 고농도의 여과된 단백질과 성장인자에 노출되었을 때 세뇨관과 간질 사이의 염증 반응을 일으키게 되어 점진적으로 간질의 섬유화가 진행된다고 알려져 있어 당뇨병성 신증의 치료 과정에서 나타나는 단백뇨의 감소가 신증의 진행 억제에 나타냄과 동시에 치료적인 의미가 있다고 알려져 있어 이러한 단백뇨를 감소시키는 것이 당뇨병성 신증을 예방하기 위한 일차적 치료 목표로 인식되고 있다^{4,19,20}. 본 연구에서 단삼 투여군에서 8주째의 24시간 단백뇨 배출량이 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었는데 이는 단삼의 투여로

당뇨병성 신증의 진행이 억제되는 것으로 여겨진다.

생화학 지표에서는 혈당이 실험군 모두 정상군에 비해 유의하게 높은 혈당을 유지하고 있었으며, 또한 단삼 투여가 혈당의 조절에는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다^{7,14,16}. 이로 추정해볼 때 본 실험의 결과에서 관찰된 단백뇨 배출의 감소와 조직학적 변화 억제라는 단삼의 작용이 혈당조절과는 무관하게 작용한다고 생각된다.

당뇨병은 지질대사에서도 변화를 나타내는데 고밀도지단백(HDL-cholesterol)의 감소, 저밀도지단백(LDL-cholesterol)의 증가와 더불어 고중성지방혈증을 보이는 경우가 보고된 바 있었다². 이번 실험에서는 실험군에서 소폭의 지질대사 변화를 보였으나 그 폭이 크지 않았고 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

당뇨병성 신증의 조직병리적인 변화 중 대표적인 것은 세포외기질의 축적이다. 이러한 세포외기질은 Type IV collagen과 같은 구조 단백질과 함께 TGF-β1과 같은 전경화성 성장인자(Prosclerotic Growth Factor)를 포함하는 싸이토카인 등으로 이루어져 있으며 AGE의 생성에 의해 진행이 촉진된다^{21,22-25}.

진행성 당화 종말 생성물들(AGEs)은 단백질이 고혈당 상황에 계속해서 노출이 되면 비효소적 당화를 거쳐 비가역적인 Schiff bases와 Amadori compounds를 형성한 후 일련의 과정을 거쳐 AGEs가 생성되고, AGEs의 조직내 축적이 세포에 직접 독성작용을 미치며 혈관투과성을 증가시켜 단핵세포의 유입과 각종성장인자와 싸이토카인의 생산을 유발한다고 알려져 있다^{2-3,29-30}. 또한 이는 세포표면의 수용체(RAGE)와 결합하여 당뇨병성 신증의 진행에 있어 중요한 원인으로 작용한다^{17,19,29-30}. 본 연구에서 혈액에서의 AGE농도를 정량 분석한 결과 대조군에서 유의하게 증가한 소견을 보였으나 단삼 투여군에서는 유의한 증가소견을 보이지 않았다.

Transforming Growth Factor(TGF)- β 는 다양한 기능을 가지고 있는 사이토카인으로 상처의 회복과 조직 재생에서 중추적인 역할을 하며²¹, 세포외기질의 축적을 조정하는데 있어 대사적 요인과 혈액역학적 요인 사이에서 중요한 매개체로 작용한다⁶. TGF- β 는 대부분의 실질세포(parenchymal cell)에서 생성되며 림프구나 단핵구, 대식세포 그리고 혈소판(platelet)과 같은 세포에 의해 생산되거나 방출된다. 일반적으로 TGF- β 의 방출과 활성화는 다양한 세포외기질 단백질의 생산을 자극시키고 분해를 막는다. 이러한 TGF- β 의 작용은 이상적인 환경 하에서는 정상 조직구조로의 회복이나 조직의 섬유화를 통한 조직의 재생과 연관이 있으나, 지나친 TGF- β 의 발현은 과도한 조직의 섬유화를 불러와 조직이 정상적인 기능을 발휘하지 못하게 한다^{21,26,27}. 본 연구에서 살펴본 TGF- β 1은 TGF- β 중에서 가장 먼저 그리고 가장 풍부하게 유도되는 지표로써 면역조직화학 분석과 혈청내 정량분석 모두에서 대조군에서는 현저하게 증가되었으나, 단삼 투여군에서는 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다^{17,19}. 이는 단삼의 투여가 TGF- β 1의 생성과 조직내 발현을 억제하여 신장조직의 섬유화를 통한 신기능저하를 억제하는 것으로 해석된다.

