



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

2
0
1
2
년
2
월

2012년 2월
박사학위논문

박
사
학
위
논
문

흰
쥐
에
서
스
트
렙
토
조
토
신
유
발
당
뇨
병
성
신
병
증
에
대
한
E
G
C
G
의
치
료
효
과

안
치
용

흰쥐에서 스트렙토조토신 유발 당뇨병성 신병증에 대한 EGCG의 치료 효과

조선대학교대학원

의 학 과

안 치 용

흰쥐에서 스트렙토조토신 유발
당뇨병성 신병증에 대한
EGCG의 치료 효과

2012년 2월 24일

조선대학교 대학원

의 학 과

안 치 용

흰쥐에서 스트렙토조토신 유발
당뇨병성 신병증에 대한
EGCG의 치료 효과

지도교수 정 종 훈

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2011년 10월 일

조선대학교대학원

의학과

안치용

안치용의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 정 춘 해 (인)

위 원 조선대학교 교수 정 종 훈 (인)

위 원 조선대학교 부교수 박 치 영 (인)

위 원 조선대학교 부교수 김 현 리 (인)

위 원 조선대학교 부교수 신 병 철 (인)

2011년 12월

조선대학교 대학원

목 차

도표 목록	ii
ABSTRACT	iii
서론	1
연구재료 및 방법	3
결과	7
고찰	22
결론	28
참고문헌	29
국문초록	35
저작물 이용 허락서	37

도표 목록

표 및 그림 목차

표 1. Effects of EGCG on blood glucose levels in mice -----	11
그림 1. Study design -----	12
그림 2. Changes of serum glucose levels in mice -----	13
그림 3. Changes of body weight in mice -----	14
그림 4. 24hr urine amount in mice -----	15
그림 5. Changes of 24hr proteinuria amount in mice -----	16
그림 6. Serum creatinine level in mice -----	17
그림 7. Blood urea nitrogen level in mice -----	18
그림 8. Western blot analysis of osteopontin protein expression -----	19
그림 9. Renal pathologic examination in mice kidney (HE staining) -----	20
그림 10. Renal pathologic examination in mice kidney (MT staining) -----	21

ABSTRACT

Therapeutic Effects of Epigallocatechin Gallate on Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy in Mice

Ahn, Chi Yong

Adviser; Chung, Jong-Hoon M.D.

Department of Internal Medicine,

Graduate School of Chosun University

Background: Diabetic nephropathy is one of the most serious complications in diabetes mellitus and has been the most common cause of end-stage renal disease. Green tea extracts (GTE) have antioxidant properties, and (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) is known to be the most abundant in green tea. Osteopontin (OPN) is a large phosphoglycoprotein adhesion molecule, and has emerged as a potentially key pathophysiologic contributor in diabetic nephropathy. We examined whether EGCG could ameliorate the development of diabetic nephropathy and its role of OPN.

Methods: The mice (n=42) were divided into 3 groups. Control group (n=7) was intraperitoneal (IP) injected 0.9% saline, Streptozotocin (STZ) group (n=7) was IP injected STZ 200mg/Kg and induced diabetic nephropathy. GTE group (n=7) was received 0.1% GTE by oral route from 4 weeks to 17 weeks. At 16 weeks, EGCG groups (n=7/each group) were received EGCG 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg body weight by subcutaneous injection three times. Serum glucose, blood urea nitrogen, serum creatinine, urine volume and urine protein amounts were measured. Western

blot assay of OPN was compared for the different groups. Histopathologic examination and immunohistochemical staining of mice kidney were performed.

Results: Compared with control group, STZ-group showed an increase in blood glucose, blood urea nitrogen, creatinine levels and urine protein amounts, and a decrease in body weight. All the above parameters were significantly reversed with EGCG treatment. After STZ injection, there were an diabetic glomerulosclerosis with increased renal OPN accumulation and its protein expression in the kidney cortex. EGCG-treated mice kidney showed an reduced expression of above parameters and an reserved pathologic findings.

Conclusions: These results suggest that EGCG ameliorates STZ-induced diabetic nephropathy by OPN suppression. The potential use of EGCG in the treatment of diabetic nephropathy should be further explored.

Key words : epigallocatechin gallate, diabetic nephropathy, streptozotocin, osteopontin

서론

당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)은 말기신부전 환자의 가장 흔한 원인이며 당뇨병 환자에 있어 이환율과 사망률의 중요한 위험인자이다 [Molitch, 2004; National Kidney Foundation, 2007]. 당뇨병성 신병증의 임상 양상은 사구체 여과율이 감소하고 알부민뇨(albuminuria)가 발생하는 것으로 알려져 있으나 일부 환자에서는 알부민뇨가 없이 사구체 여과율만 감소하기도 한다 [Kramer, 2007]. 알부민뇨는 당뇨병 환자에서 총 사망률(all-cause mortality)과 심근 경색증, 뇌졸중, 심부전 등 심혈관계 질환의 위험인자이다. [Weir et al., 2007; Gerstein et al., 2001; Mann et al., 2004].

오스테오폰틴(osteopontin, OPN)은 처음 뼈에서 분리되었으며 나중에는 혈관, 심장뿐만 아니라 신장의 세뇨관과 사구체 상피 세포(glomerular epithelial cells) 및 여러 체액에서도 분리된다 [Higashibata et al., 2004; Weber et al., 2001]. OPN은 초기에 신장에서 칼슘 옥살산 결석(calcium oxalate stones)의 축적을 예방하는 물질로 알려졌으나 [Wesson et al., 2003] 이후 당뇨병성 신병증 뿐만 아니라 세뇨관사이질 섬유화(tubulointerstitial fibrosis)와 단백뇨를 특징으로 하는 신장 질환과 연관이 있는 것이 밝혀졌다 [Junaid et al., 2004; Kramer et al., 2007]. 최근 OPN은 큰 인당 단백질 부착 분자(phosphoglycoprotein adhesion molecule)이고 당뇨병성 신병증의 병태생리학에 중요한 인자이다. OPN은 당뇨병성 신병증의 신장조직 마이크로어레이 분석(microarray analyses)에서 정상군에 비하여 당뇨병 군에서 상승하였다 [Susztak et al., 2004].

EGCG (epigallocatechin 3-O-gallate)는 녹차에서 추출한 카테킨(catechins)으로 항산화 효과가 뛰어나며 arginine에 의해 유발된 신손상을 요독으로부터 회복시켜준다 [Trachtman et al., 1996; Shin et al., 2009]. EGCG가 흰쥐의 간에서 당신생 효소 (glyconeogenesis enzymes)들인 phosphoenolpyruvate carboxykinase와 glucose-6-phosphatase의 mRNA를 감소시켜 당뇨병 예방에 도움이 되고, EGCG가 세포에서 인슐린과 유사한 작용으로 당신생 효소들과 protein-tyrosine phosphorylation에 관여하는 유전자들을 조절하여 혈당을 낮춘다는 보고들도 있다 [Koyama et al., 2004; Waltner et al., 2002]. 그러나, 당뇨병성 신병증에서 EGCG의 작용 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

본 연구는 OPN이 당뇨병성 신병증의 병태생리에 작용 기전의 하나로 역할을 하는지 규명하고, EGCG가 STZ으로 유발한 당뇨병성 신병증 흰쥐에 대해 치료 효과가 있는지를 알아보자 한다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

EGCG와 STZ는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 녹차 추출물 (green tea extract, GTE)은 Maity 등에 의한 hot-water 추출법을 사용하였다 [Maity et al., 1998]. OPN은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, UAS)에서 구입하였으며 다른 모든 화학물질들은 상품적으로 고품질의 약품들을 사용하였다.

2. 흰쥐 실험 준비와 처치

정상 수컷 ICR 흰쥐(다물사이언스, 대전)를 구입하여 사용하였으며 몸무게는 20-25 g이었고 항온, 항습, 12시간의 주/야간 주기의 조건 하에 수용하였다. 흰쥐 42마리를 대조군(control 군, 7마리), STZ 투여군(STZ 군, 7마리), EGCG 투여군(EGCG 군, 21마리) 그리고 GTE 투여군(GTE 군, 7마리)으로 분류하였다. 대조군은 생리식염수를 복강으로 투여하였다. STZ 투여군은 STZ 200 mg/kg을 복강으로 투여하고 당뇨병성 신병증을 유발시켰다. EGCG 투여군은 STZ 200 mg/kg을 복강으로 투여하고 16주 뒤에 7마리씩 3군으로 다시 분류하여 EGCG를 50 mg/kg (EGCG50 군), 100 mg/kg (EGCG100 군), 200 mg/kg (EGCG200 군)을 복강으로 2일 간격으로 3차례 투여하였다. GTE 군은 STZ를 같은 방법으로 투여한 후 4주 뒤에 요붕지법(dipstick test)으로 단백뇨가 관찰되는 것을 확인하고 0.1% GTE 용액 10 mL를 구강으로 매일 13주간 투여하였다 (GTE PO군, 7마리). 쥐들은 17주째 에테르 마취(ether anesthesia)하에 희생하여 혈액을 채취하고 즉시 양측 신장을 적출하

였다 (Figure 1).

