

挑仁이 일측 신절제와 streptozotocin으로 유발된 당뇨병성 신증 Rat에 미치는 영향

김남규, 오재선, 전상윤
동신대학교 한의과대학 내과학교실

The Effects of Prunus on Diabetic Nephropathy Rats Induced by Unilateral Nephrectomy and Streptozotocin

Nam-kyu Kim, Jae-seon Oh, Sang-yun Jeon
Dept. of Internal medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives: Diabetic nephropathy is the most common cause of end stage renal disease. Transforming growth factor (TGF)- β 1, type IV collagen, advanced glycation end-products (AGEs), and angiotensin II type 1 receptor (AT1) are the main factors of diabetic nephropathy. We investigated the effects of Prunus on renal function and histopathological changes of diabetic nephropathy rat model induced by unilateral nephrectomy and streptozotocin.

Methods: Diabetes was induced in male Sprague-Dawley rats (290 \pm 10 g) by injecting streptozotocin (55 mg/kg) into the tail vein after unilateral nephrectomy. Rats were divided into 3 groups (n=6): normal, control, and Prunus. After 8 weeks of oral administration of Prunus extract on the Prunus group from 3 days after streptozotocin injection, we checked weight, 24 hrs urine, blood biochemistry and renal tissue to evaluate renal function and histopathological changes by examining parameters including albuminuria, BUN, creatinine, cholesterol, low density lipoprotein (LDL), triglyceride, TGF- β 1, type IV collagen, AGEs, and AT1. We also measured mRNA expression of TGF- β 1, type IV collagen, AGEs, and AT1 by Real Time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Prunus decreased the amount of 24 hrs proteinuria, and inhibited histopathological changes of diabetic nephropathy including the expression and accumulation of TGF- β 1, type IV collagen and AGEs which could promote development of diabetic nephropathy. Prunus also inhibited mRNA expression of TGF- β 1, type IV collagen.

Conclusions: These findings suggest that Prunus might protect the renal function and inhibit the development of renal injury by regulating factors including TGF- β 1, type IV collagen, AGEs, except AT1, so Prunus can be used for diabetic patients to prevent the progression of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy, Prunus, unilateral nephrectomy, streptozotocin

1. 緒 論

당뇨병의 합병증들은 대부분 장기적인 고혈당 상태로 인한 혈관장애로 인해 발생하게 되는데, 그 중 당뇨병성 신증은 미세혈관 합병증으로 말기신부전으로 이행되는 주요한 원인이다^{1,2}. 당뇨병성 신증에 의한 말기신부전 환자들은 비당뇨병에 의한

· 교신저자: 전상윤 광주시 남구 월산로 141번지
동신대학교 광주한방병원 한방내과
TEL: 062-350-7207 FAX: 062-350-7551
E-mail: damiano70@hanmail.net
· 이 논문은 2014년 2월 동신대학교 일반대학원 한의학과 내과
학전공 박사학위 논문임.

말기신부전 환자들에 비해 여러 가지 동반 질환을 가지고 있어 생존율과 삶의 질이 현저히 저하된다. 이에 따라 당뇨병성 신증의 조기 발견, 예방 및 그 치료가 중요하다³.

당뇨병성 신증은 한의학적 관점에서 消渴의 轉變證 중 水病으로 水腫, 浮腫, 眩暈, 虛勞, 尿濁如膏, 尿脂, 關格 등의 범주에 속한다^{4,5}. 한의학적 병리 기전으로는 燥熱로 陰虛가 발생되어 津液이 상하고 氣가 모손되어 결국 肝腎陰虛와 氣陰兩虛가 나타나며 결국 陰陽兩虛 하게 되니 腎陽虛로 인해 水腫에 이르게 된다. 병이 오래 되거나 혹은 오랜 치료가 효과가 없을 때는 瘀血이 內阻되는 경우가 많으니 活血化瘀하는 처방을 겸하여 사용한다^{4,6}.

당뇨병성 신증에 대한 한의학적 연구를 보면 복합처방에 대한 연구⁷⁻⁹와 丹蔘¹⁰, 水蛭¹¹, 三七根¹², 紅花¹³, 牡丹皮¹⁴ 등 化瘀劑를 사용하여 유의한 결과를 얻은 실험이 보고되고 있다.

본 실험에 응용한 桃仁(Prunus Persicae Semen)은 活血祛瘀약으로 活血祛瘀, 潤腸通便의 효능이 있어 瘀血阻滯로 인한 經閉, 痛經, 癥瘕痞塊, 跌撲損傷, 腸燥便秘 등을 치료하는 효능이 있다¹⁵. 최근 桃仁을 이용하여 항염 효과¹⁶, 고지혈증¹⁷, 죽상동맥 경화¹⁸, endotoxin을 투여한 혈액에 미치는 작용¹⁹ 등의 연구가 보고 되었으며 특히 桃仁이 포함된 복합 제제로 桃仁承氣湯을 이용하여 당뇨병성 혈관장애에 대한 개선 및 혈관 합병증에 대한 효능²⁰이 밝혀져 당뇨병의 미세혈관 합병증인 당뇨병성 신증에 桃仁의 좋은 효과를 기대할 수가 있다.

이에 저자는 1/2 신절제술 후 췌장의 β세포에 특이적으로 반응하여 당노를 유발시키는 약물로 알려진 streptozotocin으로 당뇨병성 신증이 유도된²¹⁻²³ rat에 桃仁을 투여하여 체중과 24시간 요단백 배설량, 혈청 생화학 분석, 신장의 조직 병리학적 변화, 당뇨병성 신병증의 주된 병리 인자들의 면역조직화학염색 이미지 분석, 당뇨병성 혈관합병증의 주요 병리 인자들의 유전자 발현 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 실험약재

본 실험에 사용한 약재인 桃仁(Prunus persicae semen)은 동신대학교 부속 한방병원(Mokpo, Korea)에서 구입한 것을 정성하여 사용하였다.

2) 동물

280~300 g의 수컷 Sprague-Dawley rat(중앙실험동물, Korea)을 구입하여 실온의 cage에서 40~70%의 습도를 유지하며 12시간씩 낮과 밤이 교대되는 환경으로 실험 전 1주일간 사육하여 적응기를 거쳤으며, 음수는 자유롭게 공급하였다(Table 1).

Table 1. Composition of Experimental Diets (LabDiet 5002C33)

	Protein	20.1
	Fat (ether extract)	4.5
	Fat (acid hydrolysis)	5.1
Ingredient (%)	Crude Fiber	4.6
	Ash	5.8
	Calcium	0.80
	Phosphorus	0.60
Gross nergy (kcal/gm)		4.04

3) 시약 및 기기

일반시약의 경우 당뇨병 유도제 streptozotocin (Sigma Chemical Co, USA), 동물마취제(zoletil, Virbac Laboratories, France)를 사용하였다.

