



Original Article / 원저

大黃酸의 당뇨병쥐 신장조직섬유화 억제 효과에 관한 실험연구

趙容杰¹·趙正林^{2*}·張杰²·劉洪鳳²·崔榮軍²·金相贊³·金宣亨⁴

¹牡丹江醫學院 藥理學教室·²牡丹江醫學院 生化學教室, 中國
³大邱韓醫大學校 方劑學教室, 韓國·⁴東國大學校 韓醫科大學, 韓國

Inhibitory Effect of Rhein on Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy Rats

Rongjie Zhao¹ · Zhenglin Zhao^{2*} · Jie Zhang² · Hongfeng Liu²
Rongjun Cui² · Sang Chan Kim³ · Sun-Hyung Kim⁴

¹Department of Pharmacology Mudanjiang Medical University,

²Department of Biochemistry Mudanjiang Medical University, Mudanjiang
157011, China,

³College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-828, Korea,

⁴College of Oriental Medicine, Dongguk University, Korea,

ABSTRACT

Objectives : To investigate the therapeutic effect and underlying mechanisms of rehin on renal fibrosis in diabetic rats.

Methods : Diabetic nephropathy (DN) was induced in adult Wistar rats via intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (20 mg/kg/d) for three consecutive days. Two days after the last dose of STZ, rehin was administered to the diabetic rats at a dose of 25 mg/kg or 50 mg/kg, twice a day by gavage, respectively. Following 28 days treatment with rehin, the plasma glucose and creatinine levels were measured, the renal levels of TGF- β 1 protein and mRNA were examined, and the fibronectin mRNA levels were also determined.

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This is an open access journal which permits unrestricted access via the internet (URL, <http://www.ompak.okdanche.com>.) non-commercial use, distribution, reproduction and providing the original work is properly cited.



Results : Rhein significantly inhibited the increased plasma glucose and creatinine levels of diabetic rats in a dose- and a time-dependent way. Immunohistochemical analysis showed both doses of rhein markedly attenuated elevated induction of renal TGF- β 1 protein expressions in diabetic rats. Additionally, the high dose of rhein improved both TGF- β 1 and fibronectin mRNA expressions, while the low dose of rhein only alleviated fibronectin mRNA expressions.

Conclusions : Rhein can improve renal fibrosis in diabetic nephropathy rats, and which may be mediated through inhibition of the renal mRNA expressions of TGF- β 1 and fibronectin.

Keyword : Rhein, Diabetic Renal Fibrosis, TGF- β 1, Fibronectin

I. 서 론

당뇨병성신장질환(Diabetic Nephropathy, DN)은 당뇨병의 가장 흔한 합병증의 하나로서 발병율이 점차 증가하는 추세를 보이고 있으며 당뇨병으로 인한 사망의 중요한 원인으로 인정받고 있다.^{1,2)}

DN은 신장의 여러 구조에 영향을 미치는데 주로 사구체 경화와 섬유화에 의한 신장의 기능상실로 이어져 이러한 병변의 주요원인은 사구체 세포외기질 (Extracellular Matrix, ECM)의 증가와 간질의 섬유화이다.³⁾ 그중 TGF- β 1은 ECM의 합성을 촉진하여 섬유화를 유도하는 주요한 사이토카인으로 알려져 있다.⁴⁾ 당뇨병에서 장기적인 고혈당은 TGF- β 1의 promoter를 작동하여 세포외 기질인 Fibronectin, 제1형콜라겐, 제4형콜라겐등의 합성을 증가시킨다. 또한TGF- β 1은 기질의 분해를 저해하고 세포와 기질사이 상호작용을 증가하여 ECM의 축적을 촉진한다^{5,6)}. TGF- β 1은 DN의 발병기전과 밀접한 관계를 보이고 있는 관건적인 요인이지만 현재까지 TGF- β 1의 발현을 억제함으로써 신장의 섬유화를 억제하여 DN을 치료하는 효과적인 약물과 방법을 찾지 못하고 있다.

