creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265968

2017년 2월

석사학위 논문

녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근 세포 증식에 미치는 영향

조선대학교 대학원

의 학 과

이 정 인

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근 세포 증식에 미치는 영향

Effects of green tea catechin on proliferation of aortic smooth muscle cell in diabetic rat

2017년 2월 24일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 정 인

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근 세포 증식에 미치는 영향

지도교수 이 병 래

이 논문을 의학석사 학위신청 논문으로 제출함

2016년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

이 정 인

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

이정인의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 배 학 연 (인)

위 원 조선대학교 교 수 정 종 훈 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 병 래 (인)

2016년 11 월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT vi

1. 서론 1
2. 재료 및 방법 3
   A. 실험재료 3
   B. 실험동물 3
   C. 혈액 채취 및 분석 4
   D. Aortic ring sprouting assay 4
   E. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(qRT-PCR) 5
   F. Western blotting 6
   G. Immunohistochemistry 6
   H. 통계처리 7
3. 결과 8
   A. 당뇨병 흰쥐의 생리적 소견 8

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. 녹차 카테킨 투여 당뇨병 흰쥐의 생리적 소견.8
C. 녹차 카테킨 투여 당뇨병 흰쥐의 대동맥 신생혈관 형성에 미치는 영향 9
D. 녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근세포 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 단백질 발현에 미치는 영향 10
E. 녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근세포 수축형표현형질(contractile phenotype) 단백질 발현에 미치는 영향 11
F. 녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근세포 표현형질 단백질에 미치는 영향 11
4. 고찰 13
5. 요약 18
6. 참고문헌 20

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. The primers sequence for qRT-PCR 24
Table 2. Physical and biochemical parameters of experimental animals 25
Table 3. Effect of green tea catechin on physical and biochemical parameters in diabetic rats 26

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Fig.1. Effects of green tea catechin on endothelial cell(EC) sprouting from aortic ring of diabetic rats 27
Fig. 2. Green tea catechin decrease EC sprouting from aortic ring of diabetic rats 28
Fig. 3. Effect of green tea catechin on proliferating proteins expression in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats 29
Fig. 4. Effect of green tea catechin on contractile proteins expression in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats 30
Fig. 5. Effects of green tea catechin on Ki-67 level in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats 31
Fig. 6. Effects of green tea catechin on α-SMA level in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats 32

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 7. Effects of green tea catechin on myocardin level in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats 33
Fig. 8. Immunohitochemical assay of thoratic aorta from green tea catechin treated diabetic rats 34

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Effects of green tea catechin on proliferation of aortic smooth muscle cell in diabetic rat

Lee JungIn
Advisor : Prof. Lee Byoung-rai, Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

The incidence of diabetic complication is closely related to the vascular dysfunction. The aim of this study is to investigate the effects of tea catechin on proliferation of vascular smooth muscle cells(VSMC) in diabetic rats. Diabetes mellitus of SD rats was induced by high fat diet/low-dose streptozotocin(STZ). The experimental group was divided into 3 different groups, non-diabetes control(NC) group, diabetes mellitus(DM) group, diabetes mellitus+green tea catechin (DM+GTC) group. GTC, polyphenon 60, administered with dissolved in 0.2%(W/V) dringking water. After 16 weeks of GTC administration, the altered-angiogenesis in diabetic rats examined by aortic ring assay and the expression of contractile and synthetic proteins in VSMC of thoractic aorta were also examined by qPCR and wastern blot.

Fasting blood glucose level increased in the DM group compared to the NC group. In the DM+GTC group, it decreased by 31% compared to the DC group. The serum creatinine and blood urea nitrogen(BUN) levels were increased in the DM group and it decreased in the DM+P60 group compared

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

to the DM group. Aortic ring assay using thoractic aorta showed that the length of cell sprout significantly increased in DM group compared with NC group and that of the DM+GTC group was decreased compared to the DM group.

qRT-PCR for VSMC synthetic phenotype protein, cellular retinol binding protein 1(CRBP-1) and connexin 43, from thoratic aorta showed that CRBP-1 expression was increased by 70% in DM group, and decreased by 70% in DM+GTC compared to DM group. Connexin43 was not different between DM and NC group, and decreased in DM+GTC compared to DM group. qRT-PCR of VSMC contractile phenotype protein, Smooth muscle-myosin heavy chain(SM-MHC), myocardin, α-smooth muscle actin(α-SMA), were as follows. SM-MHC was increased 160% and 170% in DM group and DM+GTC group respectively, myocardin was increased by 75% in DM+GTC group compared with DM group. α-SMA was increased by 70% in DM group and DM+GTC group by 80% compared to NC group.

The results of wetern blot of VSMC phenotype protein, ki-67, myocardin, α-SMA, were as follows. Ki-67 was increased by 277% in DM group and DM+GTC group decreased by 77% compared to DM group, myocardin was increased 240% and 540% in DM and DM+GTC group compared with NC group and α-SMA was increased by 120% in DM group compared to NC group. Immunohistochemical assay of thoratic aorta showed that MMP2 and Ki were increased in dibetes mellitus and decreased GTC treatments.

This study shows that synthetic phenotype of VSMC in aorta was incresed in diabetes mellitus and GTC administration showed a decrease in the expression of synthetic phenotype specific protein. Dietary supplementation with GTC could potentially contribute to nutritional strategies for suppression of diabetic vascular complications.

Key words: Diabetes mellitus, catechin, Vascular smooth muscle cell

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. 서 론

당뇨병은 유병율이 매우 높은 질환으로, 국제 당뇨병 연맹(IDF)의 통계에 의하면 2015년 당뇨병 환자 수는 전체인구의 8.8%로 4.1억 명 정도로 추정되고, 2040년에는 세계인구의 10.4% 인 6.4억 명 정도가 될 것으로 예상되고 있다(1). 경제가 발전된 선진국에서 당뇨병환자의 87-91%는 인슐린 비의존형인 제 2형 당뇨병이고 인슐린 의존형인 제 1형 당뇨병 환자는 당뇨병환자의 1-3%를 차지하고 있으며, 저 개발 국가의 제 1형 당뇨병과 제 2형 당뇨병 환자 비율은 아직까지 보고되어 있지 않다(2). 2형 당뇨병환자에서 심혈관계 질환의 발병율은 일반인보다 4-6배 정도 증가되어 있는데, 당뇨병 환자의 심혈관질환 발병은 당뇨병 합병증이나 사망률 증가에 직접적으로 연관되어 있다(3). 당뇨병환자에서 발생하는 심혈관 질환은 고혈당이나 인슐린 저항성 증가로 인해서 유발되는 혈관 신생기전의 변화가 당뇨병성 혈관합병증 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(4). 혈관의 신생은 혈관 내피세포와 평활근세포가 관여하는데, 제 2형 당뇨병에서 나타나는 혈관 평활근세포의 변화는 혈관 합병증을 유도하는 중요한 병리소견이라 할 수 있다(5,6). 혈관 평활근세포는 혈관벽 구조를 지지하여 혈관의 탄력성을 유지하는 역할을 하는 수축형(contractile phenotype) 세포와 혈관의 증식에 관여하는 합성형(synthetic phenotype) 세포가 있다(5). 수축형 세포는 분화된 혈관 평활근세포로서 혈관의 정상적인 생리적 기능을 담당하고, 합성형은 수축형으로부터 탈분화된 혈관 평활근세포(dedifferentiated smooth muscle cells)로서 증식할 수 있으며 혈관의 손상이나 혈관질환의 발생과 관련이 있다(5,7). 식물에 함유되어 있는 폴리페놀류는 당뇨병, 암 및 심혈관질환 등의 발생을 억제 할 수 있다고 알려지면서 많은 연구가 진행되고 있는데(8), 폴리페놀이 2형 당뇨병의 발생을 억제 하거나(9), 인슐린 저항성을 감소시킬 수 있다고