3. 생화학적 분석

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

4. Western blot 분석

흰쥐의 신장 조직 0.5mg 을 300ul 용해 완충액(lysis buffer; pH 7.5, containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, 10% glycerol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail)으로 30 분 동안 0°C에서 용해시킨 후 균질화(homogenization) 시켰다. OPN 단백 표현을 측정하기 위해서 각 표본을 Ultrasonicator 를 이용하여 세포를 파괴시켜 원심분리(14,000rpm, 4°C, 15 분)하고, 상층액을 재차 원심분리하였다(14,000 rpm, 4°C, 10 분). 5 분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하고, 20 ug 의 단백질을 10% polyacrylamid gel 로 전기영동 시킨 후 단백질을 니트로셀룰로오스 막에 옮겨서 염색하였다. 제 1 항체로는 anti-OPN (1:1000, 4°C, 24hr)과 anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:1000, 4°C, 24hr) 항체를 이용하였다. 제 2 항체는 conjugated horseradish peroxidase anti-mouse antibody (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 실온에서 2 시간 동안 함께 염색하였다. 염색된 단백질을 enhanced

chemiluminescence detect system (iNtRON, Biotech., Seoul, Korea)을 이용하여 발현 여부를 확인하고, β -actin 을 대조군으로 하여 OPN 의 변화를 비교하였다.

5. 신장 조직의 형태학적 분석

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

6. 신장 조직의 면역조직화학적 염색

신장 조직 절편을 0.05M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 옮겨 세척한 후 과산화수소 (hydrogen peroxide; 0.03% in methanol)를 첨가하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제시킨 다음, 0.5% bovine serum albumin (BSA)과 1.5% normal horse serum (NHS)이 포함된 PBS 용액에 1 시간 처리한 후 제 1 항체를 반응시켰다. 발색은 0.05% 3'3-diaminobenzidine (DAB)을 사용하였다. DAB 의 갈색 반응을 확인한 후 PBS 로 세척하고, glycine-HCl 용액 (pH 2.2)에 1 시간 동안 처리하였습니다. 이후 2 차 반응을 위해 동일한 반응을 유도하였다. 모든 제 1 항체는 BSA 와 NHS 가 포함된 PBS 용액에 각각 1:500 으로 희석하여 4°C에서 24 시간 동안 반응시켰고, 모든 염색과정이 끝난 후 에탄올에 탈수한 후 xylene 에 투명, polymount 에 봉입하였다. 1 차 반응 또는 2 차 반응에

이용한 제 1 항체를 생략하고 동일한 염색과정을 시행함으로써 위양성 반응을 확인하였다.

7. 통계학적 분석

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

III. 결과

1. 혈당의 변화

혈당은 매주 간격으로 측정을 하였다. STZ를 투여하기 전에는 대조군 (144 ± 33 mg/dL), STZ 군 (153 ± 28 mg/dL), EGCG IP 투여군 (151 ± 23 mg/dL)과 GTE PO 투여군 (165 ± 27 mg/dL) 사이에 차이를 보이지는 않았다. STZ를 투여한 군에서 대조군에 비하여 실험도중 모두 유의있게 상승하였다 ($p < 0.01$). EGCG 투여군은 STZ 군에 비하여 유의있게 감소하였으며 ($p < 0.05$), GTE PO 투여군은 14주째부터 STZ군에 비하여 유의있게 감소하였다 (Table 1, Figure 2).

2. 체중의 변화

STZ 투여 전의 체중을 기준으로 했을 때, 대조군에 비하여 STZ 투여군은 체중이 증가하지 않았다. 대조군은 시간에 따라 점차 체중이 증가하였으며 (23.3 g at baseline vs. 30.9 g at 17wks), STZ 투여군은 체중의 증가가 관찰되지 않았다 (22.4 g at baseline vs. 23.3 g at 17wks). GTE PO 투여군은 STZ 투여군에 비하여 10주째부터 유의있는 차이를 보이며 체중이 서서히 증가하였고 (24.8 g at 10wks, $p < 0.05$), EGCG 투여군은 STZ 투여군에 비하여 오히려 체중이 감소하였다 (20.5 g at 17wks, $p < 0.05$, Figure 3).

3. 24시간 소변량의 변화

24시간 소변량은 STZ 군에서 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다 (11.4 ± 8.5

ml/24hr vs. 0.8 ± 0.6 ml/24hr, $p < 0.01$). EGCG IP 투여군에서 STZ군에 비하여 소변량이 유의있게 감소하였으며 이는 용량에 비례하였다 (EGCG50 vs. EGCG100 vs. EGCG200, 8.1 ± 5.3 ml/24hr vs. 6.0 ± 3.7 ml/24hr vs. 5.8 ± 3.2 ml/24hr). GTE PO 투여군 (4.9 ± 2.7 ml/24hr)에서도 STZ 투여군에 비하여 소변량이 유의있게 감소하였다 (Figure 4).

4. 24시간 단백뇨 양에 대한 효과

24시간 소변 단백뇨 양은 STZ 투여군에서 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다(STZ group vs. control group, 13.2 ± 6.9 mg/day vs. 4.9 ± 2.5 mg/day, $p < 0.05$). EGCG 투여군 중에서 50 mg/kg 투여군에서는 STZ군에 비하여 단백뇨 양이 감소하였으나 의의는 없었고($p > 0.05$), 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 STZ 투여군에 비하여 유의있게 감소하였으나 두군 사이에는 통계학적 차이는 없었다 (EGCG100 vs. EGCG200, 10.5 ± 5.7 mg/day vs. 8.6 ± 4.1 mg/day). GTE PO 투여군 (7.3 ± 3.9 mg/day)에서도 STZ 투여군에 비하여 단백뇨 양이 유의있게 감소하였다 ($p < 0.05$, Figure 5).

5. 신장 기능에 미치는 효과

STZ 투여군에는 대조군에 비하여 혈중요소질소가 유의있게 증가하였다(STZ group vs. control group, 62.7 ± 21.9 mg/dL vs. 27.4 ± 8.5 mg/dL, $p < 0.05$). EGCG IP 투여군에서는 50 mg/kg 투여군에서 STZ 군에 비하여 혈중요소질소가 감소하였으나 통계적으로 의의는 없었으며($p > 0.05$), 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는

STZ 투여군에 비하여 유의있게 감소하였다(EGCG100 vs. EGCG200, 41.5 ± 13.1 mg/dL vs. 43.3 ± 14.5 mg/dL). GTE PO 투여군(43.1 ± 11.9 mg/dL)에서는 STZ 투여군에 비하여 유의있게 혈중요소질소가 감소하였다 (Figure 6).

혈청 크레아티닌 값은 STZ 투여군에서 대조군에 비하여 유의있게 상승하였다 (STZ group vs. control group, 0.64 ± 0.21 mg/dL vs. 0.25 ± 0.08 mg/dL, $p < 0.05$). EGCG IP 투여군에서는 100 mg/kg 투여군(0.44 ± 0.12 mg/dL)에서만 STZ 군에 비하여 혈청 크레아티닌 값이 유의있게 감소하였으나($p < 0.05$), 50 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에는 STZ 군에 비하여 값이 감소는 하였으나 통계학적 의의는 없었다($p > 0.05$). GTE PO 투여군에서도 STZ 투여군에 비하여 혈청 크레아티닌 값이 감소하였으나 통계학적 의의는 없었다 (Figure 7).

6. Western blot 분석

STZ 투여한 당뇨병성 신병증에서 OPN 단백질의 함량 변화를 보기 위해서 Western blot 분석을 시행하였다. STZ 투여군에서 대조군에 비하여 OPN 단백질의 함량이 증가하는 것을 관찰하였다. EGCG IP 투여군에서는 50 mg/kg 투여군에서는 OPN 함량 발현이 약간은 감소하였으나 큰 차이는 없었으며 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서는 OPN의 발현이 유의있게 감소하였다. GTE PO 투여군에서도 STZ 군에 비하여 OPN 발현이 약간은 감소하였다 (Figure 8).

