



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2
0
1
4
년
2
월

2014년 2월
박사학위논문

박
사
학
위
논
문

S
T
Z
로
유
발
된
당
뇨
병
성
신
증
환
자
에
서
G
T
E
와
칸
테
사
탄
의
시
너지
효과

이
완
수

스트렙토조토신으로 유발된
당뇨병성 신증 환자에서
신보호에 대한 녹차 추출물과
칸테사탄의 시너지 효과

조선대학교대학원

의 학 과

이 완 수

스트렙토조토신으로 유발된
당뇨병성 신증 흰쥐에서
신보호에 대한 녹차 추출물과
칸테사탄의 시너지 효과

Synergic Renoprotective Effects of Green Tea Extract and
Candesartan on Streptozotocin-induced Diabetic
Nephropathy in Mice

2014년 2월 24일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 완 수

스트렙토조토신으로 유발된
당뇨병성 신증 흰쥐에서
신보호에 대한 녹차 추출물과
칸테사탄의 시너지 효과

지도교수 김 현 리

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2013년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 완 수

이완수의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 정종훈 (인)

위원 순천향대학교 교수 김현숙 (인)

위원 조선대학교 교수 김동민 (인)

위원 조선대학교 교수 김현리 (인)

위원 조선대학교 부교수 신병철 (인)

2013년 12월

조선대학교 대학원

목차

ABSTRACT	iv
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	4
1. 연구 재료	4
2. 흰쥐 실험 준비 및 처치	4
3. 생화학적 분석	5
4. 흰쥐 사이토카인 정열 패널 A 분석	5
5. 신장 조직의 형태학적 분석	6
6. 통계학적 분석	6
III. 결과	7
1. 혈당의 변화	7
2. 체중의 변화	7
3. 24 시간 소변량의 변화	7
4. 24 시간 단백뇨 양에 대한 효과	8
5. 신기능에 미치는 효과	8
6. 흰쥐 사이토카인 정열 패널 A 분석 결과	9
7. 신장 조직학적 변화	9
IV. 고찰	25
V. 결론	32
참고 문헌	33

표목차

표 1. Body weight changes in experimental groups.....	11
표 2. Effects of GTE on blood glucose levels in mice.....	12

도목차

그림 1. Study design	13
그림 2. Mouse cytokine array panel A coordinates	14
그림 3. Changes of serum glucose levels in mice	15
그림 4. Changes of body weight in mice	16
그림 5. 24hr urine amount in mice	17
그림 6. Changes of 24hr proteinuria amount in mice	18
그림 7. Blood urea nitrogen level in mice	19
그림 8. Serum creatinine level in mice	20
그림 9. Mice cytokines and chemokines by mouse cytokine array panel A kit	21
그림 10. Densitometry of mice cytokines and chemokines by mouse cytokine array panel A kit	22
그림 11. Renal pathologic examination in mice (HE staining)	23
그림 12. Renal pathologic examination in mice (MT staining)	24

ABSTRACT

Synergic Renoprotective Effects of Green Tea Extract and Candesartan on Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy in Mice

Lee Wan Soo

Advisor: Prof. Kim Hyun-Lee M.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Background: Diabetic nephropathy (DMN) is one of the most serious complications in diabetes mellitus and has been the most common cause of end-stage renal diseases. Green tea extracts (GTE) have antioxidant properties and are known to be the most abundant in green tea. Inflammatory cytokines, mainly IL-1 and IL-6, as well as TNF- α , are involved in the development and progression of DMN. We examined whether GTE with candesartan (CDS) could be synergic protective effects on DMN and relationship of cytokines in mice.

Methods: The mice (n=50) were divided into 5 groups (n=10 each group). Control group was given intraperitoneal injection of 0.9% saline. Streptozotocin (STZ) group

was given intraperitoneal injection of STZ 200mg/kg and induced diabetic nephropathy. CDS group was received 30 mg/kg CDS by oral route and GTE group was received GTE 100 mg/kg by oral route. GTE+CDS group was received GTE 100 mg/kg with CDS 30 mg/kg from 4 weeks to 16 weeks. Serum glucose, blood urea nitrogen, serum creatinine, urine volume and urine protein amounts were measured. Mouse cytokine array panel A kit was used to examine the relative levels of mouse cytokines and chemokines, and histopathologic staining of mice's kidney were performed.

Results: Compared with control group, STZ-group showed an increase in blood glucose, blood urea nitrogen, creatinine levels and urine protein amounts, and a decrease in body weight. All the above parameters were significantly reversed with GTE treatment, especially GTE+CDS group. IL-1 α/β , IL-16, TNF- α , and C5/C5a levels are significantly elevated in STZ group compared with control group and reversed in GTE and GTE plus CDS groups. GTE+CDS treated mice kidney showed a reduced expression of above parameters and a reserved pathologic findings.

Conclusions: These results suggest that GTE with CDS has synergic renoprotective effects on STZ-induced DMN mice by suppression of inflammatory cytokines. The potential use of GTE with CDS is suggested in the treatment of diabetic nephropathy.

Keywords : green tea extract, diabetic nephropathy, streptozotocin, candesartan, cytokines

I. 서론

당뇨병성 신증은 말기신부전 환자의 가장 흔한 원인이며 당뇨병 환자에 있어 이환율과 사망률의 중요한 위험인자이다 [National Kidney Foundation, 2007]. 당뇨병성 신증의 초기에는 콩팥의 크기와 부피가 증가하고 과여과가 나타나며 후기에는 단백뇨가 발생하고 메산지움의 증식, 사구체 세포외 기질(extracellular matrix)의 침착, 사구체 경화를 특징으로 한다 [Kramer CK et al., 2007]. 현성 당뇨병성 신증의 특징은 단백뇨, 고혈압, 신기능 감소이며, 특히 단백뇨는 당뇨병 환자에서 총 사망률(all-cause mortality)과 심근 경색증, 뇌졸중, 심부전 등 심혈관계 질환의 중요한 위험인자이다 [Gerstein HC et al., 2001; Mann JF et al., 2004; Weir MR, 2007].

당뇨병성 신증이 발생한 환자에서 안지오텐신 수용체 차단제에 의한 레닌-안지오텐신-알도스테론 계(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 차단은 신장 보호 효과가 있다고 알려져있다. 단백뇨와 중등도 이하의 신부전이 있는 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 실시한 RENAAL(Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan) 연구[Brenner BM et al., 2001]에서 안지오텐신 수용체 차단제는 2배 이상 혈청 크레아티닌이 상승 위험을 25%, 말기신부전으로 진행 위험을 28% 감소시켰으며, IDNT(The Irbesartan in Diabetic Nephropathy Trial) 연구[Lewis EJ et al., 2001]에서 안지오텐신 수용체 차단제는 칼슘 통로 차단제와 비교하여 비슷한 혈압 감소 효과에도 불구하고 알부민뇨를 감소시키고 2배 이상 혈청 크레아티닌이 상승 위험을 37%, 말

기 신부전 진행 위험을 23% 감소시켰다.

당뇨병성 신증의 발생 기전은 전통적으로 대사 장애와 혈액학적 이상이 콩팥을 손상시킨다고 알려졌으나 최근에는 많은 분자생물학적 물질들의 역할이 규명되고 있다. 당뇨병의 병태 생리 중에서 중요한 변화 중 한가지는 면역학적 염증 과정(immune-mediated inflammatory processes)이 관여한다는 사실이며 [Williams MD et al., 2007; Navarro JF et al., 2005] 당뇨병성 신증의 발생과 진행에도 면역학적 기전과 염증 기전이 관여한다는 많은 보고들이 있다 [Truttel KR, 2005; Mora C et al., 2006]. 당뇨병성 신증에 관여하는 세포들에는 백혈구, 단핵구, 대식세포 [Galkina E et al., 2006; Shikata K et al., 2001; Chow FY et al., 2006] 뿐만 아니라 단핵구 화학선회 단백질(Monocytes chemoattractant protein, MCP)-1, 세포사이 부착 물질(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)-2, 산화 질소 합성효소(nitric oxide synthase), 성장인자, 변형성 성장 인자 베타(transforming growth factor-beta, TGF- β), 핵 인자 카파 비(nuclear factor kappa B, NF- κ B) [Chow FY et al., 2006; Cheng HF et al., 2002; Komers R et al., 2007; Levine DZ, 2006; Nakagawa T, 2007; Flyvbjerg A et al., 2004; Pansulaia T, 2006; Schena FP et al., 2005; Mezzano S et al., 2004; Schmid H et al, 2006] 등 다양한 물질들이 관여한다. 또한, 단핵구와 대식세포에서 분비되고 염증전 물질(pro-inflammatory molecules)로 알려진 인터류킨(interleukin, IL)-8, IL-1 β , IL-6, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)- α 등도 중요한 역할을 한다고 알려져

있다 [Nakamura A et al., 2005].

녹차추출물은 카테킨(catechins)이 주성분으로 항산화 효과가 뛰어나며 아르기닌에 의해 유발된 신손상 모델에서 메산지움 세포의 생존율을 향상시켜준다 [Shin BC et al., 2009]. 또한, 녹차 추출물은 제2형 당뇨병 환자에서 혈당을 떨어뜨리고 [Nagao T et al., 2009], 카테킨의 주성분인 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate, EGCG)가 흰쥐의 간에서 당신생 효소들인 포스포에놀피루브산 카르복시키나아제(phosphoenolpyruvate carboxykinase)와 포도당-6-인산가수분해효소(glucose-6-phosphatase)의 mRNA를 감소시켜 당뇨병 예방에 도움이 되고, EGCG가 세포에서 인슐린과 유사한 작용으로 당신생 효소들과 단백질티로신 인산화(protein-tyrosine phosphorylation)에 관여하는 유전자들을 조절하여 혈당을 낮춘다는 보고들도 있다 [Koyama Y et al., 2004; Waltner-Law ME et al., 2002]. 또한 녹차 카테킨은 스트렙토조토신(streptozotocin)를 투여한 당뇨 쥐에서 포스포리파제(phospholipase) A와 고리형 산소화효소(cyclooxygenase)의 활동성을 감소시켜 항혈전(antithrombotic) 효과를 가진다고 보고하였다 [Yang JA et al., 1999]. 그러나, 당뇨병성 신증에서 녹차추출물과 시토카인 연관성은 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

본 연구는 스트렙토조토신 유발 당뇨병성 신증 흰쥐에서 녹차추출물과 안지오펜신 수용체 억제제인 칸테사탄 병합요법이 신장을 보호하는 시너지 효과가 있는지를 확인하고 시토카인 발현의 연관성을 밝히고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

STZ는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 녹차 추출물(green tea extract, GTE)은 Maity 등에 의한 hot-water 추출법을 사용하였다 [Maity S et al., 1998]. 칸테사탄(candesartan, CDS)는 종근당(서울, 한국)에서 제공받았다.

