



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](#)

2018년 2월

박사학위 논문

당뇨병성 신병증에 대한  
녹차 폴리페놀 성분의  
예방적 효과

조선대학교 대학원

의 학 과

안 희 정

당뇨병성 신병증에 대한  
녹차 폴리페놀 성분의  
예방적 효과

Preventive effect of  
Green Tea Polyphenol Component  
on Diabetic Nephropathy

2018년 2월 23일

조선대학교 대학원

의 학 과

안 희 정

당뇨병성 신병증에 대한  
녹차 폴리페놀 성분의  
예방적 효과

지도교수 김진화

이 논문을 의학박사학위 신청 논문으로 제출함

2017년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

안 희 정

## 안희정의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	배학연	인
위원	조선대학교 교수	이병래	인
위원	조선대학교 교수	신병철	인
위원	조선대학교 교수	김진화	인
위원	화순 미소병원 원장	신지혜	인

2017년 12월

조선대학교 대학원

## 목 차

표목차	ii
도목차	iv
Abstract	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
III. 결과	8
IV. 고찰	18
V. 결론	25
참고문헌	47

## 표목차

<b>Table 1.</b> Diet formula -----	26
<b>Table 2.</b> Physical and biochemical parameters of experimental animals -----	27
<b>Table 3.</b> Effect of catechin on physical and biochemical parameters in experimental animals -----	28
<b>Table 4.</b> Effects of catechin on enzyme activities in kidney of diabetic rats -----	29
<b>Table 5.</b> Gene set analysis from the kidney differential expressed genes selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of control vs diabetic rats -----	30
<b>Table 6.</b> Gene set analysis from the kidney differential expressed genes selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of DM vs DM+catechin -----	31
<b>Table 7.</b> Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to oxidation reduction -----	32
<b>Table 8.</b> Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to oxidation reduction -----	33
<b>Table 9.</b> Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to endogenous stimulus -----	34

**Table 10.** Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to endogenous stimulus ----- 35

**Table 11.** Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to wounding ----- 36

**Table 12.** Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to wounding ----- 37

**Table 13.** Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to hormone stimulus ----- 38

**Table 14.** Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to hormone stimulus ----- 39

**Table 15.** Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to organic substance ----- 40

**Table 16.** Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to organic substance ----- 41

**Table 17.** Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to inflammatory response ----- 42

**Table 18.** Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to inflammatory response ----- 43



## 도목차

<b>Fig. 1.</b> Effects of catechin on blood glucose in diabetic rats -----	44
<b>Fig. 2.</b> Effects of catechin on serum creatinine in diabetic rats -----	45
<b>Fig. 3.</b> Effects of catechin on blood urea nitrogen (BUN) in diabetic rats -----	46

# ABSTRACT

## Preventive effect of Green Tea Polyphenol Component on Diabetic Nephropathy

Ahn Hee Jung

Advisor : Prof. Kim Jin Hwa M.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

**Introduction:** Diabetic nephropathy is a serious complication of diabetes mellitus and many studies have been conducted to prevent progression of nephropathy. Recently, there has been a search for natural products for the prevention and treatment of diabetic nephropathy. Polyphenol has two or more phenolic ring structures and is known to have physiological activities such as antioxidative action, antibacterial action and anticancer action. Catechin is a type of polyphenols and has been known to lower blood sugar levels in diabetes. The purpose of this study was to investigate the effect of catechin on the protection of diabetic nephropathy.

**Methods:** Diabetes mellitus was induced in SD rats by high fat diet and low dose streptozotocin injection. The experimental group was divided into three groups: control group, diabetes mellitus(DM) group and diabetes mellitus + catechin(DM+CA) group.

In the control group and the DM group, tap water was supplied as drinking water, and 0.2% catechin tap water was supplied to the DM+CA

group for 16 weeks with drinking water. Blood glucose, blood urea nitrogen and creatinine levels were measured in the blood, alkaline phosphatase and gamma glutamyl transpeptidase activity and renal transcriptome were analyzed in renal tissue.

**Results:** Blood creatinine and BUN in DM group were higher than control group, and blood creatinine and BUN in DM+CA group were lower than DM group.

The transcriptomes of the kidneys showed 5 genes related to gas transport, 10 genes related to response to extracellular stimulus, 13 genes related to response to organic substance, 4 genes related to response to starvation, 6, genes related to water transport, 3 genes for response to vitamins, and 9 genes for response to hormone stimulus were changes in the DM group compared to the control group. These changes in gene expression may be related to the development of diabetic nephropathy.

Compared to the DM group and DM + CA kidney transcripts, the genes with different RNA expression levels were nine genes related to oxidation reduction, seven genes related to response to endogenous stimulation, six genes related to response to wounding, 8 genes involved in the response to organic substance, 4 genes involved in the inflammation response, 5 genes involved in defense reactions, and 2 genes related to glycine metabolism. These results suggest that administration of catechine to diabetic rats reduces BUN and creatinine levels and in kidney AP and GGT activity.

In addition, transcriptomes analysis showed that changes in the gene expression of diabetic rat kidney were associated with the development of diabetic nephropathy.

Genes with different gene expression levels in diabetes + catechin and diabetic groups were thought to have undergone changes in renal tissue

gene expression by the action of catechin, and reduced renal damage in diabetic rats treated with catechin may be associated with changes in gene expression.

**Conclusion:** Catechin seems to be effective in the prevention of diabetic nephropathy, and changes in transcripts of diabetic kidney by catechin administration may be related to the prevention of diabetic nephropathy.

There is a continuing need for further study of whether diabetic nephropathy is induced or prevented by altered expression of a gene

**KEY WORDS :** Green tea polyphenol; Diabetic nephropathy; Preventive effect

## I. 서 론

당뇨병은 만성 대사성질환으로 전 세계적으로 유병율이 계속 증가되고 있는데, 국제당뇨병연맹(IDF)의 보고에 의하면 2016년 당뇨병 환자 수는 3.8억 명 정도로 추정되며, 2035년에는 5.9억 명 정도로 증가 될 것으로 예상되고 있다(1). 우리나라 국민건강보험공단이 발표한 당뇨병 현황 자료에 따르면, 당뇨병 환자수는 2010년 201만9000명에서 2015년 251만5000명으로 5년 사이 약 25% 가 증가되었다(2). 당뇨병 환자는 40대부터 급속히 증가되어 남자는 50대(40만여 명, 전체의 30%), 여자는 60대(32만여 명, 28%)에 가장 많으며, 현재의 추세로 당뇨병 발병이 진행된다면 2020년도에는 30대 이상 인구 10명 중 1명이 당뇨병 환자가 될 것으로 추정된다(2). 대한당뇨병학회에서는 당뇨병 전 단계인 내당능장애가 있는 사람이 700만~800만명이 될 것으로 추산하고 있다(3). 당뇨병 증가 원인으로는 고령화, 비만 증가, 운동 부족, 지방질 과다 섭취 및 스트레스 등 다양한 요인이 작용하며(4,5), 아시아인에서 과체중이나 비만에 의한 당뇨병 발병 위험율이 더 높은 것으로 추측되고 있다(5). 당뇨병은 제 1형 당뇨병과 제 2형 당뇨병이 있는데, 당뇨병 환자의 대부분은 인슐린 비의존형인 제 2형 당뇨병이다(6). 제 2형 당뇨병은 췌장 인슐린 분비량과 간, 골격근 및 지방세포에서 인슐린 작용의 불균형에 의해서 혈당조절의 이상 발생하는 것으로 알려져 있다(7). 당뇨병 환자의 혈당조절을 위해서 현재 사용되고 있는 혈당강하제는 sulphonylureas, biguanides, thiazolidinediones,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, glucagon-like peptide-1 agonists, dipeptidyl peptidase-IV inhibitors 및 amylin analogues 등이 있다(8). 당뇨병 환자에서 지속적인 고혈당은 당질뿐만 아니라 지질 및 단백질 대사에도 이상을 초래할 수 있고, 신장 기능의 저하, 동맥경화, 망막 출혈로 인한 시력 저하, 족부 궤양, 말초신경병증 등 다양한 합병증을 유발할 수 있는데(9), 국민건강보험공단이 발표한 당뇨병 현황 자료에 따르면, 2016년 당뇨병 합병증 환자는 84만여 명으로 5년 새 26% 늘었으며, 당뇨병성 망막증 환자가 36만 명, 말초 신경병증 환자가 34만명 그리고 당뇨병으로 인한 만성 신부전증 환자가 14만 명이다(2). 당뇨병성 신병증은 당뇨병 환자 사망 원인에 많은 부분

을 차지하는 중요한 당뇨병 합병증이다(10). 당뇨병성 신병증은 단백(알부민)뇨증이 주요한 증상으로 나타나는데, 이는 사구체의 지속적인 비가역적 손상이 진행되어 나타난다. 당뇨병성 신증 신장의 병리학적 소견은 사구체 기저막의 두께가 증가하고, mesangial matrix 확장, 사구체 경화(glomerulosclerosis), 및 세뇨관 간질 섬유화 등이 나타난다(11). 당뇨병성 신증의 이러한 변화에 대한 기전은 명확히 알려져 있지는 않지만 산화적 손상이 주요한 요인으로 알려져 있어서 당뇨병 환자들은 말기 신장병으로의 진행을 막는 것이 환자관리의 가장 중요한 목표이다. 따라서 당뇨병 환자에서 당뇨병성 신병증의 진행을 예방하기 위한 많은 연구들이 이루어지고 있으며 이는 경구혈당강하제 등의 약물적인 부분 이외에도 천연 식물 소재 기능성 물질에 대한 탐색으로까지 이어지고 있다(12).

