

## Research Article



# 고혈당으로 유도된 신장 mesangial cell 에서 nobiletin의 matrix accumulation 과 TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 signaling에 의한 사구체 경화증 억제효과

김동연 , 강영희 , 강민경

한림대학교 식품영양학과

## OPEN ACCESS

**Received:** Dec 1, 2019  
**Revised:** Jan 1, 2020  
**Accepted:** Jan 8, 2020

### Correspondence to

**Min-Kyung Kang**

Department of Food Science and Nutrition,  
Hallym University, 1 Hallymdaehak-gil,  
Chuncheon 24252, Korea.  
Tel: +82-33-248-2142  
E-mail: mitholy@hallym.ac.kr

© 2020 The Korean Nutrition Society  
This is an Open Access article distributed  
under the terms of the Creative Commons  
Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)  
which permits unrestricted non-commercial  
use, distribution, and reproduction in any  
medium, provided the original work is properly  
cited.

### ORCID iDs

Dong Yeon Kim   
<https://orcid.org/0000-0001-9177-2935>  
Young-Hee Kang   
<https://orcid.org/0000-0003-2039-7968>  
Min-Kyung Kang   
<https://orcid.org/0000-0002-9461-9220>

### Funding

This work was supported by the National  
Research Foundation of Korea (NRF) grants  
funded by the Korea government (MEST)  
(NRF-2017R1A6A3A04011473).

### Conflict of Interest

There are no financial or other issues that  
might lead to conflict of interest.

## Dietary nobiletin suppresses TGF- $\beta$ 1- Src-caveolin-1 dependent signaling involved with high glucose-induced renal mesangial matrix accumulation

Dong Yeon Kim , Young-Hee Kang , and Min-Kyung Kang

Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 24252, Korea

## ABSTRACT

**Purpose:** Diabetic nephropathy is one of the most important diabetic complications prompted by chronic hyperglycemia, characterized by glomerulosclerosis, tubular fibrosis, and it eventually causes kidney failure. Nobiletin is a polymethoxyflavone present in tangerine and other citrus peels, and has anti-cancer and anti-inflammatory effects. This study investigated the effects of nobiletin on glomerular fibrosis through inhibition of the transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 pathway.

**Methods:** Human renal mesangial cells (HRMC) were incubated in media containing 33 mM glucose with or without 1–20  $\mu$ M nobiletin for 3 day. The cellular expression levels of fibrogenic collagen IV, fibronectin, connective tissue growth factor (CTGF), TGF- $\beta$ 1, Src and caveolin-1 were all examined. In addition, TGF- $\beta$ 1, Src and caveolin-1 proteins were screened to reveal the relationship among TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 signaling in glomerular fibrosis.

**Results:** High glucose promoted the production of collagen IV, fibronectin and CTGF in HRMC, which was inhibited in a dose dependent manner by 1–20  $\mu$ M nobiletin. The Western blot data showed that high glucose elevated the expression of TGF- $\beta$ 1, Src, caveolin-1 and Rho GTPase. When nobiletin was treated to the HRMC exposed to high glucose, the expression of TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 was dampened. Finally, TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 signaling pathway was activated in high glucose-exposed HRMC, and such activation was encumbered by nobiletin.

**Conclusion:** These result demonstrated that nobiletin blunted high glucose-induced extracellular matrix accumulation via inhibition of the TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 related

intracellular signaling pathway. Nobiletin may be a potent renoprotective agent to counteract diabetes-associated glomerular fibrosis that leads to kidney failure.