2. 흰쥐 실험 준비와 처치

실험동물은 생후 6주된 BALB/C계 수컷 흰쥐(샘타코 바이오코리아, 인천)를 구입하여 사용하였으며 몸무게는 20-25 g이었고 항온, 항습, 12시간의 주/야간 주기의 조건 하에 수용하였다. 흰쥐 50마리를 대조군(control 군, 10마리), STZ 투여군(STZ 군, 10마리), CDS 투여군(CDS 군, 10마리), GTE 투여군(GTE 군, 10마리) 그리고 GTE와 CDS 병합투여군(GTE+CDS 군, 10마리)으로 분류하였다. 대조군은 생리식염수를 복강으로 투여하였다. STZ 투여군은 STZ 200 mg/kg을 복강으로 투여하고 당뇨병성 신증을 유발시켰다. CDS 투여군은 CDS 30 mg/kg을 STZ투여하고 나서 4주째부터 경구로 투여하였고, GTE 투여군은 GTE 100mg/kg을 4주째부터 경구로 투여하였으며, GTE+CDS군은 GTE와 CDS을 같은 용량으로 같은 방법으로 투여하였다. GTE와 CDS군은 STZ를 같은 방법으로 투여한 후 4주 뒤에 요붕지법(dipstick test)으로 단백뇨가 관찰되는 것을 확인하고 0.1% GTE 용액 10 mL를 구강으로 매일 12주간 투여하였다. 쥐들은 17주째에 희생하

여 혈액을 채취하고 즉시 양측 신장을 적출하였다 (Fig. 1).

3. 생화학적 분석

혈중 요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 혈청과 소변 크레아티닌(creatinine)은 AVIDA 1650 (Siemens, NY, USA)를 이용하여 측정하였으며 24시간 단백뇨량은 Cobas Integra 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 녹십자 의료재단(서울)에 의뢰해서 측정하였다.

4. Mouse cytokine array panel A 분석

신장 조직 0.5 mg 을 300 μ L 용해 완충액(lysis buffer; pH 7.5, containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, 10% glycerol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail)으로 30 분 동안 0 $^{\circ}$ C에서 용해시킨 후 균질화(homogenization) 시켰다. 각 표본을 초음파 분산기(ultrasonicator)를 이용하여 세포를 파괴시켜 원심분리(14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 분)하고, 상층액을 재차 원심분리하였다 (14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 분). 2.0 mL 의 Array Buffer 6 을 4-Well Multi-dish 에 투여하고 막의 숫자를 덮어서 1 시간 동안 배양을 한다. 막이 차단되는 동안 각각의 튜브에 Array Buffer 4 를 0.5 mL 넣고 각 조직샘플 1 mL 를 추가한다. 준비된 샘플에 15 μ L 의 mouse cytokine array panel detection antibody cocktail 를 추가하고 잘 섞은 다음 실온에 1 시간 가량 둔다. 4-Well Multi-dish 의 wells 에서 Array Buffer 6 를 제거하고 나서 샘플-항체 혼합물을 추가한다. 2-8 $^{\circ}$ C에 밤새 배양하고 1X Wash Buffer

20 mL 을 이용하여 세척을 한다. 4-Well Multi-dish 의 각 well 에 희석된 Streptavidin-HRP 을 2.0 mL 투여하고 각 막을 조심이 제거한다. 각 막에 Chemi Reagent Mix 을 1mL 을 투여하고 1 분 뒤에 플라스틱 보호 막을 제거한다. 자동영상 필름 카세트에 막을 위치 시키고 1-10 분 정도 X-ray 필름에 막을 노출시킨다(Fig. 2).

5. 신장 조직의 형태학적 분석

쥐들은 17 주째에 신장을 적출하여 이를 절반씩 분할하여 10% buffered formaline (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)를 사용하여 4°C에서 24 시간 정도 고정하였다. 고정된 조직은 통상의 수세, 탈수, 투명 과정을 거쳐 파라핀 조직 처리(Tissue-Tekk, Sakura, Japan)를 시행한 후, 회전식 미세박절기를 이용하여 4 μ m 두께로 연속 절편을 제작하였다. 절편은 헤마톡실린-에오신(hematoxylin and eosin, HE) 염색과 마손트리크롬(Masson's trichrome, MT) 염색을 시행하였다.

6. 통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS(Statistical Package for Social Science v 12.0)를 이용하였으며, 모든 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 기술하였다. 각 군간의 평균치의 비교는 Mann-Whitney test와 Kruskal-Wallis test를 이용하였고, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 유의수준으로 검정하였다.

III. 결과

1. 혈당의 변화

혈당은 매주 간격으로 측정을 하였다. STZ를 투여하기 전에는 대조군, STZ 군, CDS 투여군, GTE 투여군, GTE와 CDS 병합투여군 사이에 차이를 보이지는 않았다. STZ를 투여한 군에서 대조군에 비하여 실험도중 모두 유의있게 상승하였다. GTE 투여군과 GTE+CDS 병합투여군에서 STZ 군에 비하여 13주째부터 유의있게 감소하였다(Table 1, Fig. 3).

2. 체중의 변화

STZ 투여 전의 체중을 기준으로 했을 때, 대조군과 시험군들 사이에 체중의 차이는 없었다. 대조군은 처음 18.5g에서 시간에 따라 점차 체중이 증가하여 17주에 30.1g까지 증가하였으며, STZ 투여군은 17주에 21.6g으로 체중의 증가가 적었다. GTE를 투여한 군은 STZ 투여군에 비하여 체중이 서서히 증가하여 14주부터는 STZ군에 비하여 유의있는 증가를 보였다(Fig. 4).

3. 24시간 소변량의 변화

24시간 소변량은 STZ 군에서 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다(11.4 ± 8.5 mL/24hr vs. 0.8 ± 0.6 mL/24hr, $p < 0.01$). GTE 투여군에서 STZ군에 비하여 소변량이 유의있게 감소하였고(6.0 ± 3.3 mL/24hr, $p < 0.05$), GTE+CDS 투

여군(2.6 ± 1.7 mL/24hr)에서도 STZ 투여군에 비하여 소변량이 유의있게 감소하였고 GTE 투여군과 CDS 투여군에 비해서 소변량이 유의있게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 5).

4. 24시간 단백뇨 양에 대한 효과

24시간 소변 단백뇨 양은 STZ 투여군에서 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다(13.2 ± 9.6 mg/24hr vs. 4.9 ± 2.1 mg/24hr, $p < 0.05$). GTE 투여군(8.6 ± 4.9 mg/24hr)과 CDS 투여군(10.5 ± 6.6 mg/24hr)에서 24시간 단백뇨 양이 STZ 투여군에 비하여 유의있게 감소하였으나 GTE 투여군과 CDS 투여군 사이에는 통계학적 차이는 없었다. GTE+CDS 병합투여군(6.7 ± 3.1 mg/24hr)에서 24시간 단백뇨 양이 GTE 투여군과 CDS 군에 비하여 유의있게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 6).

5. 신기능에 미치는 효과

STZ 투여군에는 대조군에 비하여 혈중요소질소가 유의있게 증가하였다(71.0 ± 41.3 mg/dL vs. 23.9 ± 20.3 mg/dL, $p < 0.01$). GTE 투여군(46.1 ± 25.3 mg/dL)과 CDS 투여군(45.0 ± 29.9 mg/dL)은 STZ 군에 비하여 혈중요소질소가 유의있게 감소하였으나 두군 사이에는 통계적으로 의의는 없었다. GTE+CDS 병합투여군(36.3 ± 10.1 mg/dL)에서는 STZ 투여군에 비하여 혈중요소질소가 유의있게 감소하였고 GTE 투여군과 CDS 투여군에 비해서도 혈중요소질소가 의

의있게 감소하였다 ($p < 0.05$, Fig. 7).

혈청 크레아티닌 값은 STZ 투여군에서 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다 (0.45 ± 0.23 mg/dL vs. 0.18 ± 0.09 mg/dL, $p < 0.05$). GTE 투여군(0.29 ± 0.22 mg/dL)과 CDS 투여군(0.29 ± 0.19 mg/dL)는 STZ 군에 비하여 혈청 크레아티닌이 감소하였다. GTE+CDS 병합투여군(0.20 ± 0.15 mg/dL)에서는 GTE 투여군과 CDS 투여군에 비하여 혈청 크레아티닌이 유의있게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 8)

6. 흰쥐 사이토카인 정열 패널 A 분석 결과

STZ 투여한 군에서 대조군에 비하여 인터류킨(interleukin, IL)-1, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)- α , C5/C5a, IL-16, 단핵구 화학선회 단백질(monocytes chemoattractant protein, MCP)-5, 인터페론 감마 유발 모노카인(monokine induced by interferon-gamma, MIG), 단백질가수분해효소 조직 저해제(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)가 증가하였으나 IL-6, 세포내 부착물질(intracellular adhesion molecule, ICAM)-1은 증가하지 않았다. GTE와 CDS를 병합투여군에서는 IL-1, TNF- α , C5/C5a, IL-16, MCP-5, MIG, TIMP이 STZ 투여군에 비하여 유의있게 감소하였으나 대조군에 비하여 유의있는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 9, Fig. 10).

