알파-리포산이 비만형 제2형 당뇨병 백서 모델의 단백뇨 및 신장 TGFβ 발현에 미치는 효과

서울적십자병원 내과, 한림대학교 의과대학 내과학교실[1] 한양대학교 의과대학 내과학교실[2]

강석우 · 이성진[1] · 김동선[2] · 김태화[2]

The Effect of *α*-Lipoic Acid on Proteinuria and Renal TGFβ Expression in Obese Type 2 Diabetic Rat Model

Seok Woo Kang, Seong Jin Lee[1], Dong-Sun Kim[2], Tae Wha Kim[2]

Department of Internal Medicine, Seoul Red Cross Hospital;
Department of Internal Medicine[1] College of Medicine, Hallym University; and
Department of Internal Medicine[2] College of Medicine, Hanyang University

Abstract

Background: It is well known that renal TGFβ expression is related to the development of diabetic nephropathy. Alpha-lipoic acid (ALA), a potent antioxidant and cofactor of mitochondrial respiratory enzymes, can improve the insulin resistance and the vascular endothelial dysfunction, and suppresses the development of diabetic vascular complications. This study was undertaken to investigate whether ALA could reduce urinary protein excretion and renal TGFβ protein expression in obese type 2 diabetes mellitus animal model, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat.

Methods: Obese 30 male OLETF rats were randomly divided to 3 groups at the age of 30 weeks. The rats in the Control group fed normal rat chow while the rats in the ALA group were fed with rat chow containing ALA (0.5% of food weight). Ten rats in the Pair-fed group were fed with normal rat chow, but were given the same amount of food as consumed by the ALA group. During 5 weeks of ALA feeding, food intake and body weight were checked in metabolic chamber. Blood glucose levels, HbA1c and urinary protein excretion were measured at 30 weeks and 35 weeks of age, and renal TGFβ protein expression at 35 weeks of age was measured by Western blot and represented by relative unit (RU). Immunohistochemical staining for TGFβ protein in renal tissue was also examined at 35 weeks of age.

Results: Food intake, body weight, blood glucose levels, HbA1c and urinary protein excretion among the Control, ALA and Pair-fed groups at 30 weeks of age were not different. At 35 weeks of age, food intake was significantly decreased in the ALA group than the Control group (Control group vs. ALA group, 27.7 ± 1.1 g/day vs. 22.4 ± 1.4 g/day, $P < 0.001$), and body weight was significantly decreased in the ALA group than the Control and Pair-fed groups (Control group: 694.4 ± 10.3 g, ALA group: 600.4 ± 7.4 g, Pair-fed group: 685.4 ± 11.6 g, $P < 0.001$). Blood glucose levels were significantly decreased in the ALA group than the Control and Pair-fed groups (Control group: 157.7 ± 4.6 mg/dL, ALA group: 130.7 ± 4.8 mg/dL, Pair-fed group: 153.7 ± 3.3 mg/dL, $P < 0.001$) although blood glucose levels from 30 weeks to 34 weeks of age and HbA1c at 35 weeks of age were not different among the groups. Urinary protein excretion and renal TGFβ protein expression were significantly decreased in the ALA group than the Control and Pair-fed groups (urinary protein excretion, Control group: 5.033 ± 0.254 mg/mgCr, ALA group: 3.633 ± 0.303 mg/mgCr,

접수일자: 2007년 10월 8일, 통과일자: 2008년 1월 11일, 책임저자: 김태화, 한양대학교 의과대학 내과학교실

Pair-fed group: 4.977 ± 0.339 mg/mgCr, $P < 0.001$; renal TGFβ protein expression, Control group: 7.09 ± 0.17 RU, ALA group: 4.14 ± 0.26 RU, Pair-fed group: 7.00 ± 0.29 RU, $P < 0.001$). In the ALA group at 35 weeks of age, urinary protein excretion and renal TGFβ protein expression were positively related in the Control, ALA and Pair-fed groups (Control group, r = 0.847, $P = 0.002$; ALA group, r = 0.954, $P < 0.001$; Pair-fed group, r = 0.858, $P = 0.002$). TGFβ staining in glomeruli was observed in all groups but was decreased in the ALA group at 35 weeks of age.

Conclusion: These results suggest that ALA may prevent the increase of food intake, body weight, blood glucose, urinary protein excretion and renal TGFβ protein expression in obese type 2 diabetic rat model. The effect of ALA on diabetic nephropathy presented as proteinuria and renal TGFβ expression in diabetic patients needs to be further clarified. **(KOREAN DIABETES J 32:21~29, 2008)**

Key Words: Diabetes, Transforming growth factor β, α-lipoic acid

서 론

당뇨병성 신증은 당뇨병환자의 35~40%에서 발생하며 말기 신부전의 가장 흔한 원인이고 당뇨병에 의한 입원과 사망의 주원인으로 알려져 있는데[1] 지속적인 고혈당과 동반된 다양한 성장인자와 안지오텐신 II의 증가, 세포외 기질의 증가, 사구체 기저막의 비후, 신장 내 미세순환의 변화 등에 의한 사구체의 구조적, 기능적 변화에 의하여 발생함이 보고되어 있다[2-5]. Transforming growth factor β (TGFβ)는 당뇨병 동물 모델과 당뇨병환자의 손상된 신장에서 메산지움 세포의 비대, 세포외 기질의 축적, 사구체 기저막의 비후, 세포간질의 섬유화, 사구체 경화증을 유발함으로써 당뇨병성 신증의 발생과 진행에 깊이 관여함이 알려져 있다[6-9].