**Keywords:** nobiletin, diabetic nephropathy, glomerular fibrosis, TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 pathway

## 서론

당뇨병성 신장병증은 당뇨병의 가장 중요한 만성 합병증으로, 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 말기 신부전증을 초래하는 가장 흔한 원인질환이다 [1]. 만성 고혈당에 의한 사구체 경화증의 증상으로는 사구체 및 세뇨관의 비후, mesangium과 세뇨관-간질에 세포외 기질의 축적과 신세뇨관 기저막의 비후가 일어난다 [1-3]. 또한 사구체와 세뇨관-간질에 염증 세포의 침윤이 나타나며, 사구체 내 족세포의 감소와 족돌기의 융합이 일어나며, 이러한 변화의 계속적인 진행으로 인해 궁극적으로는 사구체 경화 및 신세뇨관 위축이 발생하게 된다 [2]. 이러한 병태적인 변화는 특히 고혈당, 산화스트레스, 성장인자 등과 같은 수많은 인자의 복잡한 상호작용에 의해서 유발되게 되는데 그 중에서도 증가된 transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1은 당뇨병성 신장병증의 진행에 관여하는 주요 섬유성 사이토카인이며, 고혈당으로 자극된 신장세포에서 세포외 기질의 축적을 자극하는 것으로 알려져 있다 [4,5,6]. TGF- $\beta$ 1은 그 자체로도 세포외 기질의 축적을 유도하기도 하지만 다양한 관련 신호 전달 경로 예를 들어 p42/44 MAP kinase 경로, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), SMAD 경로 등의 조절을 통해 다양한 세포 내 메커니즘을 조절하게 된다 [4,7,8].

Caveolae는 50-100 nm의 크기로 세포 표면의 원형질막에 플라스크 모양으로 함입되어 있으며, 세포 내로의 세포 내 이입과 신호전달 등에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [9,10]. 이는 콜레스테롤 스펅고리피드 그리고 glycosyl-phosphatidylinositol 등이 연결된 막 단백질로 주요 구성성분으로는 caveolin-1, caveolin-2 caveolin-3가 있으며 caveolae를 형성하는 역할을 한다 [9]. 그 중에서도 caveolin-1은 신장을 포함한 대부분의 기관에서 caveolae를 구성하는데 필수적인 요소로 보고되었다. 신장에서의 caveolin-1은 대부분의 세포에서 발현되며 이는 세포부착과 migration, 당뇨병성 신장병증에 있어서 중요한 신호 전달의 조절자로 알려져 있다 [11].

Caveolin-1의 발현 증가는 당뇨병성 신장병증을 포함한 신장 질환에서 주요병변으로 알려져 있으며 최근 연구에서는 caveolin-1이 섬유화 반응에 관여하는 다양한 세포 신호 전달체계에서 중요한 역할을 담당한다는 것을 뒷받침하는 다양한 연구가 보고된 바 있다 [9-11].

Nobiletin은 감귤류의 껍질에서 분리된 플라보노이드 성분의 하나로, 플라본에 하이드록시기 (-OH)나 메톡시기 (-OCH<sub>3</sub>)가 하나 이상 결합된 폴리메톡시플라본 화합물로서 감귤류와 감귤류의 껍질에 다량 함유되어 있는 생리활성물질이다. Nobiletin 성분은 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있는데, 항암, 항산화, 항염증 작용 등 강력한 생리활성을 나타내는 물질로 알려져 있는 성분이다 [12]. Nobiletin은 앞선 질환에서 PKA/ERK/MEK/CREB, NF- $\kappa$ B, MAPK, Ca<sup>2+</sup>/CaMKII, PI3K/Akt1/2, HIF-1 $\alpha$ , 그리고 TGF- $\beta$ 1과 관련된 세포 신호 전달 체계를 조절함으로써 체내에서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 생리활성은 nobiletin의 구조적 특성에서 나타나는 것으로 알려져 있으며, 높은 투과성과 친유성으로 인해 세포 안에서 특정 메커니즘을 조절하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다 [13].

따라서 본 연구에서는 고혈당으로 유발된 당뇨병성 신장병증의 하나인 사구체 경화증에서 세포외 기질 생성 및 축적과 고혈당에 의해 증가되는 섬유증 유발 인자인 TGF- $\beta$ 1과 caveolin-1과의 연관성에 대해 알아보고 생리활성 물질인 nobiletin의 세포외 기질 단백질 축적 억제 효능에 따른 당뇨병성 신장병증의 억제기전에 대해 알아보고자 하였다.