7. 신장 조직학적 변화

신장 조직 검사에서 대조군에 비하여 STZ 투여군에서 사구체 경화

(nephrosclerosis)와 세뇨관 위축(tubular atrophy) 소견이 관찰되었다(Figure 11). GTE 투여군과 CDS 투여군에서는 STZ 투여군에서 관찰되었던 사구체 경화나 세뇨관 위축 소견은 관찰되지 않고 대조군과 거의 유사한 소견을 보였다(Figure 11). 마손 삼색(Mason's Trichrome) 염색에서도 STZ 투여군의 신장 조직에서는 사구체 경화와 메산지움의 증식을 관찰할 수 있었으며 세뇨관 위축과 세뇨관 기저막의 비후를 보였다(Fig. 12).

Table 1. Body weight changes in experimental groups

Group	Blood glucose (mg/dL)				
	Initial	4wks	8wks	13wks	17wks
Control	23.3 ± 1.2	25.4 ± 1.2	27.6 ± 1.9	27.6 ± 1.9	30.9 ± 2.5
STZ	22.4 ± 1.3	20.5 ± 1.2*	22.7 ± 1.4*	22.7 ± 1.4*	23.3 ± 1.3*
STZ+CDS	23.1 ± 1.1	21.2 ± 1.1*	23.5 ± 1.1*	23.5 ± 1.1*	23.0 ± 1.3*
STZ+GTE	23.5 ± 1.3	22.0 ± 1.2*	23.4 ± 1.3*	23.4 ± 1.3*	23.1 ± 1.0*
STZ+GTE +CDS	23.3 ± 1.1	21.8 ± 1.0	22.8 ± 1.3*	22.8 ± 1.3*	20.9 ± 0.9 [†]

Values are expressed as mean ± standard deviation. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candesartan. * $P < 0.01$ as compared to control group. [†] $P < 0.01$ as compared to STZ group

Table 2. Effects of GTE on blood glucose levels in mice.

Group	Blood glucose (mg/dL)				
	Initial	4wks	8wks	13wks	17wks
Control	92 ± 13	126 ± 13	143 ± 13	131 ± 13	158 ± 19
STZ	91 ± 11	333 ± 19*	433 ± 27*	555 ± 29*	594 ± 21*
STZ+CDS	90 ± 14	329 ± 18*	423 ± 24*	512 ± 24*	547 ± 18*
STZ+GTE	92 ± 14	288 ± 18*	420 ± 24*	425 ± 24*†	369 ± 22*†
STZ+GTE +CDS	90 ± 11	300 ± 20*	412 ± 25*	391 ± 25*†	339 ± 19*†

Values are expressed as mean ± standard deviation. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan. * $P < 0.01$ as compared to control group. † $P < 0.01$ as compared to STZ group

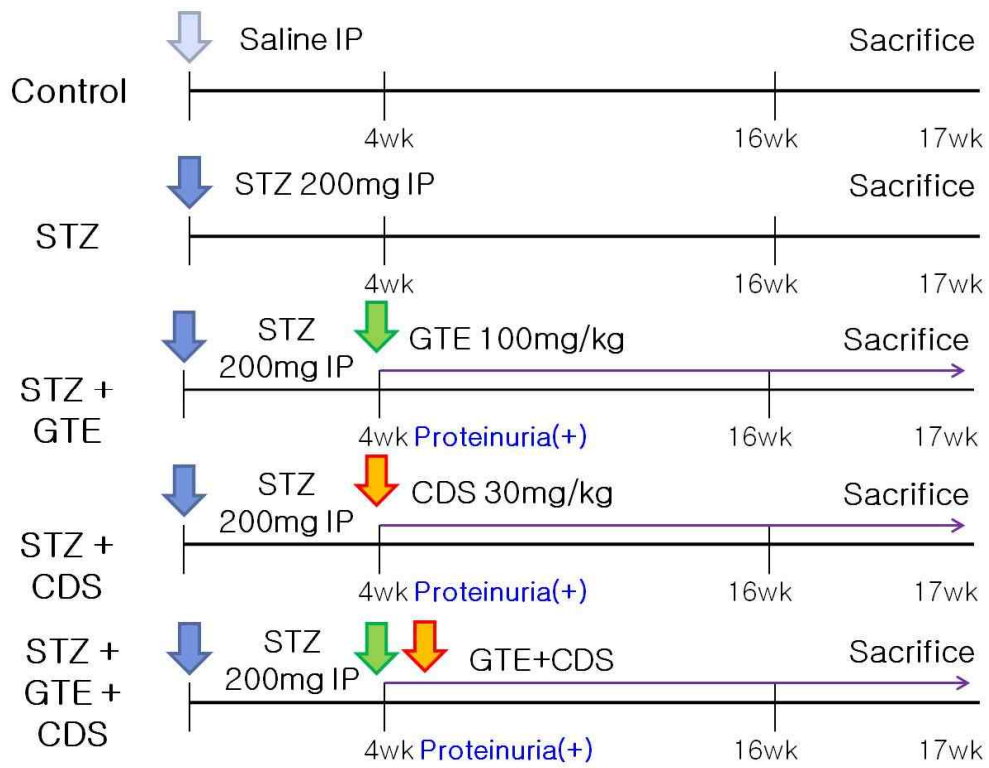


Figure 1. Study design (n=10/each group). STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan; IP, intraperitoneal; PO, per oral.

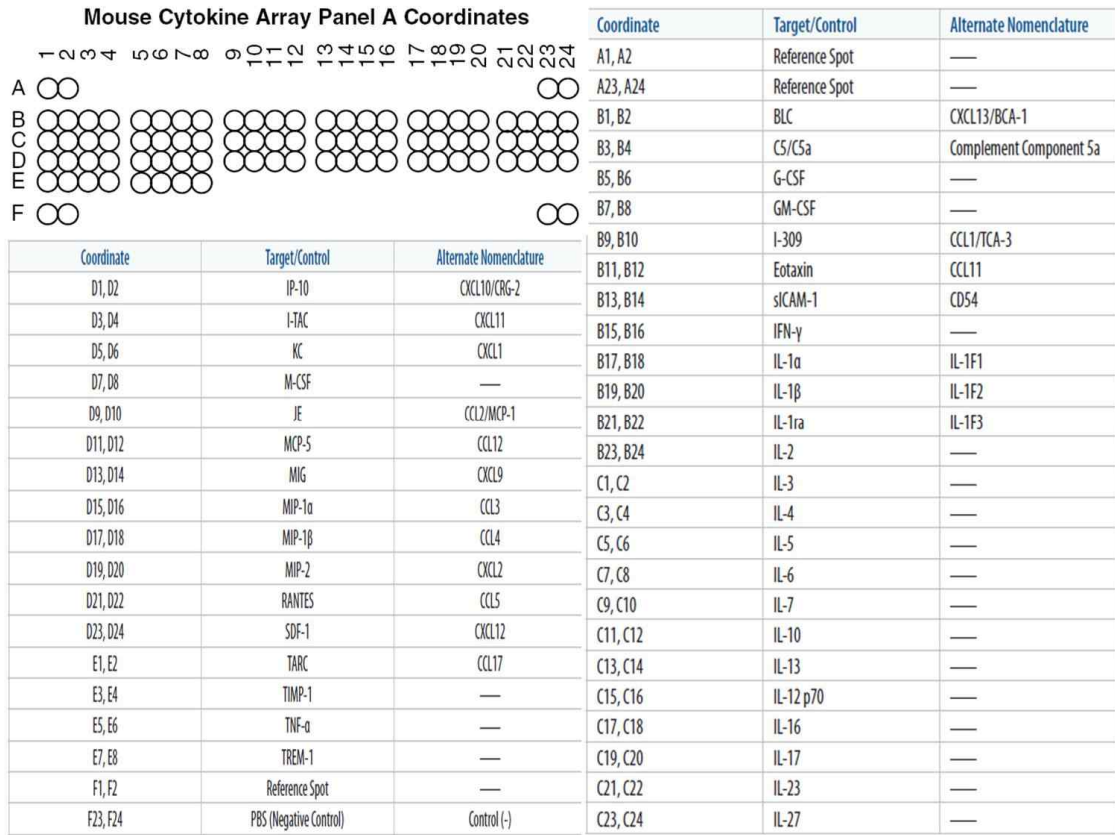


Figure 2. Mouse cytokine array panel A coordinates.