검체의 제조 및 실험 결과 측정을 위해 사용된 기기는 rotary evaporator(Model NE-1, 東京理化學株式會社, Japan), 동결건조기(Model FD-1, 東京理化學株式會社, Japan), 혈당측정기(SureStep, LIFESCAN Inc, USA), high-resolution camera 부착 광학 현미경(Olympus BX-50, Olympus Optical, Japan), MetaVue (Molecular devices, USA), 실시간 유전자 분석기(StepOne real-time PCR device, Applied Biosystems, USA), 통계학적 비교분석기(GraphPad PRISM statistical

package(ver 2.00), Graphpad software Inc, USA)를 사용하였다.

면역조직 화학염색을 위하여 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA.), 10% normal horse serum (Vector Laboratories, USA.) vectastain ABC ELITE kit(Rat IgG)(Vector Laboratories, USA)를 사용하였고, 이 때 사용한 각각의 primary antibody 종류는 TGF- β 1은 polyclonal rabbit anti-rat TGF- β 1 antibodies(Santa Cruz Biotechnology, USA), Type IV collagen은 Goat Anti-Type IV Collagen(SouthernBiotech, USA), AGEs는 Anti AGE Monoclonal Antibody (Clone No.6D12)(TransGenic Inc, Japan), AT1은 Rabbit polyclonal Antibody(abcam, USA)를 사용하였으며, secondary antibody는 biotinylated Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG(H+L) made in horse(Vector Laboratories, USA)를 사용하였다.

신장 수질 조직에서의 RNA 분리는 Mini RNA Isolation II TM(ZYMO RESEARCH, USA)을 이용하였으며, 유전자 발현을 위하여 SYBR[®] Premix Ex Taq TM(Takara, Japan), ROX(Takara, Japan)를 사용하였고, 역전사 연쇄중합반응(Reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)을 위하여 StepOne real-time PCR device(Applied Biosystems, USA)와 StepOne Software(Applied Biosystems, USA)를 이용하였다.

2. 方法

1) 검체의 제조

총량 1000 g의 桃仁을 1,500 ml의 80% 에탄올에 넣고 heating mantle를 이용하여 2시간 동안 가열 추출하고 여과한 여액을 500 ml 플라스크에 applicator를 이용하여 넣은 후 filter로 걸러냈다. 걸러진 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조시켰다. 동결 건조된 桃仁 추출물을 실온에서 보관하였다. 桃仁의 최종 수거율은 9.0%(90 g)였다.

2) 당뇨병성 신병증 동물 모델의 제작

적응기간을 마친 후, zoletil을 1 cc/kg 당 rat의 꼬리정맥을 통해 주사하여 마취시켰다. 마취된 rat

의 우상복부를 절개하여 우측 신장을 노출시킨 후 신동맥, 신정맥, 우측 요관을 봉합사로 묶은 다음 우측 신장을 절제하였다. 정상군의 경우 개복수술 시 마취 하에서 복부를 절개하여 신장을 노출시킨 후 손으로 만지기만 하고 신장의 어떠한 절제나 손상 없이 다시 봉합하였다. 실험동물에 수술전후 수술부위에 대한 소독, 체온 유지를 위한 기본 처치 및 감염예방을 위해 ampicillin(150 mg/Kg)으로 피하처치 하였다. 우측 신장 절제 1주일 후 pH 4.5의 citrate buffer(2.5 ml/kg)에 녹인 streptozotocin을 rat의 꼬리 정맥을 통해 55 mg/kg의 용량으로 1회 주사하였다. 반면 정상군은 citrate buffer(2.5 ml/kg)만을 rat의 꼬리 정맥으로 주사하였다.

당뇨병의 유발여부를 확인하기 위해 streptozotocin 정맥주사 3일 후 rat의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기를 이용하여 혈당을 측정하였고, 측정된 혈당이 300 mg/dl 이상인 rat만을 본 실험에 사용하였다.

3) 실험군의 배정 및 연구 과정

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

정상군은 streptozotocin 없이 citrate buffer만을 정맥 주사하였고, 연구기간 동안 어떤 약물도 투여하지 않았다. 대조군은 streptozotocin 투여 3일 후 측정된 혈당이 300 mg/dl 이상인 rat을 대상으로 연구기간 동안 insulin 투여 없이 streptozotocin 투여 3일 후부터 생리식염수 5 ml/kg만을 8주간 경구 투여하였다. 桃仁 투여군은 streptozotocin 투여 3일 후 측정된 혈당이 300 mg/dl 이상인 rat을 대상으로 연구기간 동안 insulin 투여 없이 streptozotocin 투여 3일 후부터 桃仁추출물을 생리식염수에 현탁하여 500 mg/kg의 용량으로 zonde를 이용하여 1일 1회 경구로 8주간 투여하였다.

4) 혈액학적 분석

실험시작 8주째 마지막 투약 다음날 rat의 심장에서 채혈하여 혈청 glucose, albumin, blood urea

nitrogen(BUN) 및 creatinine, total cholesterol, low density lipoprotein(LDL) cholesterol, triglyceride (TG) 등의 생화학적 분석을 시행하였다.

5) 체중 및 24시간 요단백 배설량 측정

체중은 streptozotocin 투여 이전에 측정하고, streptozotocin 투여 4일째부터 실험 종료시까지 1주일 간격으로 측정하였다. 24시간 요단백 배설량의 측정은 streptozotocin 투여 8주째에 rat을 metabolic cage에 넣고 24시간 동안 소변을 수거하여 수거된 소변에 함유되어있는 알부민의 양을 측정하였다.

6) 신장의 조직병리학적 평가

마지막 투약 다음날 체중을 측정하고 채혈 후 rat의 좌심실에 바늘을 꽂아 0.05 M phosphate buffered saline(PBS)와 4% paraformaldehyde(PFA)을 perfusion pump를 이용하여 주입하여 신장의 붉은 색이 없어질 때까지 관류시켰다. 이후 좌측 신장을 절제하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정하고 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 절편하여 gelatin coated slide에 부착시켰다. 이렇게 만들어진 조직 절편들은 조직염색을 위해 xylene에 담가 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올, 증류수에 차례로 담가 재수화(rehydration)시켰다. 재수화된 조직을 hematoxylin and eosin(H&E)로 염색하여 광학현미경 하에서 컴퓨터와 연결된 high-resolution camera 부착 광학 현미경을 이용하여 각각의 디지털 영상을 얻었다. 이러한 과정으로 얻은 영상을 통한 사구체내 메산지움 기질의 팽창정도의 평가는 이미지 분석 프로그램인 MetaVue를 이용하여 측정하였다. 무작위로 각 rat당 10개의 사구체를 선정하여 디지털 영상 상 메산지움 기질이 염색된 pink 색에 대한 RGB값의 하한값과 상한값을 입력하고 외곽선 기능을 이용하여 사구체 안쪽만을 선택한 후 각각의 사구체 내에서 메산지움 기질이 차지하는 비율을 백분율로 계산하였다.