본 연구에서는 대황추출물의 주요성분인 대황산 (Rhein)을 이용하여 당뇨병쥐의 신장에서 TGF-

β 1의 발현과 세포외기질의 발현을 고찰함으로써 이를 토대로 DN의 임상치료에 기초적인 실험근거를 제공할 것으로 생각된다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

대황산은 Xi'An Kang Wei Biology Project Co. ltd. (중국)에서 구입하였고 Streptozotocin (STZ)은 Sigma, TGF- β 1항체는 R&D사, 기타 시약은 모두 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 실험동물

150-180g의 수컷 Wistar rat (중국 목단강의 과대학 동물실 제공)를 구입하여 물과 고체사료를 충분히 공급하여 1주간 실험실 환경에 적응후 실험에 사용하였다.

3. 당뇨병 신질환의 유발 및 실험군 선정 및 대황산의 투여

STZ의 복강주사로 당뇨병을 유발하였다. 0.1 M의 citrate buffer를 pH 4.5로 적정한 다음, 20mg/kg/d의 분량으로 3일 연속 복강 주사 하고 정상군은 동일한 양의 0.1 M citrate buffer를 복강 주사하였다. 48시간후 공복혈당을 측정하여 ≥ 16.8 mmol/L이면 당뇨병이 유발되었다고 생각하고 실험에 사용하였다. 6주후 채혈하여 공복혈당을 측정하여 혈당농도 ≥ 16.8 mmol/L, 혈중 cr-

*교신저자 : Zhenglin Zhao, Research Fund for Overseas & Returned Scholars from the Heilongjiang Provincial Department of Education of China (No. 1154h24).
· Tel : +86-453-6984382
· Email : mdj6612@163.com

·접수 2013/06/03 ·수정 2013/06/08 ·채택 2013/06/10

eatinine 농도 $\geq 0.8\text{mg/dl}$, metabolic cage에 넣어 소변을 수집하여 24시간 요단백을 측정하여 요단백 $\geq 20\text{mg}$ 에 도달된 쥐를 DN이 유발된 것으로 생각하고 실험을 계속하였다. 결과 DN이 유발된 쥐는 모두 24마리였다. 실험군은 4개조로 나누었다. 정상군 A조(n=7)는 0.1 M의 citrate buffer를 복강 주사하고 당뇨병 대조군 B조(n=10)는 STZ로 당뇨병을 유발시킨 후, 증류수를 하루2회 경구 투여하였다. 실험군 C조(n=7)는 저농도 치료군으로 대황산을 (25 mg/kg) 하루 2회 경구투여하였고 실험군 D조(n=7)는 고농도 치료군으로 대황산을 (50 mg/kg) 하루 2회 경구투여 하였다. 대황산의 투여기간은 4주로 하고, 실험 종료시까지 물과 고체사료를 충분히 공급하면서 관찰하였다. 대황추출물 투여기간 중 당뇨병대조군 B조 쥐 4마리가 death하였는데 그 원인은 STZ로 인한 독성과 장기적인 고혈당이 원인으로 생각된다.

4. 생화학적 분석

혈당측정은 금식후 꼬리 정맥혈을 취하여 ONE TOUCH II 형 혈당기(USA)로 측정하였고 혈청 중 creatinine 농도는 alkaline picrate (2.5N NaOH : picric acid = 1: 9)용액에 넣고 실온에서 20분간 방치후 spectrophotometer로 520 nm 파장에서 측정하여 정량하였다. 24h 요단백은 metabolic cage로 요를 수집하여 coomassie brilliant blue G-250법으로 정량하였다. 대황산 투여 전, 투여 후 1주, 2주, 4주에 각각 측정하였다.