폴리페놀(polyphenols)은 페놀링 구조를 2개이상 가진 물질로서 식물이나 및 식물 가공식품 등에 포함되어 있으며 항산화 작용, 항균작용 및 항암작용 등 생리활성이 알려지면서 많은 연구자들의 관심을 끌고 있다(13,14). Hanhineva 등(15)은 폴리페놀이 전분의 소화, 흡수를 억제하고 당질대사에도 영향을 미친다고 하였고, Wedick 등(16)은 폴리페놀을 지속적으로 섭취하면 2형 당뇨병의 발생을 억제한다고 하였으며, Song 등(17)은 폴리페놀 함량이 높은 식품을 섭취하면 폴리페놀이 인슐린 저항성을 감소시켜서 2형 당뇨병 발생이 억제된다고 하였다. 녹차(*Camellia sinensis* L.)에는 폴리페놀류인 카테킨이 함유되어 있는데, 녹차잎에 함유된 카테킨은 수용성 물질의 30~42%를 차지 할 정도로 매우 높다(18). 녹차에 함유된 카테킨은 epicatechin(EC), epicatechin-3-gallate(ECG), epigallocatechin(EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등이 있는데 이들 중 EGCG 함량이 가장 높다(18). 녹차 카테킨은 지방이나 당질의 대사에 작용하여 고지방식이에 의한 비만을 억제하고, 당뇨병으로 인한 당질의 대사 장애를 조절하며, 심혈관 질환의 위험성을 감소시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있다(19). Iso 등(20)이 일본사람을 상대로 2형 당뇨병의 발생에 대한 역학조사 결과에 따르면 녹차를 하루에 6컵 이상 마시는 사람이 일주일에 1컵 이하로 마시는 사람보다 제 2형 당뇨병 발생율이 유의하게 낮게 나타나서 녹차음용이 2형 당뇨병

발생을 억제한다고 하였다. 녹차 카테킨을 STZ로 당뇨병이 유도된 흰쥐에 투여하면 아라키돈산 캐스캐이드 시스템(arachidonic acid cascade system)을 조절하여 혈전생성을 방지하여 신장의 기능이 개선되는 것으로 알려져 있다(21). 또한 Yokozawa et al.(22) 등은 시스플라틴에 의한 신장손상 유발실험에서 녹차 카테킨이 BUN과 혈액 creatinine 을 감소시켜서 신장손상 기능을 회복시킨다고 하였다. 또한 Alloxan-diabetic rat 에서도 녹차 카테킨이 혈당과 혈액 creatinine 을 감소시킨다고 하였는데, 이는 카테킨의 항산화작용으로 산화적 세포손상으로 억제하여 나타난 결과라 하였으며(23), Renno 등(24)은 스트렙토조토신으로 유발된 당뇨쥐에서 녹차카테킨이 신장 mesangial cell의 성장을 억제함으로써 당뇨병성 신병증의 진행을 억제한다고 하여 녹차 카테킨이 당뇨병성 신장합병증의 예방에 유의한 작용을 한다는 보고가 있다. 유전자를 분석하여 질병의 발생과 연관시키려는 연구가 많이 진행되고 있는데, 최근에 세포에서 일정시점에 발현되는 전체 RNA 즉 전사체(transcriptome)에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(25,26). 전사체는 세포나 조직에서 한 순간 발현되는 전체 RNA의 모음을 의미하며, 전사체를 분석하면 조직이나 세포에 따라 발현되는 유전자들의 정보를 얻을 수 있으며, 이러한 전사체 분석을 통해서 정상 세포와 비정상 세포 간의 발현되는 RNA 차이를 알 수 있으며 질병과 관련한 유전자를 파악하고, 그에 알맞은 치료를 실시할 수 있는 자료로 활용 될 수 있다.

본 연구는 고지방식이와 스트렙토조토신을 이용하여 유발된 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 16주 동안 음용시킨 후 혈액과 신장의 생화학적 소견을 비교하여 신장손상에 미치는 카테킨의 영향을 관찰하고, 신장조직 전사체를 분석하여 녹차 카테킨이 당뇨병성 신병증에 미치는 유전자 발현의 변화를 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용된 카테킨은 polyphenon 60(P60)로서 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. Streptozotocin(STZ), sodium citrate,  $\gamma$ -glutamyl-nitroanilide, p-nitrophenyl phosphate, 단백질 측정 kit 및 인슐린 측정 kit 는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

### 2. 동물실험

실험동물은 체중 180~200 g 되는 Sprague-Dawley 종 수컷흰쥐로 샘타코 (Samtako, Daejeon, Korea)에서 구매하였고, 12시간 명암주기, 온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  상대습도  $60 \pm 5\%$  의 환경에서 사육하였다. 고지방 식이(Table 1)는 전체 열량소중 지방의 열량비율이 45%가 되도록 조성된 제품을 샘타코(Samtako, Daejeon, Korea)에서 구매하여 실험동물사육에 이용하였다. 동물실험은 조선대학교 동물실험 윤리 위원회 승인(승인번호: CIACUC2017-S0037)을 받아 실험윤리 규정에 따라서 동물실험을 실시하였다. 제 2형 당뇨병의 유발은 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신을 사용하여 유발하였다. 실험동물을 45% 고지방 식이를 투여하여 4주일간 사육한 후 스트렙토조토신(streptozotocin)를 0.05M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 흰쥐(STZ 35 mg/kg BW)의 복강에 주사하여 당뇨병을 유도하였고, 대조군에는 0.05M citrate buffer를 복강에 주사하였다. 스트렙토조토신 주사 후부터 실험동물은 일반 사료를 공급하여 사육하였다. 스트렙토조토신 주사 1주일 후 혈당을 측정하여 혈당이 300 mg/dL이상인 쥐를 당뇨병군으로 분류하였다. 실험군은 대조군(control), 당뇨병군(diabetes mellitus: DM), 당뇨병+카테킨(DM+CA)군등 총 3 군으로 나누었고, 각 실험군의 동물 수는 5마리로 하였다. 대조군과 당뇨병군은 식수로 수돗물을 공급하였고, 당뇨병+카테킨군은 수돗물에 P60을 0.1%(w/v) 농도로 용해시켜서



식수로 공급하여 16주일 동안 사육하였다.

### 3. 혈액 채취 및 분석

실험 시작 후 2주 간격으로 16주까지 실험동물의 공복혈당을 측정하였다. 공복혈당은 실험동물을 12시간 금식시킨 뒤 꼬리정맥에서 혈액을 채혈하여 혈당측정기 ACCU-CHEK(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용해 측정하였다. 실험동물은 질소가스로 마취시켜 개복 후 복부 정맥에서 혈액을 채취하고, 신장을 절제하였다. 채취된 혈액의 일부는 즉시 혈장을 분리하여 인슐린을 측정하고, 나머지는 응고시킨 후 혈청을 분리하여 중성지질, BUN(blood urea nitrogen) 및 creatinine 정량을 위한 시료로 사용하였다.

혈장 인슐린은 인슐린 측정 키트(Insulin ELISA kit)은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 제조사의 방법에 따라서 반응시킨 후 ELISA plate reader(TECAN, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하여 인슐린 양을 계산하였다. 혈청 중성지질, BUN 및 creatinine 양은 혈액 자동분석기(Hitachi 7180, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 인슐린저항성 지수인 homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR)는 Matthews 등(27)의 방법에 따라 산출하였다. 인슐린저항지수 계산식은 다음 과 같다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{Insulin}(\mu \text{ units/mL}) \times \text{glucose}(\text{mmol/L})/22.5$$

### 4. 신장 효소 활성 측정

신장조직 0.2 g에 0.1M 인산염완충액(pH 7.4) 2mL을 첨가하여 균질화시킨 후 alkaline phosphatase(AP)와  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase(GGT) 측정을 위한 시료로 이용하였다. GGT 활성도는 Tate 등(28)의 방법으로  $\gamma$ -glutamyl-nitroanilide으로부터 생성되는 p-nitroanilide 양을 정량하는 방법으로, AP 는 Tenenhouse 등(29)의 방법에 따라 p-nitrophenyl phosphate 로 부터 생성되는 p-nitrophenol 양을 정량하는 방법으로 측정하였고, 단백질은

Sigma-Aidrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 단백질 정량 키트(total protein kit)을 이용하여 측정하였다. 효소의 활성은  $\mu\text{moles/mg protein/hour}$  로 표시하였다.

## 5. 실험 결과의 분석

모든 측정결과는 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$  SD)로 표시하였고, 실험결과는 SPSS 14 를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였고, 시료간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서  $p<0.05$  수준에서 비교하였다.

## 6. 신장 조직 전사체(transcriptome) 검사

신장조직을 일부 절제하여 TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 신장조직에서 분리한 total RNA의 안정성은 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 BioAnalyzer 2100 automated electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 안정성이 확인된 신장조직 RNA는 TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (illumina, San Diego, CA, USA) 을 이용하여 제조사의 방법에 따라서 mRNA sequencing library를 만들었다. 신장조직 mRNA library는 Agilent DNA High sensitivity Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 를 이용하여 BioAnalyzer 2100로 분석하고, CFX96 real time system (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량분석 하였다. 각각의 신장조직 mRNA library 는 Illumina HiSeq 2500를 이용하여 RNA sequencing 분석을 실시하였다. 신장조직 cDNA libraries는 TruSeq flow cell을 이용하여 cDNA libraries의 clusters를 만든 다음 TruSeq 200 cycle SBS kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 를 이용하여 100bp-end read 로서 염기서열을 분석하였다. Illumina HiSeq 2500에서 수집된 cDNA libraries의 염기서열 정보는 FASTQ format에 저장된 정보와 비교하여 분석하였다. Gene set의 분석은 DAVID

Bioinformatics Resources6.7, NIH(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)에서 Functional Annotation Tool을 이용 하였다(30). 실험군간의 유전자 발현 차이는 reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) 값을 이용하여 fold-change false discovery rate (FDR)을 측정하여  $p < 0.05$  인 것을 유의한 것으로 하였다.

## 7. 통계 처리

RNA-seq를 제외한 모든 측정 결과는 평균 $\pm$  표준편차(mean $\pm$  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.

### III. 결 과

#### 1. 흰쥐에서 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신에 의한 당뇨병 유도

고지방식이 투여와 저용량 스트렙토조토신 주사로 유도된 당뇨병 흰쥐의 특성을 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 당뇨군 식이섭취량은 대조군보다 59%가 증가되었고, 체중은 대조군과 당뇨군 사이에 유의한 차이가 없었다. 당뇨군의 공복혈당은  $385.4 \pm 21.8$  mg/dL로 대조군군의  $89.7 \pm 9.4$  mg/dL에 비하여 약 3.3배가 증가되었고, 혈장인슐린은 대조군  $8.6 \pm 0.6$   $\mu$ U/L, 당뇨군  $8.2 \pm 0.7$   $\mu$ U/L로 두군 간에 차이가 없었으며, 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR은 대조군  $1.8 \pm 0.4$ , 당뇨군  $8.1 \pm 0.9$  로 당뇨군에서 약 4.5배 높게 나타났고, 중성지방량은 대조군에 비하여 당뇨군에서 약 2.5배가 증가되었다.