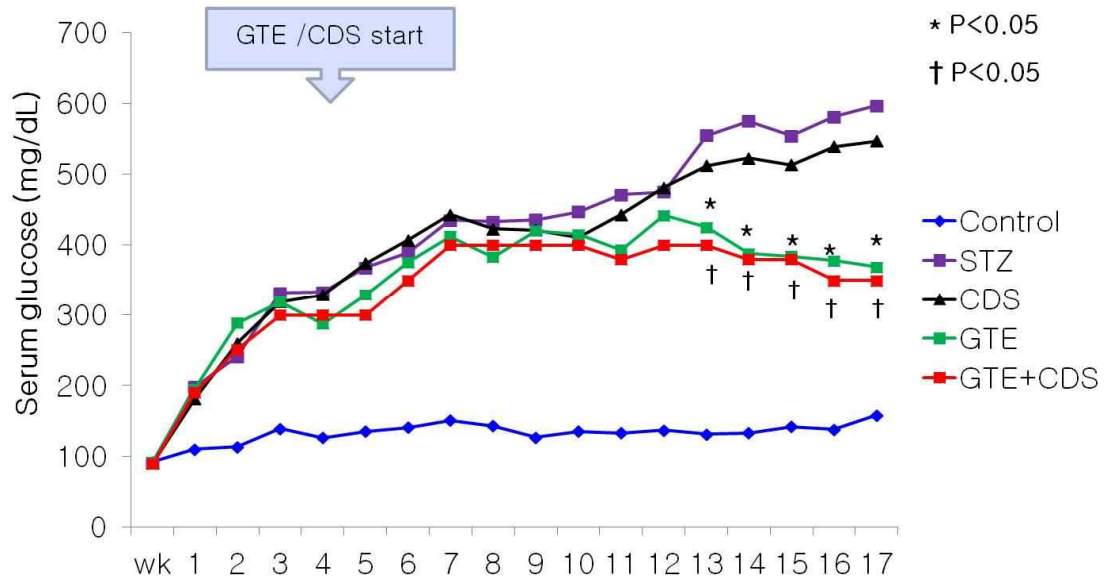


Figure 3. Changes of serum glucose levels in mice. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan. *p < 0.05: STZ group vs. GTE group, †p < 0.05: STZ group vs. GTE+CDS group

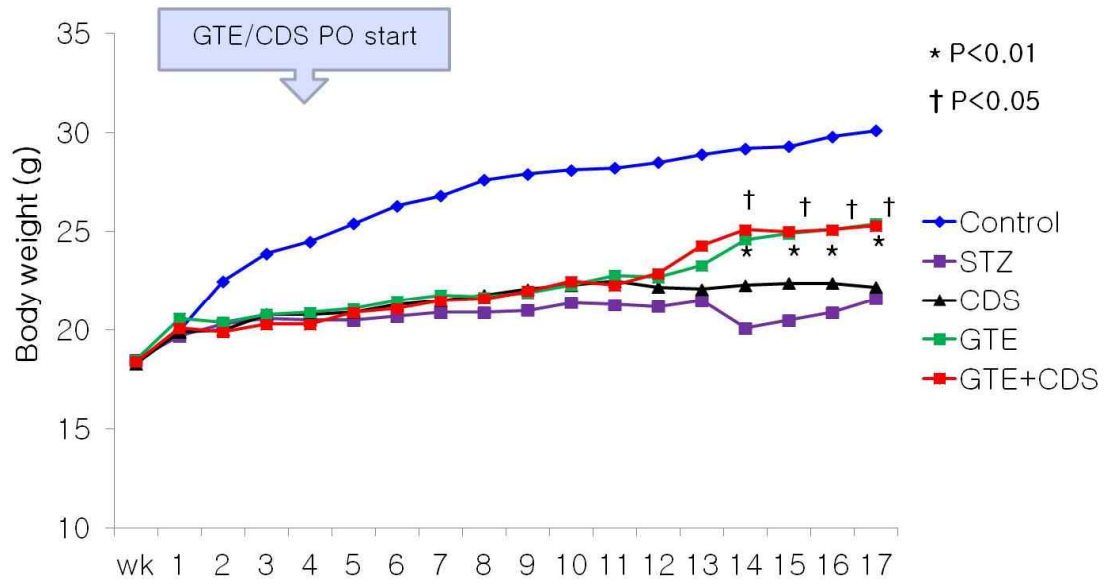


Figure 4. Changes of body weight in mice. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan. * $p < 0.05$: STZ group vs. GTE group, † $p < 0.05$: STZ group vs. GTE+CDS group

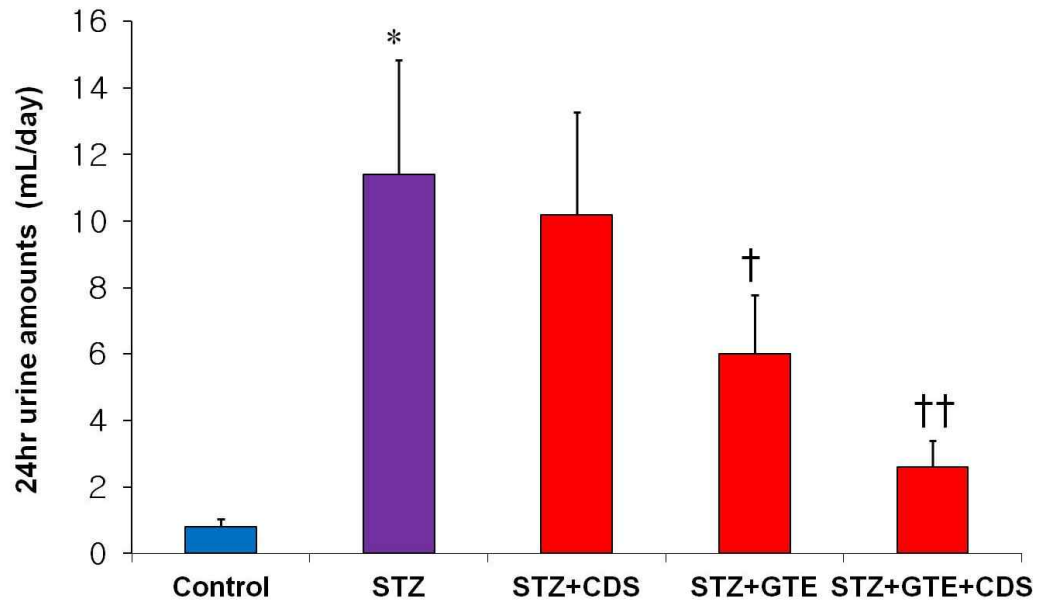


Figure 5. 24hr urine amount in mice. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan.

* $p < 0.01$: control group vs. STZ group, † $p < 0.05$: STZ+GTE group vs. STZ group, †† $p < 0.05$:

STZ+GTE+CDS group vs. STZ+CDS and STZ+GTE group.

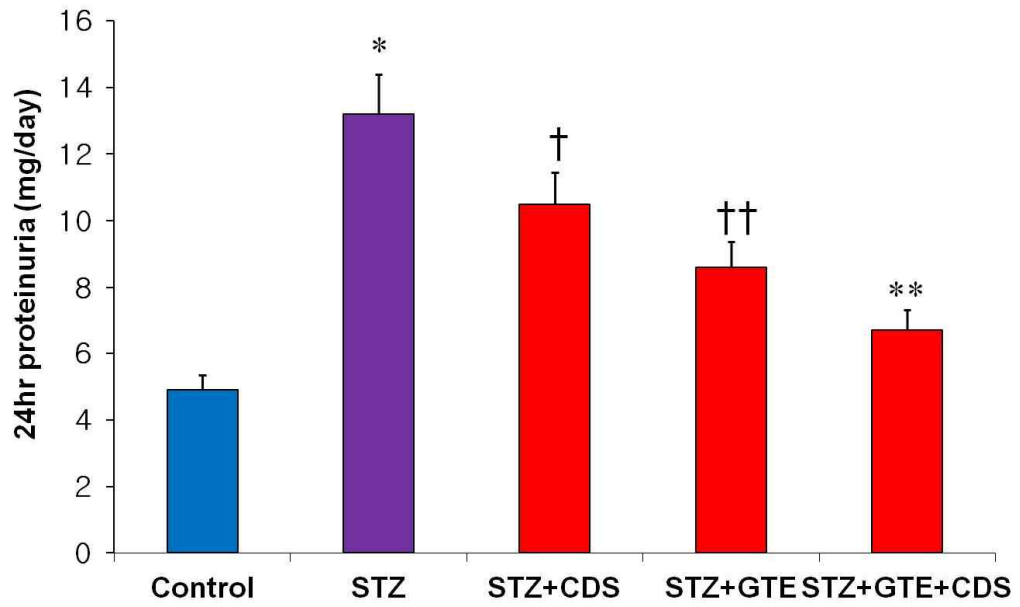


Figure 6. Changes of 24hr proteinuria amount in mice. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan. * $p < 0.01$: control group vs. STZ group, † $p < 0.05$: STZ+CDS group vs. STZ group, †† $p < 0.05$: STZ+GTE group vs. STZ group, ** $p < 0.05$: STZ+GTE+CDS group vs. STZ+CDS and STZ+GTE group.

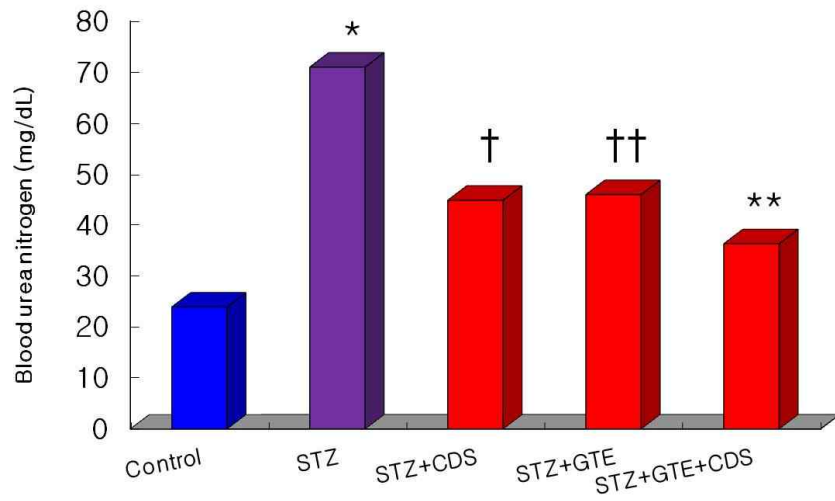


Figure 7. Blood urea nitrogen level in mice. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan. * $p < 0.01$: control group vs. STZ group, † $p < 0.05$: STZ+CDS group vs. STZ group, †† $p < 0.05$: STZ+GTE group vs. STZ group, ** $p < 0.05$: STZ+GTE+CDS group vs. STZ+CDS and STZ+GTE group.