7) Transforming growth factor(TGF)- β 1, type IV collagen, advanced glycation end-products(AGEs), angiotensin II type 1 receptor(AT1)의 면역조직 화학염색

TGF- β 1, type IV collagen, AGEs, AT1에 대한 분석은 4 μ m의 두께의 신장조직을 gelatin coated slide에 부착시킨 후 xylene에 담가 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올, 증류수에 차례로 담가 재수화(rehydration)시켰다. 1% H₂O₂ in methanol에 15분간 반응시킨 후 1% bovine serum albumin과 10% normal horse serum을 혼합하여 만든 protein blocking agent를 분주하고 1시간동안 배양하였다. 재수화 및 blocking agent의 처리과정을 거친 slide상 조직절편에 해당하는 각각의 primary antibody를 분주하고 실온에서 overnight 시켰다. 50 mM PBS로 3회 세척한 후 secondary antibody와 1시간 동안 반응시켰다. 다시 50 mM PBS로 3회 세척한 후 vectastain ABC ELITE kit를 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. Diaminobenzidine(DAB)을 이용하여 갈색으로 염색하고 hematoxylin으로 대조 염색한 후 증류수, 70%, 80%, 95%, 100%에탄올, xylene에 차례로 담가 탈수화(dehydration)시키고 permount로 mounting하여 컴퓨터와 연결된 high-resolution camera 부착 광학 현미경을 이용하여 각각의 디지털 영상을 얻었다.

이러한 과정으로 얻은 영상은 이미지 분석 프로그램인 MetaVue를 이용하여 측정하였다. 무작위로 각 rat당 10개의 사구체를 선정하여 디지털 영상 상 조직내 TGF- β 1, type IV collagen, AGEs, AT1가 염색된 갈색에 대한 RGB값의 하한값과 상한값을 입력하고 외곽선 기능을 이용하여 사구체 안쪽만을 선택한 후 각각의 사구체 내에서 차지하는 비율을 백분율로 계산하였다.

8) 신장 조직에서의 RNA 분리

마지막 투약 다음날 rat의 혈액 생화학 분석용 혈액을 심장에서 채취한 후 신장 관류를 시행한 다음 우측 신절제 후 남아있는 좌측 신장을 절제

하여 절제한 좌측 신장중 신수질을 선택적으로 15 mg씩 분리하여 신속하게 tube에 넣고 여기에 ZR RNA buffer 300 μ l씩을 분주한 다음 homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직이 담긴 tube를 1,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 Zymo-Spin III Column에 옮기고 이를 2 ml collection tube에 꽂은 다음 2,000 rpm으로 1분간 원심 분리하였다. Column에 RNA wash buffer 350 μ l를 분주하고 1분간 원심분리하여 2회 세척한 후 column을 1.5 ml tube에 옮겨 꽂은 다음 RNA-free water 50 μ l를 분주하여 1,000 rpm으로 원심 분리하여 최종적으로 RNA를 수거하여 사용하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

9) Transforming growth factor(TGF)- β 1, type IV collagen, receptor for AGEs(RAGEs), angiotensin-converting enzyme(ACE) 및 angiotensin II type 1 receptor(AT1)의 real time 연쇄중합반응(Real time polymerase chain reaction, RT-PCR)

TGF- β 1, type IV collagen, RAGEs, ACE 및 AT1의 mRNA 발현은 real time 연쇄중합반응을 이용하여 측정하였다. 신피질에서 분리한 1 μ g의 RNA에 PCR buffer와 5 mM의 MgCl₂, 1 mM의 dNTP, 20 U의 RNasin, 2.5 M의 Oligo(dT), 100 U의 mononeuronal murine leukemia virus reverse transcriptase를 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 50 분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분씩 반응을 시켰다. 역전사를 통해 얻어진 각각의 complementary DNA(cDNA)에 PCR buffer, SYBR[®] Premix Ex Taq[™], ROX, primers를 혼합하여 StepOne real-time PCR device를 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였다. 연쇄중합반응의 신장단계 온도(annealing temperature)는 58 $^{\circ}$ C로 시행하였다. 이상의 과정을 통해 얻어진 결과는 StepOne Software를 이용하여 각기 threshold cycle(CT)에서의 증폭산물을 정량화하였으며, GAPDH에 대한 값으로 환산한후 대조군을 1로 환산하여 relative quantitation(RQ)값으로 표시하였다.

10) 통계분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical

package를 이용하였다. 각 군간의 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 이어 Tukey's post-hoc test로 사후 검증하였다. 각각의 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. 結果

1. 체중과 24시간 요단백 배출양에 미치는 영향

체중은 8주째에 정상군의 396.85 \pm 30.16 g에 비해 대조군에서 186.00 \pm 29.90 g으로 유의하게 감소하였다(P<0.001). 桃仁 투여군에서는 192.00 \pm 23.59 mg/dl로 대조군에 비해 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 2).

24시간 요단백 배출량에서 8주째에 정상군의 19.59 \pm 6.49 mg/kg에 비해 대조군에서 137.75 \pm 84.81 mg/kg으로 유의하게 증가하였고(P<0.001), 桃仁 투여군에서는 8주째 36.36 \pm 19.20 mg/kg으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.05)(Table 2).

Table 2. The Body Weight and 24hrs Urinary Protein Excretion of Each Experimental Group

	Normal (n=6)	Control (n=6)	Prunus (n=6)
Body weight (g)			
8 weeks	396.85 \pm 30.16	186.00 \pm 29.90***	192.00 \pm 23.59
Urinary protein excretion (mg/kg/day)			
8 weeks	19.59 \pm 6.49	137.75 \pm 84.81***	36.36 \pm 19.20#

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

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

2. 혈청 생화학 분석상 지표들의 변화에 미치는 영향

Glucose(P<0.001), BUN(P<0.001), creatinine(P<0.001), total-cholesterol(P<0.001), LDL-cholesterol(P<0.001), triglyceride(P<0.001)는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였고, albumin은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소하였다(P<0.01). Creatinine은

桃仁 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 이외의 측정 항목에서는 桃仁 투여군과 대조군사이에서 유의한 차이를 나타내지 않았다($P<0.01$)(Table 3).