7. 신장 조직학적 변화

신장 조직 검사에서 대조군에 비하여 STZ 투여군에서 사구체 경화

(nephrosclerosis)와 세뇨관 위축(tubular atrophy) 소견이 관찰되었다(Figure 9, B). EGCG 투여군과 GTE PO 투여군에서는 STZ 투여군에서 관찰되었던 사구체 경화나 세뇨관 위축 소견은 관찰되지 않고 대조군과 거의 유사한 소견을 보였다(Figure 9, C-F). MT (Mason's Trichrome) 염색에서도 STZ 투여군의 신장 조직에서는 사구체 경화와 메산지움의 증식을 관찰할 수 있었으며 세뇨관 위축과 세뇨관 기저막의 비후를 보였다 (Figure 10).

Table 1. Effects of EGCG on blood glucose levels in mice.

	대조군	STZ	EGCG IP	GTE PO
기초	144 ± 33	153 ± 28	151 ± 23	165 ± 27
1주	122 ± 11	198 ± 53	181 ± 31	195 ± 19
2주	137 ± 16	296 ± 80	260 ± 57	314 ± 76
3주	131 ± 12	332 ± 117	315 ± 83	319 ± 83
4주	135 ± 15	334 ± 102	303 ± 79	288 ± 88
5주	130 ± 18	332 ± 96	339 ± 89	329 ± 105
6주	141 ± 8	388 ± 49	407 ± 108	376 ± 101
7주	151 ± 9	435 ± 72	417 ± 124	412 ± 124
8주	143 ± 12	433 ± 81	395 ± 104	383 ± 106
9주	127 ± 9	436 ± 92	421 ± 114	420 ± 114
10주	134 ± 15	447 ± 54	411 ± 95	415 ± 97
11주	140 ± 11	398 ± 100	356 ± 101	393 ± 111
12주	134 ± 15	462 ± 56	455 ± 113	431 ± 137
13주	122 ± 11	468 ± 57	440 ± 95	425 ± 142
14주	124 ± 15	514 ± 57	475 ± 117	388 ± 133†
15주	136 ± 19	423 ± 53	397 ± 114	384 ± 125†
16주	136 ± 13	461 ± 42	386 ± 88*	361 ± 121†
17주	155 ± 12	494 ± 54	332 ± 121*	367 ± 134†

Values are given as mean ± S.E.M

*p < 0.05: STZ group vs. EGCG IP, †p < 0.05: STZ group vs. GTE PO

STZ: streptozotocin, EGCG: epigallocatechin gallate, IP: intraperitoneal GTE: green tea extract, PO: per oral

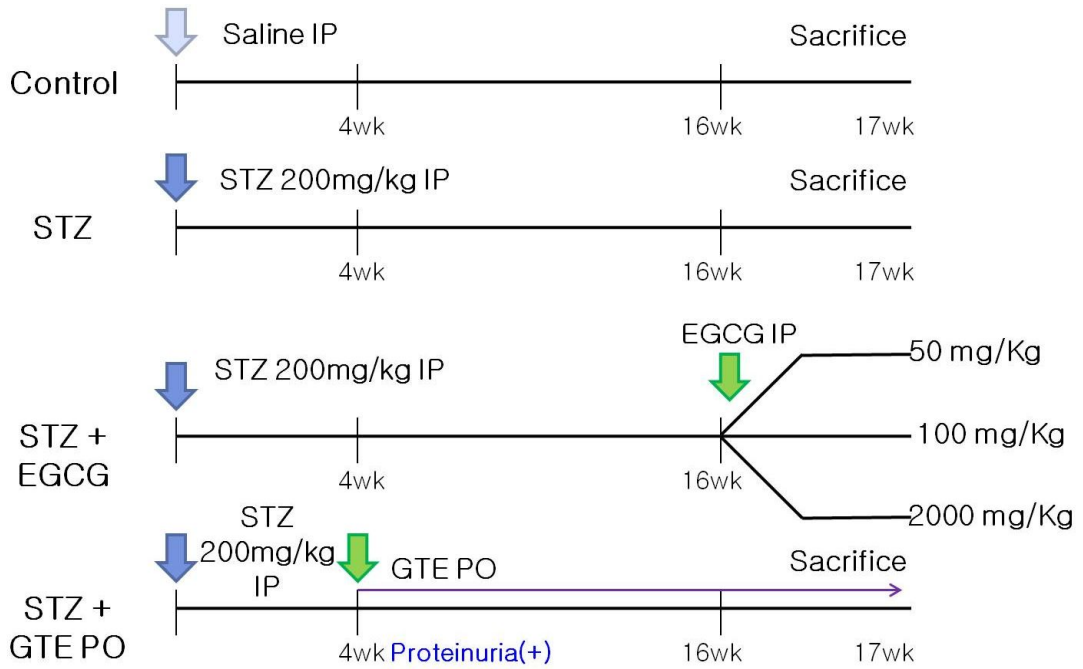


Figure 1. Study design (n=7/each group). STZ; streptozotocin, EGCG; epigallocatechin gallate, GTE; green tea extract, IP; intraperitoneal, PO; per oral.

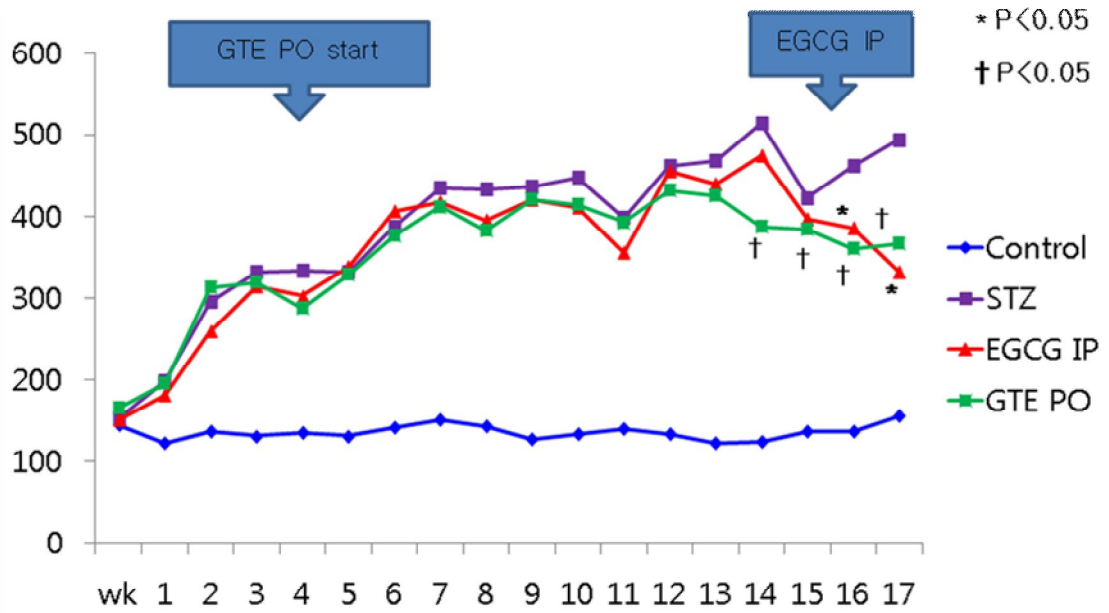


Figure 2. Changes of serum glucose levels in mice. *p < 0.05: STZ group vs. EGCG IP group, †p < 0.05: STZ group vs. GTE PO group