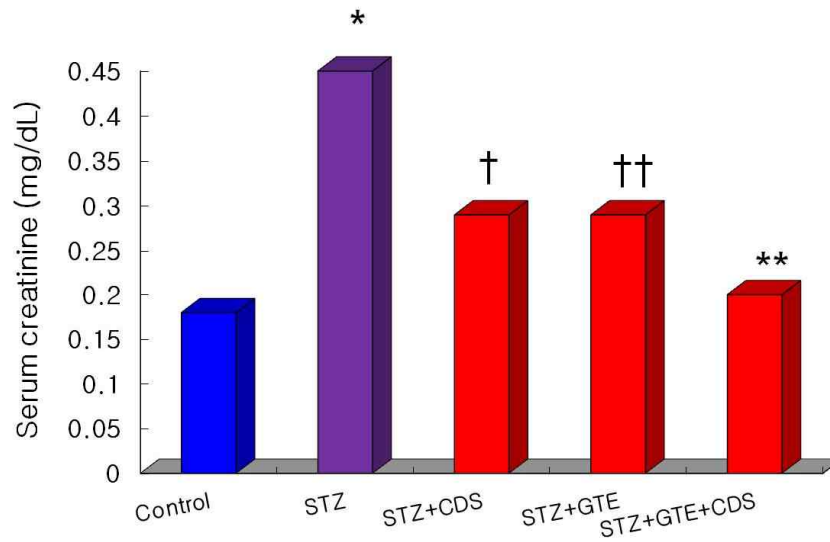


Figure 8. Serum creatinine level in mice. STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan. * $p < 0.01$: control group vs. STZ group, † $p < 0.05$: STZ+CDS group vs. STZ group, †† $p < 0.05$: STZ+GTE group vs. STZ group, ** $p < 0.05$: STZ+GTE+CDS group vs. STZ+CDS and STZ+GTE group.

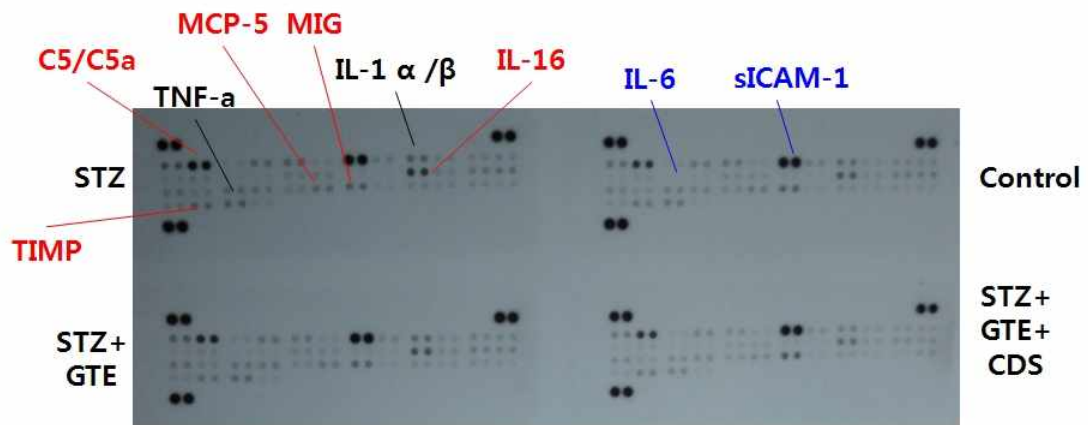


Figure 9. Mice cytokines and chemokines by mouse cytokine array panel A kit. The expressions of IL-1 α/β , IL-16, TNF- α , C5/C5a, MCP-5, MIG and TIMP are increased in STZ group compared with control group and reversed in GTE and GTE plus CDS groups but not IL-6. IL, interleukin; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TNF, tumor necrosis factor; STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS, candersartan.

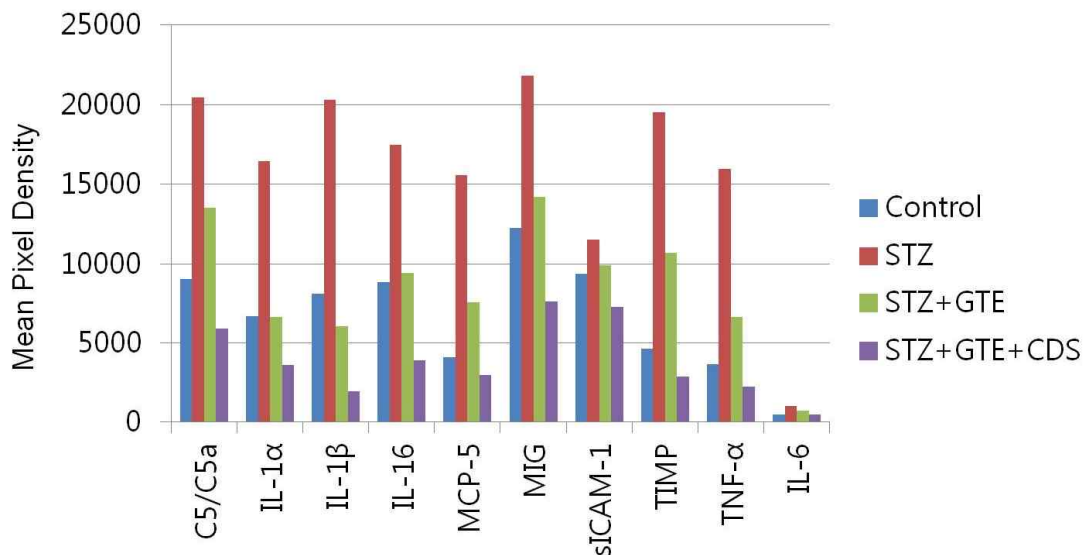


Figure 10. Densitometry of mice cytokines and chemokines by mouse cytokine array

panel A kit. C5/C5a, IL-1 α/β , IL-16, MCP-5, MIG, TIMP and TNF- α levels are significantly elevated in

STZ group compared with control group and reversed in GTE and GTE plus CDS groups. IL, interleukin;

MCP, monocyte chemoattractant protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; TIMP, tissue inhibitor

of metalloproteinases; TNF, tumor necrosis factor; STZ, streptozotocin; GTE, green tea extract; CDS,

candensartan.

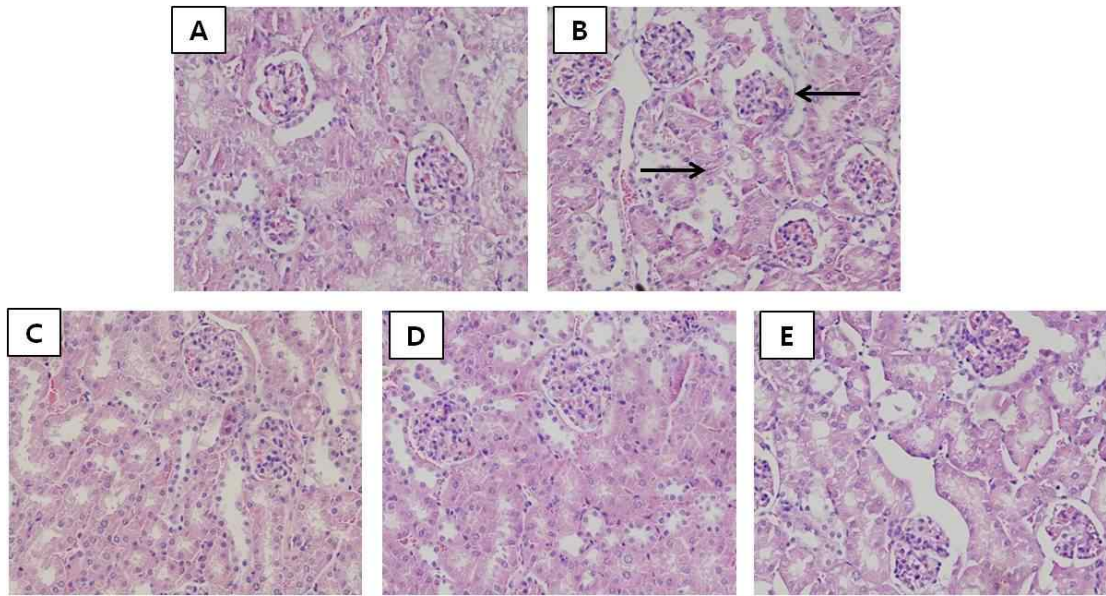


Figure 11. Renal pathologic examination in mice (HE staining). Photomicrograph of control group (A), streptozotocin (STZ) group (B), STZ with CDS 30 mg/Kg treated group (C), STZ with GTE 100 mg/kg treated group (D), STZ with CDS 30 mg/kg and GTE 100 mg/kg treated group (E). Photomicrograph of STZ treated mice (B) showing a diabetic glomerulosclerosis (right arrow) and tubular atrophy (left arrow). X 100.