Table 3. The Blood Chemistry of Each Experimental Group

	Normal (n=6)	Control (n=6)	Prunus (n=6)
Glucose (mg/dl)	193.66 ±49.77	1014.00 ±90.36***	1005.66 ±95.99
Albumin (mg/dl)	2.38 ±0.08	1.86 ±0.22**	1.92 ±0.08
BUN (mg/dl)	24.05 ±1.33	60.23 ±6.00***	63.85 ±14.76
Creatinine (mg/dl)	0.55 ±0.05	0.71 ±0.07***	0.63 ±0.05#
Total-cholesterol (mg/dl)	77.00 ±6.54	147.83 ±35.96***	128.00 ±28.72
LDL-cholesterol (mg/dl)	9.66 ±2.06	15.16 ±3.43**	11.83 ±4.75
Triglyceride (mg/dl)	77.66 ±20.65	1210.66 ±423.34***	1054.67 ±360.18

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

Significantly different from the control group (# $P<0.05$)

3. 신장의 조직 병리학적 변화에 미치는 영향

정상군은 사구체의 크기와 보우만씨 막(Bowman's capsule)과 내강(space)이 정상 크기를 나타내며, 보우만씨 막 내부 사구체에서의 내피세포(endothelial cell), 장축상피세포(visceral epithelial cell), 메산지움 세포(mesangial cell) 들의 세포밀도(cellularity)가 정상범위로 잘 유지하고 있고, 기저막(basement membrane)의 비후나 메산지움 기질(mesangial matrix)을 포함한 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 팽창이나 축적이 관찰되지 않았으며, 결합 조직의 증식이나 섬유화 역시 관찰되지 않았다.

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 세포

의 과다 증식으로 인한 세포밀도의 증가가 보였다. 아울러 메산지움 기질을 포함한 세포외 기질의 팽창이 관찰되었다.

桃仁 투여군에서는 사구체와 보우만씨 내강의 크기가 대조군에 비해 커졌고, 세포밀도는 경도의 메산지움 세포의 증식으로 인해 증가하였으나 대조군에 비해 그 정도가 현저히 낮았다. 또한 내피세포, 장축상피세포들 역시 약간의 비후가 관찰되었으나 정상군과 비슷한 정도를 유지하고 있었고, 메산지움 기질을 포함한 세포외 기질의 일부 축적이 관찰되었으나, 이 역시 대조군에 비해 현저히 낮았다.

또한 메산지움 기질의 팽창정도를 평가하기 위해 사구체내에서 메산지움 기질이 차지하는 비율을 이미지 분석프로그램을 이용하여 분석한 결과 정상군의 $10.13\pm 2.62\%$ 에 비해 대조군에서는 $38.93\pm 9.17\%$ 로 유의하게 증가하였고($P<0.001$), 桃仁 투여군에서는 $23.84\pm 7.44\%$ 로 대조군에 비해 현저한 증식 억제효과를 나타내었다($P<0.01$)(Fig. 1).

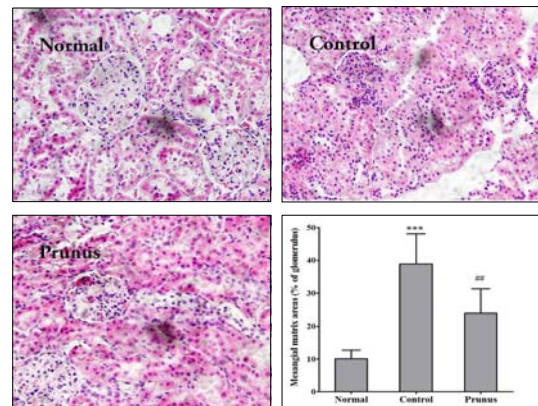


Fig. 1. Morphological profiles and morphometric studies of the kidney cortex from the rats with diabetic nephropathy experimentally induced by streptozotocin.

(A) Normal group, (B) Control group, (C) Prunus group. Original magnification $\times 200$. (D) The proportion of mesangial matrix area within glomerulus (% of positive area).

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

Significantly different from the control group (## $P<0.01$)

4. Transforming growth factor(TGF)- β 1, advanced glycation end-products(AGEs), angiotensin II type 1 receptor(AT1)의 면역조직 화학염색의 변화에 미치는 영향

사구체에서의 TGF- β 1, type IV collagen, AGEs, AT1의 발현정도를 평가하기 위해 각각의 항목에 대한 면역조직 화학염색 및 이미지 분석을 시행하였다.

사구체내 TGF- β 1 양성 면적은 정상군의 5.91 \pm 3.72%에 비해 대조군에서 22.10 \pm 5.01%로 유의하게 증가하였고(P<0.001), 桃仁 투여군에서는 16.14 \pm 5.98%로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.05)(Fig. 2).

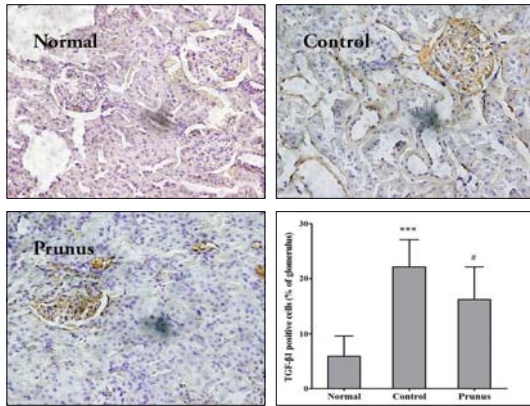


Fig. 2. Effects of Prunus on renal transforming growth factor (TGF- β 1) expression in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats.

Original magnification \times 200. The proportion of TGF- β 1 positive area within glomerulus (% of positive area).

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

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

사구체내 type IV collagen 양성 면적은 정상군의 5.15 \pm 3.51%에 비해 대조군에서 24.12 \pm 3.310%로 유의하게 증가하였고(P<0.001), 桃仁 투여군에서는 13.39 \pm 4.52%로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.05)(Fig. 3).

사구체내 AGEs의 양성 면적은 정상군의 6.76 \pm 2.21%에 비해 대조군에서 23.46 \pm 5.79%로 유의하게 증가하였고(P<0.001), 桃仁 투여군에서는 11.93 \pm 4.52%

로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.01)(Fig. 4).

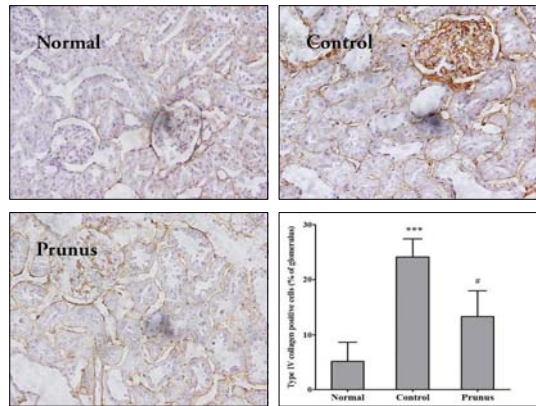


Fig. 3. Effects of Prunus on renal type IV collagen expression in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats.