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

한다(10). 녹차(Camellia sinensis L.)는 음료로서 세계적으로 널리 이용되고 있는데, 녹차의 건조 잎에는 폴리페놀류인 카테킨(catechin)이 10～15% 정도 함유되어 있다(11). Iso 등(12)은 녹차음용과 당뇨병발생의 상관관계를 역학 조사한 결과 녹차 음용이 제 2형 당뇨병의 발생을 억제한다고 하였고, Ishikawa 등(13)은 녹차 카테킨이 소장에서 당질의 소화 흡수를 억제하여 식후 혈당 증가를 저하시킨다고 하였고, Wolfram 등(14)은 녹차 카테킨이 제 2형 당뇨병의 예방과 치료에 효과가 있다고 하였다. 녹차 카테킨이 제 2형 당뇨병의 예방과 혈당 증가 억제 효과에 대한 연구결과는 많이 보고되어 있으나, 혈관손상과 관련된 연구는 아직까지 매우 적다. 혈관 평활근세포는 혈관 내피세포와 함께 혈관벽을 이루는 주요 세포로서 수축형 (contractile phenotype)과 합성형 (synthetic phenotype)의 두 가지의 표현형을 나타낼 수 있지만, 정상 생리적 조건에서는 대부분 수축형의 표현형을 가지면서 세포의 증식과 이동이 거의 일어나지 않지만, 혈관에 가해지는 물리적, 화학적 자극에 의해 증식형의 표현형을 나타내면서 증식 및 이동성에 변화가 나타난다(5,7). 혈관 평활근세포는 두 가지 표현형에 특이적인 단백질이 발현되는데, 수축형 표현형질을 나타내는 표지 단백질로는 SM-MHC(smooth muscle-myosin heavy chain), Myocardin 및 α-SMA (α-smooth muscle actin)이 있고, 합성형 표현형질을 나타내는 표지 단백질로는 CRBP-1 (cellular retinol binding protein 1)과 Connexine 43 등이 있으며 이들 단백질의 발현이 각각의 표현형에서 증가한다(5,7). 본 연구는 녹차 카테킨이 당뇨병 혈관 합병증에 미치는 영향을 알기 위한 연구의 일환으로 당뇨병 흰쥐에 녹차 카테킨을 음용시킨 후 혈관손상에 미치는 영향을 혈관 내피세포 증식과 평활근세포의 표현형 변화를 비교 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 재료 및 방법

A. 실험재료

본 실험에 사용된 polyphenon60(P60), streptozotocin(STZ), sodium citrate 및 인슐린 측정 kit 는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

B. 실험동물

본 실험에서 사용한 흰쥐는 체중 180~200 g 되는 Sprague-Dawely 종 수컷으로 샘타코(Samtako, Daejeon, Korea)에서 구매하여, 12시간 명암 주기, 온도 20± 2℃ 상대습도 60± 5% 의 환경에서 사육하였고, 45% 고지방 식이는 샘타코(Samtako, Daejeon, Korea)에서 구매하여 사용 하였다. 동물실험은 조선대학교 동물실험 윤리 위원회 승인(승인번호: CIACUC2015-A0003)을 받아 윤리 규정에 따라서 실험을 실시하였다. 제 2형 당뇨병의 유발은 고지방식이와 저용량 STZ을 사용하여 유발하였다. 실험동물에 45% 고지방 식이를 공급하여 4주일간 사육한 후 당뇨 군에는 STZ를 0.05M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 흰쥐(STZ 35 mg/kg BW)의 복강에 주사하였고, 대조군은 0.05M citrate buffer를 복강에 주사하였다. STZ 주사 후부터 실험동물은 일반 실험동물 사육 사료를 공급하여 사육하였다. STZ 주사 2주일 후 꼬리 정맥에서 측정한 공복혈당 300 mg/dL 이상인 동물을 당뇨군으로 분류하였다. 실험군은 대조군(none diabetic control : NC), 당뇨병군(diabetes mellitus : DM) 및 당뇨병+녹차 카테킨군(diabetes mellitus+green tea catechin : DM+GTC) 등 총 3 군으로 나누었고, 각 실험 군의 동물 수는 5마리로 하였으며, 녹차카테킨(green tea catechin : GTC)은 P60을 사용하였다. NC 군 과 DM 군은 식수로 수돗물을 공급하였고, DM+GTC 군은 수돗물에 P60을 0.2%(w/v) 농도로 용해시켜서 식수로 공급하여 16주일 동안 사육하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

C. 혈액 채취 및 분석

실험동물을 실험 시작 후 2주 간격으로 공복 혈당을 측정하였다. 공복 혈당은 동물을 12시간 금식시키고 꼬리를 절제하여 혈액을 채취하고 혈당 측정기 ACCU-CHEK(Roche Diagnostics, Manheim, Germany)를 이용해 측정하였다. 녹차 카테킨 투여 16주일 경과 후 실험동물은 에테르로 마취시켜 개복 후 복부정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액의 일부는 즉시 혈장을 분리하여 일부는 인슐린 측정에 이용하고, 나머지는 응고시킨 후 혈청을 분리하여 크레아틴(creatine), BUN(blood urea nitrogen) 및 중성지질 정량 시료로 사용하였다. 혈장 인슐린은 인슐린 측정 kit(Insulin ELISA kit) Sigma-Aidrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 제조사의 방법에 따라서 반응시킨 후 ELISA plate reader(TECAN. Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하여 계산하였다. 혈청 중성지질, BUN 및 creatinine 량은 혈액 자동분석기(Hitachi 7180, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 인슐린저항성 지수인 homeostasis model assessment for insulin resistance(HOMA-IR)는 Matthews 등(15)의 방법에 따라서 다음 식에 의해 계산하였다.

HOMA-IR = Insulin(μ units/mL) x glucose(mmol/L)/22.5

D. Aortic ring sprouting assay

혈관신생능력을 관찰하기 위한 aortic ring assay는 Baker등(16)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 흉·복부를 절개하여 흉부대동맥을 적출하였다. 척출된 흉부대동맥을 4℃ 로 냉각된 PBS (phosphated buffer saline, PH7.2, Welgene, Gyeongsan-si, korea)에 옮겨 혈액과 지방조직을 제거하고 1mm 두께로 절단하여 대동맥 고리를 준비하였다. Matrigel Matrix (growth factor reduced, Corning, N.Y., USA)를

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

96well plate에 50㎕씩 넣어 37℃ CO_2 incubator에서 30분 배양시켜 겔로 굳힌 후, 준비된 대동맥 고리를 Matrigel 중앙에 올려놓고 37℃에서 10분간 배양 후 다시 각 대동맥 고리 위에 50㎕의 Matrigel Matrix를 넣어 37℃에서 30분간 배양하여 굳혔다. Matrigel 위에 세포 배양액 (10% FBS, 100 mg/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin이 포함된 DMEM) 100㎕를 넣고 7일 동안 배양하면서 자라난 신생혈관을 관찰 하였고, 혈관형성능력은 Image J 프로그램을 사용하여 세포의 길이를 측정하였다.

E. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(qRT-PCR)

흰쥐에서 적출된 흉부대동맥은 주위 결합조직과 지방조직 및 혈액을 제거하고 TRIzol Reagent (QIAGEN, Tokyo Japan)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 분광광도계로 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 후 1μg의 RNA을 취해서 cDNA 합성 kit(Prime Script 1st strand cDNA synthesis kit, TaKaRa Bio Inc, Japan)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 반응 조건은 1μg의 RNA을 Random 6 mers (50μM) 1㎕, dNTP mixture (10mM) 1㎕에 멸균된 증류수를 첨가해 총 반응액을 10㎕로 하여 65℃에서 5분간 반응시킨 후, 5X Prime Script buffer 4㎕, RNase inhibitor (40U/㎕) 0.5㎕ 및 Prime Script RTase (200U/㎕) 1㎕를 첨가하여 30℃ 10분, 42℃ 50분, 70℃ 15분의 순서의 조건으로 수행하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SYBR Premix Ex Taq (2X) (TaKaRa Bio Inc, Kusatsu, Japan)와 유전자(CRBP1, Connexin43, SM-MHC, Myocardin, α-SMA) 특이적인 primer을 사용하여 qPCR을 수행하였다. 반응조건은 100ng의 cDNA 1㎕, 10 pmol의 Forward & Reverse primer 각 2㎕, SYBR premix 10㎕에 멸균된 증류수를 첨가하여 총 반응액 20㎕가 되게 한 후 초기 denaturation을 95℃에서 15분 동안 반응 후, denaturation은 95℃에서 30초, annealing 60℃ 에서 30초, extention은

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

72℃에서 20초를 40 cycles 수행하였다. 유전자의 발현정도는 housekeeping 유전자인 GAPDH를 기준으로 delta-delta Ct (ΔΔct) 방법으로 계산하였다.