신장의 다른 간질조직에서 발견되는 I, II, III형 콜라겐과는 대조적으로 Type IV collagen은 사구체 기저막의 고유한 구성분자이고, 당뇨병에서는 고혈당이 Type IV collagen의 합성을 자극하여 사구체 메산지음 영역내의 침착이 증가되는 것으로 알려져 있다^{17,22-25}. 혈청내 Type IV collagen은 미세단백뇨의 배출이 없는 상황에서도 정상인에 비해 당뇨병 환자에게서 증가하는 것을 관찰할 수 있고, 신증이 있는 환자에게는 신장애(renal impairment)가 심해질수록 뇨중 알부민배출과 혈중 BUN, Creatinine이 증가하는 것과 마찬가지로 혈중 Type IV collagen이 증가하게 되며, 망막병증이나 신경병증 등의 다른 미세혈관병증이 있는 환

자들에게서도 Type IV collagen이 증가한 것을 확인할 수 있어 혈청내 Type IV collagen의 양이 당뇨병성 미세혈관병증의 진행과 관련있는 지표로서의 의미를 찾을 수 있다²²⁻²⁵. 본 실험에서 면역조직화학염색으로 살펴본 사구체내 Type IV collagen이 대조군에서는 유의하게 증가하였으나 단삼 투여군에서는 유의하게 감소함으로써 사구체 경화의 진행이 억제되고 있는 것을 확인할 수 있었다¹¹.

PAS염색으로 살펴본 사구체 내부의 조직변화는 대조군에서는 미만성 사구체 비후와 함께 보우만씨 내강의 축소, 사구체 기저막의 비후, 세포외기질의 팽창, 반월형 경화성 변화 등 당뇨병성 신증의 특징을 나타내었으나, 단삼 투여군에서는 사구체 내부의 조직 변화가 적었으며, 메산지음 기질의 비율 비교에서도 현저하게 증식이 억제된 결과를 보여주었다¹⁴.

또한 당뇨병성 신증의 진행에 있어서 각종 케모카인(chemokine)과 사이토카인에 의한 염증반응이 중요한 역할을 하고, CD4+와 CD8+ 림프구가 당뇨병성 신증의 초기단계에서 작용하는 것으로 짐작되고 있으며, TNF- α , INF- γ 등이 과도발현되어 유발되는 염증반응이 당뇨병성 신증의 대식세포와 단핵구의 사구체 내 침윤을 증가시킨다^{18,28}. ED-1 면역조직화학 염색으로 살펴본 대식세포와 단핵구의 사구체내 침윤은 대조군에서는 현저하게 증가하였으나, 단삼 투여군에서는 유의하게 감소된 결과를 보였다. 이는 당뇨병성 신증의 진행에 영향을 미치는 신장조직내의 염증반응이 단삼의 투여로 인해 억제되고 있는 것을 보여주는 것이다.

이번 연구를 종합해보면 STZ로 유발한 당뇨병성 신증 모델 rat에게 8주간 단삼을 투여한 후의 관찰에서 단삼 투여군에서 24시간 뇨단백 배출량의 증가가 억제되는 효과를 보였다. 이는 단삼이 당뇨병성 신증의 초기 기능적 지표인 단백뇨의 증가를 억제함으로써 당뇨병성 신증의 진행을 억제하는 신장보호 효과가 있음을 보여주는 결과였다. 그 구체적인 조직학적 증거들은 단삼 투여군에서