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 백서는 1993년 일본에서 확립된 당뇨병 동물 모델로 출생 후 점차 비만해지다가 24주경 당뇨병이 발생하는데 제2형 당뇨병환자처럼 비만, 인슐린저항성, 고혈당을 특징적으로 나타내므로 비만형 제2형 당뇨병 동물 모델로 널리 이용되고 있다[10,11]. OLETF 백서의 체중은 14주와 46주 사이에 급격히 증가하다가 이후에 천천히 증가하며 혈당은 연령이 증가함에 따라 상승하여 14주째 당뇨병 전단계, 30주째 제2형 당뇨병, 54주째 제1형 당뇨병의 특징을 각각 나타낸다[12].

알파-리포산은 미토콘드리아 내에 존재하는 pyruvate dehydrogenase의 중요한 보조인자로[13] OLETF 백서에서 당뇨병 예방 효과와 혈관내피세포 기능개선 효과를 나타내는 한편[14-19] 먹이 섭취를 억제하고 에너지 대사를 촉진함으로써 체중 감소 효과를 나타내며[20] 당뇨병환자에서 당뇨병성 신경병증의 치료에 이용되고 있으나 다른 당뇨병성 미세혈관 합병증, 특히 당뇨병성 신증에 미치는 영향에 대하여 아직까지 거의 연구되지 않은 실정이다.

저자들은 본 연구를 통하여 비만형 제2형 당뇨병 동물 모델인 OLETF 백서에서 알파-리포산 투여 전후 먹이 섭취량, 체중, 혈당, 요중 단백 양, 신장 내 TGFβ 단백 발현의 변화들을 분석함으로써 알파-리포산이 당뇨병과 당뇨병성 신증에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

5주령의 비만형 제2형 당뇨병 백서 모델인 OLETF 백서 수컷 30마리를 일본 Otsuka 연구소에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 모든 백서는 5주에서 30주까지 적정온도(23 ± 2℃)와 적정습도(60 ± 10%)가 유지되는 무균실(specific pathogen free, SPF)에서 사육되었으며 물과 사료를 제한 없이 공급하였다.

2. 연구 방법

1) 실험군 배정

30주령의 OLETF 백서 수컷 30마리를 10마리씩 세 군으로 나누어 각 군에 포함된 백서의 평균 체중과 평균 혈당이 같도록 배정한 후 30주에서 35주까지 5주 동안 metabolic chamber에서 사육하였다. 대조군(10마리)은 일반 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 알파-리포산 투여군(10마리)은 알파-리포산이 사료 무게의 0.5% 함유된 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였고 먹이섭취 제한군(10마리)은 일반 사료를 섭취하되 먹이 섭취량이 알파-리포산 투여군과 일치하도록 제한하였다. 실험에 이용된 알파-리포산은 Viatris GmbH & Co. KG (Frankfurt, Germany)로부터 기증받았다.

30주째와 35주째 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 요중 단백 및 크레아티닌 양을 각각 측정하였으며 35주째 당화혈색소를 측정하였다. 먹이 섭취량, 체중은 3번씩, 공복 혈당, 요중 단백 및 크레아티닌 양, 당화혈색소는 2번씩 측정하여 평균값을 계산하였다.

2) 공복 혈당 및 당화혈색소 측정

12시간 공복 상태에서 꼬리정맥 혈액을 채혈한 후 glucose oxidase법으로 공복 혈당을 측정하였으며 HPLC법으로 당화혈색소를 측정하였다.

3) 요중 단백 및 크레아티닌 양 측정

24시간 동안 모은 소변을 3,000 g에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액에서 Coomassie quantitative reaction법으로 요중 단백 양을 측정하였으며 요중 크레아티닌 양으로 보정하였다.

3. 신장 내 TGFβ 단백 발현 측정

35주째 실험 종료 후 신장을 적출하여 Western blot법으로 TGFβ 단백 발현 정도를 측정하였다. 간략하게 기술하면 적출한 신장을 잘라서 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 650 mM NaCl, 5% Triton X-100, 200 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, 0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine)에 넣은 후 균질화시키고 13,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 총 단백 100 ug을 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리한 후 membrane transfer시켰다. 1차 항체로 rabbit TGFβ polyclonal antibody (Santa Cruz), 2차 항체로 anti-rabbit Ig horseradish peroxidase-linked whole antibody (Amersharm Biosciences, UK)를 반응시킨 후 ECL western blot detection reagent (Amersharm Biosciences, UK)를 반응시켜 영상을 얻었으며 internal control로 β-actin을 이용하였다. 측정된 TGFβ 단백 양은 동시에 측정된 β-actin 단백 양으로 보정되었으며 이를 상대 단위(relative unit, RU)로 표시하였다.

4. 면역조직화학염색

35주째 TGFβ 단백에 대한 면역조직화학염색은 TGFβ 단클론항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 이용하여 시행되었으며 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 Paramount (Dako, Glostrup, Denmark)로 표본 제작하였다. 일차 항체가 없는 표본을 음성 대조군으로 설정하여 비특이적 반응 유무를 점검하였다.