F. Western blotting

흰쥐로부터 분리된 흉부대동맥 조직에 1mM protease inhibitor(PMSF)가 포함된 lysis buffer (50 mMTris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0.1% SDS) 용액 3mL 를 가하여 homogenizer (BioMasher, Tokyo, Japan)를 이용하여 잘게 부순 후 14,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 수집하여 시료로 사용하였다. 수집된 상층액은 단백질을 Bradford protein assay kit (Bio-Rad, CA)를 이용하여 정량하고, 동량의 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis)에 전기영동하여 단백질을 크기별로 분리한 다음 Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane에 transfer buffer (20 mMTrizma® base, 190 mM glycine, 20% methanol)와 electrotransfer kit를 이용하여 1시간 30분 동안 이동시켰다. 전기 이동된 membrane은 blocking buffer (5% skim milk in TBS-T [1x Tris-bufferd saline, 0.1% tween-20])에 반응시켜 비특이적인 결합을 예방한 뒤, 1차 항체 (myocardin; Santa Cruz Biotechnology, ki-67; Bioworld, α-SMA; abcam)를 첨가한 후 4℃에서 overnight 반응 시킨 후 2차 항체(horseradish peroxidase conjugated-Ab)를 첨가 한 후 상온에서 1시간 반응시켰다. ECL (enhanced chemiluminescence)kit (BIONOTE, korea)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 X-ray상에서 밴드의 크기로 확인하였다. 밴드의 정량은 Image J 프로그램을 사용하여 분석하였다.

G. Immunohistochemistry

흰쥐로부터 분리된 흉부대동맥을 0.5 cm 길이로 절단하여 10% paraformaldehyde 용액에서 고정시킨 후 탈수과정을 거쳐서 파라핀에 포매(embedding)한 후 6μm의 절편으로 잘라 슬라이드 글라스 위에 붙여 파라핀

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

을 제거하는 과정(xylene Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ→ 100% EtoHⅠ,Ⅱ→ 95% EtoHⅠ,Ⅱ→ 90% EtoH→80% EtoH→ 70% EtoH ,각 10분씩)을 진행하였다. 증류수에 5분간 세척(washing)하는 동안 미리 준비해 놓은 retrieval solution(sodium citrate buffer : stock A-0.1M citric acid 9ml, stock B-0.1M sodium citrate dehydrate 41mL ; total of 500mL D.W, pH 6.0)을 비이커에 담아 microwave를 이용하여 조직샘플을 넣고 총 20분 내로 가열하여 조직에 숨겨진 항원을 회복하는 과정을 진행한 다음 실온에서 1시간 정도 냉각시켰다. 이후 0.3% H_2O_2 를 포함한 60% methanol 에 25분간 담가 내인성 peroxidase을 차단하고, 증류수로 2회, 1X PBS로 2회, 각각 7분씩 세척 후, 슬라이드 글라스의 조직 위에 normal serum을 충분히 떨어뜨려 상온에서 1시간동안 방치하였다. 슬라이드 글라스의 조직위에 1차 항체(PCNA 1:1000 dilution-Cell Signaling, Ki-67 1:100 dilution, MMP2 1:200 dilution-abcam)를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 후 1X PBS로 7분씩 4회 세척하였다. 2차 항체(1:200 in 1X PBS)를 첨가하여 30분간 처리하고 1X PBS로 7분씩 3회 세척하는 동안 30분전에 미리 결합시킨 ABC reagent를 50분간 처리하고 1X PBS로 7분씩 2회 세척 후 DAB(diamino benzidine, 0.2mg DAB , 3% H_2O_2 10㎕ in 1X PBS 1ml)을 5분간 처리하여 갈색의 염색 상태를 확인하면서 반응을 진행시킨 후 증류수로 10분간 세척하고 hematoxylin에 1분간 대조염색한 후 탈수과정 (70% EtoH→ 80% EtoH→ 90% EtoH→ 95% EtoHⅠ,Ⅱ→ 100% EtoHⅠ,Ⅱ→xyleneⅠ,Ⅱ,Ⅲ, 각 5분씩)을 거친 후 현미경으로 관찰한다.

H. 통계처리

RNA-seq를 제외한 모든 측정 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였고, 실험결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 시료 간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 결 과

A. 당뇨병 흰쥐의 생리적 소견

고지방식이와 저용량 STZ 투여하여 당뇨병이 유도된 흰쥐의 체중, 식이섭취량 및 혈액 소견을 측정한 결과는 Table 2와 같다. NC 군의 흰쥐의 체중은 278.5± 16.2 g, DM 군의 체중은 263.4± 14.3 g 으로 NC 군 과 DM 군 사이에 유의한 차이가 없었고, 식이섭취량은 NC 군 13.2± 3.2 g/24 h, DM 군 22.8± 6.6 g/24 h로 DM 군이 NC 군보다 72%가 증가되었다. 공복 혈당은 DM 군에서 24.2± 2.1 mmol/L로 NC 군의 4.7± 0.8 mmol/L에 비하여 약 4배가 증가되었고, 혈장 인슐린은 NC 군 7.6± 0.7 μU/L, DM 군 8.2± 0.7 μU/L로 두군 간에 차이가 없었으며, HOMA-IR은 NC 군보다 DM 군에서 약 3.8배 높게 나타났다. 중성지질량은 DM 군에서 NC 군에서 78.2± 7.5 mg/dL, DM 군에서 168.2± 17.9 mg/dL로 DM 군에서 약 1.1배가 증가 되었다.

B. 녹차 카테킨 투여 당뇨병 흰쥐의 생리적 소견

녹차 카테킨투여가 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하기 위해 P60을 당뇨병 흰쥐에 16주간 투여한 후 관찰한 식이섭취량, 음수량, 체중 및 혈액소견은 Table 3과 같다. 식이섭취량은 NC 군 22.7± 3.6 g/24 h, DM 군 31.7± 6.5 g/24 h, DM+GTC 군 28.7± 5.6 g/24 h를 각각 나타내서 NC 군에 비하여 DM 군과 DM+GTC 군은 39% 와 26% 가 각각 증가되었으나 DM 군과 DM+GTC 군 사이에 식이섭취량의 차이는 없었다. 음수량은 NC 군, DM 군과 DM+GTC 군에서 17.8± 3.5 mL/24 h, 42.1± 7.3 mL/24 h 및 33.5± 6.5 mL/24 h를 각각 나타내서 NC 군에 비하여 DM 군에서 136 %가 증가되었고, DM+GTC 군의 음수량은 DM 군에 비하여 20% 정도 감소되었다. 공복 혈당은 NC 군, DM 군과 DM+GTC 군에서 4.8± 0.7 mmol/L, 25.2± 2.6 mmol/L 및 17.2± 2.1 mmol/L

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

를 각각 나타내서 NC 군에 비하여 DM 군은 425%가 증가되었고, DM+GTC 군의 공복혈당은 DM 군에 비하여 31% 가 감소되어 당뇨흰쥐에 녹차 카테킨 투여로 공복혈당의 감소가 나타남을 알 수 있었다. 혈청 인슐린 량은 NC 군, DM 군과 DM+GTC 군 사이에 유의한 차이가 없으며, HOMA-IR은 NC 군 1.8± 0.3, DM 군 8.7± 0.9, DM+GTC 군 6.1± 0.6 으로 각각 나타나서 NC 군에 비하여 DM 군에서 유의하게 증가되었고, DM+GTC 군의 HOMA-IR 지수는 DM 군에 비하여 29% 가 감소되었다. 혈청 중성지질량은 NC 군, DM 군과 DM+GTC 군에서 79.4± 11.9 mg/dL, 182.2± 15.8 mg/dL 및 141.2± 14.2 mg/dL를 각각 나타내서 NC 군에 비하여 DM 군에서 130%가 증가되었고, DM+GTC 군의 중성지질량은 DM 군에 비하여 22% 가 감소되어 녹차카테킨 투여로 당뇨병 흰쥐의 혈장 중성지질량 감소가 나타남을 알 수 있다. 혈청 BUN 량은 NC 군, DM 군과 DM+GTC 군에서 27.5± 5.5 mg/dL, 81.4± 11.8 mg/dL 및 65.1± 10.1 mg/dL를 각각 나타내서 NC 군에 비하여 DM 군에서 196%가 증가되었고, DM+GTC 군의 BUN 량은 DM 군에 비하여 20% 가 감소되어 녹차카테킨 투여로 당뇨병 흰쥐의 혈청 BUN 량 감소가 나타남을 알 수 있다. 혈청 creatinine 량은 NC 군, DM 군과 DM+GTC 군에서 0.31± 0.08 mg/dL, 1.25± 0.14 mg/dL 및 0.85± 0.11 mg/dL를 각각 나타내서 NC 군에 비하여 DM 군에서 303%가 증가되었고, DM+GTC 군의 BUN 량은 DM 군에 비하여 32% 가 감소되어 녹차카테킨 투여로 당뇨병 흰쥐의 혈청 creatinine 량 감소가 나타남을 알 수 있다.