#### 2. 카테킨투여 당뇨병 흰쥐의 신체적 및 혈액소견에 미치는 영향

카테킨투여가 당뇨병에 미치는 영향을 관찰하기 위해 P60 을 당뇨병 흰쥐에 16주간 경구투여한 후 관찰한 신체적 및 혈액소견 결과는 Table 3과 같다. 일일식이섭취량은 당뇨군에서 대조군보다 약 28%가 증가되었고, 당뇨군과 당뇨+카테킨군 사이에 식이섭취량의 차이가 없었다. 체중은 대조군과 당뇨군 사이에 유의한 차이가 없었고, 당뇨군과 당뇨+카테킨군 사이에 체중의 차이는 없었다. 공복혈당은 당뇨군에서  $407.8 \pm 32.1$  mg/dL로 대조군에 비하여 약 4.6배로 증가되었고, 당뇨+카테킨군은  $312.7 \pm 27.8$  mg/dL로 당뇨군보다 23% 정도 감소되어 카테킨 투여로 당뇨 흰쥐의 증가된 공복혈당이 감소됨을 보여주고 있다. 혈청 인슐린 양은 대조군, 당뇨군 및 당뇨+카테킨군 사이에 유의한 차이가 없었으며, 인슐린저항성 지수인 HOMA-IR은 당뇨군에서 대조군보다 4.6배 증가되었고, 당뇨군과 당뇨+카테킨군 사이에 유의한 차이가 없어서 카테킨에 의한 인슐린 분비량의 차이는 없는 것으로 추측된다. 혈장 중

성지질량은 당뇨군에서  $189.8 \pm 15.2$  mg/dL 로 대조군에 비하여 1.4배가 증가되었고, 당뇨+카테킨군은 당뇨군보다 25% 정도 감소된  $141.2 \pm 13.1$  mg/dL 를 나타내서 카테킨 투여로 당뇨쥐의 증가된 중성지질량이 감소됨을 보여주고 있다.

### 3. 카테킨 투여가 당뇨병 흰쥐의 공복혈당에 미치는 영향

카테킨 투여가 당뇨병의 공복혈당에 미치는 영향을 관찰하기 위해 당뇨 흰쥐에 카테킨을 경구 투여하면서 16주간 공복혈당을 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군의 공복혈당은 실험시작 할 때인 0주에  $92 \pm 6$  mg/dL이었고, 16주까지 유의한 변화를 나타내지 않았다. 당뇨군의 공복혈당은 0주에  $372 \pm 28$  mg/dL, 16주에  $405 \pm 27$  mg/dL로 유의한 변화가 없었다. 당뇨+카테킨군의 공복혈당은 0주  $381 \pm 31$  mg/dL이었으며 4주, 8주, 12주 및 16주에 12%, 15%, 19% 및 18%가 감소되어 당뇨 흰쥐에 카테킨을 경구 투여하면 공복혈당이 감소됨을 보여주고 있다.

### 4. 카테킨투여가 당뇨병 흰쥐의 신장손상에 미치는 영향

카테킨 투여가 당뇨병 흰쥐의 신장손상에 미치는 영향을 관찰하기 위해 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 16주 동안 경구투여한 후 혈청 creatinine, BUN 량과 신장 효소(AP와 GGT) 활성도를 측정 결과는 Fig. 2, 3 및 Table 4와 같다. 혈청 creatinine 량은 당뇨군에서  $1.21 \pm 0.12$  mg/dL로 대조군보다 3.9배로 증가되었고, 당뇨+카테킨군은  $0.89 \pm 0.1$  mg/dL로 당뇨군보다 26% 가 감소되었다. 혈청 BUN 량은 당뇨군에서  $82.7 \pm 7.1$  mg/dL로 대조군보다 221%가 증가되었고, 당뇨+카테킨군은  $68.7 \pm 6.3$  mg/dL로 당뇨군보다 17% 정도가 감소되었다. 신장 GGT 활성도는 당뇨군에서  $32.1 \pm 4.1$  units(moles/mg protein/hour)로 대조군보다 28% 정도가 감소되었고, 당뇨+카테킨군은  $42.7 \pm$

4.2 units(moles/mg protein/hour)로 당뇨군보다 24% 정도가 증가되었다. 신장 AP 활성도는 당뇨군에서  $12.1 \pm 1.3$  units(moles/mg protein/hour)로 대조군보다 25%가 감소되었고, 당뇨+카테킨군은  $15.2 \pm 1.0$  units(moles/mg protein/hour)로 당뇨군보다 25% 정도가 증가되었다.

## 5. 대조군과 당뇨군의 신장조직 유전자 세트(Gene set) 발현 비교

당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 차이를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주일 후 흰쥐를 희생시켜 신장조직을 절제하고 total RNA를 분리하여 전사체를 분석하여 대조군과 당뇨군의 신장조직 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(\text{FC})$  값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 Table 5와 같다. 가스운반(Gas transport) 관련 유전자 5개는 p 값이 0.000001 이하면서  $\log_2(\text{FC})$  값이 61.2 이었다. 세포외인성 자극에 대한 반응(response to extracellular stimulus) 관련 유전자 10개, 유기물질에 대한 반응(response to organic substance) 관련 유전자 13개, 기아에 대한 반응(response to starvation) 관련 유전자 4개, 금속이온에 대한 반응(response to metal ion) 관련 유전자 6개, 수분이동(water transport) 관련 유전자 3개, 비타민에 대한 반응(response to vitamin) 관련 유전자 5개 및 호르몬 자극에 대한 반응(response to hormone stimulus) 관련 유전자 9개였다.

## 6. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 유전자 세트(Gene set) 발현 비교

카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직을 절제하고 total RNA를 분리하여 전사체를 분석하여 당뇨군의 신장조직 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(\text{FC})$  값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 Table 6와 같다. 산화환원(oxidation reduction) 관

런 유전자 9개는 p 값이 0.00052 이하면서 log<sub>2</sub>(FC) 값이 4.56 이었다. 내인성 자극에 대한 반응(response to endogenous stimulus)관련 유전자 7개, 손상에 대한 반응(response to wounding) 관련 유전자 6개, 유기물질에 대한 반응(response to organic substance) 관련 유전자 8개, 염증 반응(inflammatory response)관련 유전자 4개, 방어 반응(defense response) 관련 유전자 5개 및 글리신 대사과정(glycin metabolic process) 관련 유전자 2개였다.

## 7. 대조군과 당뇨군의 신장조직 산화 환원(oxidation reduction)관련 유전자 발현 변화

당뇨병성 신병증의 신장 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주후에 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 산화 환원 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과 log<sub>2</sub>(FC) 값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Table 7과 같다. 당뇨군의 신장조직 cytochrome P450 1A1(Cyp1a1), delta(24)-sterol reductase precursor(Dhcr24), aldose reductase(Akr1b1), cytochrome P450 2C11 precursor(Cyp2c11), aldehyde dehydrogenase family 1 member A3(Aldh1a3), acyl-CoA desaturase 2(Scd), retinol dehydrogenase 2 precursor(Rdh16), urea transporter 2 isoform c(Slc14a2), prostaglandin G/H synthase 1 precursor(Ptgs1) 및 sulfhydryl oxidase 1 precursor(Qsox1) mRNA량은 대조군에 비하여 감소되었다. 당뇨군의 신장조직 proline dehydrogenase 1, mitochondrial precursor(Prodh) 와 short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase(Acadsb) mRNA량은 대조군에 비하여 증가되었다.

## 8. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 산화 환원(oxidation reduction)관련 유전자 발현 변화



카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 산화 환원 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.001 이하인 유전자는 Table 8과 같다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 *delta(24)-sterol reductase precursor(Dhcr24)*, *aldose reductase-related protein 2(Akr1b8)*, *fatty acid desaturase 1(Fads1)*, *short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial(Acadsb)*, *cytochrome P450 2C11 precursor(Cyp2c11)*, *retinol dehydrogenase 2 precursor(Rdh16)* 및 *lysyl oxidase homolog 1 precursor(Loxl1)* mRNA량은 당뇨군에 비하여 증가되었다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 *dihydrofolate reductase, isoform A(Dhfr)* 와 *sulfiredoxin-1(Srxn1)* mRNA량은 당뇨군에 비하여 감소되었다.

#### 9. 대조군과 당뇨군의 신장조직 내인성 자극에 대한 반응(response to endogenous stimulus)관련 유전자 발현 변화

당뇨병성 신병증의 신장 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주후에 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 내인성 자극에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Table 9와 같다. 당뇨군의 신장조직 *alpha-1-antitrypsin precursor(Serpina1)*, *mitochondrial brown fat uncoupling protein 1(Ucp1)*, *sonic hedgehog protein precursor(Shh)*, *haptoglobin precursor(Hp)*, *nuclear receptor subfamily 4 group A member 3(Nr4a3)*, *prostaglandin G/H synthase 1 precursor(Ptgs1)* 및 *prostaglandin-H2 D-isomerase precursor(Ptgds)* mRNA량은 대조군에 비하여 감소되었다.

당뇨군의 신장조직 *insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1)* mRNA량은 대조군에 비하여 증가되었다.



## 10. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 내인성 자극에 대한 반응(response to endogenous stimulus)관련 유전자 발현 변화

카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 내인성 자극에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.001 이하인 유전자는 Table 10과 같다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 proto-oncogene c-Fos(IFos) 와 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(gfbp1) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 감소되었다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 gap junction protein, alpha 1(Gja1), fatty acid desaturase 1(Fads1), matrix Gla protein precursor(Mgp), nicotinamide N-methyltransferase(Nnmt) 및 prostaglandin-H2 D-isomerase precursor(Ptgds) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 증가되었다.

## 11. 대조군과 당뇨군의 신장조직 손상에 대한 반응(response to wounding)관련 유전자 발현 변화

당뇨병성 신병증의 신장 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주후에 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 손상에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Table 11과 같다. 당뇨군의 신장조직 cytochrome P450 1A1(Cyp1a1), insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor(Igfbp4), bone morphogenetic protein 2 preproprotein(Bmp2), alpha-1-antitrypsin precursor(Serpina1), alpha-1-inhibitor 3 precursor(Ali3), sonic hedgehog protein precursor(Shh), haptoglobin precursor(Hp), complement factor B isoform 1 precursor(Cfb), C-C motif chemokine 7 precursor(Ccl7) 및 plasminogen activator inhibitor 1 precursor(Serpine1) mRNA 량은 대조군에 비하여 감소되었다. 당뇨군의

신장조직 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1) 와 clusterin precursor(Clu) mRNA 량은 대조군에 비하여 증가되었다.

## 12. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 손상에 대한 반응(response to wounding)관련 유전자 발현 변화

카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 손상에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과 log<sub>2</sub>(FC) 값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.001 이하인 유전자는 Table 12와 같다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 gap junction protein, alpha 1(Gja1), insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor(Igfbp4) 및 C-C motif chemokine 7 precursor(Ccl7) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 증가되었다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 pantetheinase precursor(Vnn1), silk fibroin 2 precursor(F2) 및 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 감소되었다.