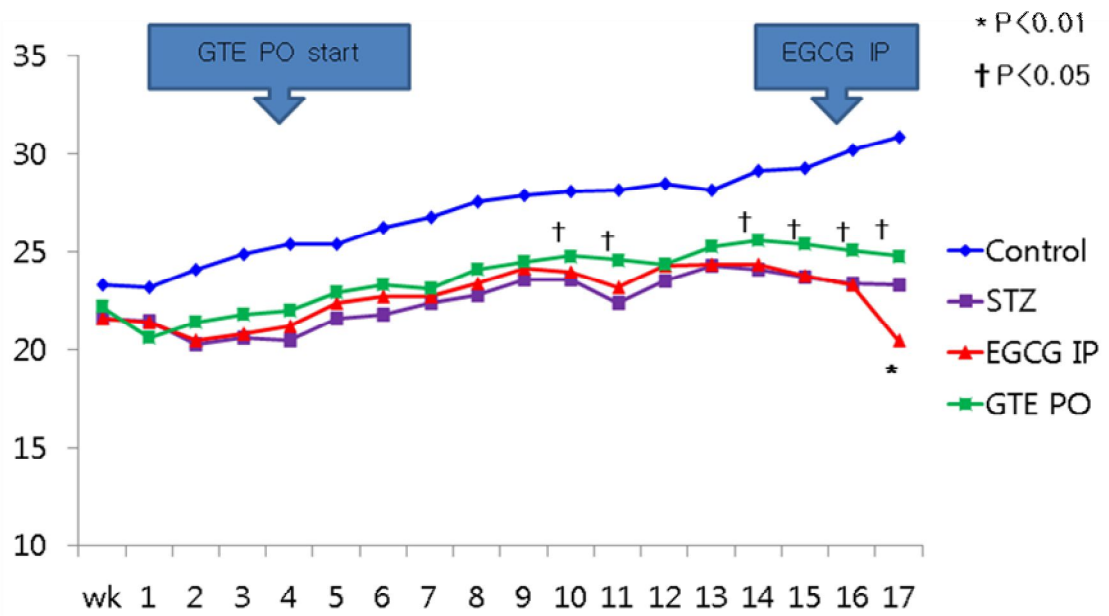


Figure 3. Changes of body weight in mice. * $p < 0.05$: STZ group vs. EGCG IP group, † $p < 0.05$: STZ group vs. GTE PO group

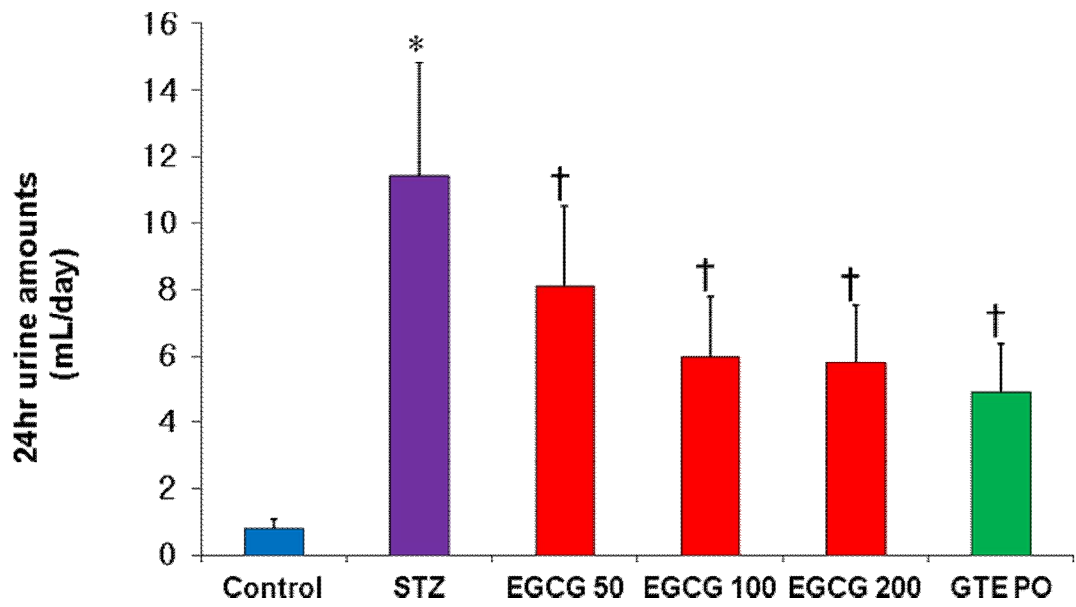


Figure 4. 24hr urine amount in mice. * $p < 0.01$: control group vs. STZ group, † $p < 0.05$ vs. STZ group

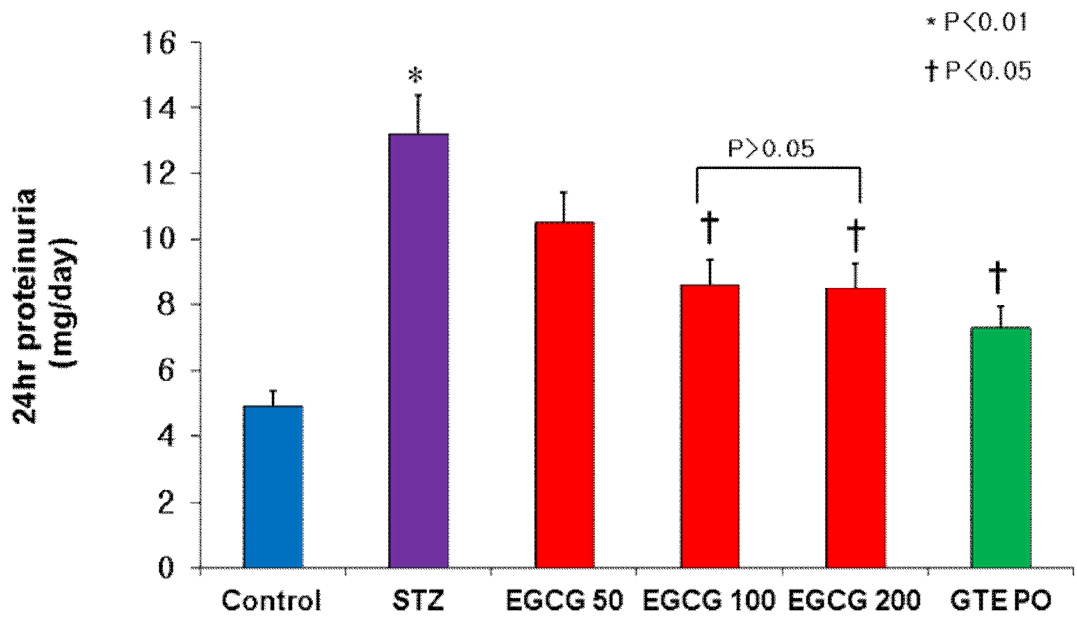


Figure 5. Changes of 24hr proteinuria amount in mice. *p < 0.01: control group vs. STZ group, †p < 0.05 vs. STZ group

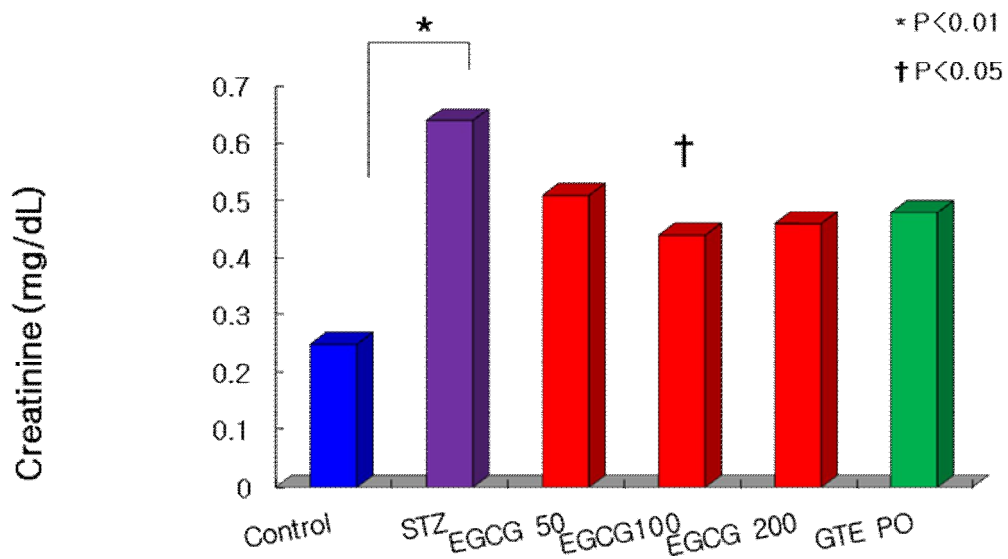


Figure 6. Serum creatinine level in mice. * $p < 0.01$: control group vs. STZ group, † $p < 0.05$ vs. STZ group