C. 녹차 카테킨 투여 당뇨병 흰쥐의 대동맥 신생혈관 형성에 미치는 영향

녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 신생혈관 형성능력에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병이 유발된 흰쥐에 녹차 카테킨 0.2%(W/V) 용액을 16주 동안 경구 투여한 후 흰쥐를 희생시켜서 흉부 대동맥을 채취하여 약 1mm 정도 두께로 절단하여 대동맥 고리(aortic ring)를 만들었다. 대동맥 고리는 Matrigel 에 배양하여 시간 경과에 따라서 내피세포 발아(EC sprouting)정도를 자라나는 혈관세포의 길이를 측정하여 관찰한 결과는 그림 1, 2와 같다. 대동맥 고리를 배양하면서 1, 3, 5, 7일째에 관찰한 결과 NC 군, DM 군 및

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

DM+GTC 군에서 모두 3일째부터 내피세포 발아가 나타나서 7일 째까지 증식이 계속 되었는데, 증식되어 나온 신생혈관세포의 길이는 NC군에 비하여 DM 군이 현저히 증가되었고, DM+GTC 군의 신생혈관세포 길이는 NC 군보다는 증가되어 있으나, DM 군보다는 현저히 감소되어 있었다. 혈관세포 증식을 신생혈관세포의 길이를 측정하여 비교한 결과 7일째에 DM 군은 NC 군의 306 %로 증가되었고, DM+GTC 군은 NC 군의 306 %로 증가되어 있어서 DM 군의 혈관세포 증식은 NC 군보다 증가되고, DM+GTC 군은 DM 군보다 감소된 것을 나타내고 있다.

D. 녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근세포 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 단백질 발현에 미치는 영향

당뇨병이 유발된 흰쥐에 녹차 카테킨 0.2%(W/V) 용액을 16주 동안 경구 투여한 후 흰쥐를 희생시켜서 흉부 대동맥을 절제하여 RNA 를 분리한 후 평활근세포 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 단백질 CRBP-1과 Connexine 43 에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과는 그림 3과 같다. CRBP-1 mRNA에 대한 qRT-PCR 을 시행하여 NC 군과 비교한 결과 DM 군은 NC 군보다 70% 정도 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군보다 70% 정도가 감소되어 CRBP-1 유전자 발현이 당뇨병 발생으로 인하여 증가되고 녹차카테킨투여가 당뇨병으로 인한 CRBP-1 유전자 발현 증가를 억제하는 것으로 나타났다. Connexine 43에 대한 qRT-PCR 을 시행하여 NC 군과 비교한 결과 DM 군은 NC 군과 유의한 차이가 없었으나, DM+GTC 군은 DM 군보다 33% 정도가 감소되어 당뇨병에서 대동맥 Connexine 43 유전자 발현은 녹차카테킨투여로 억제되는 것을 보여주고 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

E. 녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근세포 수축형 표현형질(contractile phenotype) 단백질 발현에 미치는 영향

당뇨병 유발 흰쥐에 녹차 카테킨 0.2%(W/V) 용액을 16주 동안 경구 투여한 후 흰쥐를 희생시켜서 흉부 대동맥을 절제하여 RNA 를 분리, 정제한 후 평활근세포 수축형 표현형질(contractile phenotype) 단백질 SM-MHC, myocardin 및 α-SMA에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과는 그림 4와 같다. SM-MHC mRNA에 대한 qRT-PCR을 시행하여 NC 군과 비교한 결과 NC 군에 비하여 DM군과 DM+GTC 군에서 각각 160% 및 170%가 각각 증가되었고, DM 군과 DM+GTC 군은 유의한 차이가 없었다. Myocardin mRNA에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과 DM 군은 NC 군과 유의한 차이가 없었으나, DM+GTC 군은 DM 군보다 75% 정도가 증가되어 당뇨병에서 대동맥 myocardin 유전자 발현은 녹차카테킨투여로 증가되는 것을 보여주고 있다. α-SMA mRNA에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과 NC 군에 비하여 DM 군과 DM+GTC 군에서 각각 70% 및 80%가 각각 증가되었고, DM 군과 DM+GTC 군은 유의한 차이가 없었다.

F. 녹차 카테킨이 당뇨병 흰쥐의 대동맥 평활근세포 표현형질 단백질에 미치는 영향

당뇨병 유발 흰쥐에 녹차 카테킨 0.2%(W/V) 용액을 16주 동안 경구 투여한 후 흰쥐를 희생시켜서 흉부 대동맥을 절제하여 평활근세포 표현형질(phenotype) 단백질 Ki-67, myocardin 및 α-SMA에 대한 western blot 을 시행한 결과는 그림 5, 6, 7 과 같다. 흉부 대동맥 Ki-67 는 NC군에 비하여 DM 군에서 277% 가 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 77% 가 감소되어

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

당뇨병 흰쥐의 대동맥에서 Ki-67 단백질이 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 유의하게 감소됨을 보여주고 있다. 흉부대동맥 α-SMA 는 NC군에 비하여 DM 군에서 120%가 증가되어 당뇨군에서 α-SMA 가 증가됨을 보여주고 있고, DM 군과 DM+GTC 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 흉부 대동맥 myocardin 은 NC군에 비하여 DM 군과 DM+GTC 군에서 각각 240%와 540%가 각각 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 91% 가 증가되어 당뇨병 흰쥐의 대동맥에서 myocardin 이 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 유의하게 증가됨을 보여주고 있다. 당뇨병 유발 흰쥐에 녹차 카테킨 0.2%(W/V) 용액을 16주 동안 경구 투여한 후 흰쥐를 희생시켜서 흉부 대동맥을 절제하여 고정시킨 후 MMP2, Ki-67 및 PCNA 에 대한 면역조직화학검사를 시행하여 분석한 결과는 그림 8 과 같다. 흉부 대동맥 MMP2와 Ki-67은 NC군에 비하여 DM 군에서 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 감소되어, 당뇨병 흰쥐의 대동맥에서 MMP2와 Ki-67 가 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 감소됨을 보여주고 있으며, PCNA는 NC 군, DM 군 및 DM+GTC 군 사이에 유의한 차이는 없었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 고 찰

본 연구는 녹차 카테킨이 당뇨병환자의 혈관합병증 유발에 미치는 영향을 관찰하기 위한 실험으로 당뇨병이 유발된 흰쥐에 녹차 카테킨을 16주간 투여한 후 혈관신생 및 혈관평활근 표현형 변화를 조사하였다. 고지방식이와 저용량 STZ 에 의해서 제 2형 당뇨병이 유발되는 것으로 알려져 있는데(17), 본 실험에서 흰쥐에 고지방식이를 4주간 공급한 후 STZ(35 mg/kg)을 주사하여 2주경과 후 흰쥐의 공복혈당은 STZ 를 주사하지 않은 대조군(NC) 보다 4배가 증가되었고, 혈장 인슐린은 NC 군과 차이가 없었으며, 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR은 NC 군보다 3.8배가 증가되어 인슐린 저항성이 있는 당뇨병이 유발된 것으로 생각된다. 녹차 카테킨이 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 흰쥐에 P60을 0.2% 용액으로 만들어 식수로 16주간 공급한 후 공복 혈당은 DM 군에서 NC 군보다 425%가 증가되었고, DM+GTC 군의 공복혈당은 DM 군에 비하여 31% 가 감소되어 녹차 카테킨 투여로 공복혈당의 감소가 나타남을 알 수 있는데, 이는 Wein 등(18)이 당뇨병 생쥐에서 녹차 카테킨이 탄수화물의 소화, 흡수를 억제하여 혈당을 감소시키는 작용이 있다고 한 결과나, Nagao 등(19)이 2형 당뇨병 환자에게 녹차 카테킨 투여하면 공복혈당이 감소된다고 한 결과와 유사한 소견으로 녹차 카테킨이 당뇨병에서 공복혈당을 감소시키는 작용이 있는 것으로 생각된다. 혈청 BUN과 creatinine 량은 신장 기능을 나타내는 소견으로서 당뇨병성 신장손상이 나타나면 증가되는 것으로 알려져 있는데(20), 본 실험결과에서 당뇨병 유발 후 16주가 지난 DM군에서 혈청 BUN과 creatinine 량이 증가되어 신장 기능 장애가 있음을 나타내고 있다. 당뇨병에 의한 신장 기능 이상은 당뇨병성 신증을 초래하는데, 당뇨병성 신증은 신장 사구체의 모세혈관손상을 초래하여 혈관의 기능 이상을 유발 시켜서 합병증을 유발 하는 것으로 알려져 있어서, 본 실험에서