5. 통계 처리

결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였으며 SPSS 프로그램(version 13.0)을 이용하여 통계 분석을 시행하였다. 세 군의 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 당화혈색소, 요중 단백 양, 신장 내 TGFβ 단백 발현 정도를 비교하기 위하여 ANOVA를 시행하였으며 알파-리포산 투여 전후 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 당화혈색소, 요중 단백 양을 비교하기 위하여 paired-t test를 시행하였고 알파-리포산 투여군의 요중 단백 양과 신장 내 TGFβ 단백 발현의 상관 여부를 알기 위하여 Pearson correlation analysis를 시행하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 알파-리포산 투여 전각 군의 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 당화혈색소, 요중 단백 양의 비교(Table 1)

30주째 먹이 섭취량은 대조군에서 25.30 ± 1.26 g/day, 알파-리포산 투여군에서 25.50 ± 1.33 g/day, 먹이섭취 제한군에서 25.40 ± 1.31 g/day (P = 0.834), 체중은 대조군에서 654.60 ± 9.34 g, 알파-리포산 투여군에서 655.60 ± 11.92 g, 먹이섭취 제한군에서 655.40 ± 10.54 g (P = 0.976), 공복

Table 1. Food intake, body weight, blood glucose level, urinary protein excretion and renal TGFβ protein expression of the Control, ALA and Pair-fed groups

	Control group		ALA group		Pair-fed group	
	30 week	35 week	30 week	35 week	30 week	35 week
Food intake (g/day)	25.30 ± 1.26	27.70 ± 1.06	25.50 ± 1.33	22.40 ± 1.43*,**	25.40 ± 1.31	22.40 ± 1.43
Body weight (g)	654.60 ± 9.34	694.40 ± 10.32	655.60 ± 11.92	600.40 ± 7.41**,†	655.4 ± 10.54	685.40 ± 11.59
Blood glucose (mg/dL)	147.30 ± 4.03	157.70 ± 4.62	147.50 ± 5.99	130.70 ± 4.81**,†	147.20 ± 5.05	153.70 ± 3.30
HbA1c (%)	10.31 ± 0.28	11.04 ± 0.32	10.33 ± 0.42	10.72 ± 0.39	10.30 ± 0.34	10.76 ± 0.23
Urinary protein/Cr (mg/mg·Cr)	3.475 ± 0.291	5.033 ± 0.254	3.570 ± 0.293	3.633 ± 0.303**,†	3.550 ± 0.307	4.977 ± 0.339
Renal TGFβ	-	7.09 ± 0.17	-	4.14 ± 0.26**,†	-	7.00 ± 0.29

ALA, α-lipoic acid. * P < 0.001 vs. 35 week of the Control group. ** P < 0.001 vs. 30 week of the ALA group. † P < 0.001 vs. 35 week of the Control and Pair-fed groups.

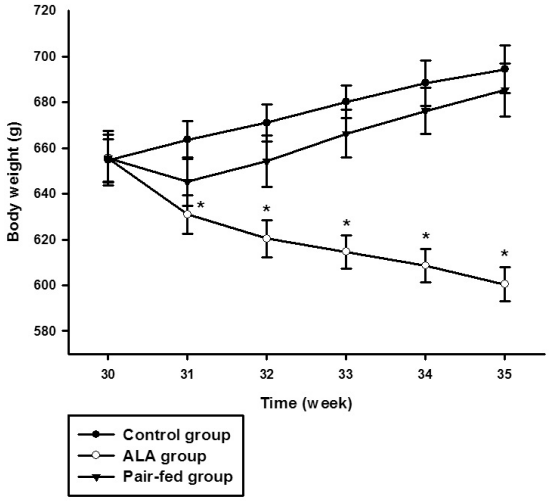

Fig. 1. The body weight was significantly decreased in the ALA group than the Control and Pair-fed groups after ALA (0.5% wt/wt) administration. * P < 0.001 vs. the Control and Pair-fed groups.

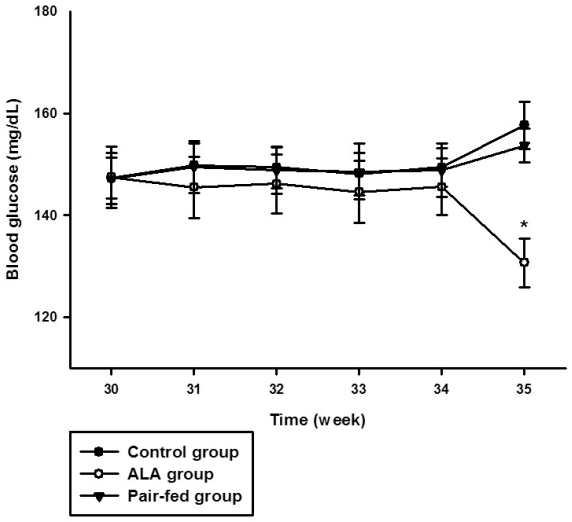

Fig. 2. The blood glucose levels were significantly decreased in the ALA group than the Control and Pair-fed groups at 35 week after ALA (0.5% wt/wt) administration. * P < 0.001 vs. the Control and Pair-fed groups.

혈당은 대조군에서 147.30 ± 4.03 mg/dL, 알파-리포산 투여군에서 147.50 ± 5.99 mg/dL, 먹이섭취 제한군에서 147.20 ± 5.05 mg/dL (P = 0.991), 당화혈색소는 대조군에서 10.31 ± 0.28%, 알파-리포산 투여군에서 10.33 ± 0.42%, 먹이섭취 제한군에서 10.30 ± 0.34% (P = 0.987), 요중 단백 양은 대조군에서 3.475 ± 0.291 mg/mg·Cr, 알파-리포산 투여군에서 3.570 ± 0.293 mg/mg·Cr, 먹이섭취 제한군에서 3.550 ± 0.307 mg/mg·Cr (P = 0.754)로 모두 차이가 없었다. 30주째 신장 내 TGFβ 단백 발현은 측정하지 않았다.