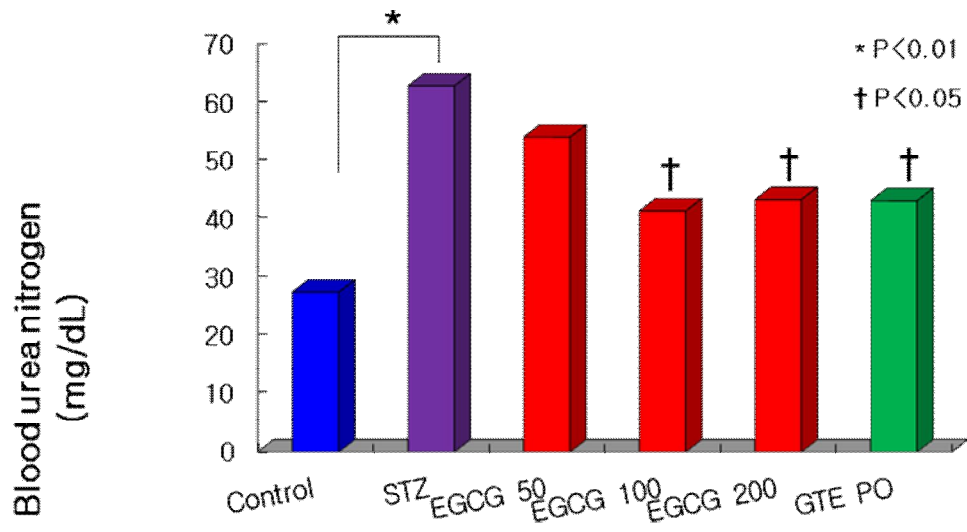


Figure 7. Blood urea nitrogen level in mice. *p < 0.01: control group vs. STZ group, † p < 0.05 vs. STZ group

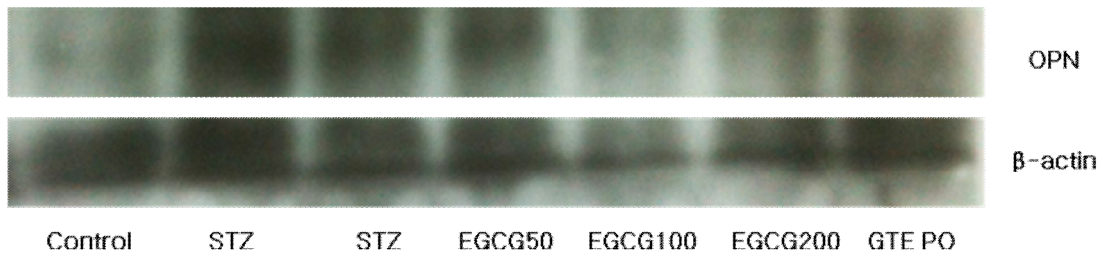


Figure 8. Western blot analysis of osteopontin protein expression. In streptozotocin (STZ) group, osteopontin (OPN) protein expression was higher than that of control group. In EGCG100, EGCG200 group and GTE PO group, OPN protein expression was decreased than that of STZ group. The data was normalized with β -actin expression.

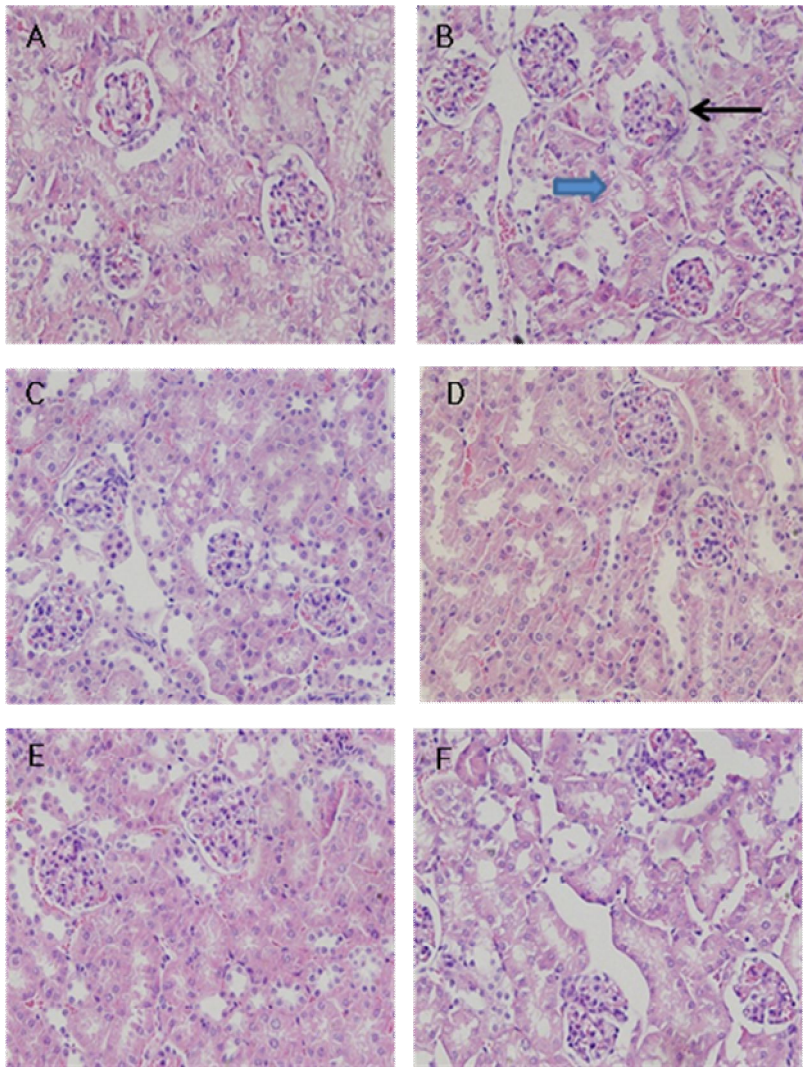


Figure 9. Renal pathologic examination in mice kidney (HE staining). Photomicrograph of control group (A), streptozotocin (STZ) injected group (B), STZ with EGCG 50 mg/kg treated group (C), STZ with EGCG 100 mg/kg treated group (D), STZ with EGCG 200 mg/kg treated group (E) and STZ with GTE PO treated group (F). Photomicrograph of STZ treated mice (B) showing a diabetic glomerulosclerosis (right blue arrow) and tubular atrophy (left black arrow). X 100.

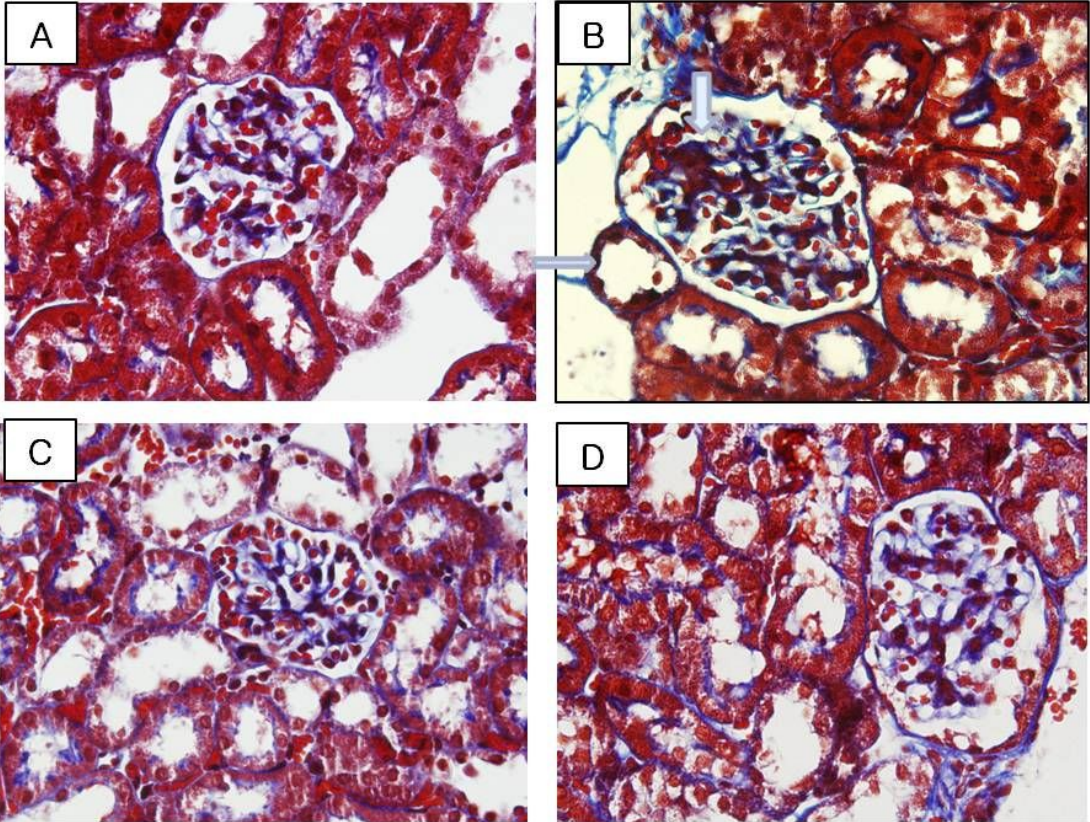


Figure 10. Renal pathologic examination in mice kidney (MT staining). Photomicrograph of control group (A), streptozotocin (STZ) injected group (B), STZ with EGCG 100 mg/kg treated group (C) and STZ with GTE PO treated group (D). Photomicrograph of STZ treated mice (B) showing a diabetic glomerulosclerosis, increased mesangial matrix (down arrow) and tubular atrophy, diffuse thickening of tubular basement membrane (right arrow). X 200.