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

당뇨병 흰쥐에서 혈청 BUN과 creatinine 이 증가되는 것은 신장 기능이 감소되어 나타나는 것으로서 사구체의 기능이상에 의한 결과로 추측된다. 당뇨병에 의한 사구체 기능 감소는 사구체 혈관손상을 동반함으로 BUN과 creatinine 증가는 사구체 모세혈관손상이 나타나 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다. DM+GTC 군의 혈청 BUN과 creatinine 량은 DM 군에 비하여 유의하게 감소되어 녹차 카테킨 투여로 당뇨병성 신장손상 방지효과 나타남을 알 수 있다. 녹차추출물이 항암제 시스플라틴 투여에 의한 혈청 creatinine 과 BUN이 증가를 억제하여 시스플라틴에 의한 신장손상을 억제한다고 보고가 있다(21). 당뇨병 환자에서 혈관기능 이상은 당뇨병 합병증발생과 밀접한 연관이 있으며, 당뇨병성 합병증은 고혈당이나 인슐린 저항성 증가로 초래될 수 있는 혈관 신생의 변화가 중요한 요인으로 알려져 있다(4,22). 혈관신생에는 내피세포와 평활근세포가 관여하는데 혈관신생의 증가는 혈관질환의 발생과 연관이 있으므로(22, 23), 본 실험에서 당뇨병 발생으로 인한 혈관신생능력 변화를 관찰하기 위하여 대동맥 링 발아 실험(Aortic ring sprouting assay)를 흉부대동맥을 절제하여 실시하였다. 대동맥 링 발아는 주로 혈관내피세포가 증식되어 나타나는 결과로 본 실험결과 발아세포의 길이가 NC군에 비하여 DM 군이 현저히 증가되어 당뇨병 발생으로 혈관 신생능력이 증가됨을 알 수 있다. DM 군에서 흉부대동맥 혈관신생능력의 증가는 혈관의 손상이 일어나는 중요한 요소로서 당뇨병성 혈관 손상과 연관이 있으며, 당뇨병성 합병증 유발에도 관련이 있을 것으로 추측된다. 따라서 DM+GTC 군의 발아세포 길이가 DM 군보다는 현저히 감소된 결과는 녹차 카테킨 투여로 당뇨병성 혈관세포의 손상이 감소되어 나타난 결과로 추측됨으로 녹차 카테킨은 당뇨병에 의한 혈관손상을 방지하는 효과가 있는 것으로 생각된다. 혈관 평활근세포는 혈관내피세포와 함께 혈관벽을 이루는 주요 세포로 혈관의 장력과 혈류의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(3). 혈관 평활근세포는 수축형 (contractile

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

phenotype)과 합성형 (synthetic phenotype)의 두 가지의 표현형을 나타낼 수 있다. 정상 상태에서 혈관 평활근 세포는 수축형의 표현형을 가지면서 세포의 증식과 이동이 거의 일어나지 않지만, 혈관에 물리적, 화학적 자극이 가해지면 합성형의 표현형 세포로 변형이 일어나면서 단백질 합성과 세포 증식 및 이동성이 증가하게 된다(3,4). 혈관 평활근세포 표현형을 나타내는 특이적 단백질이 발현되는데, 본 실험에서 흉부 대동맥에서 RNA를 분리하여 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 단백질 CRBP-1과 Connexine 43 에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과는 CRBP-1 은 DM 군에서 NC 군보다 70% 증가되어 CRBP-1 유전자 발현이 당뇨병 발생으로 인하여 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군보다 70% 정도가 감소되어 녹차 카테킨이 당뇨병으로 인한 CRBP-1 유전자 발현 증가를 억제하는 것으로 나타났고, Connexine 43은 DM 군과 NC 군과 유의한 차이가 없었으나, DM+GTC 군은 DM 군보다 33% 정도가 감소되어 당뇨병에서 대동맥 Connexine 43 유전자 발현은 녹차 카테킨에 의해서 억제되는 것을 보여주고 있다. 또한 수축형 표현형질(contractile phenotype) 단백질 SM-MHC, myocardin 및 α-SMA에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과 SM-MHC 는 NC 군에 비하여 DM군과 DM+GTC 군에서 각각 160% 및 170%가 각각 증가되었고, DM 군과 DM+GTC 군은 차이가 없었고, Myocardin 은 DM 군은 NC 군과 유의한 차이가 없었으나, DM+GTC 군은 DM 군보다 75% 정도가 증가되었으며, α-SMA 는 NC 군에 비하여 DM 군과 DM+GTC 군에서 각각 70% 및 80%가 각각 증가되었고, DM 군과 DM+GTC 군은 차이가 없었다. 이러한 결과로서 당뇨병으로 인하여 수축형과 합성형 단백질 유전자 발현이 모두 증가된 것으로 나타났고, 녹차 카테킨은 합성형 단백질의 발현은 감소되나 수축형 단백질의 발현에는 영향이 적은 것으로 나타났다. 평활근세포 표현형질(phenotype) 단백질 Ki-67, myocardin 및 α-SMA에 대한 western blot 을 시행한 결과 Ki-67 은 DM 군에서 NC 군보다 277% 가 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군 보다 77% 가

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

감소되어 당뇨병 발생으로 대동맥 Ki-67 단백질이 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 감소되었다. α-SMA 는 NC 군에 비하여 DM 군에서 120%가 증가되어 당뇨병으로 α-SMA 가 증가되며, DM 군과 DM+GTC 군 사이에 차이가 없어서 녹차 카테킨에 의한 영향은 적을 것으로 추측된다. 또한 myocardin 은 NC 군에 비하여 DM 군과 DM+GTC 군에서 240%와 540%가 각각 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군보다 91% 가 증가되어 당뇨병으로 인하여 대동맥 myocardin 이 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 유의하게 증가됨을 보여주고 있다. Ki-67은 세포증식 시 과발현되는 핵단백질(nuclear protein)로서 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 세포에서 발현이 증가하는데(24) 본 실험에서 DM 군에서 Ki-67량이 증가된 것은 당뇨병 발생으로 인하여 합성형 표현형질이 증가됨을 나타내고 있고, 녹차 카테킨 투여로 ki-67 량이 감소되므로 당뇨병으로 인한 합성형 표현형질 전환을 억제하여 나타난 결과로 추측된다. 또한 수축형 표현형질(contractile phenotype) 세포에서 발현되는 α-SMA와 myocardin은 DM 군에서 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 증가되거나 변화가 없어서 수축형 표현형질에 미치는 영향은 형질전환을 촉진하거나 영양이 없는 것으로 추측된다. 또한 MMP2, Ki-67 및 PCNA 에 대한 면역조직화학검사를 시행하여 분석한 결과 흉부 대동맥 MMP2와 Ki-67은 NC군에 비하여 DM 군에서 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 감소되어, 당뇨병으로 MMP2와 Ki-67 가 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 감소됨을 보여주고 있으며, PCNA는 NC 군, DM 군 및 DM+GTC 군 사이에 유의한 차이는 없었다. MMP2는 세포외 기질을 분해하는 효소이므로 본 실험에서는 평활근세포의 이동에 관여하는 인자로서 본 실험에서 당뇨병으로 증가되는 것으로 나타나서 당뇨병으로 인하여 세포이동이 일어나고 세포증식이 일어날 수 있음을 보여주고 있으며, 녹차 카테킨 투여로 감소되는 것으로 나타나서 세포이동을 억제하는 작용을 나타낼 것으로 추측된다. Ki-67과 PCNA는 세포 증식기 세포핵에서 발현이 증가하는 단백질로서 Ki-67 발현이 증가되고 녹차카테킨 투여로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과로서 당뇨병으로 인하

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

여 대동맥 혈관 평활근세포는 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 세포 특이 단백질 발현이 증가되어 합성형 표현형 세포가 증가됨을 알 수 있고, 녹차 카테킨은 이를 억제하는 작용이 있는 것으로 나타나서 녹차 카테킨은 당뇨병으로 인한 혈관손상을 방지하여 합병증을 억제하는 효과가 있을 것으로 추측되며 이에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. 요 약