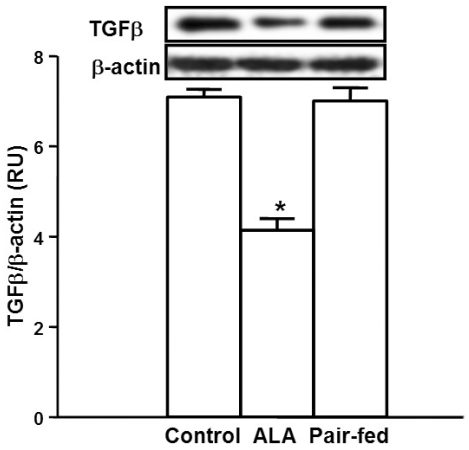

Fig. 3. The renal TGFβ protein expression was significantly decreased in the ALA group than the Control and Pair-fed groups at 35 week after ALA (0.5% wt/wt) administration. RU, relative unit. * P < 0.001 vs. the Control and Pair-fed groups.

2. 알파-리포산 투여 전후 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 당화혈색소의 변화

35주째 알파-리포산 투여군의 먹이 섭취량은 대조군의 먹이 섭취량과 비교하여 유의하게 감소하였으며 (22.40 ± 1.43 g/day vs. 27.70 ± 1.06 g/day, P < 0.001) 알파-리포산 투여 전보다 투여 후 유의하게 감소하였다(25.50 ± 1.33 g/day vs. 22.40 ± 1.43 g/day, P < 0.001). 알파-리포산 투여군의 체중 역시 대조군과 먹이섭취 제한군의 체중과 각각 비교하여 유의하게 감소하였으며(대조군, 694.40 ± 10.32 g; 알파-리포산 투여군, 600.40 ± 7.41 g; 먹이섭취 제한군, 685.40 ± 11.59 g; P < 0.001) 알파-리포산 투여 전보다 투여 후 유의하게 감소하였다(655.60 ± 11.92 g vs. 600.40 ± 7.41 g, P < 0.001) (Fig. 1). 각 군의 공복 혈당은 30주부터 34주까지 차이가 없었으나 35주째 대조군에서 157.70 ± 4.62 mg/dL, 알파-리포산 투여군에서 130.70 ± 4.81 mg/dL, 먹이섭취 제한군에서 153.70 ± 3.30 mg/dL로 유의한 차이가 있었으며(P < 0.001) 알파-리포산 투여군의 투여 전·후 공복 혈당 역시 30주부터 34주까지 차이가 없었으나 35주째 유의한 차이가 있었다(P < 0.001) (Fig. 2). 각 군의 35주째 당화혈색소는 대조군에서 11.04 ± 0.10%, 알파-리포산 투여군에서 10.72 ± 0.12%, 먹이섭취 제한군에서 10.76 ± 0.07%로 차이가 없었다(P = 0.071).

3. 알파-리포산 투여 전후 요중 단백 양, 신장 내 TGFβ 단백 발현의 변화

35주째 요중 단백 양은 대조군에서 5.033 ± 0.254 mg/mg·Cr, 알파-리포산 투여군에서 3.633 ± 0.303 mg/mg·Cr, 먹이섭취 제한군에서 4.977 ± 0.339 mg/mg·Cr로 알파-리포산 투

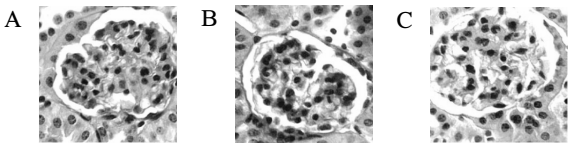

Fig. 4. The renal tissue at 35 weeks of age was stained with periodic acid Schiff (PAS). The glomerular hypertrophy and mesangial matrix expansion are shown in the Control (A), ALA (B) and Pair-fed groups (C) (H&E stain, ×400).

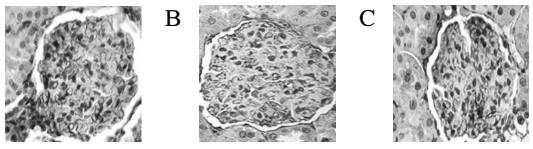

Fig. 5. The TGFβ immunostaining of glomeruli at 35 weeks of age is observed in all groups but decreases in the ALA group (brown color, ×400). Immunoperoxidase TGFβ, hematoxylin counterstaining.

여군의 요중 단백 양이 유의하게 감소하였으며(P < 0.001) 알파-리포산 투여 전보다 투여 후 유의하게 감소하였다(P < 0.001). 신장 내 TGFβ 단백 양은 알파-리포산 투여군에서 유의하게 감소하였으며(대조군, 7.09 ± 0.17 RU; 알파-리포산 투여군, 4.14 ± 0.26 RU; 먹이섭취 제한군, 7.00 ± 0.29 RU; P < 0.001) 알파-리포산 투여 후 유의하게 감소하였다(P < 0.001) (Fig. 3). 35주째 모든 실험군의 신장 조직에서 사구체의 비대와 세포외 기질의 확장 소견이 관찰되었으며 대조군, 먹이섭취 제한군, 알파-리포산 투여군 순서로 심한 경향을 나타내었다(Fig. 4). 모든 실험군의 신장 조직 내 사구체에서 TGFβ 단백이 염색되었으며 알파-리포산 투여군에서 가장 약하게 염색되었다(Fig. 5).