IV. 고찰

스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)은 분자량 265이고 구조식은 $C_{14}H_{27}N_5O_{12}$ 를 가지는 glucosamine-nitrosurea 항생제로서 [Lewis et al., 1959; Dorr & Fritz, 1980], 췌장의 베타세포에 대한 독성을 가지고 있어서 인슐린 의존성 당뇨병 동물 모델을 만드는데 널리 사용된다 [Punithavathi et al., 2008; Fadillioglu et al., 2008]. STZ은 췌장 베타세포에 비가역적인 손상을 주고 탈 과립(degranulation)을 일으켜서 인슐린 분비 능력을 상실시키며 [Gu et al., 1997], 흰쥐에 복강 또는 정맥으로 투여하면 췌장 인슐린염(pancreatic insulinitis)을 발생시키고 인슐린을 분비하는 베타세포를 파괴하여 당뇨병을 유발한다. STZ의 투여 용량은 쥐(rats)에 STZ 45 mg/kg을 복강으로 투여하면 고혈당을 유발하고, 65 mg/kg을 투여하면 고혈당과 위점막 궤양을 초래한다 [Piyachaturawat et al., 1990]. 당뇨병성 신병증 흰쥐(mice)를 만드는 방법은 고용량(high-dose)과 저용량(low-dose) STZ을 투여하는 것으로 나뉜다 [Breyer et al., 2005]. 고용량 STZ 방법은 150-200 mg/kg을 한차례 투여하는 것이고 저용량 STZ 방법은 40-50 mg/kg을 복강으로 매일 5일 동안 투여하는 방법이다. 고용량 STZ를 투여한 군이 저용량 STZ를 투여한 군보다 단백뇨가 더 많이 발생하고 고혈당의 정도는 서로 유사하여 본 연구에서도 고용량 STZ 방법을 이용하여 당뇨병성 신병증 동물 모델을 만들었다 [Breyer et al., 2005].

당뇨병성 신병증은 당뇨병 환자에서 주요한 미세혈관 합병증(microvascular complication)이고 말기신부전 환자의 가장 중요한 원인 질환이다. 당뇨병성 신병

증의 발생은 전통적으로 혈액학적 원인과 대사 장애로 발생하나 [Cooper et al., 2001], 신장 손상이 진행되는 것은 이차적으로 전신 또는 사구체내의 압력이 상승하거나 고혈당 하에서 분자 변형으로도 완벽하게 설명하지 못하는 실정이다. 당뇨병성 신병증의 병태생리학적 원인은 매우 다양하며(multifactorial) 복합적인 병태기전들이 유전적인 인자와 환경적인 인자들을 자극하여 발생한다 [Wolf et al., 2004; Martini et al., 2008]. 당뇨병성 신병증의 원인은 세포와 분자 수준까지 연구가 되고 있으며 염증(inflammation)이 병태생리학적 기전에 중요한 요소로 발견되었고 염증 분자들과 전달물질(mediators)들이 당뇨병성 신장 질환의 초기에 중요한 요소들이며 당뇨병성 신장 손상의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다. 당뇨병성 신병증의 조직 검사 소견은 사구체 경화증(glomerulosclerosis), 세뇨관 위축(tubular atrophy), 세포외 기질(extracellular matrix)의 축적과 사이질의 섬유화(interstitial fibrosis)를 특징으로 한다. 특히, 세뇨관사이질 영역이 당뇨병에서 신 부전을 일으키는 것과 관련이 있다 [Ziyadeh et al., 1991]. 세뇨관의 위축과 확장 그리고 사이질에 과도한 콜라겐의 침착이 세뇨관사이질 손상의 특징적이 소견이다. 단핵구의 침착이 이 과정에서 중요한 특징이며 OPN이 이러한 과정을 매개한다 [Yu et al., 2000].

OPN은 1985년 처음 소개되었으며 뼈 기질의 인당단백질 성분이고 신장, 뇌, 척장, 혈관에 존재한다 [Franzen et al., 1985; Butler et al., 1989; Brown et al., 1992]. OPN은 다양한 상피 세포(epithelial cells)와 암세포에 연관이 있으며 대식세포와 림프구와도 연관이 있다. OPN은 다양한 인테그린(integrins)과 상호작용을 통하여

세포의 부착(adhesion)과 이동(migration)에 관여할 뿐만 아니라 단핵구와 혈관 민 무늬근육세포(vascular smooth muscle cell)의 강력한 화학인자(chemokine)이다 [Denhardt et al., 1993]. OPN은 악성종양, 동맥경화, 상처 치유, 감염, 면역, 심근 remodeling, multiple sclerosis와 같은 다양한 병태생리에 관여한다 [Singh et al., 1999; Liaw et al., 1998; Liaw et al., 1994; Crawford et al., 1998; Chabas et al., 2001; Trueblood et al., 2001]. OPN은 발생학적으로 인간 신장에 존재하며 성인에서는 헨 레 고리의 thick ascending limb과 원위 세뇨관에 존재하며 [Hudkins et al., 1999] 신장 질환의 동물 모델에서는 보호작용과 유해작용이 모두 있다. OPN은 급성 세뇨관 손상을 회복시킨다고 알려져 있음에도 불구하고 염증성 사구체 신염 (inflammatory glomerulonephritis), 폐쇄성 요로장애 (obstructive uropathy), 세뇨관사 이질 질환을 일으킨다 [Noiri et al., 1999; Ophascharoensuk et al., 1999; Hwang et al., 1994; Diamond et al., 1995]. 또한 angiotensin II를 쥐에 피하로 주입하면 세뇨관사 이질 손상이 발생하고 대식세포가 침윤하였으며 손상된 부위에서 OPN이 상승 하는 것을 관찰하였다 [Giachelli et al., 1994]. 보고에 의하면 신장 조직의 OPN mRNA와 OPN 단백질이 STZ으로 유발한 당뇨 쥐의 근위세뇨관에서 정상군에 비 하여 상승하였으며 대식세포의 침윤 영역도 증가하였고 [Fischer et al., 1998; Kelly et al., 2002], 신장 내의 OPN up-regulation이 만성 진행성 사구체경화증 질환 조직 에서 관찰되었다 [Narita et al., 1997]. 제2형 당뇨병 흰쥐 모델의 신장 피질에서 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)가 활성화되고 OPN의 생성이 증가하였으며 [Feliars et al., 2001], 유전자 발현 연구에서 OPN이 높은 군에서 심한 단백뇨가 관 찰되고 사구체경화증이 심하였다 [Susztak et al., 2004]. 본 실험에서도 STZ을 흰

쥐에 투여하였을 때 단백뇨가 증가하고, 신장 조직의 OPN 단백 발현이 증가하는 것을 Western blot에서 확인할 수 있었다.