Original magnification \times 200. 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<0.05)

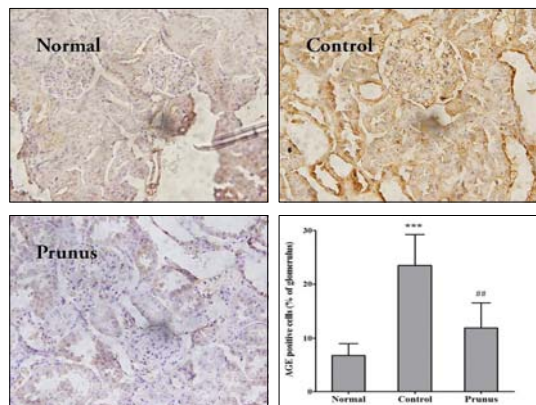


Fig. 4. Effects of Prunus on renal advanced glycation end-products (AGEs) expression in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats.

Original magnification \times 200. The proportion of AGEs positive area within glomerulus (% of positive area).

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

Significantly different from the control group (## P<0.01)

사구체내 AT1의 양성 면적은 정상군의 $5.24 \pm 2.38\%$ 에 비해 대조군에서 $23.31 \pm 7.92\%$ 로 유의하게 증가하였고($P < 0.001$), 桃仁 투여군에서는 $18.58 \pm 7.98\%$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 5).

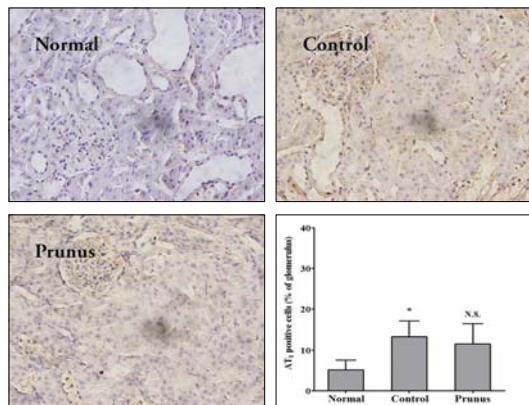


Fig. 5. Effects of Prunus on renal Angiotensin II type 1 receptor (AT1) expression in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats.

Original magnification $\times 200$. The proportion of RAGEs positive area within glomerulus (% of positive area). Each column represents the mean \pm S.D. * Significantly different from the normal group (* $P < 0.001$)

N.S. : No significance

5. Transforming growth factor(TGF)- β 1, type IV collagen, receptor for AGEs(RAGEs), angiotensin-converting enzyme(ACE) 및 angiotensin II type 1 receptor(AT1) 유전자 발현에 미치는 영향

TGF- β 1에 대한 분석에서 대조군을 1로 설정했을 때 정상군에서는 0.59 ± 0.14 였고 ($P < 0.01$), 桃仁 투여군에서는 0.76 ± 0.14 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$)(Fig. 6).

Type IV collagen에 대한 분석에서 대조군을 1로 설정했을 때 정상군에서는 0.64 ± 0.14 였고($P < 0.01$), 桃仁 투여군에서는 0.80 ± 0.18 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$)(Fig. 6).

RAGEs에 대한 유전자 발현 분석에서 대조군을

1로 설정했을 때 정상군에서는 0.84 ± 0.09 였고, 桃仁 투여군에서는 0.93 ± 0.12 로 대조군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

ACE에 대한 유전자 발현 분석에서 대조군을 1로 설정했을 때 정상군에서는 0.39 ± 0.19 였고($P < 0.001$), 桃仁 투여군에서는 0.86 ± 0.19 로 대조군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

AT1에 대한 유전자 발현 분석에서 대조군을 1로 설정했을 때 정상군 0.62 ± 0.09 였고($P < 0.01$), 桃仁 투여군에서는 0.86 ± 0.13 로 대조군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

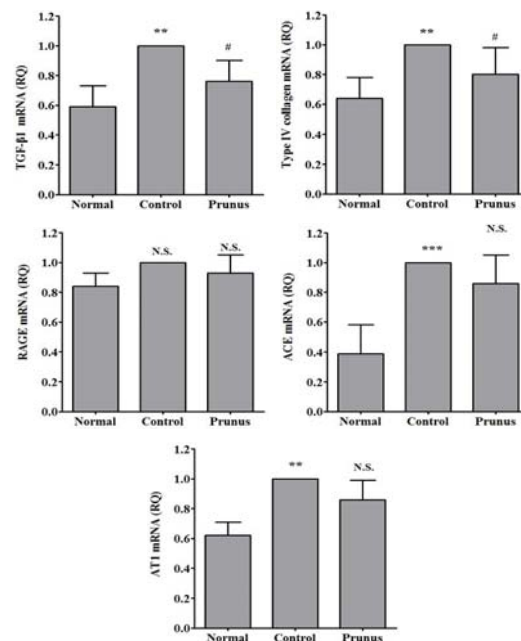


Fig. 6. Effects of Prunus on expression of Transforming growth factor (TGF)- β 1, type IV collagen, receptor for advanced glycation end-products (RAGEs), angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin II type 1 receptor (AT1) in the renal glomerulus.

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

Significantly different from the control group (# $P < 0.05$)

N.S. : No significance

IV. 考 察

당뇨병은 고혈당을 보이는 모든 대사성 질환들의 집합체를 의미한다. 당뇨병으로 인한 대사이상은 여러 장기들 특히 신장, 눈, 신경 그리고 혈관들에 이차적인 병태 생리학적인 변화를 일으키게 된다²⁴.

당뇨병은 최근 의학의 발달로 혈당조절이 용이해지면서 급성 합병증에 따른 사망은 감소하였으나 유병기간의 연장에 의한 만성 합병증인 대혈관 및 미세 혈관 합병증 등은 오히려 증가하는 추세이다^{24,25}. 특히 미세 혈관 합병증 중 하나인 당뇨병성 신병증은 말기 신부전의 주요한 원인이며, 당뇨병과 관련된 이환율과 사망률의 주요 원인이다²⁶.

말기신부전을 일으키는 만성 고혈당에 대한 기전은 완전히 알려져 있지 않으나 유전적 요인과 후천적 요인이 동시에 관여한다고 생각하고 있다²⁶. 후천적 요인으로는 다음과 같은 가설에 의해 발생할 것으로 생각하고 있다. 수용성 인자(성장인자, angiotensin II, endothelin, AGEs)의 영향, 신장 미세순환계의 혈류 역동적 변화(사구체 여과율의 증가, 과관류, 사구체 모세혈관내 압력증가) 및 사구체내의 구조적 변화(세포외 기질의 증가, 기질막의 비후, 사구체간질의 확장 및 섬유화)가 그것이며 이러한 작용의 일부는 angiotensin II 수용체를 통해 일어난다고 알려져 있다².