5. TGF- β 1에 대한 면역조직화학염색

TGF- β 1의 단백 발현을 알아보기 위해 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 파라핀 포매된 신장생검조직을 4m두께로 잘라서 부착제로 처리된 슬라이드에 붙이고 탈파라핀을 거쳐 함수하였다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소수 용액에서 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.01M 인산염 완충액에서 10분간 세척하였다. TGF- β 1에 대한 1차 항체인 TGF- β 1 (DAKO, Carpinteria, U.S.A) 을 1:400으로 희석하여 37°C에서 30분간

반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG (1:50, AKO, Carpinteria, U.S.A.)를 2차 항체로 사용하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. Streptavidin peroxidase (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)로 37°C에서 15분간 반응시키고 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하였다.

6. 신장 조직내 TGF- β 1, Fibronectin mRNA의 발현

대황산이 쥐의 신장조직에서의 TGF- β 1, Fibronectin 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 total RNA를 추출한 후 RT-PCR 방법을 시행하였다. 최종 투여 4주째 쥐를 ether 마취하에 개복하여 신장을 적출하여 TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 총 RNA를 추출하고 RT-PCR은 Promega사의 제품을 사용하여 TGF- β 1, Fibronectin mRNA 발현을 분석하였다.

TGF- β 1 Primer: Upstream primer는 5'-AGC CTG CTT CTT GAG TC-3', Downstream primer는 5'-AGG AAA GGT AGG TGA TA-3'(241bp). PCR 반응조건은 예비변성을 94°C에서 5분간 시행 후 변성 94°C에서 30초, 결합 49°C에서 30초, 신장 72°C에서 30초로 이루어진 중합효소연쇄반응을 40회 진행하였으며 이후 신장반응을 72°C에서 10분간 진행하였다. Fibronectin Primer: Upstream primer는 5'-TGA CTC GCT TTG ACT TCA CCA C-3', Downstream primer는 5'-TCT CCT TCC TCG CTC AGT TCG T-3'(205bp). PCR 반응조건은 예비변성을 94°C에서 5분간 시행 후 변성 94°C에서 60초, 결합 65°C에서 60초, 신장 72°C에서 90초로 이루어진 중합효소연쇄반응을 35회 진행하였으며 이후 신장반응을 72°C에서 10분간 진행하였다. 대조군으로 GAPDH를 사용하였으며 Upstream primer는 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', Downstream primer는 5'-TCC ACC ACCCTG TTG CTG TA-3'(419bp). PCR 반응조건은 예비변성을 94°C에서 5분간 시행 후 변성 94°C에서 30초, 결합 63°C에서 30초, 신장 72°C에서 30초로 이루어진 중합효소연쇄반

응을 35회 진행하였으며 이후 신장반응을 72°C에서 10분간 진행하였다. 얻어진 PCR 생성물은 et-hidium bromide가 첨가된 2% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고 결과는 GAPDH 발현량에 대한 상대적인 값으로 표현하였다.

7. 통계분석

모든 자료는 mean ± SEM로 표시하였다. 통계분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램 SPSS 윈도우용 13.0판을 이용하여 two-way ANOVA를 수행하였으며 각 군 간의 차이검정은 post hoc Turkey's test로 분석하였다. P값은 0.05 미만, 0.01미만을 각각 통계학적으로 유의한 것, 매우 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 혈당의 변화

STZ투여 후 쥐의 혈당은 높아져 20-30mmol/L이며 Group B, Group C, Group D의 혈당농도는 비슷하며 Group A보다 현저히 높다. Group B는 시간이 늘어남에 따라 혈당농도가 지속적으로 높아지는 양상을 보이고 Group C와 Group D는 대황

산 투여시간과 비례하게 혈당이 현저히 낮아지는 양상을 보여 대황산 투여 4주째에는 Group B와 현저한 차이를 보였으며 (P<0.01) Group D의 효과가 더욱 현저하였다. (Table 1)