4. 요중 단백 양과 신장 내 TGFβ 단백 발현 사이의 상관 관계

35주째 대조군, 알파-리포산 투여군, 먹이섭취 제한군에서 요중 단백 양과 신장 내 TGFβ 단백 발현 사이에는 모두 유의한 양의 상관 관계가 있었다(대조군, r = 0.847, P = 0.002; 알파-리포산 투여군, r = 0.954, P < 0.001; 먹이섭취 제한군, r = 0.858, P = 0.002).

고 찰

알파-리포산은 미토콘드리아 내 pyruvate dehydrogenase의 보조인자로[13] 체내에서 dihydrolipoic acid로 전환된 후 산화환원반응 결합체(redox couple)를 형성하여 다양한 유리 산소기를 제거하는 한편 세포 내 glutathione 농도를 증가시켜 강력한 항산화 효과를 나타냄으로써 당뇨병성 신경병증의 치료에 이용되고 있다[21-23]. 알파-리포산은 OLETF 백서에서 혈중 유리 지방산과 중성지방 농도 감소, 골격근 내 유리 지방산과 중성지방 산화 촉진, 골격근과 췌장 β세포 내 중성지방 축적 억제, 췌장 β세포 파괴 예방, 세포 내 산화 스트레스 감소, 말초 조직 내 포도당 이용 촉진 등을 유도하여 말초 조직, 특히 골격근의 인슐린저항성을 개선시킴으로써 당뇨병 진행을 예방하는 한편[14-18] 혈관내피세포 내 과산화 음이온(superoxide anion) 농도를 감소시키며 혈관내피세포 의존성 반응을 호전시키고 동맥경화증의 초기 병변인 혈관내피세포 기능 이상을 개선시킴으로써 동맥경화증과 심혈관질환 발생을 예방한다[19]. 알파-리포산이 OLETF 백서에서 먹이 섭취를 억제시키며 에너지 대사를 촉진시키고 지방 산화를 증가시키며 시상하부의 AMPK 발현을 감소시킴으로써 체중 감소 효과를 나타낸다는 연구 결과들이 최근 보고된 바 있다[20,24,25]. 본 연구에서도 알파-리포산을 5주 동안 투여하였을 때 먹이 섭취량과 체중이 투여 전보다 감소하였으며 알파-리포산 투여군과 먹이섭취 제한군의 먹이 섭취량이 동일하였음에도 불구하고 알파-리포산 투여군의 체중이 먹이섭취 제한군의 체중보다 감소하였는데 이는 알파-리포산이 먹이 섭취 억제 이외에도 기존의 연구들에서 제시된 다양한 기전들에 의하여 체중 감소 효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사한다고 하겠다.

본 연구는 알파-리포산이 OLETF 백서의 당뇨병성 신증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 알파-리포산 투여 전후 요중 단백 양과 신장 내 TGFβ 단백 발현의 변화를 분석하였다. 이와 관련하여 최근 흥미로운 연구 결과들이 보고되었는데 Melhem 등은 streptozotocin 당뇨병 유발 백서에서 30 mg/kg/day 용량의 알파-리포산을 2개월 동안 투여하였을 때 체중과 혈당의 증가가 억제되는 경향을 보였으며 요중 알부민 양이 유의하게 감소되었음을 보고하였고[26] Morcos 등은 당뇨병환자에서 600 mg/day 용량의 알파-리포산을 18개월 동안 경구 투여하였을 때 당화혈색소의 증가가 억제되는 경향을 보였으며 요중 알부민 양이 유의하게 감소되었음을 보고한 바 있다[27]. 본 연구의 경우 OLETF 백서에서 사료 무게 0.5% 용량의 알파-리포산을 5주 동안 투여하였을 때 알파-리포산 투여군의 공복 혈당은 대조군과 먹이섭취 제한군의 공복 혈당과 비교하여, 알파-리포산 투여 후의 공복 혈당은 투여 전의 공복 혈당과 비교하여 각각 30주부터 34주까지 차이가 없었으나 35주째 이르러 유의한 차이가 있었으며 알파-리포산 투여군의 당화혈색소는 대조군과 먹이섭취 제한군의 당화혈색소와 비교하여, 알파-리포산 투여 후의 당화혈색소는 투여 전의 당화혈색소와 비교하여 차이가 없었던 반면 35주째 알파-리포산 투여군의 요중 단백 양은 대조군과 먹이섭취 제한군의 요중 단백 양과 비교하여 유의하게 감소되었으며 알파-리포산 투여 전보다 투

여 후 유의하게 감소되었음을 확인할 수 있었다.