한의학에서는 당뇨병을 消渴의 범주에 속한다. 消渴이 오래되면 여러 가지 轉變證이 나타나는데, 그 원인에는 氣虛와 함께 濕痰과 瘀血이 관여한다. 이때 발생한 瘀血과 濕痰이 全身脈絡의 흐름을 방해하여 해당기관에 기혈 공급이 차단되어 여러 가지 轉變證을 유발하게 된다²⁷. 한의학에서는 비록 당뇨병성 신증이라는 병명은 존재하지 않지만, 당뇨병성 신증의 임상증상이라 할 수 있는 부종 및 소변증상의 변화에 대한 내용을 참고해보면 水腫, 小便白濁, 關格의 범주로 볼 수 있다⁴⁵. 결국 당뇨병성 신증은 精氣虛에 濕痰이나 瘀血이 겹쳐서 증상이 더욱 악화된다는 것을 알 수 있는데, 이는 중

국에서 만성신부전 환자들을 대상으로 분석한 자료에서도 알 수 있다. 당뇨병성 신증은 결국 만성신부전으로 이행되게 되는데, 만성신부전의 경우 精氣虛에 주로 濕熱이나 瘀血이 겹쳐서 증상을 더욱 악화시킨다고 보고하였다^{27,28}. 또한 陣은 당뇨병성 신병증이 당뇨병으로 凝血이 심해져 혈류장애와 말초 순환장애를 일으켜서 발생한 것으로 보고 치료에 活血化瘀하는 약물을 사용함을 원칙으로 하였다²⁹.

본 실험에 쓰인 桃仁(Prunus Persicae Semen)은 장미과(薔薇科 : Rosaceae)에 속한 낙엽소관목인 복숭아나무 Prunus persica (L.) Batsch와 산복사 P. davidiana (Carr.) Franch의 성숙한 種子를 건조한 것으로, 性は 平하며, 味는 苦甘하고, 心·肝·大腸經에 들어간다. 桃仁은 破瘀行血에 상용하는 약물로 瘀血阻滯로 인한 血閉·血結·血燥를 잘 치료하고 혈의 막힘을 통하며 血癥을 破한다^{15,30}.

당뇨병성 신증에 대한 최근 연구를 살펴보면 丹蓼¹⁰, 水蛭¹¹, 三七根¹², 紅花¹³, 牡丹皮¹⁴ 등 活血祛瘀하는 약물들을 단미제제로 사용하여 유의한 결과를 얻은 실험들이 보고되고 있다.

최근 桃仁에 대한 연구로 항염 효과¹⁶, 고지혈증¹⁷, 죽상동맥경화¹⁸, endotoxin을 투여한 혈액에 미치는 작용¹⁹ 등의 보고가 있었다. 특히 桃仁이 포함된 복합제제로 桃仁承氣湯을 이용하여 당뇨병성 혈관장애에 대한 개선 및 혈관 합병증에 대한 효능²⁰이 밝혀져 破瘀行血에 상용하여 血瘀阻滯로 인한 모든 증에 사용하는 약물인 桃仁이 당뇨병의 미세혈관 합병증인 당뇨병성 신증에 좋은 효과가 있을 것으로 생각한다.

이에 일측 신절제와 Streptozotocin(STZ)투여로 유발된 당뇨병성 신증 rat에 桃仁을 투여하여 24시간 요단백 배설량 측정, 혈청 생화학적 분석, 신장의 조직 병리학적 검사, 면역조직 검사 및 유전자 발현 등을 관찰하였다.

실험에서는 당뇨병성 신증을 유발하고자 일측 신절제 후에 베타세포를 선택적으로 파괴하는 STZ

를 투여하여 만성 당뇨병성 신증과 같은 상태를 유발하고자 하였다. STZ는 항생제로 개발되어 항백혈병 치료제와 발암물질로도 보고 되었는데 1963년 Rakierten에 의해 당뇨병 유발작용이 발견된 뒤로 실험동물에서 당뇨를 유발하는 물질로 가장 유용하게 사용되고 있으며, I형 당뇨병을 유발하는 가장 좋은 가장 좋은 물질이다³¹. STZ와 더불어 일측 신장의 제거로 인해 사구체 모세혈관, 메산지움, 보우만 주머니의 병변 등의 병리적인 변화가 나타나 당뇨병성 신증이 유발된다^{21-23,31}. 또한 STZ로 유발된 당뇨병의 경우 일측 신절제술 없이는 최소 3개월 정도의 유발기간이 필요하지만 일측 신절제술을 할 경우 이 기간이 단축되므로³² 실험 기간의 단축과 보다 확실한 당뇨병성 신증 모델의 유발을 위하여 일측 신절제 후에 STZ를 투여하였다. 본 실험에서는 이렇게 유발된 당뇨병성 신증 rat에 桃仁을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

신 질환에서 단백뇨는 신 질환 진행에 가장 강력한 예측인자로, 신 질환의 중증도를 나타내는 척도일 뿐 아니라 비정상적으로 여과된 다량의 단백질이 재흡수 되어 근위세뇨관 세포내에 단백질이 축적되면 신장간질에 손상을 입히고 독성 작용을 끼쳐 신 질환의 진행기전에 중요한 역할을 한다^{25,33}. 당뇨병성 신증에서도 미세 단백뇨의 발생은 현성 단백뇨의 진행에 중요한 위험되고 일단 현성 단백뇨가 발생하면 말기 신부전증으로의 진행 가능성이 매우 높다². 그러므로 요단백의 배설량 감소는 신부전 진행 속도를 늦추는 중요한 방법이 된다²⁵. 본 실험에서는 24시간 요단백 배설량은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, 桃仁 투여군은 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다(Table 2). 이는 桃仁의 투여가 당뇨병성 신증의 진행을 억제하는 것으로 생각한다.

혈당의 정상화와 엄격한 혈압조절 및 이상지질혈증의 치료가 미세 단백뇨에서 단백뇨로의 진행을 억제하는 효율적인 방법이다². 특히 혈당조절은 당뇨병 치료에서 가장 중요한 과제로 불량한 혈당

조절은 당뇨병성 신증의 가장 큰 위험인자이다. 또한 고지혈증이 당뇨병성 신증의 악화인자로 작용할 수 있는데 당뇨병 환자에서는 triglyceride의 상승과 high density lipoprotein(HDL)-cholesterol의 감소 등의 이상지질혈증을 동반하고, 신증에서는 단백뇨의 결과로 LDL-cholesterol의 상승이 더 악화된다. 이 결과 심혈관계 질환의 발생과 이에 의한 높은 사망률의 원인이 된다²⁶. 당뇨병성 신증에서는 단백뇨로 인해 뇨를 통해 배설되는 단백질이 증가하므로 혈중 albumin이 감소하게 된다. 혈중 BUN과 creatinine의 수치는 glomerular filtration rate (GFR)과 관련이 있는데, BUN과 달리 creatinine이 신장이외의 인자에 대하여 영향을 거의 받지 않는 특이성 때문에 GFR의 측정 물질로 주로 사용된다¹.