## 13. 대조군과 당뇨군의 신장조직 호르몬 자극에 대한 반응(response to hormone stimulus)관련 유전자 발현 변화

당뇨병성 신병증의 신장 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주후에 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 호르몬 자극에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과 log<sub>2</sub>(FC) 값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Table 13과 같다. 당뇨군의 신장조직 alpha-1-antitrypsin precursor(Serpina1), mitochondrial brown fat uncoupling protein 1(Ucp1), sonic hedgehog protein precursor(Shh), haptoglobin precursor(Hp), nuclear receptor subfamily 4 group A member 3(Nr4a3), prostaglandin G/H synthase 1 precursor(Ptgs1) 및

prostaglandin-H2 D-isomerase precursor(Ptgds) mRNA 량은 대조군에 비하여 감소되었다. 당뇨군의 신장조직 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1) mRNA 량은 대조군에 비하여 증가되었다.

#### 14. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 호르몬 자극에 대한 반응(response to hormone stimulus)관련 유전자 발현 변화

카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 호르몬 자극에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.001 이하인 유전자는 Table 14와 같다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 gap junction protein, alpha 1(Gja1), insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor(Fads1) 및 C-C motif chemokine 7 precursor(Mgp) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 증가되었다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 pantetheinase precursor(Ptgds), silk fibroin 2 precursor(Fos) 및 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 감소되었다.

#### 15. 대조군과 당뇨군의 신장조직 유기물질에 대한 반응(response to organic substance)관련 유전자 발현 변화

당뇨병성 신병증의 신장 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주후에 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 유기물질에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Table 15와 같다. 당뇨군의 신장조직 cytochrome P450 1A1(Cyp1a1), aldose reductase(Akr1b1), alpha-1-antitrypsin precursor(Serpina1), mitochondrial brown fat uncoupling protein 1(Ucp1), sonic hedgehog protein precursor(Shh),

haptoglobin precursor(Hp), nuclear receptor subfamily 4 group A member 3(Nr4a3), complement factor B isoform 1 precursor(Cfb), prostaglandin G/H synthase 1 precursor(Ptgs1) 및 prostaglandin-H2 D-isomerase precursor(Ptgds) mRNA 량은 대조군에 비하여 감소되었다. 당뇨군의 신장조직 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1) 와 potassium-transporting ATPase alpha chain 2 b(Atp12a) mRNA 량은 대조군에 비하여 증가되었다.

#### 16. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 유기물질에 대한 반응(response to organic substance)관련 유전자 발현 변화

카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 유기물질에 대한 반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.001 이하인 유전자는 Table 16와 같다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 dihydrofolate reductase, isoform A(Dhfr), proto-oncogene c-Fos(Fos) 및 insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor(Igfbp1) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 감소되었다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 matrix Gla protein precursor(Mgp), nicotinamide N-methyltransferase(Nnmt), fatty acid desaturase 1(Fads1), gap junction protein, alpha 1(Gja1) 및 prostaglandin-H2 D-isomerase precursor(Ptgds) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 증가되었다.

#### 17. 대조군과 당뇨군의 신장조직 염증반응(Inflammatory response)관련 유전자 발현 변화

당뇨병성 신병증의 신장 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 16주후에 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 염증반응 관련 유전

자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상, p 값이 0.005 이하인 유전자는 Table 17과 같다. 당뇨군의 신장조직 insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor(Igfbp4), bone morphogenetic protein 2 preproprotein(Bmp2), alpha-1-antitrypsin precursor(Serpina1), alpha-1-inhibitor 3 precursor(Ali3), haptoglobin precursor(Hp), complement factor B isoform 1 precursor(Cfb) 및 C-C motif chemokine 7 precursor(Ccl7) mRNA 량은 대조군에 비하여 감소되었다.

#### 18. 당뇨군과 당뇨+카테킨군의 신장조직 염증반응(Inflammatory response)관련 유전자 발현 변화

카테킨이 당뇨병성 신병증의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨을 경구투여 하고 흰쥐를 희생시켜 신장조직 전사체를 분석하여 염증반응 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.001 이하인 유전자는 Table 18과 같다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor(Igfbp4) 와 C-C motif chemokine 7 precursor(Ccl7) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 증가되었고, pantetheinase precursor(Vnn1) 와 silk fibroin 2 precursor(F2) mRNA 량은 당뇨군에 비하여 감소되었다.

## IV. 고 찰

본 연구 결과 카테킨을 당뇨병 흰쥐에 음용시키면 공복혈당이 감소되고 신장 손상이 억제되는 것으로 나타났다. 고지방식이와 저용량 스트렙토조토신은 2형 당뇨병 유발에 이용되고 있는데(31,32), 본 실험에서 이용된 당뇨병 흰쥐는 당뇨병이 유도되지 않은 대조군에 비하여 1일 식이섭취량이 59% 증가, 공복혈당이 약 3.3배 증가, 혈청 인슐린의 양은 변화가 없었으나 인슐린 저항성 지수인 HOMA-IR은 약 4.5배 높게 나타나 제 2형 당뇨병과 유사한 질환이 유발된 것으로 생각된다. 혈청 BUN과 creatinine 양은 신장 기능을 나타내는 소견으로서 시스플라틴과 같은 항암제에 의한 신장손상이나(33), 당뇨병성 신장손상이 나타나면 증가되는 것으로 알려져 있는데(34), 본 실험결과 당뇨병이 유발되고 16주 후에 당뇨병이 유발되지 않은 대조군에 비하여 혈청 creatinine 양은 2.2배 증가, 혈청 BUN 양은 2.9 배가 증가되어 신장손상이 나타났음을 보여 주고 있다. Khan 등(33)은 항암제 시스플라틴에 의한 신장독성이 녹차 추출물에 의해서 억제된다고 하였고, Ahad 등(34)은 항산화물질인 ellagic acid가 2형 당뇨병 흰쥐에서 신장손상을 억제한다고 하였는데, 본 실험에서 당뇨병에 카테킨을 투여한 경우 creatinine 과 BUN이 감소되어 신장손상이 감소된 것으로 생각된다. Yamabe 등(35)은 당뇨병 흰쥐에 EGCG를 투여하면 크레아티닌 과 BUN 양이 유의하게 감소되었다고 하여 본 실험결과와 유사하였다. 당뇨병에서 고혈당은 신장의 구조적 변화를 초래하는 주요 요인이며 고혈당증이 당뇨병성 미세 혈관 합병증이 당뇨병성 신병증의 유발과 직접적으로 관련된 것으로 알려져 있다(36). 따라서 혈당 조절은 당뇨병성 신병증의 예방에 주요한 목표로서 본 실험에서 당뇨병이 유발된 흰쥐를 16주일동안 사육하면서 혈당을 측정한 결과 당뇨+카테킨군의 공복혈당이 당뇨군에 비하여 4주, 8주, 12주 및 16주에 12%, 15%, 19% 및 18%가 각각 감소되어 당뇨 흰쥐에 카테킨을 경구 투여하면 공복혈당이 감소됨을 보여주고 있다. 카테킨은 당질의 소화 흡수를 억제하고, 당신생을 억제하며, 근육조직과 지방조직에서 당의 사용을 촉진시키는 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있어 이러한 기전을 통해 공복혈당의 조절에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된



다(37). 혈당의 감소는 당뇨병성 신병증의 예방에 밀접한 연관이 있기 때문에 카테킨 투여로 인한 공복혈당의 감소는 당뇨병성 신장손상을 억제하는 요인으로 작용할 것으로 생각된다.

신장에서 AP와 GGT는 신장 세뇨관의 솔가장자리 막(brush border membrane)에 많이 존재하는 효소로서 신세뇨관 손상이 일어나면 효소가 감소되는 것으로 알려져 있다(33,38). 이들 효소들은 용모상구조 (microvillus structure)에 손상을 입게 될 경우 소변으로 분비되게 되는데 이들의 이런 특징과 관련하여 급만성 신장 질환에 있어 이들 효소들과의 연관성에 대한 연구들이 이루어진 바 있었으며, 당뇨병성 신병증을 진단하는데 있어 소변 GGT, AP를 측정하는 것이 의의가 있을 수 있다는 연구도 있었다(39,40). 본 실험에서 당뇨군의 신장 AP와 GGT 활성도가 대조군보다 감소된 것으로 나타나 당뇨군에서 신세뇨관 손상이 나타나고 있음을 보여 주고 있다. 항암제 시스플라틴이나 항생제 gentamycin 을 투여하면 신장 AP와 GGT 활성도 감소가 나타나고 녹차 추출물이 AP와 GGT 활성도 감소를 억제하는 것으로 알려져 있는데(33,41), 본 실험에서 당뇨+카테킨군에서 신장 GGT 와 AP 활성도가 병군보다 높게 나타나서 카테킨이 신장 손상을 억제하는 작용이 있음을 보여주고 있다.

세포나 조직에서 어떤 시간을 기준으로 발현되는 유전자의 전체 RNA의 모음을 전사체(transcriptome)라 하고, 전사체 분석을 통하여 세포나 조직에서 발현되는 유전자들의 정보를 얻을 수 있다. 전사체 분석을 통해 정상 세포와 비정상 세포 간에 발현되는 RNA 차이를 분석하여 질병과 관련한 유전자를 파악할 수 있다. 전사체 분석은 RNA 염기서열 분석(Sequencing), 정렬(Alignment) 및 분석(Analysis) 등 세 단계로 나눌 수 있다. RNA 염기서열 분석은 RNA를 cDNA로 만들어서 염기서열을 읽어내는 단계이고, 정렬은 염기서열이 분석된 RNA를 표준 유전체와 비교하여 일치하는 서열을 찾아 어떤 유전자들이 얼마만큼 발현되었는지 알아내는 단계이며, 분석은 조사된 유전자의 종류와 발현된 양을 이용하여 세포나 조직과 유전자 사이의 연관성을 찾는 작업을 말한다. 전사체 분석은 여러 가지 질병의 발병기전을 알아내고 치료제를 검색하기 위한 방법으로 이용되고 있는데, 본 실험에서도 당뇨병성

신병증 발생시에 발현이 변화되는 유전자를 전사체 분석으로 알아보았다. 당뇨병 발생 16주일 후 흰쥐를 희생시켜 신장조직을 절제하고 total RNA를 분리하여 전사체를 분석하여 대조군의 신장조직 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(\text{FC})$  값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 가스운반 관련 유전자 5개, 세포외인성 자극에 대한 반응 관련 유전자 10개, 유기물질에 대한 반응 관련 유전자 13개, 기아에 대한 반응 관련 유전자 4개, 금속이온에 대한 반응 관련 유전자 6개, 수분이동 관련 유전자 3개, 비타민에 대한 반응 관련 유전자 5개 및 호르몬 자극에 대한 반응 관련 유전자 9개였다. 본 실험에 사용된 당뇨병 발생 16주일 된 흰쥐는 BUN과 creatinine 이 증가되어 있고, 신장조직 AP와 GGT 효소 활성도가 감소되어 있어서 신장손상이 초래되었음을 나타내고 있다. 따라서 본 실험에서 당뇨군은 당뇨병성 신병증이 나타났다고 할 수 있고, 전사체 분석결과 정상군과 차이가 있는 유전자는 당뇨병성 신증으로 인하여 변화가 일어났다고 추측 할 수 있다.