## 연구방법

### 세포배양

Human renal mesangial cells (HRMCs)은 Sciencell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 F12를 7:1의 비율로 혼합하고 15% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 일차 배양된 HRMC의 doubling 시간은 26–40 시간으로 [14], HRMC는 passage 6–10 사이를 사용하였으며 plate에 80% 밀도 이상 일 때 실험에 사용하였다. 고혈당으로 인한 당뇨병성 신장병증 환경을 유발하기 위해 세포를 33 mM 고농도 포도당을 첨가한 DMEM 배지에 0.1% bovine serum albumin (BSA)가 함유된 배지로 3일간 배양하였으며 삼투압으로 인한 영향을 배제하기 위해 osmotic control로 조절하기 위해 DMEM 배지에 27.5 mM mannitol과 0.1% BSA를 첨가한 배지를 사용하였다. 고혈당 자극과 더불어 nobiletin은 1–20  $\mu$ M의 농도로 3일간 처리하였으며, nobiletin은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 배지로 희석하여 실험을 실시하였다.

### Western blot analysis

고혈당 자극과 더불어 nobiletin을 처리한 HRMC를 1 M  $\beta$ -glycerophosphate, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5 M NaF, 0.1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 그리고 protease inhibitor cocktail이 첨가되어 있는 lysis buffer를 사용하여 용해하였으며, cell lysates는 lowry assay를 통해 단백질 정량을 실시한 후 동량의 단백질을 6%–15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 비 특이적 결합을 방지하기 위해 5% skim milk로 3시간 동안 blocking한 후 TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20)로 세척한 후 membrane을 collagen IV, fibronectin, connective tissue growth factor (CTGF), Src, caveolin-1, Ras homolog family member A (RhoA), Rho-associated protein kinase (ROCK), TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$  receptor I, II 항체를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이후 TBS-T buffer로 10분간 3회 세척한 후에 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체를 이용하여 1시간 동안 반응시킨 뒤 15분간 4회 세척 후 immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)와 Agfa X-ray film (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)을 이용하여 가시화 시켰다.

### Immunocytochemistry

HRMC를 유리 슬라이드가 깔려 있는 24-well plate에 분주하여 33 mM 고혈당 자극과 더불어 20  $\mu$ M/mL의 nobiletin을 처리한 후 3일간 배양하였다. 슬라이드를 0.2% tween 20 이 포함된 PBS-T로 세척한 후 4% formaldehyde로 세포를 20분 간 고정하였다. 그 후 0.1% triton X-100이 함유된 0.1% sodium citrate 용액으로 5분간 세포막을 permeabilization 시킨 뒤 고정된 세포에 collagen IV 항체와 fibronectin 항체를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이후 세

포에 cy3 형광 염료가 결합된 anti-rabbit immunoglobulin G (IgG)와 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 anti-mouse IgG 2차 항체를 이용하여 단백질의 발현을 가시화 시켰다. 형광 이미지는 Axiomager optical fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany)를 이용하여 촬영하였다.

### Caveolin-1 small interfering RNA (siRNA) transfection

Caveolin-1이 직접적으로 경화에 관여하는지 알아보기 위해 세포 내 caveolin-1의 유전자의 발현을 억제시킨 뒤 경화 인자의 발현을 확인해 보았다. 억제를 위해 HRMC에 lipofectamine 3000 mixture (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 caveolin-1 siRNA transfection assay를 실시하였다. 세포에 5 µg caveolin-1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)와 lipofectamine 3000 mixture (Life Technologies)를 처리하여 5시간 동안 37°C에서 배양한 후 transfection된 HRMC에 33 mM 고혈당 자극과 nobiletin을 처리한 후 3일간 배양하였다. 이후 세포를 용해하여 western blot을 통해 caveolin-1 발현 억제를 확인하였다.

### 통계 분석

데이터 통계처리는 SPSS프로그램 (windows 16.0; SPSS Inc. IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 실시하였으며, 결과는 mean ± SE로 나타내었으며 각 항목은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)를 통한 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다.