당뇨병성 신증의 특징적 병변인 사구체 기저막과 메산지움의 비후는 사구체 기저막과 메산지움을 구성하는 정상 단백들의 양적 변화, 즉 laminin과 fibronectin 등의 증가 및 질적 변화, 즉 비정상적 collagen IV 등의 축적에 의하여 유발되며 특히 TGFβ가 세포외 기질의 축적에 매우 중요하게 관여함이 보고되어 있다[28]. 고혈당과 TGFβ 발현 사이의 관련성은 비교적 잘 알려져 있는데[2,29] 고혈당은 TGFβ 촉진자를 활성화시키는 한편 TGFβ 단백을 과발현시킴으로써 세포외 기질인 laminin, fibronectin, collagen 등의 합성을 촉진시키며 사구체 기저막의 비후, 메산지움 세포의 비대, 세포외 기질의 축적, 세포간질의 섬유화, 사구체 경화증을 유발함이 보고되어 있다[5-9,30-32]. Streptozotocin 당뇨병 유발 백서의 신장에서 TGFβ mRNA와 단백 발현이 증가되는데 TGFβ 항체를 이용하여 TGFβ 단백 활성을 억제하면 신장 비대와 세포외 기질 증식이 억제되어 사구체 경화증 진행이 예방된다는 연구 결과들이 보고된 바 있다[33-36]. OLETF 백서의 신장 내 TGFβ 단백은 30주부터 피질에서 급격하게 증가하며 37주부터 세뇨관에서도 증가하는데[37] 본 연구에서는 알파-리포산 투여 시 OLETF 백서의 신장 내 TGFβ 단백 발현의 증가가 억제되며 신장 내 TGFβ 단백 발현이 요중 단백 양과 양의 상관 관계가 있음을 Western blot법과 면역조직화학염색으로 확인할 수 있었다. 한편 35주째 각 군의 공복 혈당은 차이가 있었으나 30주부터 34주까지 각 군의 공복 혈당은 차이가 없었으며 35주째 각 군의 당화혈색소 역시 차이가 없었기 때문에 35주째 요중 단백 양과 신장 내 TGFβ 단백 발현의 증가 억제는 비록 혈당 변화에 의한 영향을 완전히 배제할 수는 없으나 알파-리포산의 효과가 좀 더 우세하였을 가능성이 높다고 판단하였다. 요약하면 본 연구 결과는 TGFβ가 단백뇨를 특징으로 하는 당뇨병성 신증의 발생 또는 진행에 중요하게 관여할 뿐 아니라 알파-리포산이 TGFβ 단백 매개성 당뇨병성 신증의 발생 또는 진행을 억제시킬 수 있음을 의미하므로 향후 알파-리포산이 당뇨병성 신증의 치료 약물로 이용될 가능성을 검토할 필요가 있을 것으로 생각된다. 이와 함께 본 연구처럼 먹이 섭취량을 동일하게 설정한 알파-리포산 투여군과 비투여군 비교 연구 이외에도 체중을 동일하게 설정한 알파-리포산 투여군과 비투여군 사이의 요중 단백 양과 TGFβ 단백 발현 변화를 비교하기 위한 연구도 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

TGFβ가 당뇨병성 신증의 발생 또는 진행에 관여하는 기전으로 Schiffer 등은 동물 모델의 초기 사구체 경화증 병변에서 TGFβ가 p38 MAPK와 caspase-3의 활성화, Smad7의 증가, NF-κB 신호전달체계의 교란 등을 통하여 사구체 상피세포 사멸을 유발함을 보고한 반면[38,39] 김 등은 사구체 경화증 병변에서 사구체 상피세포 손상이 TGFβ 단백 발현을 증가시키며 Smad 신호전달체계를 활성화시키고 사구체 상피세포를 과자극시킴으로써 다시 사구체 경화증 병변을 악화시킴을 보고하고 있어서[40] 향후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구는 알파-리포산 투여 전후 요중 TGFβ 양의 변화를 확인하지 못하였던 점, 30주째 TGFβ 단백 발현을 측정하지 못하였던 점, 알파-리포산에 의한 먹이 섭취 억제 이외 체중 감소 기전을 규명하지 못하였던 점 등의 한계들을 내포하고 있음에도 불구하고 알파-리포산이 먹이 섭취 억제 효과, 체중 감소 효과, 혈당 상승 억제 효과를 나타낼 뿐 아니라 TGFβ 매개성 당뇨병성 신증의 발생 또는 진행을 억제시킬 수 있음을 확인하였다는데 의미가 있으며 향후 알파-리포산의 단백뇨 및 신장 내 TGFβ 발현 감소 효과가 당뇨병환자에서 나타나는지 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 당뇨병성 신증은 사구체의 구조적, 기능적 변화에 의하여 발생하며 신장 내 TGFβ는 메산지움 세포의 비대, 세포외 기질의 축적, 사구체 기저막의 비후, 세포간질의 섬유화, 사구체 경화증을 유발함으로써 당뇨병성 신증의 발생과 진행에 깊이 관여함이 알려져 있다. 알파-리포산은 OLETF 백서에서 당뇨병 예방 효과와 혈관내피세포 기능개선 효과를 나타내는 한편 먹이 섭취를 억제하고 에너지 대사를 촉진함으로써 체중 감소 효과를 나타냄이 보고되어 있다. 저자들은 비만형 제2형 당뇨병 동물 모델인 OLETF 백서에서 알파-리포산 투여 전후 먹이 섭취량, 체중, 혈당, 요중 단백 양, 신장 내 TGFβ 단백 발현의 변화들을 분석함으로써 알파-리포산이 당뇨병과 당뇨병성 신증에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

방법: 30주령의 OLETF 백서 수컷 30마리를 10마리씩 세 군으로 나누어 각 군에 포함된 백서의 평균 체중과 평균 혈당이 같도록 배정한 후 30주에서 35주까지 5주 동안 metabolic chamber에서 사육하였다. 대조군(10마리)은 일반 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 알파-리포산 투여군(10마리)은 알파-리포산이 사료 무게의 0.5% 함유된 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였고 먹이섭취 제한군(10마리)은 일반 사료를 섭취하되 먹이 섭취량이 알파-리포산 투여군과 일치하도록 제한하였다. 30주째와 35주째 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 당화혈색소, 요중 단백 양을 각각 측정하였으며 35주째 신장을 적출하여 Western blot법과 면역조직화학염색으로 TGFβ 단백 발현 정도를 측정하였다.