카테킨이 당뇨병 흰쥐의 신장조직 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 당뇨병 발생 후 16주일 동안 카테킨 투여한 흰쥐와 당뇨군 흰쥐의 신장조직 전사체를 분석하여 신장조직 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과  $\log_2(\text{FC})$  값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 산화환원 관련 유전자 9개, 내인성 자극에 대한 반응 관련 유전자 7개, 손상에 대한 반응 관련 유전자 6개, 유기물질에 대한 반응 관련 유전자 8개, 염증 반응 관련 유전자 4개, 방어 반응 관련 유전자 5개 및 글리신 대사과정 관련 유전자 2개였다. 전사체 분석결과 당뇨+카테킨군에서 당뇨군과 차이가 있는 유전자는 카테킨이 작용하여 신장조직 유전자 발현의 변화가 일어났다고 생각된다.

당뇨병군 신장조직 전사체를 분석하여 산화 환원 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 대조군과 비교한 결과  $\log_2(\text{FC})$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Cyp11a1, Dhcr24, Akr1b1, Cyp2c11, Aldh1a3, Scd, Rdh16, Slc14a2, Ptgs1 및 Qsox1 mRNA량은 대조군에 비하여 감소되었고, Prodh 와 Acadsb mRNA량은 대조군에 비하여 증가되었다. 산화 환원 반응은 세포나 조직의 대사에 중추적 역할을 하는 반응으로 산화 환원상태의 균형유지는 세포의 기능 유지에 매우 중요한 요소인데, 당뇨병군에서 산화



환원 관련 유전자의 발현 변화는 산화 환원 균형을 변화시킬 수 있는 요인으로 작용할 수 있다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 전사체를 분석하여 산화 환원 관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 당뇨군과 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자는 Dhcr24, Akr1b8, Fads1, Acadsb, Cyp2c11, Rdh16 및 Loxl1 mRNA량은 당뇨군에 비하여 증가되었고, 당뇨+카테킨군의 신장조직 Dhfr 와 Srxn1 mRNA량은 당뇨군에 비하여 감소되었다. delta(24)-sterol reductase는 콜레스테롤 합성대사에 관여하며 산화적 자극시에 caspase 3를 억제하여 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 작용을 하는 것으로 알려진 효소로서(42) 당뇨군에서 유전자 발현이 감소되고 카테킨 투여로 유전자 발현이 일부분 회복되는 것으로 나타났다. cytochrome P450 2C11 은 testosterone 대사에 관여하는 효소로서(43) 당뇨군에서 유전자 발현이 감소되고 카테킨 투여로 유전자 발현이 회복되는 것으로 나타났다. short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase는 지질의 대사에 관여하는 효소로서(44) 당뇨군에서 유전자 발현이 증가되고 카테킨 투여로 유전자 발현이 회복되는 것으로 나타났다. 당뇨+카테킨군에서 산화 환원관련 단백질의 회복은 당뇨병으로 인해서 초래될 수 있는 산화환원 균형의 변화를 회복시키는데 작용할 수 있을 것으로 추측된다.

당뇨병군 신장조직 전사체를 분석하여 내인성 자극에 대한 반응관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 대조군과 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자 중 Serpina1, Ucp1, Shh, Hp, Nr4a3, Ptgs1 및 Ptgds mRNA량은 대조군에 비하여 감소되었고, 당뇨군의 Igfbp1 mRNA량은 대조군에 비하여 증가되었다. 내인성 자극은 세포나 조직의 수축, 이완과 같은 움직임, 분비, 효소활성 및 유전자 발현등에 의해서 유발될 수 있는 세포나 장기의 상태나 활성의 변화로서 당뇨병군에서 이에 관여하는 단백질의 유전자발현이 감소되면 세포는 내인성 자극에 대한 적응력이 감소된다고 할 수 있다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 전사체를 분석하여 내인성 자극에 대한 반응관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 당뇨군과 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자 중 IFos 와 Igfbp1 mRNA량은 감소되었고, Gjal, Fads1, Mgp, Nnmt 및

Ptgds mRNA 량은 증가되었다. Igfbp1은 insulin like growth factor(IGF)에 결합하여 IGF의 수명을 늘려주고, 세포막 수용체에 결합하는 것을 억제하는 역할을 하는 단백질로서(45) 당뇨병군에서 증가되었고, 당뇨+카테킨군의 신장 조직에서는 당뇨군보다 감소되었으며, PGD2 합성에 관여하는 Ptgds는(46) 당뇨군 신장에서 감소되었고, 당뇨+카테킨군에서는 당뇨군보다 증가되어 당뇨군에 의한 내인성 자극에 대한 반응관련 유전자 발현의 변화가 카테킨에 의해서 일부 회복되는 것을 보여주고 있다.

당뇨군 신장조직 전사체를 분석하여 손상에 대한 반응관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 대조군과 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자 중 Cyp1a1, Igfbp4, Bmp2, Serpina1, Ali3, Shh, Hp, Cfb, Ccl7 및 Serpine1 mRNA 량은 감소되었고, Igfbp1 와 Clu mRNA 량은 증가되었다. 손상에 대한반응은 세포나 장기의 손상을 초래하는 자극의 결과로서 이동(movement), 분비, 효소합성, 유전자 발현 등의 측면에서 세포 또는 장기의 활성이나 상태의 변화가 일어나게 되는 모든 과정을 말한다. 당뇨병에서 손상에 대한 반응관련 유전자의 감소는 장기나 세포의 적응력 감소가 일어난다고 할 수 있다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 전사체를 분석하여 손상에 대한 반응관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 당뇨군과 비교한 결과  $\log_2(FC)$  값이 1 이상이거나 -1 이하이고 p 값이 0.005 이하인 유전자 중 Gjal, Igfbp4 및 Ccl7 mRNA 량은 증가되고, Vnn1, F2 및 Igfbp1 mRNA 량은 감소되었는데, 당뇨군에서 Igfbp4 및 Ccl7 mRNA 량은 감소되고, Igfbp1 mRNA 량은 증가되어 있어서 카테킨에 의해서 당뇨병으로 인해서 초래되는 변화가 예방된 것으로 생각된다.

당뇨군 신장조직 전사체를 분석하여 호르몬자극에 대한 반응관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 대조군과 비교한 결과 Serpina1, Ucp1, Shh, Hp, Nr4a3, Ptgs1 및 Ptgds mRNA 량은 대조군에 비하여 감소되었고, Igfbp1 mRNA 량은 증가되었으며, 당뇨+카테킨군의 신장조직 Gjal, Fads1 및 Mgp mRNA 량은 당뇨군에 비하여 증가되고, Ptgds, Fos 및 Igfbp1 mRNA 량은 감소되었다. 호르몬자극에 대한 반응은 세포나 장기에서 호르몬의 자극 결과로서 이동(movement), 분비, 효소합성, 유전자 발현 등의 측면에서 세포 또는

장기의 활성화나 상태의 변화가 일어나는 모든 과정을 말한다. 당뇨군에서 호르몬자극에 대한 반응관련 유전자의 감소는 장기나 세포의 호르몬작용에 변화가 일어난다고 할 수 있다.

당뇨군 신장조직 유기물질에 대한 반응관련 유전자 RNA 발현량의 차이를 대조군과 비교한 결과 Cyp1a1, Akr1b1, Serpina1, Ucp1, Shh, Hp, nNr4a3, Cfb, Ptgs1 및 Ptgds mRNA량은 대조군에 비하여 감소되었고, Igfbp1 와 Atp12a mRNA량은 증가되었다. 당뇨+카테킨군의 신장조직 유기물에 대한 반응관련 유전자 Dhfr, Fos 및 Igfbp1 mRNA량은 당뇨군에 비하여 감소되었고, Mgp, Nnmt, Fads1, Gja1 및 Ptgds mRNA량은 증가되었다. 유기물질에 대한 반응은 세포나 장기에서 유기물질에 의해서 움직임(movement), 분비, 효소합성, 유전자 발현 등의 측면에서 세포 또는 장기의 활성화나 상태의 변화가 일어나는 모든 과정을 말한다. 당뇨군에서 유기물질에 대한 반응관련 유전자의 감소는 장기나 세포의 유기물질에 대한 반응이 변화가 일어나므로 세포나 장기의 항상성에 변화가 일어난다고 할 수 있다.

당뇨군 신장조직 염증반응관련 유전자 Igfbp4, Bmp2, Serpina1, A1i3, Hp, Cfb 및 Ccl7 mRNA량은 대조군 보다 감소되었고, 당뇨+카테킨군의 염증관련 유전자 신장조직 Igfbp4 와 Ccl7 mRNA량은 당뇨군에 비하여 증가되었고, Vnn1 와 F2 mRNA량은 감소되었다. 염증에 대한반응은 화학 물질이나 물리적 자극에 의한 상해나 감염에 대한 초기 방어 반응으로서 국소적 혈관 확장, 부종 및 식세포의 집결등이 일어나는 반응이다.

이상의 실험결과 당뇨병 흰쥐에 카테킨을 음용시키면 카테킨을 투여하지 않은 당뇨병 흰쥐에 비하여 신장손상의 지표로 이용되는 creatinine 과 BUN이 낮게 나타났고, 신장조직의 AP와 GGT는 활성도가 높게 나타나서, 카테킨이 당뇨병으로 인한 신장손상을 억제하는 작용이 있는 것으로 추측된다. 또한 신장의 전사체 조사결과 가스운반 관련 유전자 5개, 세포외인성 자극에 대한 반응 관련 유전자 10개, 유기물질에 대한 반응관련 유전자 13개, 기아에 대한 반응관련 유전자 4개, 금속이온에 대한 반응관련 유전자 6개, 수분이동 관련 유전자 3개, 비타민에 대한 반응관련 유전자 5개 및 호르몬 자극에 대한 반응관련 유전자 9개 등이 당뇨병 흰쥐의 신장에서 유의하게 변화되어 있

어서 이들 유전자 발현의 변화는 당뇨병성 신병증의 발생과 관련이 있을 것으로 추측된다.