본 연구는 녹차 카테킨이 당뇨병환자의 혈관합병증 유발에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병이 유발된 흰쥐에 녹차 카테킨을 16주간 투여한 후 혈관신생 및 혈관 평활근 표현형 변화를 관찰 하였다. 공복 혈당은 DM 군에서 NC 군보다 425%가 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 31% 가 감소되어 녹차 카테킨 투여로 공복혈당의 감소가 나타남을 알 수 있었다. 혈청 BUN과 creatinine 량은 DM군에서 NC군보다 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 감소되어 녹차 카테킨 투여로 신장손상 방지효과 나타남을 알 수 있다. 혈관신생능력 변화를 관찰하기 위하여 흉부동맥을 이용하여 대동맥 링 발아 실험을 실시한 결과 발아세포의 길이가 NC군에 비하여 DM 군이 현저히 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군보다는 감소되었다. 흉부 대동맥에서 RNA를 분리하여 혈관 평활근 세포 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 단백질 CRBP-1과 Connexine 43 에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과는 CRBP-1 은 DM 군에서 70% 증가되고, DM+GTC 군은 DM 군보다 70% 감소되었고, Connexine 43은 DM 군과 NC 군은 차이가 없었으나, DM+GTC 군은 DM 군보다 33% 정도가 감소되었다. 수축형 표현형질(contractile phenotype) 단백질 SM-MHC, myocardin 및 α-SMA에 대한 qRT-PCR을 시행한 결과 SM-MHC 는 DM군과 DM+GTC 군에서 각각 160% 및 170%가 각각 증가되었고, DM 군과 DM+GTC 군 사이에 차이는 없었고, Myocardin 은 DM 군은 NC 군과 차이가 없었으나, DM+GTC 군은 DM 군보다 75% 정도가 증가되었으며, α-SMA는 NC 군에 비하여 DM 군과 DM+GTC 군에서 각각 70% 및 80%가 각각 증가되었고, DM 군과 DM+GTC 군은 차이가 없었다. 평활근세포 표현형질(phenotype) 단백질 Ki-67, myocardin 및 α-SMA에 대한 western blot 을 시행한 결과 Ki-67 은 DM 군에서 277% 가 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군 보다 77% 가 감소되었고, α-SMA 는 DM 군에서 120%가 증

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

가되었고, DM 군과 DM+GTC 군은 차이가 없었다. Myocardin 은 DM 군과 DM+GTC 군에서 240%와 540%가 각각 증가되었다. MMP2, Ki-67 및 PCNA 에 대한 면역조직화학검사를 시행하여 분석한 결과 흉부 대동맥 MMP2와 Ki-67은 NC군에 비하여 DM 군에서 증가되었고, DM+GTC 군은 DM 군에 비하여 감소되어, 당뇨병으로 MMP2와 Ki-67 가 증가되고, 녹차 카테킨 투여로 감소됨을 보여주고 있으며, PCNA는 NC 군, DM 군 및 DM+GTC 군 사이에 유의한 차이는 없었다.

이상의 실험 결과로서 당뇨병으로 인하여 대동맥 혈관 평활근세포는 합성형 표현형질(synthetic phenotype) 세포 특이 단백질 발현이 증가되어 합성형 표현형 세포가 증가됨을 알 수 있고, 녹차 카테킨은 이를 억제하는 작용이 있는 것으로 나타나서 녹차 카테킨은 당뇨병으로 인한 혈관손상을 방지하여 합병증 발생을 억제하는 효과가 있을 것으로 추측되며 이에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

REFERENCES

1. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas. 6th ed. Brussels, Belgium. 2015; 48-52.*
2. Akkati S, Sam KG, Tungha G. *Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. J Clin Pharmacol 2011; 51: 796-804.*
3. Meeuwisse-Pasterkamp SH, van der Klauw MM, Wolffenbuttel BH. *Type 2 diabetes mellitus: prevention of macrovascular complications. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2008; 6: 323-341.*
4. Cersosimo E, and RA DeFronzo RA. *Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map for cardiovascular diseases. Diabetes Metab. Res. Rev. 2006; 22: 423-436.*
5. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. *Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. J Vasc Surg. 2007; 45: A25-32.*
6. Cersosimo E, XiaoJing X, and Musi N. *Role of insulin signaling in vascular smooth muscle cell migration, proliferation & inflammation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2012; 302: C652-C657.*
7. Gomez D, Owens GK. *Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2012; 95: 156-164.*
8. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. *Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. J Med Food 2005; 8: 281-90.*
9. Wedick NM1, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. *Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. Am J Clin Nutr 2012; 95: 925-933.*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

10. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. *Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. J Am Coll Nutr 2005; 24: 376-384.*
11. Wang Y, Ho CT. *Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. J Agric Food Chem 2009; 57: 8109-8114.*
12. Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A. *JACC Study Group. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. Ann Intern Med 2006; 144: 554-562.*
13. Ishikawa A, Yamashita H, Hiemori M, Inagaki E, Kimoto M, Okamoto M, Tsuji H, Memon AN, Mohammadio A, Natori Y. *Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of Nerium indicum J Nutr Sci Vitamino 2007; 53: 166-173.*
14. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, Weber P. *Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. J Nutr 2006; 136: 2512-2518.*
15. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985; 28: 412-419.*
16. Baker M. Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, Amico GD, Jones DT, Vojnovic B, Hodivala-Dilke K. *Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis, Nat Protoc. 2011; 7: 89-104.*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

17. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. *Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. Pharmacological Research 2005; 52: 313-320.*
18. Wein S, Schrader E, Rimbach G, Wolffram S. *Oral green tea catechins transiently lower plasma glucose concentrations in female db/db mice. J Med Food 2013; 16: 312-317.*
19. Nagao T, Meguro S, Hase T, Otsuka K, Komikado M, Tokimitsu I, Yamamoto T, Yamamoto K. *A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. Obesity 2009; 17: 310-317.*
20. Lin S, Yang J, Wu G, Liu M, Luan X, Lv Q, Zhao H, Hu J. *Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy. J Biomed Sci. 2010; 17: S46-S54.*
21. Khan SA, Priyamvada S, Khan W, Khan S, Farooq N, Yusufi AN. *Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. Pharmacol Res. 2009; 60: 382-391*
22. Porter KE, Riches K. *The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes? Clin Sci (Lond). 2013; 125 :167-182.*
23. Casella S, Bielli A, Mauriello A, Orlandi A. *Molecular Pathways Regulating Macrovascular Pathology and Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype in Type 2 Diabetes. Int J Mol Sci. 2015; 16: 24353-24368.*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

24. Zhang Z, Zhang M, Li Y, Liu S, Ping S, Wang J, Ning F, Xie F, Li C. *Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and oxLDL through LOX-1 pathway. Cell Signal. 2013; 25: 332-340.*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. The primers sequence for qRT-PCR

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
GAPDH	5′-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3′	5′-TGGTAACCAGGCGTCCGATA-3′
CRBP1	5′-CACCATGCCTGTGGACTTCA-3′	5′-TCAGTGTACTTTCTTGAACAC-3′
Connexin43	5′-GGCCTTCCTGCTCATCCA-3′	5′-GGGATCTCTCTTGCAGGTGTAGA-3′
SM-MHC	5′-ATGGAGACAAATGCTAATCAGCC-3′	5′-CAGTTGGACACTATGTCAGGGAAA-3′
Myocardin	5′-CAGAAAGTGACAAGAACCATACAG-3′	5′-TGAAGCAGCCGAGCATAGG-3′
α-SMA	5′-AACTGGTATTGTGCTGGACTCTGG-3′	5′-CACGGACGATCTCACGCTCAG-3′

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

CRBP-1 : cellular retinol binding protein 1

SM-MHC : smooth muscle-myosin heavy chain

α-SMA : α-smooth muscle actin

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Physical and biochemical parameters of experimental animals

Parameter	NC[1)]	DM[2)]
Food intake(g/24h)	13.2± 3.2	22.8± 6.6*
Body weight(g)	278.5± 16.2	263.4± 14.3
FBG[3)](mmol/L)	4.7± 0.8	24.2± 2.1*
Plasma insulin(μU/mL)	7.6± 0.7	8.2± 0.7
HOMA-IR[4)]	1.7± 0.2	8.2± 0.7*
Triglyceride(mg/dL)	78.2± 7.5	168.2± 17.9*

[1)]NC: None diabetic control.

[2)]DM: Diabetes mellitus.

[3)]FBG: fasting blood glucose.

[4)]HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance.

Values are mean± SD(n=5). * $p < 0.05$ compared to the NC.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Effect of green tea catechin on physical and biochemical parameters in diabetic rats

Parameter	NC	DM	DM+GTC[1)]
Food intake (g/24h)	22.7± 3.6	31.7± 6.5*	28.7± 5.6*
Fluid intake (mL/24h)	17.8± 3.5	42.1± 7.3*	33.5± 6.5*#
Body weight(g)	372.4± 24.3	356.2± 21.2	345.1± 16.1
FBG(mmol/L)	4.8± 0.7	25.2± 2.6*	17.2± 2.1*#
Plasma insulin (μU/mL)	8.3± 0.9	7.8± 0.8	7.9± 0.9
HOMA-IR	1.8± 0.3	8.7± 0.9*	6.1± 0.6*#
Triglyceride (mg/dL)	79.4± 11.9	182.2± 15.8*	141.2± 14.2*#
BUN[2)]	27.5± 5.5	81.4± 11.8*	65.1± 10.1*#
Creatinine (mg/dL)	0.31± 0.08	1.25± 0.14*	0.85± 0.11*#

[1)]DM+GTC: diabetic rats treated with green tea catechin(0.1% Polyphenon 60 in drinking water) for 16 weeks.