결과: 30주째 각 군의 먹이 섭취량, 체중, 공복 혈당, 당화혈색소, 요중 단백 양은 모두 차이가 없었다. 35주째 알파-리포산 투여군의 먹이 섭취량은 대조군의 먹이 섭취량과 비교하여 유의하게 감소하였으며(22.40 ± 1.43 g/day vs. 27.70 ± 1.06 g/day, P < 0.001) 알파-리포산 투여 전보다

투여 후 유의하게 감소하였다(25.50 ± 1.33 g/day vs. 22.40 ± 1.43 g/day, $P < 0.001$). 알파-리포산 투여군의 체중 역시 대조군과 먹이섭취 제한군의 체중과 각각 비교하여 유의하게 감소하였으며(알파-리포산 투여군, 600.40 ± 7.41 g; 대조군, 694.40 ± 10.32 g; 먹이섭취 제한군, 685.40 ± 11.59 g; $P < 0.001$) 알파-리포산 투여 전보다 투여 후 유의하게 감소하였다(655.60 ± 11.92 g vs. 600.40 ± 7.41 g, $P < 0.001$). 각 군의 공복 혈당은 30주부터 34주까지 차이가 없었으나 35주째 대조군에서 157.70 ± 4.62 mg/dL, 알파-리포산 투여군에서 130.70 ± 4.81 mg/dL, 먹이섭취 제한군에서 153.70 ± 3.30 mg/dL로 유의한 차이가 있었으며($P < 0.001$) 알파-리포산 투여군의 투여 전·후 공복 혈당 역시 30주부터 34주까지 차이가 없었으나 35주째 유의한 차이가 있었다($P < 0.001$). 각 군의 35주째 당화혈색소는 대조군에서 11.04 ± 0.10%, 알파-리포산 투여군에서 10.72 ± 0.12%, 먹이섭취 제한군에서 10.76 ± 0.07%로 차이가 없었다($P = 0.071$). 35주째 요중 단백 양은 대조군에서 5.033 ± 0.254 mg/mg·Cr, 알파-리포산 투여군에서 3.633 ± 0.303 mg/mg·Cr, 먹이섭취 제한군에서 4.977 ± 0.339 mg/mg·Cr로 알파-리포산 투여군의 요중 단백 양이 유의하게 감소하였으며($P < 0.001$) 알파-리포산 투여 전보다 투여 후 유의하게 감소하였다($P < 0.001$). 신장 내 β-actin 단백 양으로 보정한 TGFβ 단백 양은 알파-리포산 투여군에서 유의하게 감소하였으며(대조군, 7.09 ± 0.17 RU; 알파-리포산 투여군, 4.14 ± 0.26 RU; 먹이섭취 제한군, 7.00 ± 0.29 RU; $P < 0.001$) 알파-리포산 투여 후 유의하게 감소하였다($P < 0.001$). 35주째 대조군, 알파-리포산 투여군, 먹이섭취 제한군에서 요중 단백 양과 신장 내 TGFβ 단백 발현 사이에는 모두 유의한 양의 상관 관계가 있었다(대조군, r = 0.847, $P = 0.002$; 알파-리포산 투여군, r = 0.954, $P < 0.001$; 먹이섭취 제한군, r = 0.858, $P = 0.002$). 35주째 모든 실험군의 신장 조직 내 사구체에서 TGFβ 단백이 염색되었으며 알파-리포산 투여군에서 가장 약하게 염색되었다.

결론: 비만형 제2형 당뇨병 동물 모델인 OLETF 백서에서 알파-리포산은 먹이 섭취 억제 효과, 체중 감소 효과, 혈당 상승 억제 효과를 나타낼 뿐 아니라 TGFβ 매개성 당뇨병성 신증의 발생 또는 진행을 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며 향후 알파-리포산의 단백뇨 및 신장 내 TGFβ 발현 감소 효과가 당뇨병환자에서도 나타나는지 연구되어야 할것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Raptis AE, Viberti G: *Pathogenesis of diabetic nephropathy. Exp Clin Endocrinol Diab 109:424-37, 2001*
2. 신규태, 김홍수: 메산지움 세포에서 *transforming growth factor β1 antisense*를 이용한 섬유화 물질의 억제. 대한신장학회지 *22:349-57, 2003*
3. 김형엽, 장재휘, 한상미, 안기성, 박성배, 김현철, 박관규: 자연 발생 당뇨 쥐의 신장에서 섬유화 초래인자인 *transforming growth factor β1*의 발현. 대한신장학회지 *22:165-73, 2003*
4. Lee SH, Bae JS, Park SH, Lee BH, Park RW, Choi JY, Park JY, Ha SW, Kim YL, Kwon TH, Kim IS: *Expression of TGFβ-induced matrix protein Big-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. Kidney Int 64:1012-21, 2003*
5. Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS: *High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. Kidney Int 67:82-93, 2005*
6. Border WA, Noble NA: *Transforming growth factor in tissue fibrosis. N Eng J Med 331:1286-92, 1994*
7. Peters H, Noble NA, Border WA: *Transforming growth factor β in human glomerular injury. Curr Opin Nephrol Hypertens 6:389-93, 1997*
8. Fumo P, Kuncio GS, Ziyadeh FN: *PKC and high glucose stimulate collagen alpha I(IV) transcriptional activity in reporter mesangial cell line. Am J Physiol 267:632-8, 1994*
9. Ziyadeh FN: *The extracellular matrix in diabetic nephropathy. Am J Kid Dis 22:736-44, 1993*
10. Zhu M, Mizuno A, Noma Y, Murakami T, Kuwajima M, Shima K, Lan MS: *Defective morphogenesis and functional maturation in fetal islet-like cell clusters from OLETF rat, a model of NIDDM. Int J Exp Diabetes Res 1:289-98, 2001*
11. Sugimoto K, Tsuruoka S, Fujimura A: *Effect of enalapril on diabetic nephropathy in OLETF rat: The role of anti-oxidative action in its protective properties. Clin Exp Pharmacol Physiol 28:826-30, 2001*
12. Kanagawa K, Nakamura H, Murata, Yosikawa I, Otsuki M: *Increased gastric acid secretion in cholecystokinin-1 receptor deficient Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Scand J Gastroenterol 37:9-16, 2002*
13. Reed L: *Biochemistry of lipoic acid. Vitam Horm 20:1-38, 1962*
14. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Khamaisi M, Bashan N: *Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes, Diabetologia 42:949-57, 1999*