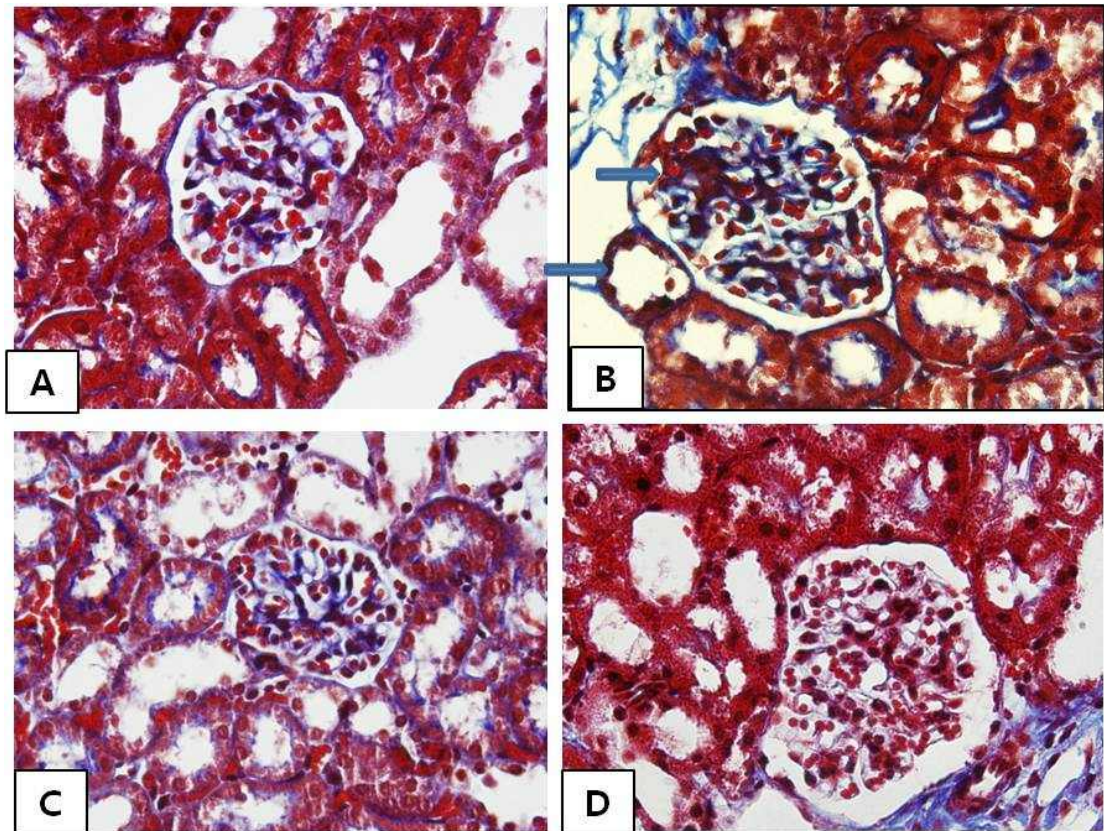


Figure 12. Renal pathologic examination in mice (Mason's Trichrome staining). Photomicrograph of control group (A), streptozotocin (STZ) injected group (B), STZ with GTE 100 mg/kg treated group (C) and STZ with CDS 30 mg/kg and GTE 100 mg/kg treated group (D). Photomicrograph of STZ treated mice (B) showing a diabetic glomerulosclerosis, increased mesangial matrix (upper arrow) and tubular atrophy, diffuse thickening of tubular basement membrane (lower arrow). X 400.

IV. 고찰

당뇨병성 신증은 당뇨병 환자에서 주요한 미세혈관 합병증(microvascular complication)이고 말기신부전 환자의 가장 중요한 원인 질환이다 [National Kidney Foundation, 2007]. 당뇨병성 신증의 발생은 전통적으로 혈액학적 원인과 대사장애로 발생하며 신손상의 진행은 전신 또는 사구체내의 압력 상승이나 고혈당 유발 분자 변형에 의한 이차적 손상으로 설명하기 한다[Cooper ME et al., 2001]. 당뇨병성 신증의 병태생리학적 원인은 매우 다양하며 복합적인 병태기전들이 유전적인 인자와 환경적인 인자들을 자극하여 발생한다 [Wolf G, 2004; Martini S et al., 2008]. 당뇨병성 신증의 원인에 대하여 세포와 분자 수준까지 연구가 되고 있으며 염증이 병태생리학적 기전에 중요한 요소로 확인되었다. 염증 분자들과 전달물질들이 당뇨병성 신장 질환의 초기에 중요한 요소들이고 당뇨병성 신장 손상의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다. 당뇨병성 신증의 조직 검사 소견은 사구체 경화증(glomerulosclerosis), 세뇨관위축(tubular atrophy), 세포외 기질(extracellular matrix)의 축적과 사이질의 섬유화(interstitial fibrosis)를 특징으로 한다. 특히, 세뇨관사이질 영역이 당뇨병에서 신부전을 일으키는 것과 관련이 있다 [Ziyadeh FN et al., 1991]. 세뇨관의 위축과 확장 그리고 사이질에 과도한 콜라겐의 침착이 세뇨관사이질 손상의 특징적인 소견이고 단핵구의 침착이 이 과정에서 중요한 역할을 한다 [Galkina E et al., 2006].

Hasegawa등이 당뇨 쥐의 사구체 기저막에서 배양된 대식세포에서 비당뇨

쥐에 비하여 많은 양의 TNF- α 와 IL-1이 생산된다는 것을 발견하였고 [Hasegawa G et al., 1991] 이는 당뇨병성 신증의 병태생리에 염증 사이토카인이 관여한다는 것을 처음으로 제시하였다. 당뇨병성 신증 쥐모델에서 IL-1의 신장 발현이 증가하고 이는 화학선회 인자(chemotactic factors)들과 부착 물질(adhesion molecules)의 발현 증가와 연관이 있다 [Sassy-Prigent C et al., 2000; Navarro JF et al., 2006]. IL-1은 사구체 내피세포에서 세포사이 부착물질(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1의 합성을 증가시키고 사구체 메산지움 세포에서 ICAM-1의 새로운 합성을 증가시킨다 [Brady HR, 1994; Park CW et al., 2000]. 또한, IL-1은 메산지움 세포에서 사구체내 혈역학적 이상과 관련된 프로스타글란딘(prostaglandin) 생성에 관여하며 재조합 인간 IL-1을 사구체 메산지움 세포에 주입하면 프로스타글란딘 E2의 생성을 증가시키고 포스포리파아제(phospholipase) A2의 활동력을 상승시켰다 [Pfeilschifter J et al., 1989]. 당뇨 실험모델에서 인간 근위 세뇨관 상피 세포에서 IL-1을 투여하였을 때 히알루로난(hyaluronan) 농도가 상승하고 사구체 과세포화(glomerular hypercellularity)를 촉진하였다 [Mahadeven P et al., 1995]. 본 실험에서도 STZ를 투여 후 당뇨병성 신증 쥐 조직에서 IL-1의 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다.

Sekizuka 등은 당뇨병성 신증 환자에서 신증이 없는 제2형 당뇨 환자에 비해 혈중 IL-6 농도가 높다고 보고하였고 [Sekizuka K et al., 1994] 신조직에서 IL-6의 전령 RNA(messenger RNA, mRNA) 발현이 증가함을 밝혀냈다 [Suzuki D

et al., 1995]. 사구체 세포에서 당뇨병성 신증의 정도가 심할수록 IL-6 mRNA의 발현이 증가하였으며 [Nosadini R et al., 2000] 제 2형 당뇨병 환자에서 IL-6와 사구체 기저막 두께와 의미있는 관계가 있음을 보고하였다 [Dalla Vestra M et al., 2005]. 또한 당뇨병성 신증 환자에서 혈중 IL-6 농도가 높을수록 단백뇨 양이 증가한다고 보고하였다 [Choudhary N et al., 2008]. 반면, 미세알부민뇨를 가진 당뇨 환자에서 혈중 IL-6의 농도가 증가하지 않으며 신기능 감소와는 관련이 없다는 최근 보고도 있어 다른 기전을 통한 당뇨병성 신증의 병태생리에 관여할 것으로 생각된다 [Prujm M et al., 2012; Ortega LM et al., 2010]. 본 연구에서도 STZ를 투여한 군에서 대조군에 비하여 IL-6가 의미있게 증가하지 않아 최근 연구와 유사한 결과를 보였다.

IL-18은 강력한 염증성 사이토카인으로 INF- γ , IL-1, TNF- α , ICAM-1의 생성을 유도하며 내피세포의 자멸사(apoptosis)를 증가시킨다 [Dai SM et al., 2004; Marino E et al., 2003; Stuyt RJ et al., 2003]. 당뇨병성 신증 환자에서 혈청과 소변의 IL-18 농도가 증가하며 단백뇨의 증가와 연관되어있고 장기간의 추적 관찰 동안 단백뇨 변화와 직접적인 연관성이 알려져있다 [Moriwaki Y et al., 2003; Nakamura A et al., 2005]. 본 연구에서도 STZ를 투여한 군에서 대조군에 비하여 IL-18의 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다.

TNF- α 는 다양한 기능을 가진 염증성 사이토카인으로서 메산지움, 사구체, 내피세포, 콩팥 세뇨관 세포에서 생성된다 [Jevnikar AM et al., 1991; Dong X et al., 2007; Zhang B et al., 2007]. TNF- α 는 콩팥 세포에 세포독성을 가지며 신

손상을 직접적으로 유도한다[Bertani T et al., 1989]. TNF- α 는 당뇨 쥐의 사구체와 근위 세뇨관에서 생성되고 신장 비대(renal hypertrophy)와 신기능 항진을 유발하여 당뇨병성 신증 초기에 중요한 영향을 미친다[Dipetrillo K et al., 2003]. 또한 소변에서 TNF- α 의 농도와 mRNA 발현은 단백뇨 발생과 직접적이고 독립적인 연관성을 갖는다 [Navarro J et al., 2005]. 임상 연구에서 당뇨병성 신증 환자의 혈청과 소변에서 TNF- α 의 농도는 당뇨병성 신증이 없는 당뇨 환자에 비해 높게 측정되었다[Navarro JF et al., 2006]. 본 연구에서도 STZ를 투여한 군에서 대조군에 비하여 TNF- α 의 발현이 증가함을 관찰할 수 있어 기존 연구와 유사하였다.