[1)]BUN: blood urea nitrogen.

Values are mean± SD (n=5). * $p < 0.05$ compared to the NC, # $p < 0.05$ compared to the DM group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

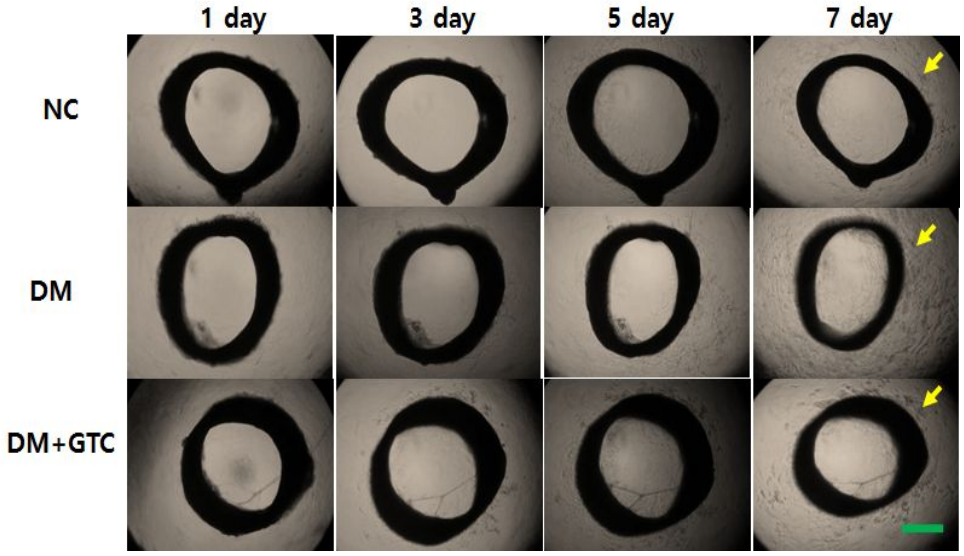

Fig. 1. Effects of green tea catechin on endothelial cell(EC) sprouting from aortic ring of diabetic rats. Type II diabetes of SD rats were induced by high fat diet and low dose STZ (35 mg/kg). 16 weeks after diabetes induction, thoracic aortas from control animal and diabetic animal were explanted and dissected to make ~1mm length aortic rings. The aortic rings were embedded in Matrigel in a 96 well plate (one aortic ring per well). Embedded aortic rings were cultured for up to 7 days. EC sprouting was monitored on a daily basis. Arrow indicates EC sprouting from aortic ring. Scale bar=1mm.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

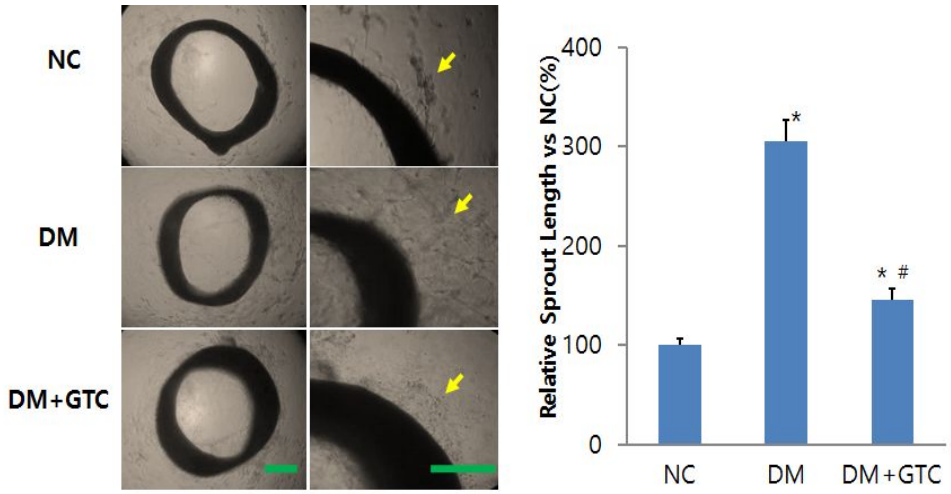

Fig. 2. Green tea catechin decrease EC sprouting from aortic ring of diabetic rats. 7 days after aortic rings cultured, EC sprouting was monitored and evaluated by Image J system. Arrow indicates EC sprouting from aortic ring. Scale bar=1mm. The data represent the means ± SD of three independent experiments. ＊$p < 0.05$ compared to the NC, # $p < 0.05$ compared to the DM group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

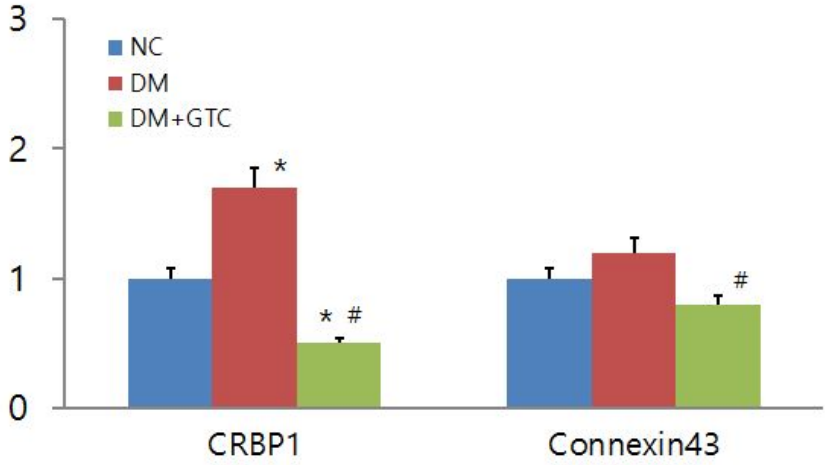

Fig. 3. Effect of green tea catechin on proliferating proteins expression in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats. Total RNA was extracted from thoratic aorta and subjected to RT-PCR using protein specific primers. CRBP-1 : cellular retinol binding protein 1. The data represent the means ± SD of three independent experiments. ＊$p < 0.05$ compared to the NC, # $p < 0.05$ compared to the DM group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

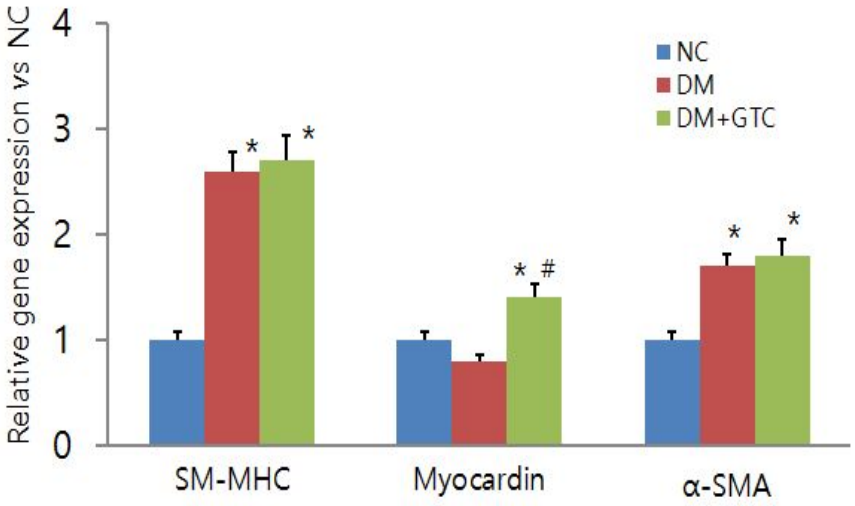

Fig. 4. Effect of green tea catechin on contractile proteins expression in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats. Total RNA was extracted from thoratic aorta and subjected to qRT-PCR using protein specific primers. SM-MHC : smooth muscle-myosin heavy chain, α-SMA : α-smooth muscle actin. The data represent the means ± SD of three independent experiments. ＊$p < 0.05$ compared to the NC, # $p < 0.05$ compared to the DM group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