녹차는 세계에서 가장 많이 소비되는 기호식품들 중의 하나로 많은 성분을 포함하고 있으며 그 중에서 폴리페놀(polyphenols)이 주된 성분으로 많은 질환들에 대한 위험도를 낮춘다[Jian et al., 2004; Wu et al., 2003; Setiawan et al., 2002]. 카테킨(catechins)은 녹차의 주요 활성 물질로서 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC) 그리고 (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)로 구분된다 [Graham et al., 1992]. 많은 in vitro 연구들에서 카테킨은 퇴행성 질환에 대한 예방 효과가 있음이 밝혀졌으나 [Nie et al., 2002; Adcocks et al., 2002; Nakagawa et al., 2002], 이들 연구들은 고농도의 카테킨을 사용하였고 동물에서 발견되는 일반적인 카테킨 농도를 반영하지는 못해서 이후 많은 in vivo 연구들이 발표되었다. 햄스터에서 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)로 유발한 구강암에 대한 예방 효과가 보고되었고 [Li et al., 1999; Li et al., 2002], 흰쥐를 대상으로 N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)로 유발한 십이지장암이나 쥐에서 azoxymethane (AOM)으로 유발한 대장암에서 암세포의 수를 줄였다 [Yamane et al., 1996]. 소화기암에 대한 녹차의 효과는 암세포의 증식을 억제하고 자멸사(apoptosis)를 유도하는 것으로 밝혀졌고, 이는 녹차가 소화기관에 흡수되지 않고 고농도로 존재하면서 십이지장암과 대장암 세포들과 직접적으로 작용하는 것으로 이해되고 있다 [Chen et al., 1997]. 흰쥐를 대상으로 4-methylnitrosamino -1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)로 유발한 폐암에서 녹차가 암세포 수를 감소시켰으며,

diethylnitrosamine (DENA)로 유발시킨 폐암에서도 암세포 수를 감소시켰다 [Xu et al., 1992; Sazuke et al., 1995; Cao et al., 1996]. 폐암에 대한 녹차의 작용은 항암제 (antitumorigenic agents)와 면역 증강제(immune modulators)로서 작용하는 것으로 생각된다. 쥐를 대상으로 DNEA로 유발한 간암에서는 녹차가 간암의 크기, 수와 용적을 감소시키는 것으로 나타났다 [Cao et al., 1996; Hirose et al., 1995; Zhang et al., 2002]. 그 외에도 유방암과 전립선 암에도 암세포의 성장과 진행을 억제한다는 보고들이 있다 [Tanaka et al., 1997; Gupta et al., 2001]. 심혈관계 질환에 대한 녹차의 효과는 항산화 효과와 항산화 효소의 활성화와 연관이 있다. 고혈압 쥐에서 녹차가 혈압을 낮추었고 [Negishi et al., 2004], 총 콜레스테롤과 중성지방의 혈중 농도를 감소시켰다 [Raederstorff et al., 2003]. EGCG가 생체에 미치는 영향에 대한 작용 기전은 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)에 의하여 유도한 세포의 microsome 내에 prostaglandins (PG)의 증가를 차단하고, orotidine 5-phosphate decarboxylase 생산을 억제하거나 free radical의 생성을 줄이며, protein kinase C와 cellular proliferation을 억제한다. 또한 EGCG는 phase II 효소들인 glutamyl S-transferase, glutathione peroxidase, catalase 등을 증가시키고 tumor promoter와 호르몬 등이 수용체와 결합하는 것을 차단하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [Morrisey et al., 1996].

당뇨병은 일반적으로 미세혈관병증(microvascular dysfunction)을 동반한다. thromboxane A₂ (TXA₂)와 prostacyclin I₂ (PGI₂)는 정상 신장 조직에서 생성되고 조절되며 항상성 (homeostasis) 유지에 중요한 요소들이다. PGI₂:TXA₂ 비율이 변형되면 신장 세뇨관에서 트롬빈형성(thrombogenesis)을 유도하고 신기능을 악화

시키며 동맥경화가 심해진다. 이들 성분들의 생성은 phospholipase A2의 활성도와 지방산의 구성에 달려있다. STZ는 TXA2의 합성을 증가시키고 PGI2의 생성을 감소시키지만 녹차 카테킨은 TXA2의 생합성을 감소시키고 PGI2의 생성을 증가시켜 신기능을 회복하며, 이는 녹차 카테킨이 트롬빈의 형성을 억제하고 아라키돈산 연속단계(arachidonic acid cascade system)를 조절하기 때문이다 [Rhee et al., 2002]. 또한 녹차 카테킨은 STZ를 투여한 당뇨 쥐에서 PGI2:TXA2 비율을 정상화시키고 phospholipase A와 cyclooxygenase의 활성도를 감소시켜 항혈전 효과(antithrombotic effects)를 가진다 [Yang et al., 1999]. 녹차 카테킨은 cisplatin 유발 신병증 쥐에서 사구체 여과율을 증가시키고 catalase의 활성도를 증가시켰으며 [Yokozawa et al., 1999], 또한 alloxan 유발 신병증 쥐에서 혈당을 감소시키고 지질 과산화(lipid peroxidation)를 떨어뜨리며 SOD의 활성도를 증가시켜 신기능을 호전시켰다 [Sabu et al., 2002]. 이는 녹차 카테킨이 신장에서 활성산소를 감소시키는 것을 보여준다. 본 연구는 EGCG가 STZ으로 유발한 제1형 당뇨병성 신병증 흰쥐에서 혈당을 떨어뜨리고 단백뇨의 유의한 감소를 가져왔으며 신기능을 회복시켰고 신장조직에서 형태학적으로 호전된 결과를 얻었으며, 그 작용 기전으로 OPN 단백질의 발현이 신장 조직에서 감소된다는 것을 밝혀내었다.

V. 결론

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

EGCG는 STZ으로 유발된 당뇨병성 신병증 흰쥐에서 신기능을 회복시켜주고 단백뇨를 줄였으며 손상된 신장 조직을 회복시켰고, 그 작용기전으로 당뇨병성 신병증의 병태생리에 중요한 역할을 하는 OPN의 단백 발현이 신장 조직에서 감소한다는 것을 밝혀냈다. 본 연구를 토대로 EGCG는 당뇨병성 신병증 환자에서 신기능 회복과 단백뇨 감소 효과를 기대할 수 있으며, 추후 인간에서 당뇨병성 신병증에 이용하여 환자의 치료와 질환의 진행을 억제하는 기초자료로서 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다고 할 수 있다.

참고문헌

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

Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. 1992. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3:1169-1180.

Butler WT. 1989. The nature and significance of osteopontin. *Connect. Tissue Res.* 23; 123-136.

Cao J, Xu Y, Chen J, Klaunig JE. 1996. Chemopreventive effects of green and black tea on pulmonary and hepatic carcinogenesis. *Fundam Appl Toxicol.* 29:244-250.

Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman. 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294:1731-1735.

Cooper ME. 2001. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 44:1957-1972 .

Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. 1998. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Res* 58:5206- 5215.

Denhardt DT, Guo X. 1993. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7:1475-1482.

Diamond JR, Kees-Folts D, Ricardo SD, Pruznak A, Eufemio M. 1995. Early and persistent up-regulated expression of renal cortical osteopontin in experimental hydronephrosis. *Am J Pathol* 146:1455-1466.

Dorr RT, Fritz WL. 1980. Cancer chemotherapy. Hand book. London, Kinapton, pp.632-37.

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

Feliers D, Duraisamy S, Faulkner JL, Duch J, Lee AV, Abboud HE, Choudhury GG, Kasinath BX. 2001. Activation of renal signaling pathways in db/db mice with type 2 diabetes. *Kidney Int* 60:495-504.

- Fischer JW, Tschöpe C, Reinecke A, Giachelli CM, Unger T. 1998.** Upregulation of osteopontin expression in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats is mediated by bradykinin. *Diabetes* 47:1512–1518.
- Franzen A, Heinegard D. 1985.** Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232:715–724.
- Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S. 2001.** Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 286:421-426.
- Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM, Johnson RJ. 1994.** Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 45:515–524.
- Graham HN. 1992.** Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21:334–350.
- Gu D, Arnush M, Sarvetnic N. 1997.** Endocrine/exocrine intermediate cells in Streptozotocin treated Ins-IFN-gamma transgenic mice. *Pancreas* 15:246-250.
- Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H. 2001.** Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl Acad Sci* 98:10350–10355.
- Higashibata Y, Sakuma T, Kawahata H, Fujihara S, Moriyama K, Okada A, Yasui T, Kohri K, Kitamura Y, Nomura S. 2004.** Identification of promoter regions involved in cell- and developmental stage-specific osteopontin expression in bone, kidney, placenta, and mammary gland: an analysis of transgenic mice. *J Bone Miner Res* 19:78–88.
- Hirose M, Hasegawa R, Kimura J, Akagi K, Yoshida Y, Tanaka H, Miki T, Satoh T, Wakabayashi K, Ito N. 1995.** Inhibitory effects of 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ), green tea catechins and other antioxidants on 2-amino-6-methylidipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1)-induced rat hepatocarcinogenesis and dose-dependent inhibition by HTHQ of lesion induction by Glu-P-1 or 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx). *Carcinogenesis* 16:3049–3055.
- Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y, Couser WG, Johnson RJ, Alpers CE. 1999.** Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. *J Am Soc Nephrol* 10:444–457.
- Hwang SM, Wilson PD, Laskin JD, Denhardt DT. 1994.** Age and development-related changes in osteopontin and nitric oxide synthase mRNA levels in human kidney proximal tubule epithelial cells: contrasting responses to hypoxia and reoxygenation. *J Cell Physiol* 160:61–68.
- Jian L, Xie LP, Lee AH, Binns CW. 2004.** Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *Int J Cancer* 108:130–135.