본 실험에서 Glucose, BUN, creatinine, total-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였고, albumin은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소하여 대조군에서 사구체 손상이 발생하였음을 보여준다. 桃仁 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 creatinine 농도가 유의하게 감소하여 桃仁의 투여가 신장기능 저하를 개선시키는 것으로 보여지나 BUN의 변화가 미미하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다(Table 3).

당뇨병성 신병증에서 신장의 특징적인 조직학적 소견으로 사구체의 비후, 사구체 기저막의 비후, 메산지움의 확장 및 바탕질의 증가, 보우만 피막의 유리질 방울, 섬유성 모자 등이 나타난다^{26,34}.

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. 아울러 메산지움 기질을 포함한 세포의 기질의 팽창이 관찰되었다(Fig. 1, Control). 桃仁 투여군에서는 사구체와 보우만씨 내강의 크기가 대조군에 비해 커졌고, 세포밀도는 경도의 메산지움 세포의

증식으로 인해 증가하였으나 대조군에 비해 그 정도가 현저히 낮았다. 또한 내피세포, 장측상피세포 들 역시 약간의 비후가 관찰되었으나 정상군과 비슷한 정도를 유지하고 있었고, 메산지움 기질을 포함한 세포의 기질의 일부 축적이 관찰되었으나, 이 역시 대조군에 비해 현저히 낮았다(Fig. 1, Prunus).

또한 메산지움 기질의 팽창정도가 桃仁 투여군에서 대조군에 비해 유의한 증식 억제효과가 나타나(Fig. 1), 桃仁의 투여가 당뇨병성 신병증의 진행을 억제하는 효과가 있음을 보여준다.

당뇨병성 신증에서 고혈당에 의한 조직 손상의 매개인자로 알려진 신장 내 transforaming growth factor(TGF)- β 1, type IV collagen, advanced glycation end-products(AGEs), Angiotensin II type 1 receptor(AT1)의 발현정도를 파악하였다.

TGF- β 1은 다기능 cytokine으로 정상 발육, 조직의 손상과 복구 등 생물학적 활동에 관여하는 성장 조절인자로, 사구체에서 type IV collagen, laminin, fibronectin과 같은 세포외기질 단백질의 합성을 증가시키고 분해는 감소시켜 integrin과 같은 접착물질의 생성을 촉진하여 결과적으로 사구체 경화를 유발시킨다^{2,35-36}. TGF- β 1은 고혈당이나 angiotensin II 및 최종당화산물 등의 자극에 의해 생성이 현저히 증가하기 때문에 사구체 섬유화의 공통인자로 작용함을 시사한다²⁶.

Type IV collagen은 사구체 기저막을 구성하는 대표적인 세포외기질 단백질로, 메산지움의 팽창과 세포외기질 단백질의 축적의 주된 매개인자이다^{26,36-37}.

AGEs는 만성적인 고혈당이 지속되어 발생되는 단백질의 당화반응의 최종산물로, 당뇨병성 신증 발생의 대사적요인 중 중요한 병리 인자이다. AGEs는 염증세포, 내피세포, 혈관 평활근에 발현되는 특이 수용체(RAGEs)와 결합하고, 세포외기질 단백질들과 직접 교차결합을 하여 조직을 손상시키고 당뇨병의 혈관 병변을 일으키는 등의 여러 가지 세포 유해반응을 일으킨다^{24,26,34,38}.

Angiotensin II는 renin-angiotensin system(RAS)

의 기전에 의해 renin으로부터 일련의 과정을 거쳐 변환되어 신장의 수출 세동맥에 작용하여 사구체 내 혈압을 증가시켜 사구체 경화증을 유발하며, albumin 누출을 증가시키고, 그 자체로 TGF- β 의 발현을 촉진시켜 메산지움 세포 및 세포외간질의 비후를 더욱 유발할 뿐 아니라, protein kinase C나 nuclear factor κ -B와 같은 전사인자의 발현에 직접적인 영향을 미쳐 사구체 경화증을 악화시킨다^{26,37,39}. 이러한 Angiotensin II가 작용하는 수용체는 크게 두 가지가 있으나 Angiotensin II type 2 receptor(AT2)는 혈관의 이완작용에 관여하는 물질로 그 발현이 매우 적은 것으로 알려져 있고, 대부분이 AT1을 통해서 그 작용이 이루어지게 되어 혈관의 수축, 심장의 비대, 알도스테론 분비, 나트륨 재흡수, renin 분비 억제 등의 작용을 하게 된다⁴⁰.

본 실험에서는 사구체내 TGF- β 1, Type IV collagen, AGEs의 양성 면적에서 桃仁 투여군이 대조군보다 유의하게 감소하였으나, AT1의 경우에는 유의성이 없었다(Fig. 2, 3, 4, 5).

신수질(renal medulla)에서의 TGF- β 1, type IV collagen, RAGEs, ACE, AT1 유전자 발현에서는 TGF- β 1, type IV collagen이 桃仁 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나, RAGEs, ACE, AT1의 경우 유의성은 없었다(Fig. 6).

桃仁의 투여가 TGF- β 1과 그의 작용에 의해 증가하는 type IV collagen의 유전자 발현을 억제하는 것으로 보아, 당뇨병성 신증의 발생원인 중 대사적 요인에 의해 발생하는 사구체 경화의 진행을 억제하는 데 도움을 줄 수 있다고 생각한다^{2,35}. 또한 桃仁의 투여가 AGEs의 수용체인 RAGEs의 유전자 발현에 영향을 끼치지 못하였지만 AGEs자체의 양적 면적을 줄임으로 혈관 구역 내의 AGEs-RAGEs 신호전달 축의 유해 효과 역시 억제 될 수 있으며, AGEs와 직접 교차결합하는 type IV collagen의 유전자 발현이 억제 되는 것으로 보아 당뇨병 미세 혈관 병증의 특징인 기저막의 비후를 억제하는 데에도 또한 도움을 줄 수 있다고 생각된다²⁴. 그러나

桃仁의 투여가 ACE와 AT1의 유전자 발현에 유의한 차이가 없는 것으로 보아, 당뇨병성 신증의 발생원인 중 혈류역동학적 원인에 의해 발생하는 사구체 경화의 진행의 억제에는 영향이 미비한 것으로 생각한다.