카테킨을 투여한 당뇨병 흰쥐의 신장조직 전사체를 분석하여 RNA 발현량의 차이를 비교한 결과 유의한 차이를 나타내는 유전자 세트는 산화환원 관련 유전자 9개, 내인성 자극에 대한 반응관련 유전자 7개, 손상에 대한 반응관련 유전자 6개, 유기물질에 대한 반응관련 유전자 8개, 염증 반응관련 유전자 4개, 방어 반응관련 유전자 5개 및 글리신 대사과정관련 유전자 2개였는데, 당뇨+카테킨군에서 당뇨군과 차이가 있는 유전자는 카테킨의 작용으로 신장조직 유전자 발현의 변화가 일어났다고 생각되며, 카테킨 투여 당뇨흰쥐의 신장손상이 감소된 것은 이들 유전자 발현의 변화와 연관이 있을 것으로 생각된다. 어떤 유전자의 발현변화에 의해서 당뇨병성 신병증이 유발되고, 예방되는지에 대해서는 추후 계속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

이상의 실험 결과로서 당뇨+카테킨군은 당뇨군에 비하여 공복혈당이 더 낮았고, BUN과 creatinine 이 더 높았으며, AP와 GGT 활성도가 더 높게 나타나서 신장손상이 감소된 것으로 추측된다. 신장 전사체 조사결과 당뇨병군에서 증가되거나 감소된 유전자군은 카테킨 투여로 일부분 회복된 것으로 나타나서 카테킨 투여에 의한 신장손상의 감소는 이들 유전자 발현의 변화와 연관이 있을 것으로 추측 된다. 유전자 발현의 변화가 일어난 유전자 중에서 어떤 유전자의 발현변화에 의해서 당뇨병성 신병증이 유발되고, 예방되는지에 대해서는 추후 계속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

Table 1. Diet formula

Nutrients	Chow diet		High fat diet	
	gm%	Cal%	gm%	Cal%
Protein	33	28	24	20
Carbohydrate	61	60	42	35
Fat	6	12	24	45

Table 2. Physical and biochemical parameters of experimental animals

Parameter	Control rats	Diabetic rats
Food intake(g/24h)	11.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	18.6 ± 3.6 <sup>b</sup>
Body weight(g)	275.4 ± 17.6	283.1 ± 14.2
FBG <sup>1)</sup> (mg/dL)	89.7 ± 9.4 <sup>a</sup>	385.4 ± 21.8 <sup>b</sup>
Plasma insulin(μU/mL)	8.6 ± 0.6	8.2 ± 0.7
HOMA-IR <sup>2)</sup>	1.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.1 ± 0.9 <sup>b</sup>
Triglyceride(mg/dL)	73.2 ± 5.7 <sup>a</sup>	182.7 ± 18.7 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>FBG: fasting blood glucose.

<sup>2)</sup>HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance.

Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a,b) within the same row are significantly different the level of p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of catechin on physical and biochemical parameters in experimental animals

Parameter	Control	DM <sup>1)</sup>	DM+CA <sup>2)</sup>
Food intake(g/24h)	20.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	27.8 ± 3.1 <sup>b</sup>	28.6 ± 2.4 <sup>b</sup>
Body weight(g)	365.4 ± 15.1	336.4 ± 21.6	346.2 ± 16.4
FBG(mg/dL)	87.7 ± 8.7 <sup>a</sup>	407.8 ± 32.1 <sup>c</sup>	312.7 ± 27.8 <sup>b</sup>
Plasma insulin(μU/mL)	8.0 ± 0.8	7.6 ± 0.8	7.7 ± 0.8
HOMA-IR	1.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	7.6 ± 0.8 <sup>b</sup>
Triglyceride(mg/dL)	78.7 ± 9.5 <sup>a</sup>	189.8 ± 15.2 <sup>c</sup>	141.2 ± 13.1 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>DM: diabetes mellitus.

<sup>2)</sup>DM+CA : Diabetes mellitus+catechin ; diabetic rats treated with catechin(0.1% in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a-c) within the same raw are significantly different the level of p<0.05 by Duncan's multiple range test.



Table 4. Effects of catechin on enzyme activities in kidney of diabetic rats

Groups	Enzyme activities(moles/mg protein/hour)	
	GGT <sup>1)</sup>	AP <sup>2)</sup>
Control	45.7 ± 5.2 <sup>a</sup>	16.2 ± 1.6 <sup>a</sup>
DM	32.1 ± 4.1 <sup>b</sup>	12.1 ± 1.3 <sup>b</sup>
DM+CA	42.7 ± 4.2 <sup>a</sup>	15.2 ± 1.0 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>GGT:  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase.

<sup>2)</sup>AP: alkaline phosphatase.

Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a,b) within the same column are significantly different the level of  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Table 5. Gene set analysis from the kidney differential expressed genes selected by  $\log_2(\text{FC}) \geq 1$  &  $P\text{-value} \leq 0.05$  in the comparison unit of control vs diabetic rats

Term	Genes	Fold Enrichment	P value
gas transport	Hba2, Hba1, Hbb, Hbb-b1, Aqp4	61.1	0.000001
response to extracellular stimulus	Cyp1a1, Hmgcs2, Fads1, Alb, Hp, Aqp2, Spp1, Gatm, Nuak2, Aqp3	7.28	0.000006
response to organic substance	Hp, Cfb, Slc34a2, Ptgs1, Cyp1a1, Hmgcs2, Akr1b1, Alb, Serpina1, Fads1, Aqp2, Gatm, Spp1	3.08	0.00065
response to starvation	Fads1, Alb, Aqp2, Nuak2	19.5	0.00105
response to metal ion	Cyp1a1, Serpina1, Alb, Hp, Aqp2, Gatm	7.45	0.00112
water transport	Aqp2, Aqp3, Aqp4	50.7	0.00148
response to vitamin	Cyp1a1, Fads1, Hp, Spp1, Aqp3	9.73	0.00160
response to hormone stimulus	Hmgcs2, Serpina1, Fads1, Hp, Aqp2, Spp1, Gatm, Ptgs1, Slc34a2	3.88	0.00178

Table 6. Gene set analysis from the kidney differential expressed genes selected by  $\log_2(\text{FC}) \geq 1$  &  $P\text{-value} \leq 0.05$  in the comparison unit of DM vs DM+catechin

Term	Genes	Fold Enrich	P value
oxidation reduction	Dhfr, Dhcr24, Akr1b8, Fads1, Acadsb, Cyp2c11, Rdh16, Loxl1, Srxn1	4.56	0.00052
response to endogenous stimulus	Gja1, Fads1, Fos, Igfbp1, Mgp, Nnmt, Ptgds	3.79	0.00835
response to wounding	Gja1, Igfbp4, F2, Igfbp1, Ccl7, Vnn1	4.39	0.01
response to organic substance	Gja1, Dhfr, Fads1, Fos, Igfbp1, Mgp, Nnmt, Ptgds	2.67	0.0238
inflammatory response	Igfbp4, F2, Ccl7, Vnn1	5.72	0.0303
defense response	Igfbp4, F2, Ccl7, Vnn1, Defb29	3.89	0.0356
glycine metabolic process	Dhfr, Glc	47.7	0.0401

**Table 7. Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to oxidation reduction**

Gene	Control	DM	log2(FC)	P value	Q value
Cyp1a1	44.73	13.61	-1.72	0.0001	0.011
Dhcr24	33.41	5.72	-2.55	0.0001	0.011
Akr1b1	445.15	30.87	-3.85	0.0001	0.011
Cyp2c11	25.75	6.95	-1.89	0.0007	0.083
Aldh1a3	22.28	2.68	-3.06	0.0003	0.040
Scd	17.99	7.05	-1.35	0.0007	0.085
Rdh16	80.10	13.19	-2.60	0.0001	0.011
Slc14a2	19.69	3.00	-2.71	0.0001	0.011
Ptgs1	27.61	5.47	-2.33	0.0001	0.011
Qsox1	46.89	4.63	-3.34	0.0001	0.011
Prodh	15.04	45.08	1.58	0.0002	0.033
Acadsb	37.15	96.40	1.38	0.0007	0.085

Cyp1a1 : cytochrome P450 1A1, Dhcr24 : delta(24)-sterol reductase precursor, Akr1b1 : aldose reductase, Cyp2c11 : cytochrome P450 2C11 precursor, Aldh1a3 : aldehyde dehydrogenase family 1 member A3, Scd : acyl-CoA desaturase 2, Rdh16 : retinol dehydrogenase 2 precursor, Slc14a2 : urea transporter 2 isoform c, Ptgs1 : prostaglandin G/H synthase 1 precursor, Qsox1 : sulfhydryl oxidase 1 precursor, Prodh : proline dehydrogenase 1, mitochondrial precursor, Acadsb : short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial

Table 8. Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to oxidation reduction.

Gene	DM	DM+CA	log2(FC)	P value	Q value
Dhcr24	5.83	27.90	2.26	0.0001	0.026
Akr1b8	7.14	33.14	2.21	0.0003	0.103
Fads1	12.05	31.64	1.39	0.0001	0.026
Acadsb	12.05	31.64	1.39	0.0001	0.026
Cyp2c11	7.08	27.43	1.95	0.0001	0.026
Rdh16	13.44	47.49	1.82	0.0001	0.026
Loxl1	6.49	16.97	1.39	0.0005	0.142
Dhfr	127.28	48.73	-1.39	0.0001	0.045
Srxn1	18.30	5.20	-1.82	0.0001	0.026

Dhcr24 : delta(24)-sterol reductase precursor, Akr1b8 : aldose reductase-related protein 2, Fads1 : fatty acid desaturase 1, Acadsb : short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial, Cyp2c11 : cytochrome P450 2C11 precursor, Rdh16 : retinol dehydrogenase 2 precursor, Loxl1 : lysyl oxidase homolog 1 precursor, Dhfr : dihydrofolate reductase, isoform A, Srxn1 : sulfiredoxin-1

Table 9. Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to endogenous stimulus.

Gene	Control	DM	log2(FC)	P value	Q value
Serpina1	45.64	13.85	-1.72	0.0004	0.051
Ucp1	4.96	0.00	Inf	0.0001	0.011
Shh	0.74	0.00	Inf	0.0007	0.085
Hp	64.34	17.15	-1.91	0.0001	0.011
Nr4a3	0.70	0.00	Inf	0.0001	0.011
Ptgs1	27.61	5.47	-2.33	0.0001	0.011
Ptgds	225.60	25.75	-3.13	0.0001	0.011
Igfbp1	69.39	168.89	1.28	0.0009	0.100

Serpina1 : alpha-1-antitrypsin precursor, Ucp1 : mitochondrial brown fat uncoupling protein 1, Shh : sonic hedgehog protein precursor, Hp : haptoglobin precursor, Nr4a3 : nuclear receptor subfamily 4 group A member 3, Ptgs1 : prostaglandin G/H synthase 1 precursor ,Ptgds : prostaglandin-H2 D-isomerase precursor, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor.