RAAS의 차단이 당뇨병 환자에서 당뇨병성 신증의 발생을 예방할 수 있는지 연구에서 안지오텐신 전환효소 억제제를 투여한 당뇨병 환자와 투여하지 않은 당뇨병 환자 군 사이에 미세알부민뇨 발생의 차이가 없었으며[The EUCLID Study, 1997, Heart Outcomes Prevention Evaluation Study, 1998], 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 영국에서 시행된 UKPDS(UK Prospective Diabetes Study) 연구에서 철저한 혈압 조절이 미세알부민뇨 발생을 감소시키지는 못하였다 [UK Prospective Diabetes Study, 1998]. 그러나 혈압이 정상인 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 시행된 연구에서는 안지오텐신 전환효소 억제제 또는 칼슘통로 차단제를 투여하여 혈압을 낮춘 군에서 미세알부민뇨와 당뇨병성 신증의 발생이 감소하였다[Schier RW et al, 2002]. 당뇨병성 신증 동물모델에 STZ를 투여하여 제1형 당뇨모델을 만든 뒤 알도스테론 수용체 차단제를 투여하면 세뇨관 간질

의 섬유화가 감소되는 것으로 보아 신증의 진행을 억제할 수 있다고 보고하였고[Miric G et al., 2001], 안지오텐신 전환효소 억제제를 투여한 후 세뇨관 간질의 섬유화가 혈중 알도스테론 농도가 증가하지 않은 환자들에 비해 높았다고 보고하였다 [Sato A et al., 2003]

STZ는 glucosamine-nitrosurea 항생제로서 [Lewis C et al., 1959; Dorr RT et al., 1980], 췌장의 베타세포에 대한 독성을 가지고 있어 인슐린 의존성 당뇨병 동물 모델을 만드는데 널리 사용된다 [Punithavathi VR et al., 2008; Fadilliglu E et al., 2008]. STZ은 췌장 베타세포에 비가역적인 손상을 주고 탈과립(degranulation)을 일으켜서 인슐린 분비 능력을 상실시키며 [Gu D et al., 1997], 흰쥐에 복강 또는 정맥으로 투여하면 췌장 인슐린염(pancreatic insulinitis)을 발생시키고 인슐린을 분비하는 베타세포를 파괴하여 당뇨병을 유발한다. STZ의 투여 용량은 쥐(rats)에 STZ 45 mg/kg을 복강으로 투여하면 고혈당을 유발하고, 65 mg/kg을 투여하면 고혈당과 위점막 궤양을 초래한다 [Piyachaturawat P et al., 1990]. 당뇨병성 신증 흰쥐 모델을 만드는 방법은 고용량(high-dose)과 저용량(low-dose) STZ을 투여하는 것으로 나뉜다 [Breyer MD et al., 2005]. 고용량 STZ 방법은 150-200 mg/kg을 한차례 투여하는 것이고 저용량 STZ 방법은 40-50 mg/kg을 복강으로 매일 5일 동안 투여하는 방법이다. 고용량 STZ를 투여한 군이 저용량 STZ를 투여한 군보다 단백뇨가 더 많이 발생하고 고혈당의 정도는 서로 유사하여 본 연구에서도 고용량 STZ 방법을 이용하여 당뇨병성 신증 동물 모델을 만들었다 [Breyer MD et al., 2005].

녹차의 주요 활성 물질로서 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC) 그리고 (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)로 구분되며 [Graham et al., 1992] 전립선 암, 폐암, 위암 등 많은 질환들의 위험도를 낮춘다고 알려져있다 [Jian L et al., 2004; Wu AH et al., 2003; Setiawan VW et al., 2001]. EGCG가 생체에 미치는 영향에 대한 작용 기전은 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)에 의하여 유도한 세포의 미세소체(microsome) 내에 프로스타클란딘(prostaglandin, PG)의 증가를 차단하고, orotidine 5-phosphate decarboxylase 생산을 억제하거나 자유 라디칼(free radical)의 생성을 줄이며, 단백질 키나아제 C(protein kinase C)와 세포 증식을 억제한다. 또한 EGCG는 phase II 효소들인 글루타밀 S-전이효소(glutamyl S-transferase), 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase), 과산화수소분해 효소(catalase) 등을 증가시키고 종양 촉진제(tumor promoter)와 호르몬 등이 수용체와 결합하는 것을 차단하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [Morrisey JJ et al., 1996].

당뇨병은 일반적으로 미세혈관병증(microvascular dysfunction)을 동반한다. 트롬복산(thromboxane, TX) A₂와 PG I₂는 정상 신장 조직에서 생성되고 조절되며 항상성(homeostasis) 유지에 중요한 요소들이다 [Rhee SJ et al., 2002]. PGI₂:TXA₂ 비율이 변형되면 신장 세뇨관에서 트롬빈형성(thrombogenesis)을 유도하고 신기능을 악화시키며 동맥경화가 심해진다. 이들 성분들의 생성은 phospholipase A₂의 활성도와 지방산의 구성에 달려있다. STZ는 TXA₂의 합성

을 증가시키고 PGI₂의 생성을 감소시키지만 녹차 카테킨은 TXA₂의 생합성을 감소시키고 PGI₂의 생성을 증가시켜 신기능을 회복하며, 이는 녹차 카테킨이 트롬빈의 형성을 억제하고 아라키돈산 연속단계(arachidonic acid cascade system)를 조절하기 때문이다 [Rhee SJ et al., 2002]. 녹차 카테킨은 시스플라틴(cisplatin) 유발 신증 쥐에서 사구체 여과율을 증가시키고 카탈라제(catalase)의 활성도를 증가시켰으며 [Yokozawa T et al., 1999], 또한 녹차 카테킨은 STZ를 투여한 당뇨 쥐에서 PGI₂:TXA₂ 비율을 정상화시키고 포스포리파제(phospholipase) A와 고리형 산소화효소(cyclooxygenase)의 활성도를 감소시켜 항혈전(antithrombotic) 효과를 가진다 [Yang JA et al., 1999]. 알록산(alloxan) 유발 신증 쥐에서 혈당을 감소시키고 지질 과산화(oxidation)를 떨어뜨리며 SOD의 활성도를 증가시켜 신기능을 호전시켰다 [Sabu MC et al., 2002]. 이는 녹차 카테킨이 신장에서 활성산소를 감소시키는 것을 보여준다. 본 연구는 녹차 추출물이 STZ로 유발한 제1형 당뇨병성 신증 흰쥐에서 혈당을 떨어뜨리고 단백뇨의 유의한 감소를 가져왔으며 신기능을 회복시켰고 신장조직에서 형태학적으로 호전된 결과를 얻었다. 특히, 안지오텐신 II 억제제인 칸테사탄과 함께 복용했을 때 시너지 효과(synergic effect)를 나타내어 단독투여 때 보다 신보호 작용이 뛰어났다.

V. 결론

당뇨병성 신증은 만성신부전의 가장 흔한 원인이며 발생 기전이 아직 명확히 밝혀지지 않았고 치료 방법 또한 확립되어 있지 않아 새로운 치료법의 개발이 절실히 요구된다.

GTE는 STZ으로 유발된 당뇨병성 신증 흰쥐에서 신기능을 회복시켜주고 단백뇨를 줄였다. 또한 손상된 신장 조직을 회복시켰고 그 작용기전으로 당뇨병성 신증의 병태생리에 중요한 역할을 하는 IL-1, TNF- α 의 발현이 신장 조직에서 감소한다는 것을 밝혀냈다. 특히, 단독 투여 보다는 안지오텐신 II 억제제인 칸테사탄과 함께 투여했을 때 신장보호 효과가 더 좋았다. 또한 C5/C5a, IL-16, MCP-5, MIG, TIMP가 감소하는 것을 발견하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구를 토대로 당뇨병성 신증 환자에서 안지오텐신 II 억제제와 함께 녹차추출물을 함께 사용하면 신기능 회복과 단백뇨 감소 효과를 기대할 수 있으며, 추후 당뇨병성 신증 환자의 치료와 질환의 진행을 억제하는 자료로서 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다고 할 수 있다.

참고 문헌

Brady HR. (1994). Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 45(5):1285-1300.

Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snappin SN, Zhang Z, Shahinfar S, RENAAL Study Investigators. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345(12):861-869

Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, SharmaK; AMDCC. (2005). Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16(1):27-45.

Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, Zhang MZ, Mckanna JA, Harris RC. (2002). Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* 62(3):929-939.

Choudhary N, Ahlawat RS. (2008). Interleukin-6 and C-reactive protein in pathogenesis of diabetic nephropathy: new evidence linking inflammation, glycemic

control, and microalbuminuria. *Iran J Kidney Dis* 2(2):72–79.

Chow FY, Nikolic–Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. (2006).

Monocyte chemoattractant protein–1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin–treated mice. *Kidney Int* 69(1):73–80.

Chow FY, Nikolic–Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Tesch GH. (2005).

Intercellular adhesion molecule–1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. *J Am Soc Nephrol* 16(6):1711–1722.

Cooper ME. (2001). Interaction of metabolic and haemodynamic factors in

mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 44(11):1957–1972

Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. (2004). Interleukin–18

enhances monocytes tumor necrosis factor alpha and interleukin–1 beta production induced by direct contact with T lymphocytes: implications in rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum 50(2): 432–443.

Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, Brueghin M, Cernigoi AM, Saller A, Plebani M,

Fioretto P. (2005). Acute–phase markers of inflammation and glomerular structure

in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 16 Suppl 1: S78–82.

Dipetrillo K, Coutermarsh B, Gesek FA. (2003). Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(1):F113–121.

Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. (2007). Resident dendritic cells are the predominant TNF–secreting cell in early renal ischemia–reperfusion injury. *Kidney Int* 71(7):619–628.

Dorr RT, Fritz WL. (1980). Cancer chemotherapy. Hand book. London, Kinapton, pp.632–637.

Fadillioglu E, Kurcer Z, Parlakpinar H, Iraz M, Gursul C. (2008). Melatonin treatment against remote open injury induced by renal ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus. *Arch Pharm Res* 31(6):705–712.

Flyvbjerg A, Khatir DS, Jensen LJ, Dagnaes–Hansen F, Gronbaek H, Rasch R. (2004). The involvement of growth hormone (GH), insulin–like growth factors (IGFs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic kidney disease. *Curr Pharm*

Des 10(27): 3385–3394.

Galkina E, Ley K. (2006). Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17(2): 368–377.

Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S.; HOPE Study investigators. (2001). Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 286(4):421–426.