본 실험에서 당뇨병성 신증에 대한 桃仁의 투여는 요단백 배설량을 감소시키고, 혈청 생화학 지표에서 creatinine이 유의하게 감소하였다. 또한 신장의 여러 가지 조직 병리학적 변화 억제에 효과가 있었으며, 이러한 변화를 일으키는 주요 인자들 중 TGF-β1, type IV collagen, AGEs 등의 억제에 효과가 있었으며, 당뇨병성 신증의 발생요인 중 대사적 요인에 영향을 주는 주요 인자들의 발현을 억제 시켰다. 이를 종합해 보면 桃仁의 투여가 당뇨병성 신병증의 진행을 지연시키고 신장의 기능을 회복하는데 유효할 것으로 생각한다.

參考文獻

1. Futoshi Shintani. Steps to Internal medicine. 서울: 도서출판 정담; 2005, p. 49-52, 165-74.
2. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's 내과학. Vol. 2. 서울: MIP; 2013, p. 2922-57.
3. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 최신지견 내과학(II). 서울: 도서출판 고려의학; 2003, p. 1460-72.
4. 김성아, 강윤호. 당뇨병성 신증의 한의학적 접근 및 치료에 대한 연구. 대한한의정보학회지 2005; 11(2):1-13.
5. 두호경. 동의신계학. 서울: 성보사; 2003, p. 1131-41.
6. 張天, 陳以平. 實用中醫腎病學. 서울: 일중사; 1992, p. 712-8.
7. 정형철, 정지천. Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 당뇨병성 신증에서 加味九氣環童丸이 Oxidative Stress 및 Polyol Pathway에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2007;21(3):671-8.
8. 신현권, 류충렬. 韓藥複合處方이 Streptozotocin으로 유발된 糖尿病흰쥐의 血糖 및 糖尿病性腎

- 症 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지 2008; 25(3):1-11.
9. 이연경, 강석봉. 加味五苓散이 Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 糖尿病性 腎症에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2012;33(4):367-86.
10. 김영성, 이병철, 안세영, 두호경, 안영민. 단삼이 당뇨병성 신병증 Rat의 신기능 및 조직학적 변화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(3): 787-99.
11. 서수환, 김용성, 한양희. 水蛭이 Streptozotocin으로 유발된 Rat의 糖尿病性 腎症에 미치는 影響. 대한한의학회지 2008;29(4):133-45.
12. 김동훈. 三七根이 당뇨병성 신병증에 미치는 영향. 동신대 대학원 2013.
13. 김경국. 紅花가 일측 신절제와 streptozotocin으로 유발된 rat의 糖尿病性 腎症에 미치는 영향. 동신대 대학원 2013.
14. 김민석. 당뇨병성 신증 Rat에 牡丹皮가 미치는 영향. 동신대 대학원 2013.
15. 全國韓醫科大學 共同教材編輯委員會 編著. 本草學. 서울: 永林社; 2011, p. 462-3.
16. 조우아, 장민정, 천순주, 등. 桃仁 껍질의 화장품약리활성 및 항염 효과. 大韓本草學會誌 2006; 21(2):87-93.
17. 윤왕수, 소경순, 정찬길. 도인이 Triton WR-1339로 誘發된 흰쥐의 高脂血症에 미치는 影響. 대한예방한의학회지 2002;6(2):128-36.
18. 尹仁漢. 桃仁이 高Cholesterol 食餌에 의한 家兎의 粥狀動脈硬化에 미치는 影響. 경산대학교대학원 1996.
19. 이창근, 소경순, 정찬길. 桃仁이 Endotoxin을 투여한 흰쥐의 혈액에 미치는 影響. 대한약침학회지 2005;8(2):59-65.
20. 金言國. 당뇨병성 혈관 장애에 대한 도인승기탕의 개선 효과 연구. 원광대학교 대학원. 2010.
21. Yokozawa T, Nakagawa T, Wakaki K, Koizumi F. Animal model of diabetic nephropathy. *Exp*

- Toxic Pathol* 2001;53: 359-63.
22. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FR, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart, Lung and Circulation* 2003;12: 44-50.
 23. Brondum E, Nilsson H, Aalkjær C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models. *Horm Metab Res* 2005;37:56-60.
 24. 범문에듀케이션 편집부. 병리학. 서울: 범문에듀케이션; 2011, p. 927-8, 1118-33.
 25. 대한신장학회. 임상신장학. 서울: 광문출판사; 2005, p. 330-43, 594-7.
 26. 김용진, 민현기, 최영길, 이태희, 허갑범, 신순현, 등. 당뇨병학. 제 4판. 서울: 대한당뇨병학회; 2011, p. 585-603.
 27. 전국 한의과대학 신계내과학교실. 腎系內科學. 서울: 군자출판사; 2011, p. 89-96, 300-12.
 28. 양위, 주문봉, 용국향, 주소주, 호박근, 구용만, 등. 681례의 만성신부전 환자에 대한 각 단계에서의 邪實兼證의 특징 분석. *동서의학* 2000; 27(1):33-40.
 29. 陳以平. 腎病的辨證與辨病治療. 북경: 人民衛生出版社; 2003, p. 143-61.
 30. 張介賓. 景岳全書. 서울: 도서출판 한미의학; 2006, p. 2512-3.
 31. 이태희. 당뇨병 유발 약물의 기전. *대한당뇨병 학회지 당뇨병* 1993;27(1):1-15.
 32. Lopes GS, Lemos CC, Mandarin-De-Lacerda CA, Bregman R. Effect of unilateral nephrectomy on renal function of diabetic rats. *Histol Histopathol* 2004;19(4):1085-8.
 33. 서울대학교병원 신장내과. 임상 신장학 입문. 서울: (주)신희메드싸이언스; 2002, p. 389-91.
 34. 대한병리학회. 병리학[II]. 서울: 고문사(KMS); 2011, p. 770-7, 814-6.
 35. Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney disease. *Am J Physiol* 1994;35(6):829-42.
 36. 강영선, 지이화, 한상엽, 신진호, 조상경, 차대룡, 등. 당뇨병성 신증의 발병기전으로 족세포(Podocyte)에서 형질전환인자(Transforming Growth Factor) β 의 역할. *대한신장학회지* 2003;22(6):645-54.
 37. 김용섭, 이정호, 조상경, 윤종우, 이소영, 한상엽, 등. 고농도 포도당에서 배양한 혈관사이질 세포에서 안지오텐신 II와 안지오텐신 전환효소 억제제가 Procollagen α 1(IV) mRNA 발현에 미치는 효과. *대한신장학회지* 2000;19(1):12-21.
 38. 대한내분비학회. 내분비대사학. 서울: 군자출판사; 2011, p. 713-20.
 39. 박정탁, 강신욱. 당뇨병성 신증의 병태생리. *대한내과학회지* 2009;77(6):670-7.
 40. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007;13:9-20.