Junaid A, Amara FM. 2004. Osteopontin: correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and PI3-kinase-mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells. *Histopathology* 44:136–146.

Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Ricardo SD, Cox AJ, Gilbert RE. 2002. Progression of tubulointerstitial injury by osteopontin-induced macrophage recruitment in advanced diabetic nephropathy of transgenic (mRen-2)²⁷ rats. *Nephrol. Dial. Transplant* 17:985–991

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

Kramer AB, Ricardo SD, Kelly DJ, Waanders F, van Goor H, Navis G. 2005. Modulation of osteopontin in proteinuria-induced renal interstitial fibrosis. *J Pathol* 207:483–492.

Kramer CK, Leitao CB, Pinto LC, Silveiro SP, Gross JL, Canani LH. 2007. Clinical and laboratory profile of patients with type 2 diabetes with low glomerular filtration rate and normoalbuminuria. *Diabetes Care* 30:1998-2000.

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

Li N, Han C, Chen J. 1999. Tea preparations protect against DMBA-induced oral carcinogenesis in hamsters. *Nutr Cancer* 35:73–79.

Li N, Chen X, Liao J, Yang G, Wang S, Josephson Y, Han C, Chen J, Huang MT, Yang CS. 2002. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis* 23:1307–1313.

Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. 1994. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 74:214–224.

Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. 1998. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1) *J Clin Invest* 101:1468–1478.

Maity S, Vedasiromoni JR, Ganguly DK. 1998. Role of glutathione in the antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn J Pharmacol* 78:285-292

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

Martini S, Eichinger F, Nair V, Kretzler M. 2008. Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge. *Rev Endocr*

Meta. Disord 9:267–274

Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW; American Diabetes Association. 2004. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 27(suppl 1):S79-S83.

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

Narita I, Nakayama H, Goto S, Takeda T, Sakatsume M, Saito A, Nakagawa Y, Arakawa M. 1997. Identification of genes specifically expressed in chronic and progressive glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl* 63:S215–217.

National Kidney Foundation. 2007. KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 49(2)(suppl 2):S12–S154.

Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. 2004. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 134:38–42.

Noiri E, Dickman K, Miller F, Romanov G, Romanov VI, Shaw R, Chambers AF, Ritting SR, Denhardt DT, Goligorsky MS. 1999. Reduced tolerance to acute renal ischemia in mice with a targeted disruption of the osteopontin gene. *Kidney Int* 56:74–82.

Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P, Liaw L, Schmidt R, Shankland SJ, Alpers CE, Couser WG, Johnson RJ. 1999. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 56:571–580.

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

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

Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. 2003. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem* 14:326–332.

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

Sazuka M, Murakami S, Isemura M, Satoh K, Nukiwa T. 1995. Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells. *Cancer Lett*

98:27–31.

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

Shin BC, Ryu HH, Chung JH, Lee BR, Kim HL. 2009. The protective effects of green tea extract against L-arginine toxicity to cultured human mesangial cells. *J Korean Med Sci* 24(Suppl):S204-S209

Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW, Bing OH, Colucci WS. 1999. Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension* 33:663–670.

Susztak K, Bottinger E, Novetsky A, Liang D, Zhu Y, Ciccone E, Wu D, Dunn S, McCue P, Sharma K. 2004. Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease. *Diabetes* 53:784–794.

Tanaka H, Hirose M, Kawabe M, Sano M, Takesada Y, Hagiwara A, Shirai T. 1997. Post-initiation inhibitory effects of green tea catechins on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 116:47–52.

Trachtman H, Futterweit S, Garg P. 1996. Nitric oxide stimulates the activity of a 72-kDa neutral matrix metalloproteinase in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 218:704-708.

Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH, Apstein CS, Colucci WS, Singh K. 2001. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 88:1080–1087.

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

Weber GF. 2001. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1552:61–85. 32.

Weir MR. 2007. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2:581-590.

Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, Liaw L, Alpers CE, Couser WG, Kleinman JG, Hughes J. 2003. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 14:139–147.

Wolf G. 2004. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from

haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest* 34:785–796.

Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Hankin J, Pike MC. 2003. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *Int J Cancer* 106:574–579.

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

Yamane T, Nakatani H, Kikuoka N, Matsumoto H, Iwata Y, Kitao Y, Oya K, Takahashi T. 1996. Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer* 77:1662–1667.

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.

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.

Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. 2002. Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:711–716.

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

국 문 초 록

흰쥐에서 스트렙토조토신 유발 당뇨병성 신병증에 대한 EGCG의 치료 효과

안 치 용

지도교수; 정 종 훈

조선대학교 내과학교실

배경: 당뇨병성 신병증은 당뇨병의 가장 심각한 합병증 중의 하나로 만성신부전의 가장 흔한 원인이다. 녹차추출물은 항산화 효과가 알려져 있으며 그 중에서 EGCG (epigallocatechin gallate)가 가장 뛰어나다. 오스테오폰틴(osteopontin, OPN)은 인당단백질 부착 분자로 당뇨병성 신병증의 병태생리에 중요한 인자로 알려져있다. 이에 저자들은 EGCG 가 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ) 유발 당뇨병성 신병증 흰쥐에서 치료 효과가 있는지를 알아보고 OPN 과의 연관성을 밝히고자 한다.

방법: 흰쥐 42 마리를 다음과 같이 분류하였다. 대조군은 7 마리로 생리식염수를 복강으로 투여하였으며 STZ 투여군은 STZ 200 mg/kg 을 복강으로 투여하였고 당뇨병성 신병증을 유발시켰다 (STZ 군, 7 마리). EGCG 투여군은 21 마리로 STZ 200 mg/kg 을 복강으로 투여하고 16 주 뒤에 7 마리씩 3 군으로 다시 분류하여 EGCG 를

50 mg/kg (EGCG50 군), 100 mg/kg (EGCG100 군), 200 mg/kg (EGCG200 군)을 복강으로 2 일 간격으로 3 차례 투여하였다. GTE 군은 STZ 를 같은 방법으로 투여한 후 4 주 뒤에 요봉지법(dipstick test)으로 단백뇨가 관찰되는 것을 확인하고 0.1% GTE 용액 10 mL 를 구강으로 매일 13 주간 투여하였다 (GTE PO 군, 7 마리). 17 주 때 흰쥐를 희생하여 혈액을 채취하고 양쪽 신장을 절제하였다. 혈당, 혈중요소질소, 크레아티닌, 24 시간 소변량과 단백뇨를 측정하였고 OPN 단백 발현을 위한 Western blot 를 실시하였다. 신장 조직은 HE 염색과 MT 염색을 실시하였다.

결과: 혈당과 혈중요소질소, 크레아티닌, 24 시간 단백뇨 정도는 STZ 투여군에서 대조군에 비하여 증가하였으며 녹차추출물과 EGCG 를 투여한 군에서 STZ 투여군에 비하여 감소하였다. OPN 단백 발현은 STZ 투여군에서 대조군에 비하여 증가하였으며 EGCG 투여군에서 STZ 군에 비하여 유의있게 감소하였다. 신장 조직검사에서 STZ 투여군은 사구체 경화증이 있고 세뇨관 위축이 보이고 사이질의 섬유화가 관찰되었으나 EGCG 투여군에서는 이러한 변화들이 보이지 않았다.

결론: EGCG 는 STZ 로 유발한 당뇨병성 신병증 흰쥐에서 신기능을 회복시키고 단백뇨 량을 감소시켰으며 신장 조직에서 OPN 의 단백 발현을 감소시켰다. EGCG 가 당뇨병성 신병증 환자의 치료와 질환의 진행을 억제하는 치료제로 사용될 가능성을 제시한다.

저작물 이용 허락서

학과	의학과	학번	20097219	과정	박사
성명	한글: 안 치 용 한문 : 安 致 勇 영문 : Ahn Chi Yong				
주소	광주광역시 남구 진월동 삼익세라믹 1차 103동 1203호				
연락처	E-MAIL : dralchemist@naver.com				
논문 제목	한글 : 흰쥐에서 스트렙토조토신 유발 당뇨병성 신병증에 대한 EGCG의 치료 효과 영문 : Therapeutic effects of epigallocatechin gallate on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2012 년 1월 일

저작자: 안 치 용 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하