2. 혈청 creatinine의 변화

STZ를 투여하여 DN을 유발한 후 혈청 creatinine의 변화를 측정한 결과 Group B는 정상군 Group A에 비하여 유의하게 높아졌으며 (P<0.01) 대황산 투여 한 후 Group C와 Group D의 혈청 creatinine 농도는 시간에 비례하게 낮아지는 양상을 보였으며 투여 4주째는 정상군 Group A와 거의 비슷한 농도를 나타냈다 (P<0.01). (Table 2)

3. 면역조직화학 염색 관찰

신장조직에서 TGF-β1의 발현을 확인하고자 면역화학염색을 실행한 결과 대황산 투여 4주 후 신장에서 TGF-β1의 발현은 현저한 차이를 보이고 있다. 정상군 Group A에서는 TGF-β1의 발현이 세뇨관주위에서 약하게 발현되었지만 DN이 유발된 Group B에서는 사구체 간질, 사구체 기저부, 모세혈관주위 등에서 모두 강하게 발현되었으며 대황산 투여 후 4주째 치료군인 Group C와 Group D의 TGF-β1의 발현은 현저히 감소되었음을 관찰할 수 있었다 (P<0.01) (Fig. 1).

Table 1. Changes of the Serum Glucose in Rhein Treated and Untreated Rats and Controls (mmol/L)

	0 week	1 week	2 week	4 week
Group A	6.67 ± 0.75	7.01 ± 0.57	7.54 ± 0.67	7.33 ± 0.48
Group B	22.32 ± 3.44**	27.56 ± 4.39**	25.62 ± 3.12**	30.55 ± 3.55**
Group C	22.86 ± 4.07**	19.33 ± 4.31* [§]	16.74 ± 4.59* [§]	13.65 ± 3.96* [§]
Group D	24.42 ± 5.14**	20.86 ± 4.76* [§]	14.63 ± 4.72* [§]	8.48 ± 3.79* [§]

* P<0.05, ** P<0.01 vs Group A; § P<0.01,vs Group B; # P<0.05, vs Group C

Table 2. Changes of the Serum Creatinine in Rhein Treated and Untreated Rats and Controls (mg/dl)

	0 week	1 week	2 week	4 week
Group A	0.433 ± 0.044	0.501 ± 0.038	0.389 ± 0.042	0.402 ± 0.037
Group B	0.822 ± 0.033*	0.812 ± 0.028*	0.953 ± 0.042*	0.904 ± 0.035*
Group C	0.875 ± 0.045*	0.763 ± 0.037* [§]	0.638 ± 0.038* [§]	0.584 ± 0.366* [§]
Group D	0.904 ± 0.036*	0.771 ± 0.029* [§]	0.449 ± 0.033* [§]	0.326 ± 0.031* [§]