15. Maddux BA, See W, Lawrence Jr. JC, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL: *Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. Diabetes 50:404-10, 2001*
16. Midaoui AE, de Champlain J: *Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. Hypertension 39:303-7, 2002*
17. Jacob S, Ruus P, Hermann R, Tritschler HJ, Maerker E, Renn W, Augustin HJ, Dietze GJ, Rett K: *Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. Free Radic Biol Med 27:309-14, 1999*
18. Song KH, Lee WJ, Koh JM, Kim HS, Youn JY, Park HS, Koh EH, Kim MS, Youn JH, Lee KU, Park JY: *a-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes -prone obese rats, Biochem Biophys Res Comm 326:197-202, 2005*
19. 조호찬, 이상준, 김미정, 김혜순, 윤태승, 김성재, 김상훈, 허승호, 문교철, 이인규: 폐경후 여성 제2형 당뇨병 환자에서 알파리포산 투여가 혈관 내피세포 기능에 미치는 영향. 당뇨병 *26:242-53, 2002*
20. 고은희, 이우제, 김민선, 박중열, 이기업: Alpha-lipoic acid에 의한 대사 증후군의 개선. 대한내분비학회지 *19:267-73, 2004*
21. Cameron NE, Cotter MA, Horrobin DH: *Effect of alpha-lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. Diabetologia 41:390-9, 1998*
22. Stevens MJ, Orosova I, Cao X: *Effects of alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. Diabetes 49:1006-15, 2000*
23. Packer L: *Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. Nutrition 17:888-95, 2001*
24. Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Nam-Goong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU: *Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nat Med 10:727-33, 2004*
25. 송기호, 윤지영, 남궁철, 신민정, 유재원, 박혜선, 김민선, 박중열, 이기업: 비만형 당뇨병 모델인 *OLETF* 쥐에서 *α-lipoic acid*의 항 비만 효과. 당뇨병 *26:460-8, 2002*
26. Melhem MF, Craven PA, Derubertis FR: *Effects of dietary supplementation of α-lipoic acid on early glomerular injury in diabetes mellitus. J Am Soc Nephrol 12:124-33, 2001*
27. Morcos M, Borcea V, Isermann B, Gehrke S, Ehret T, Henkels M, Schiekofer S, Hofmann M, Amiral J, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Nawroth PP: *Effect of α-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study. Diabetes Res Clin Pract 52:175-83, 2001*
28. Cooper ME: *Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. Diabetologia 44:1957-72, 2001*
29. Det NF van, Verhagen NA, Tamsma JT, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude: *Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronection and transforming growth factor beta by high glucose, not by angiotensin II. Diabetes 46:834-40, 1997*
30. Sharma K, Ziyadeh FN: *Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. Semin Nephrol 17:80-92, 1997*
31. Aoyama I, Shimokata K, Niwa T: *Oral adsorbent AST-120 ameliorates interstial fibrosis and transforming growth factor b1 expression in spontaneously diabetic (OLETF) rats. Am J Nephrol 20:232-41, 2000*
32. Hida K, Wada J, Zhang H, Hiragushi K, Tsuchiyama Y, Shikata K, Makino H: *Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. J Lipid Res 41:1615 -22, 2000*
33. Sharma K, Ziyadeh FN: *Renal hypertrophy is associated with upregulation of transforming growth factor beta I gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. Am J Physiol 267:1094-101, 1994*
34. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagooka I, Tomino Y, Koide H: *mRNA expression of growth factor in glomeruli from diabetic rats. Diabetes 42:450-6, 1993*
35. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN: *Neutralization of transforming growth factor beta by anti TGFβ antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. Diabetes 45:522-30, 1996*
36. Rumble JR Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L,

Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE: *Vascular hypertrophy in experimental diabetes: Role of advanced glycation end products, J Clin invest 99:1016-27, 1997*

37. Yagi K, Kim S, Wanibuchi H, Yamashita T, Yamamura Y, Iwao H: *Characteristics of Diabetes, Blood Pressure and Cardiac and Renal Complications in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats. Hypertens 29:728 -35, 1997*
38. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Bottinger EP: *Apoptosis in podocytes induced by TGFβ and Smad7. J Clin Invest 108:807 -16, 2001*
39. Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, Shaw AS, Roberts IS, Mundel P, Bottinger EP: *Inhibitory smads and TGFβ signaling glomerular cells. J Am Soc Nephrol 13:2657-66, 2002*
40. Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, Lee HS: *Activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. Kidney Int 64: 1715-21, 2003*