Table 10. Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to endogenous stimulus.

Gene	DM	DM+CA	log2(FC)	P value	Q value
Fos	15.35	4.57	-1.748	0.0009	0.210
Igfbp1	172.10	62.44	-1.463	0.0001	0.026
Gjal	3.24	9.44	1.541	0.0009	0.218
Fads1	12.05	31.64	1.392	0.0001	0.026
Mgp	335.14	856.20	1.353	0.0001	0.026
Nnmt	0.00	1.22	Inf	0.0002	0.063
Ptgds	26.24	135.11	2.364	0.0001	0.026

Fos : proto-oncogene c-Fos, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor, Gjal : gap junction protein, alpha 1, 43kDa, Fads1 : fatty acid desaturase 1, Mgp : matrix Gla protein precursor, Nnmt : nicotinamide N-methyltransferase, Ptgds : prostaglandin-H2 D-isomerase precursor.

Table 11. Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to wounding.

Gene	Control	DM	log2(FC)	P value	Q value
Cyp1a1	44.73	13.61	-1.716	0.0001	0.011
Igfbp4	71.61	15.28	-2.228	0.0001	0.011
Bmp2	1.34	0.00	Inf	0.0001	0.011
Serpina1	45.64	13.85	-1.720	0.0004	0.051
Ali3	9.77	1.95	-2.327	0.0002	0.033
Shh	0.74	0.00	Inf	0.0007	0.085
Hp	64.34	17.15	-1.907	0.0001	0.011
Cfb	25.73	4.08	-2.655	0.0001	0.011
Ccl7	4.32	0.00	Inf	0.0001	0.011
Serpine1	12.24	3.45	-1.826	0.0009	0.097
Igfbp1	69.39	168.89	1.283	0.0009	0.100
Clu	83.46	273.62	1.713	0.0001	0.011

Cyp1a1 : cytochrome P450 1A1, Igfbp4 : insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor, Bmp2 : bone morphogenetic protein 2 preproprotein, Serpina1 : alpha-1-antitrypsin precursor, Ali3 : alpha-1-inhibitor 3 precursor, Shh : sonic hedgehog protein precursor, Hp : haptoglobin precursor, Cfb : complement factor B isoform 1 precursor, Ccl7 : C-C motif chemokine 7 precursor, Serpine1 : plasminogen activator inhibitor 1 precursor, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor, Clu : clusterin precursor.



Table 12. Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to wounding.

Gene	DM	DM+CA	log2(FC)	P value	Q value
Gja1	3.24	9.44	1.541	0.0009	0.218
Igfbp4	15.57	44.50	1.515	0.0001	0.026
Ccl7	0.00	1.58	Inf	0.0007	0.176
Vnn1	146.17	65.57	-1.156	0.0002	0.076
F2	35.36	14.19	-1.317	0.0004	0.117
Igfbp1	172.10	62.44	-1.463	0.0001	0.026

Gja1 : gap junction protein, alpha 1, 43kDa, Igfbp4 : insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor, Ccl7 : C-C motif chemokine 7 precursor, Vnn1 :panthetheinase precursor, F2 : silk fibroin 2 precursor, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor.

Table 13. Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to hormone stimulus.

Gene	Control	DM	log2(FC)	P value	Q value
Serpina1	45.64	13.85	-1.720	0.0004	0.051
Ucp1	4.96	0.00	Inf	0.0001	0.011
Shh	0.74	0.00	Inf	0.0007	0.085
Hp	64.34	17.15	-1.907	0.0001	0.011
Nr4a3	0.70	0.00	Inf	0.0001	0.011
Ptgs1	27.61	5.47	-2.335	0.0001	0.011
Ptgds	225.60	25.75	-3.131	0.0001	0.011
Igfbp1	69.39	168.89	1.283	0.0009	0.100

Serpina1 : alpha-1-antitrypsin precursor, Ucp1 : mitochondrial brown fat uncoupling protein 1, Shh : sonic hedgehog protein precursor, Hp : haptoglobin precursor, Nr4a3 : nuclear receptor subfamily 4 group A member 3, Ptgs1 : prostaglandin G/H synthase 1 precursor, Ptgds : prostaglandin-H2 D-isomerase precursor, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor.

Table 14. Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to hormone stimulus.

Gene	DM	DM+CA	log2(FC)	P value	Q value
Gja1	3.24	9.44	1.541	0.0009	0.218
Fads1	15.57	44.50	1.515	0.0001	0.026
Mgp	335.14	856.20	1.353	0.0001	0.026
Ptgds	146.17	65.57	-1.156	0.0002	0.076
Fos	35.36	14.19	-1.317	0.0004	0.117
Igfbp1	172.10	62.44	-1.463	0.0001	0.026

Gja1 : gap junction protein, alpha 1, 43kDa, Fads1 : insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor, Mgp : C-C motif chemokine 7 precursor, Ptgds : pantetheinase precursor, Fos : silk fibroin 2 precursor, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor.

Table 15. Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to response to organic substance.

Gene	Control	DM	log2(FC)	P value	Q value
Cyp1a1	44.73	13.61	-1.716	0.0001	0.011
Akr1b1	445.15	30.87	-3.850	0.0001	0.011
Serpina1	45.64	13.85	-1.720	0.0004	0.051
Ucp1	4.96	0.00	-Inf	0.0001	0.011
Shh	0.74	0.00	-Inf	0.0007	0.085
Hp	64.34	17.15	-1.907	0.0001	0.011
Nr4a3	0.70	0.00	-Inf	0.0001	0.011
Cfb	25.73	4.08	-2.655	0.0001	0.011
Ptgs1	27.61	5.47	-2.335	0.0001	0.011
Ptgds	225.60	25.75	-3.131	0.0001	0.011
Igfbp1	69.39	168.89	1.283	0.0009	0.100
Atp12a	1.92	9.66	2.332	0.0003	0.046

Cyp1a1 : cytochrome P450 1A1, Akr1b1 : aldose reductase, Serpina1 : alpha-1-antitrypsin precursor, Ucp1 : mitochondrial brown fat uncoupling protein 1, Shh : sonic hedgehog protein precursor, Hp : haptoglobin precursor, Nr4a3 : nuclear receptor subfamily 4 group A member 3, Cfb : complement factor B isoform 1 precursor, Ptgs1 : prostaglandin G/H synthase 1 precursor, Ptgds : prostaglandin-H2 D-isomerase precursor, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor, Atp12a : potassium-transporting ATPase alpha chain 2 b.

Table 16. Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to response to organic substance.

Gene	DM	DM+CA	log2(FC)	P value	Q value
Dhfr	127.28	48.73	-1.385	0.0001	0.045
Fos	15.35	4.57	-1.748	0.0009	0.210
Igfbp1	172.10	62.44	-1.463	0.0001	0.026
Mgp	335.14	856.20	1.353	0.0001	0.026
Nnmt	0.00	1.22	Inf	0.0002	0.063
Fads1	12.05	31.64	1.392	0.0001	0.026
Gjal	3.24	9.44	1.541	0.0009	0.218
Ptgds	26.24	135.11	2.364	0.0001	0.026

Dhfr : dihydrofolate reductase, isoform A, Fos : proto-oncogene c-Fos, Igfbp1 : insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor, Mgp : matrix Gla protein precursor, Nnmt : nicotinamide N-methyltransferase, Fads1 : fatty acid desaturase 1, Gjal : gap junction protein, alpha 1, 43kDa, Ptgds : prostaglandin-H2 D-isomerase precursor.

Table 17. Select kidney transcripts in control versus diabetic rats related to inflammatory response.

Gene	Control	DM	log2(FC)	P value	Q value
Igfbp4	71.61	15.28	-2.228	0.0001	0.011
Bmp2	1.34	0.00	-Inf	0.0001	0.011
Serpina1	45.64	13.85	-1.720	0.0004	0.051
Al13	9.77	1.95	-2.327	0.0002	0.033
Hp	64.34	17.15	-1.907	0.0001	0.011
Cfb	25.73	4.08	-2.655	0.0001	0.011
Ccl7	4.32	0.00	-Inf	0.0001	0.011

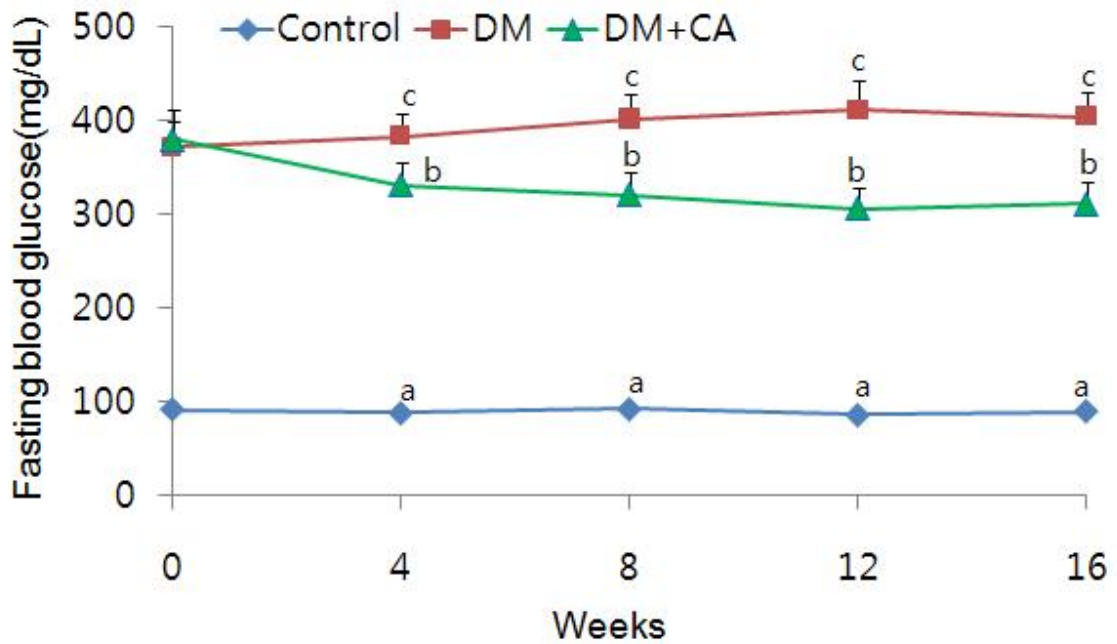
Igfbp4 : insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor, Bmp2 : bone morphogenetic protein 2 preproprotein, Serpina1 : alpha-1-antitrypsin precursor, Al13 : alpha-1-inhibitor 3 precursor, Hp : haptoglobin precursor, Cfb : complement factor B isoform 1 precursor, Ccl7 : C-C motif chemokine 7 precursor.