Graham HN. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21(3):334–350.

Gu D, Arnush M, Sarvetnic N.(1997). Endocrine/exocrine intermediate cells in Streptozotocin treated Ins-IFN-gamma transgenic mice. *Pancreas* 15(3):246–250.

Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, Shibayama Y, Ienaga K, Kondo M. (1991). Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 40(6):1007–1012.

Jevnikar AM, Brennan DC, Singer GG, Heng JE, Maslinski W, Wuthrich RP, Glimcher LH, Kelley VE. (1991). Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF alpha. *Kidney Int* 40(2):203–211.

Ihm CG. (1997). Monocyte chemotactic peptide-1 in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 60: S20–22.

Jian L, Xie LP, Lee AH, Binns CW. (2004). Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *Int J Cancer* 108(1):130–135.

Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S. (2007). Cyclo-oxygenase-2 inhibition attenuates the progression of nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(1–2):36–41.

Koyama Y, Abe K, Sano Y, Ishizaki Y, Njelekela M, Shoji Y, Hara Y, Isemura M. (2004). Effects of green tea on gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in vivo. *Planta Med* 70(11):1100–1102.

Kramer CK, Leitao CB, Pinto LC, Silveiro SP, Gross JL, Canani LH. (2007). Clinical

and laboratory profile of patients with type 2 diabetes with low glomerular filtration rate and normoalbuminuria. *Diabetes Care* 30(8):1998–2000.

Levine DZ. (2006). Hyperfiltration, nitric oxide, and diabetic nephropathy. *Curr Hypertens Rep* 8(2):153–157.

Lewis C, Barbiers AR. (1959). Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation. *Antibiot Annu* 7:247–254.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohode R, Raz I, Collaborative Study Group. (2001). Renoprotective effect of the angiotensin–receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345(12):851–860.

Mahadevan P, Larkins RG, Fraser JR, Fosang AJ, Dunlop ME. (1995). Increased hyaluronan production in the glomeruli from diabetic rats: Link between glucose induced prostaglandin production and reduced sulphated proteoglycans. *Diabetologia* 38(3):298–305.

Maity S, Vedasiromoni JR, Ganguly DK. (1998). Role of glutathione in the antiulcer

effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn J Pharmacol* 78(3):285–292.

Mann JF, Yi QL, Gerstein HC. (2004). Albuminuria as a predictor of cardiovascular and renal outcomes in people with known atherosclerotic cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* (92):S59–S62.

Marino E, Cardier JE. (2003). Differential effects of IL-18 on endothelial cell apoptosis mediated by TNF- α and Fas (CD59). *Cytokine* 22(5): 142–148.

Martini S, Eichinger F, Nair V, Kretzler M. (2008). Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge. *Rev Endocr Metab Disord* 9(4):267–274.

Mezzano S, Aros C, Droguet A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J. (2004). NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 19(10): 2505–2512.

Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L. (2001). Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-

diabetic rats. *Br J Pharmacol* 133(5):687–694.

Mora C, Navarro JF, (2006). Inflammation and diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rep* 6(6): 463–468.

Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, Okamura H, Koga M, Fukuchi M, Hada T. (2003). Elevated levels of interleukin–18 and tumor necrosis factor–alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism* 52(5): 605–608.

Morrissey JJ, Kshidoys S, McCracken R, Klahr S. (1996). Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 7(10):2202–2212.

Nagao T, Meguro S, Hase T, Otsuka K, Komikdao M, Tokimitsu I, Yamamoto T, Yamamoto K. (2009). A catechin–rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity* 17(2):310–317.

Nakagawa T. (2007). Uncoupling of the VEGF–endothelial nitric oxide axis in diabetic nephropathy: an explanation for the paradoxical effects of VEGF in renal

disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(6): F1665–1672.

Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu T, Nakatou T, Kitamura T, Wada J, Itoshima T, Makino H. (2005). Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28(12):2890–2895.

Nosadini R, Velussi M, Brocco E, Bruseghin M, Abaterusso C, Saller A, Dalla Vestra M, Carraro A, Bortoloso E, Sambataro M, Barzon I, Frigato F, Muollo B, Chiesura-Corona M, Pacini G, Baggio B, Piarulli F, Sfriso A, Fioretto P. (2000). Course of renal function in type 2 diabetic patients with abnormalities of albumin excretion rate. *Diabetes* 49(3): 476–484.

National Kidney Foundation. (2007). KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 49(2)suppl 2:S12–154.

Navarro JF, Mora C. (2005). Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol Dial Transplant* 20(12):2601–2604.

Navarro J, Milena F, Mora C, Leon C, Claverie F, Flores C, Garcia J. (2005). Tumor necrosis factor- α gene expression in diabetic nephropathy: relationship with urinary albumin excretion and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Kidney Int Suppl* (99):S98-102.

Nosadini R, Velussi M, Brocco E, Bruseghin M, Abaterusso C, Saller A, Dalla Vestra M, Carraro A, Bortoloso E, Sambataro M, Barzoni, Frigato F, Muollo B, Chiesura-Corona M, Pacini G, Baggio B, Piarulli F, Sfriso A, Fioretto P. (2000). Course of renal function in type 2 diabetic patients with abnormalities of albumin excretion rate. *Diabetes* 49(3):476-484.

Okada S, Shikata K, Matsuda M, Ogawa D, Usui H, Kido Y, Nagase R, Wada J, Shikata Y, Makino H. (2003). Intercellular adhesion molecule-1 deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes* 52(10): 2586-2593.

Ortega LM, Fornoni A. (2010). Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res* 2:49-62.

Pantsulaia T. (2006). Role of TGF-beta in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Georgian Med News* (131):13-18.

Park CW, Kim JH, Lee JH, Kim YS, Ahn HJ, Shin YS, Kim SY, Choi EJ, Chang YS, Bang BK. (2000). High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent. *Diabetologia* 43(12):1544-1553.

Piyachaturawat P, Poprasit J, Glinsukon T. (1990). Gastric mucosal secretions and lesions by different doses of Streptozotocin in rats. *Toxicol Let* 55(1):21-29.

Pfeilschifter J, Pignat W, Vosbeck K, Marki F. (1989). Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 159(2):385-394.

Pruijm M, Ponte B, Vollenweider P, Mooser V, Paccaud F, Waeber G, Marques-Vidal P, Burnier M, Bochud M. (2012). Not all inflammatory markers are linked to kidney function: results from a population-based study. *Am J Nephrol* 35(3): 288-294.

Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PS. (2008). Combined treatment with arginin and vitamin C ameliorates streptozotocin–induced diabetes in male Wistar rats. *J Appl Toxicol* 28(6):806–813.

Rhee SJ, Kim MJ, Kwag OG. (2002). Effects of green tea catechin on prostaglandin synthesis of renal glomerular and renal dysfunction in streptozotocin–induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 11(3):232–236.

Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. (2002). Anti–diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol* 83(2):109–116.

Sassy–Prigent C, Heudes D, Jouquey S, Auberval D, Belair MF, Michel O, Hamon G, Bariety J, Bruneval P. (2000). Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes* 49(1):466–475.

Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. (2003). Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 41(1):64–68.

Schena FP, Gesualdo L. (2005). Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy.

Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Meheler P. (2002). Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes. *Kidney Int* 61(3):1086–1097.

Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Grone HJ, Nelson PJ, Schlondorff D, Cohen CD, Kretzler M, European Renal cDNA Bank (ERCB) Consortium. (2006). Modular activation of nuclear factor- κ B transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 55(11):2993–3003.

Sekizuka K, Tomino Y, Sei C, Kurusu A, Tashiro K, Yamaguchi Y, Kodera S, Hishiki T, Shirato I, Koide H. (1994). Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 68(2):284–285.

Setiawan VW, Zhang ZF, Yu GP, Lu QY, Li YL, Lu ML, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Kurtz RC, Hsieh CC. (2001). Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int J Cancer* 92(4):600–604.

Shikata K, Makino H. (2001). Role of macrophages in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 1(134): 46–54.

Shin BC, Ryu HH, Chung JH, Lee BR, Kim HL. (2009). The protective effects of green tea extract against L-arginine toxicity to cultured human mesangial cells. *J Korean Med Sci* 24 Suppl:S204–209.

Stuyt RJ, Netea MG, Geijtenbeek TB, Kullberg BJ, Dinarello CA, van der Meer JW. (2003). Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology* 110(3):329–334.

Suzuki D, Miyazaki M, Naka R, Koji T, Yagame M, Endoh M, Sakai H. (1995). In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. *Diabetes* 44(10):1233–1238.

The EUCLID Study Group. (1997). Randomized placebo-controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. *Lancet* 349(9068):1789–1792.

Tuttle KR. (2005). Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an

inflammatory disease. *J Am Soc Nephrol* 16(6):1537–1538.

UK Prospective Diabetes Study Group. (1998). Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complication in type 2 diabetes. *BMJ* 317(160):703–713.

Waltner–Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. (2002). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 277(38):34933–34940.

Weir MR. (2007). Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2(3):581–590.

Williams MD, Nadler JL. (2007). Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr Diab Rep* 7(3):242–248.

Wolf G. (2004). New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest* 34(12):785–796.

Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Hankin J, Pike MC. (2003). Green tea and risk of breast

cancer in Asian Americans. *Int J Cancer* 106(4):574–579.

Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C, Chung FL. (1992). Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res* 52(14):3875–3879.

Yang JA, Choi JH, Rhee SJ. (1999). Effects of green tea catechin on phospholipase A2 activity and antithrombus in streptozotocin diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 45(3):337–346.

Yokozawa T, Nakagawa T, Lee KI, Cho EJ, Terasawa K, Takeuchi S. (1999). Effects of green tea tannin on cisplatin-induced nephropathy in LLC-PK1 cells and rats. *J Pharm Pharmacol* 51(11):1325–1331.

Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int* 72(1):37–44.

Ziyadeh FN, Goldfarb S. (1991). The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int* 39(3):464–475.