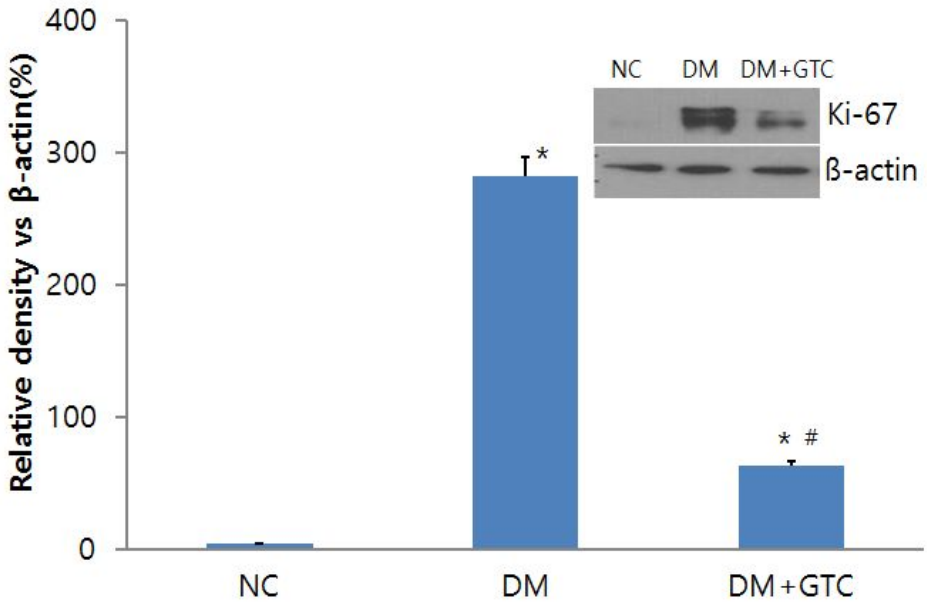

Fig. 5. Effects of green tea catechin on Ki-67 level in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats. Rats aorta collected and subjected to Western blot using Ki-67 specific antibody. The data represent the means ± SD of three independent experiments. $*p < 0.05$ compared to the NC, $\#\ p < 0.05$ compared to the DM group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

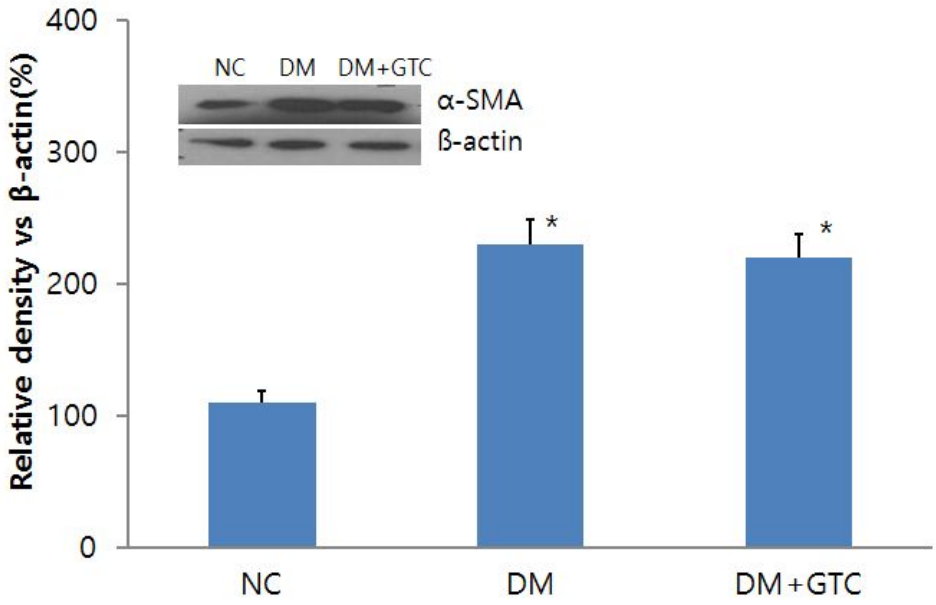

Fig. 6. Effects of green tea catechin on α-SMA level in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats. Rats aorta collected and subjected to Western blot using α-SMA specific antibody. The data represent the means ± SEM of three independent experiments. $*p < 0.05$ compared to the NC group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

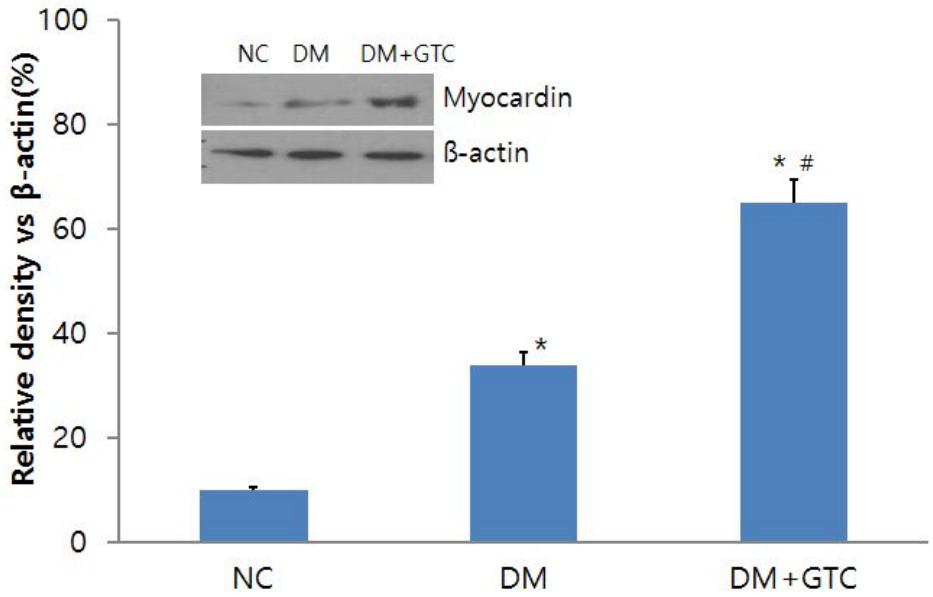

Fig. 7. Effects of green tea catechin on myocardin level in VSMC of thoratic aorta of diabetic rats. Rats aorta collected and subjected to Western blot using myocardin specific antibody. The data represent the means ± SEM of three independent experiments. $*p < 0.05$ compared to the NC, $\#\ p < 0.05$ compared to the DM group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

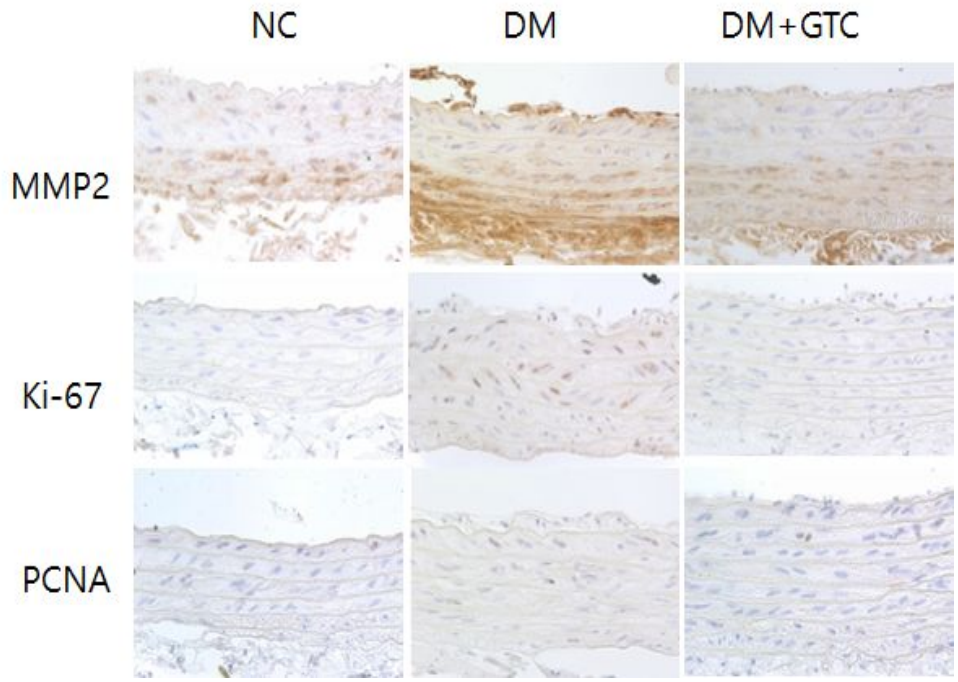

Fig. 8. Immunohitochemical assay of thoratic aorta from green tea catechin treated diabetic rats. Thoratic aorta of rats were collected and subjected to immunohistochemical examination using specific antibody. MMP2 : matrix metalloproteinase 2. PCNA : proliferating cell nuclear antigen.

Collection @ chosun