* P<0.05, ** P<0.01 vs Group A; § P<0.01,vs Group B; # P<0.05, vs Group C

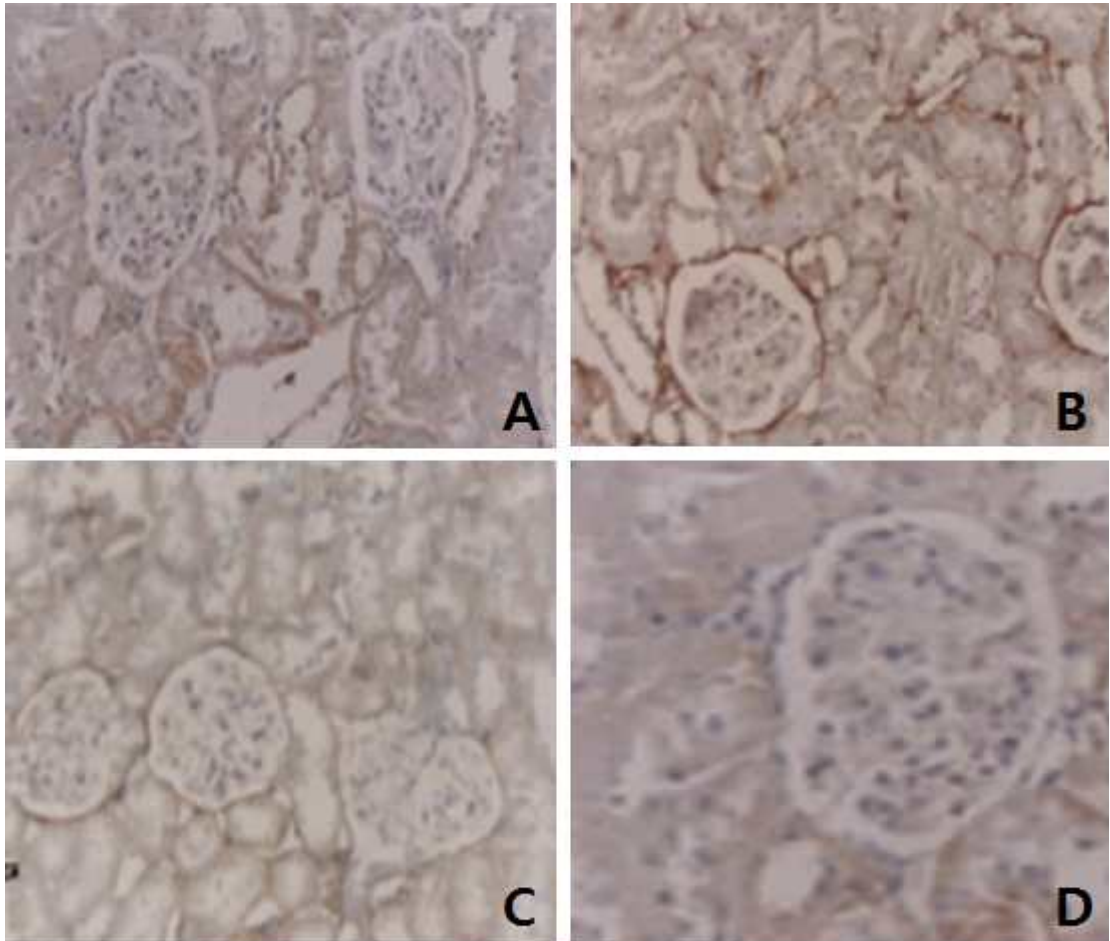


Fig. 1. TGF- β 1 immunohisto-staining in rat kidney (200 \times). A: non-diabetic control group; B: DN control group; C: the group treated with the low dose of rhein; D: the group treated with the high dose of rhein.

4. 신장조직에서 TGF- β 1, Fibronectin mRNA의 발현

DN이 유발된 Group B의 TGF- β 1의 mRNA 발현은 정상군 Group A에 비해 높으며 대황산 치료군 Group C의 TGF- β 1 mRNA의 발현은 Group B보다 줄어들었지만 유의성을 나타내지 않았다. Group D의 TGF- β 1 mRNA의 발현은 Group B와 현저한 차이를 보여 유의성을 나타냈다. ($P < 0.05$) Fibronectin mRNA의 발현도 비슷한 양상을 보였지만 대황산 투여 4주째 Group C, Group D의 Fibronectin의 발현은 Group B와 현저한 차이를 보여 유의성을 나타냈다 ($P < 0.05$) (Fig. 2).