Table 18. Select kidney transcripts in DM versus DM+catechin rats related to inflammatory response.

Gene	DM	DM+CA	log2(FC)	P value	Q value
Igfbp4	15.57	44.50	1.515	0.0001	0.026
Ccl7	0.00	1.58	inf	0.0007	0.176
Vnn1	146.17	65.57	-1.156	0.0002	0.076
F2	35.36	14.19	-1.317	0.0004	0.117

Igfbp4 : insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor, Ccl7 : C-C motif chemokine 7 precursor, Vnn1 : pantetheinase precursor, F2 : silk fibroin 2 precursor.

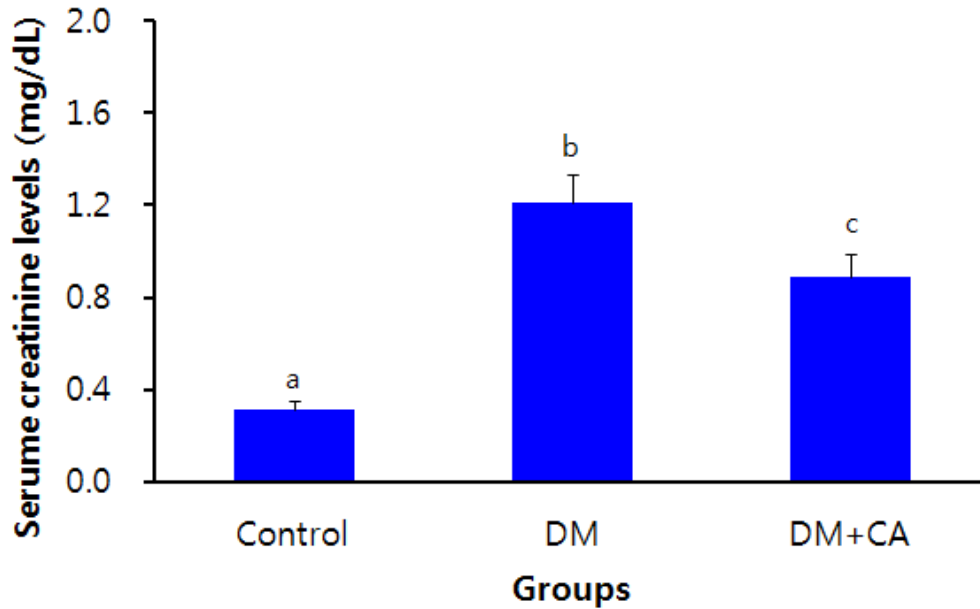
Fig. 1. Effects of catechin on blood glucose in diabetic rats.



Rats were administered catechin for 16 weeks, the fasting blood glucose were determined after 12 hrs fasting. DM: diabetes mellitus, DM+CA: diabetic rats treated with catechin (0.1% in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a-c) above the bars within the same weeks are significantly different at the level of  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range.

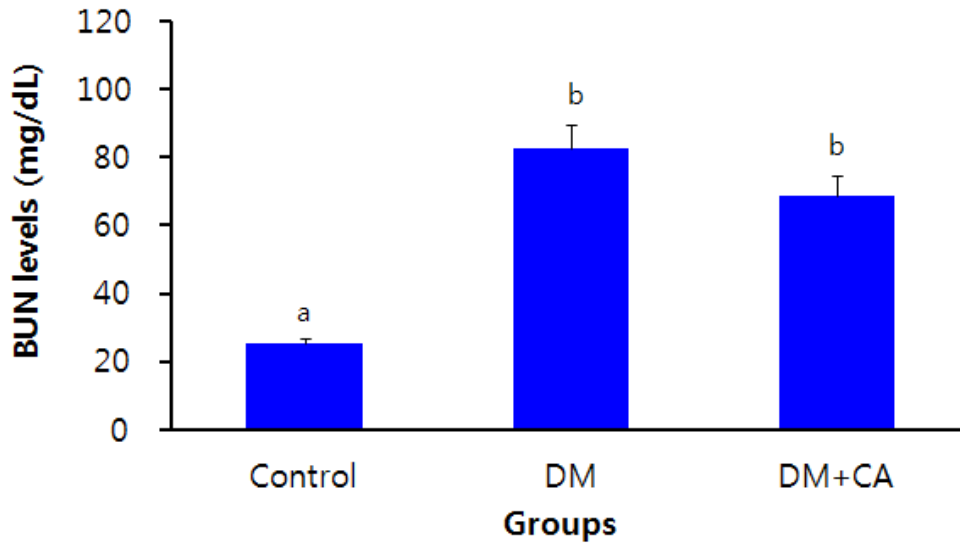


Fig. 2. Effects of catechin on serum creatinine in diabetic rats



Rats were administered P60 for 16 weeks, the serum creatinine were determined after these treatments. DM: diabetes mellitus, DM+CA: diabetic rats treated with catechin(0.1% in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a-c) above the bars are significantly different at the  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Fig. 3. Effects of catechin on blood urea nitrogen (BUN) in diabetic rats



Rats were administered catechin for 16 weeks, the BUN were determined after these treatments. DM: diabetes mellitus, DM+CA: diabetic rats treated with catechin (0.1% in drinking water). Values are mean±SD (n=5). Values with different letters(a, b) above the bars are significantly different at the level of  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

## 참고문헌

1. International Diabetes Federation. 2014. IDF Diabetes Atlas, 6th edition, Brussels, Belgium. p 7-17.
2. 건강보험 통계연보. 2015. 국민 건강 보험공단
3. Korean Diabetes Association. Korean diabetes fact sheet 2016 [Internet]. Available from: [http://www.diabetes.or.kr/bbs/index.html?sub\\_menu=&code=e\\_resource&category=1&gubun=&page=1&number=292&mode=view&order=&sort=&keyfield=&key=](http://www.diabetes.or.kr/bbs/index.html?sub_menu=&code=e_resource&category=1&gubun=&page=1&number=292&mode=view&order=&sort=&keyfield=&key=).
4. American Diabetes Association. 2013. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care. 36: S67 - S74.
5. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. 2001. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. JAMA. 289:76-79.
6. Akkati S, Sam KG, Tungha G. 2011. Emergence of promising therapies in diabetes mellitus. J Clin Pharmacol 51: 796-804.
7. American Diabetes Association. 2012. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 35: S64 - S71
8. Philippe J, Raccah D. 2009. Treating type 2 diabetes: how safe are current therapeutic agents? Int J Clin Pract 63: 321-332.
9. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: Oxidative stress and diabetic vascular complications. Diabetes Care, 1996, 19, 257-267.
10. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. Semin Nephrol 2007;27:195-207.
11. Jefferson J, Shankland S, Pichler R. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. Kidney Int 2008;74: 22-36.
12. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. Journal of Nutritional Biochemistry 24: 1777-1789.
13. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 79: 727-747.
14. Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in

epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S-325S.

15. Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkanen H, Poutanen K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 11: 1365-1402.

16. Wedick NM<sup>1</sup>, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. 2012. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr* 95: 925-933.

17. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. 2005. 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* 24: 376-384.

18. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:693-704.

19. Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T & Tokimitsu I (2002) Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 1459-1464.

20. Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A; JACC Study Group. 2006. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med* 144: 554-562.

21. 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, 337-346.

22. 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, 1325-1331.

23. Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, et al. (2005) Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycooxidation and cross-linking. *Diabetes* 54, 517-526.

24. Waleed M. Renno, Suad Abdeen, Mousa Alkhalaf and Sami Asfar : Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *British Journal of Nutrition* (2008), 100, 652-659

25. Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a

- revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57 - 63.
26. Hart T, Komori HK, LaMere S, Podshivalova K, Salomon DR. (2013). Finding the active genes in deep RNA-seq gene expression studies. *BMC Genomics.* 14: 778-785.
27. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.
28. Tate SS, Meister A. 1985.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods in Enzymology.* Meister A, ed. Academic Press, New York, USA. Vol 113, p 400-437.
29. Tenenhouse HS, Scriver CR, Vizel EJ. 1980. Alkaline phosphatase activity does not mediate phosphate transport in the renal-cortical brush-border membrane. *Biochem J* 190: 473-476.
30. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2008. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols.* 4:44-57.
31. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM and Reaven GM. 2000. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 49: 1390-1394.
32. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL and Ramarao P. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research* 52: 313-320.
33. Khan SA, Priyamvada S, Khan W, Khan S, Farooq N, Yusufi AN. 2009. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 60: 382-391.
34. Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA. 2014. Ellagic acid, an NF- $\kappa$ B inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic

nephropathy. *Chem Biol Interact* 219: 64-75.

35. Noriko Yamabe, Takako Yokozawa, Takeshi Oya, and Mujo Kim T. (Oct 2006). Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(1):228-36.

36. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977 - 986.

37. Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. (Aug 2013) Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord* 13;12(1):43

38. Tenenhouse HS, Scriver CR, Vizel EJ. 1980. Alkaline phosphatase activity does not mediate phosphate transport in the renal-cortical brush-border membrane. *Biochem J* 190: 473-476.

39. De Carvalho JA, Piva SJ, Hausen BS et al. (Jul 2011) Assessment of urinary  $\gamma$ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 15;412(15-16):1407-11

40. Geus HR, Betjes MG, Bakker J. (Apr 2012) Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J* 5(2):102-108

41. Khan SA, Priyamvada S, Farooq N, Khan S, Khan MW, Yusufi AN. 2009. Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacol Res* 59: 254-262.

42. Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, Fitz Patrick DR, Kelley RI, Wanders RJ (Sep 2001). "Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis". *Am J Hum Genet.* 69 (4): 685 - 94.

43. Pampori NA, Shapiro BH. 1994. Over-expression of CYP2C11, the major male-specific form of hepatic cytochrome P450, in the presence of

nominal pulses of circulating growth hormone in adult male rats neonatally exposed to low levels of monosodium glutamate. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1067 - 1073.

44. Arden KC, Viars CS, Fu K, Rozen R (Feb 1995). Localization of short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase (ACADSB) to human chromosome 10. *Genomics*. 25 (3):743 - 5.

45. Ferry RJ, Cerri RW, Cohen P (1999). Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. *Horm. Res.* 51 (2): 53 - 67

46. Bachmann G, Petereit H, Djenabi U, Michel O (Mar 2002). Predictive values of beta-trace protein (prostaglandin D synthase) by use of laser-nephelometry assay for the identification of cerebrospinal fluid. *Neurosurgery*. 50 (3): 571 - 6