메산지움 기질의 증가가 억제되고 macrophage/monocyte antigen(ED-1)의 사구체내 침윤이 억제되었으며, 사구체내 비후 매개 주요 증식인자인 TGF- β 1의 발현이 억제되는 것에서 확인할 수 있었다. 또한 메산지움 팽창 매개 병리인자인 Type IV collagen의 발현이 유의하게 억제를 관찰할 수 있었는데 이는 단삼이 당뇨병성 신증의 악화와 진행을 억제하는 효능이 있음을 실험적으로 밝힌 것으로 임상적으로 당뇨병성 신증의 치료에 사용해보던 단삼에 실험적인 근거를 제공하는 것이라 평가할 수 있다. 추후 단삼 투여가 당뇨병성 신증에 미치는 장기간의 영향 평가와 함께 임상연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 최영길 외. 당뇨병성 혈관합병증 진단과 치료. 서울: 현의학: 1998, p. 3-7, 215-9.
2. 김용진 외. 당뇨병학 제 3판. 서울: 대한당뇨병학회: 2005, p. 471-86.
3. 임상신장학. 대한신장학회. 서울: 광문출판사: 2001, p. 321-45.
4. Ralph Rabkin, Diabetic Nephropathy, Complications of Diabetes, Clinical Cornerstone, 2003;5,2:1-11
5. T.A. Chowdhury, A.H. Barnett, S.C. Bain. Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. Trends Endocrinol Metab. 1996;7,9:320-3.
6. Mark E. Cooper, Richard E. Gilbert, and Murray Epstein, Pathophysiology of Diabetic Nephropathy. Metabolism. 1998;47,12:3-6.
7. Michael Wei, Leslie Ong, Maree T. Smith, Fraser B. Ross, Katrina S&mid, Andrew J. Hoey. The Streptozotocin - Diabetic Rat as a Model of the Chronic Complications of Human Diabetes. Heart, Lung and Circulation. 2003; 12:44-50.
8. 안세영. 東醫臨床內科學 II. 서울: 법인문화사: 1999, p. 80-93, 396-413.
9. 김성아, 강운호. 당뇨병성 신증의 한의학적 접근 및 치료에 대한 연구. 대한한의학정보학회지. 2005 ;11(2):1-13.
10. 두호경. 동의신계학. 서울: 동양의학연구원: 1993, p. 389-391, 1166-7.
11. 본초학교실, 본초학, 서울: 영림사: 1992, p. 419-20.
12. Kevin K.M. Yue, Kin-wah Lee, Kelvin K.C.Chan, K.S.Y. Leung, Albert W.N. Leung, Christopher H.K. Cheng. Danshen prevents the occurrence of oxidative stress in the eye and aorta of diabetic rats without affecting the hyperglycemic state. Journal of Ethnopharmacology. 2006;106:136-41.
13. Geun Taek Lee, Hunjoo Ha, Mankil Jung, Hari Li, Soon Won Hong, Bong Soo Cha. Delayed Treatment with lithospermate B attenuates Experimental Diabetic Renal Injury. Journal of American Society of Nephrology. 2003;14:709-20.
14. E.P.K. Mensah-Brown, E.N. Obineche, S. Galadari, E. Chandranath, A. Shahin, I. Ahmed. Streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: The role of inflammatory cytokines. Cytokine. 2005;31:180-90.
15. 안영민. 한방으로 이겨내는 당뇨병. 서울: 홍신문화사: 2003, p. 146-51.
16. Takako Yokozawa, Takako Nakagawa, Kunihikowakaki, Fumitomo Koizumi. Animal model of diabetic nephropathy. Exp Toxic Pathol. 2001;53:359-63.
17. Rainer Lehmann, Erwin D. Schileicher. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. Clinica Chimica Acta. 2000;297:135-44.
18. Abbas, Lichtman., 세포 분자 면역학. 서울: 범문사: 1998, p. 16-39.

19. Dick de Zeeuw. Should Albuminuria Be a Therapeutic Target in Patients With Hypertension and Diabetes? *American Journal of Hypertension*. 2004;17:11-5.
20. Giuseppe Remuzzi, Jan J Weening. Albuminuria as early test for vascular disease. *Lancet*. 2005;365:556-7.
21. Marcello Casaccia Bertoluci, Deise Uebel, Alexandre Schmidt, Fulvio Clemo, Santos Thomazelli, Fa'bio Ramos Oliveira. Urinary TGF- β 1 reduction related to a decrease of systolic blood pressure in patients with type 2 diabetes and clinical diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2006;72:258-64.
22. Ching Ye Hong, Kee Seng Chia. Markers of Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes and its Complications*. 1998;12:43-60.
23. Nobuo Kotajima, Takao kimura, Tsugiyasu Kanda, Kenichi Obata, Atsushi Kuwabara, Yukihoto Fujumura. Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2000;14 :13-7
24. Michel Zeisberg, Mark B. Ericksen, Yuki Hamano, Eric G. Neilson, Fuad Ziyadeh, and Raghu Kalluri. Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;295:401-7.
25. Seijiro Kado, Akira Aoki, Seiki Wada, Yasuyuki Katayama, Nobuo Kugai, Nobuyuki Yomizawa. Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1996;31:103-8.
26. Elena Gagliardini, Ariela Benigni. Role of anti-TGF- β antibodies in the treatment of renal injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006;17:89-96.
27. Mary H. Branton, Jeffrey B. Kopp. TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*. 1999; 1:1349-65.
28. Joseph Cantor¹, Kathryn Haskins. Interactions of macrophages and T cells in autoimmune diabetes. *Drug Discovery Today*. 2006;30,20:1-5.
29. Tomoko Shimoike, Toyoshi Inoguchi, Fumio Umeda, Hajime Nawata, Katsumi Kawano, Hiroto Ochi. The Meaning of Serum Levels of Advanced Glycosylation End Products in Diabetic Nephropathy. *Metabolism*. 2000;49:1030-5.
30. Yasuhiko Yamamoto, Ichiro Kato, Toshio Doi, Hideto Yonekura, Seiji Ohashi, Masayoshi Takeuchi. The role of AGE - RAGE system in the development of diabetic nephropathy in vivo. *International Congress Series*. 2002;1245 :45-50.