IV. 고찰 및 결론

본 연구에서는 생쥐에 STZ를 투여하여 급성 인슐린 의존성 당뇨병을 유발한 후 DN을 보이는 생쥐의 신장조직에서 진행되는 병리적인 변화와 그 원인을 분석하고 DN이 유발된 쥐에 대황산을 투여하여 효과를 관찰 하였다. TGF- β 는 다면발현성 사이토카인의 대표적인 물질 중의 하나로, 25 kDa의 이합체 단백질로서 섬유화를 유발하는 대표적인 사이토카인으로 알려져 있으며, 잠복기 형태로 분비되어 세포 표면과 세포외기질에 저장되었다가 활성화 된다⁷⁾. TGF- β 는 TGF- β 1, TGF-

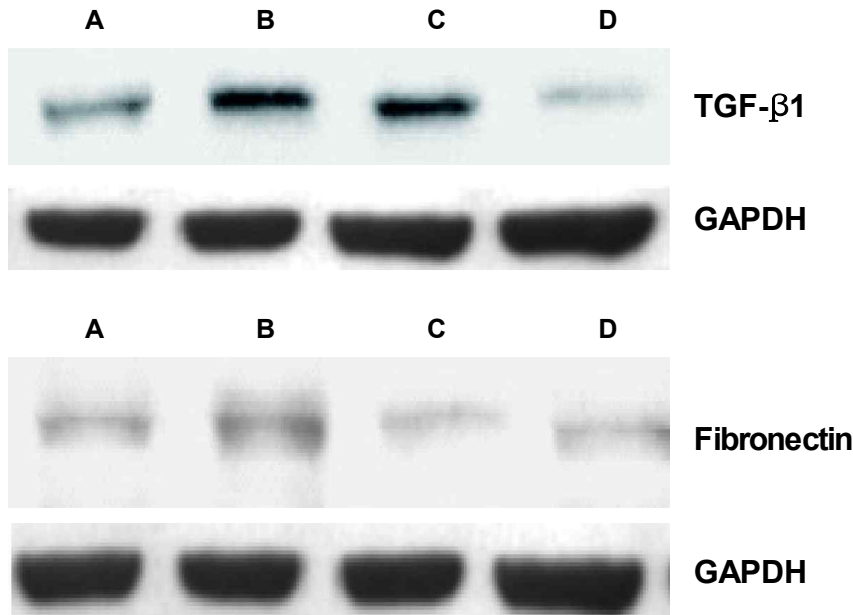


Fig. 2. TGF- β 1 and fibronectin mRNA expression in renal cortex. A: Control group; B: DN Model group; C: Low concentration treated group; D: High concentration treated group

β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, TGF- β 5 등 5 종류의 아형들이 있고, 이들은 유사한 생물학적 작용을 갖는다^{8,9)}. 그중에서 TGF- β 1은 신장의 메산지움, 신세뇨관 세포에 분포하고 있으며, 당뇨병성 신증 발생에 있어 대표적인 인자 중의 하나로 생각되고 있다. TGF- β 1은 collagenase 생성억제와 metalloprotease inhibitor의 생성을 증가시켜 세포외간질 (ECM)을 조절한다^{3,10)}. 고혈당, 고혈압, 사구체 내 혈압 증가, 안지오텐신 등은 잘 알려진 당뇨병성 신증의 유발요인으로, 이 요인은 마찬가지로 TGF- β 1의 생성을 촉진시키는 요인으로 작용하고 있다¹¹⁾.

최근 TGF- β 1의 생성을 억제하여 신장조직의 섬유화를 억제하여 사구체 경화와 간질의 섬유화로 인한 신장기능의 상실과 만성 신부전을 예방하기 위한 연구를 많이 진행하고 있다. 본 연구는 대황추출물을 이용하여 신장조직에서 TGF- β 1 및 Fibronectin의 발현의 변화를 고찰하여 대황산의 효과를 확인하여 당뇨병신장질환의 치료제로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

대황산은 한약 대황의 주요 성분으로서 많은 연

구와 실험에서 DN을 치료할 수 있는 효과가 있을 것으로 예측하고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 대황산은 세포의 당대사를 조절하여 TGF- β 의 역할을 저해하며 지질대사의 혼란을 바로잡아 주고 내피세포와 인슐린 저항성을 조절하여 당뇨병으로 인한 신장질환을 치료할 수 있는 가능성을 보여주었다. 대황산은 또 STZ로 유발된 당뇨병의 뇨단백의 배설을 감소시키고 신장의 사구체 비후를 줄이고 사구체 간질의 면적을 감소시켜 사구체에서 TGF- β 1과 GLUT1 mRNA의 발현을 감소시켜 당뇨병 쥐의 지질 대사를 효과적으로 개선하여 혈청의 creatinine의 농도를 조절하여 뇨단백의 배설을 감소하며 ECM의 축적을 줄여서 사구체 경화를 막는다^{15,16)}.

본 연구에서는 대황산은 당뇨병쥐의 혈당과 혈중 creatinine의 농도를 줄이고 DN이 유발된 쥐의 신장조직에서 TGF- β 1의 발현이 사구체 간질이나 세뇨관의 기저막 또는 모세혈관 주위에서 관찰하였으며 대황산을 투여한 후 신장조직에서 TGF- β 1의 발현, TGF- β 1, Fibronectin mRNA의 발현은 모두 현저히 감소되었음을 확인하였다. 활성화된 TGF- β 는 ECM의 축적을 늘이고 섬유화를 촉진하는 작용이 있다. TGF- β 는 또 제1형 콜라

겐과 제4형 콜라겐, Fibronectin 등의 ECM을 구성하는 분자들의 합성을 촉진한다¹⁷⁾. 본 연구에서 보여준 대로 대황산 투여 후 신장조직에서 Fibronection mRNA의 발현이 DN이 유발된 쥐보다 현저히 줄어들어 대황산은 TGF- β 의 활성화로 인한 ECM의 생성을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있다. 이로부터 대황산은 신장조직의 섬유화를 억제하여 당뇨병으로 인한 신장질환으로 발전하는 것을 예방할 수 있는 유용한 치료제로 응용 될 가능성을 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Munaka KR. Long-term complications of diabetes mellitus, part 1:retinopathy, nephropathy, neuropathy, Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1995;25:715-30.
2. Nichols R. Complications and concurrent disease association with diabetes mellitus, Semin Vet Med Surg (Small Anim). 1997;12:263-7.
3. Eddy AA. Expression of genes that promote renal interstitial fibrosis in rats with proteinuria. Kidney Int. 1996;49:S49-S54.
4. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell, 1991;64:867-9.
5. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol. 1996;7:2495-508.
6. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor in tissue fibrosis. N Engl J Med. 1994;331:1286-92.
7. Flaumenhaft R, Abe M, Mignitti P, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. M J Cell Biol. 1992;118:901-9.
8. Okuda A, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis: possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. J Clin Invest. 1990;86:453-62.
9. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta : recent progress and new challenges. J Cell Biol. 1992;119:1017-21.
10. Massague J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem. 1998;67:753-91.
11. 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 Natl Acad Sci USA. 2000;97:8015-20.
12. 郭啸华, 刘志红, 王建平等. 大黄酸对NOD小鼠糖尿病肾病的治疗作用观察. 肾脏病与透析肾移植杂志. 2002;11:11-6.
13. 郭啸华, 刘志红, 彭艾等. 大黄酸对2型糖尿病肾病大鼠疗效观察. 中华肾脏病杂志. 2002;18:280-4.
14. Guo XH, Liu ZH, Dai CS, Li H, Liu D, Li LS. Rhein inhibits cell hypertrophy and accumulation of extracellular matrix in renal tubular epithelial cells induced by transforming growth factor- β 1. Acta Pharmacol Sin. 2001;22:934-8.
15. Mogyorosi A, Ziyadeh FN. GLUT1 and TGF-beta: the link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 1999;14:2827-9.
16. Brosius FC, Heilig CW. Glucose transporters in diabetic nephropathy. Pediatr Nephrol. 2005;20:447-51.
17. Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, Cooper ME. Expression of transforming growth Factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. Diabetes. 1998;47:414-22.