## 결과

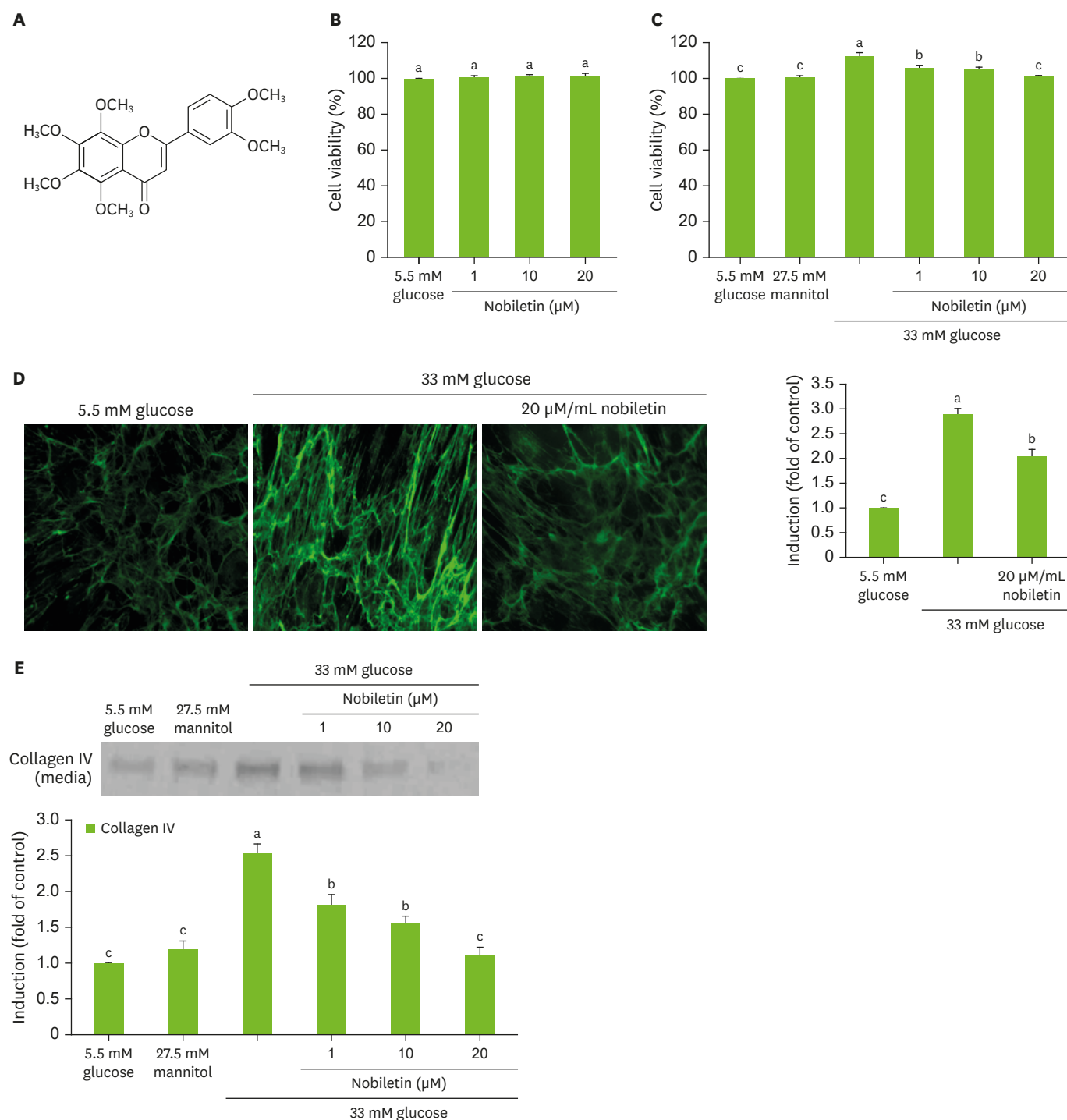
### Nobiletin의 세포 독성 확인

감귤류의 껍질에서 분리된 폴리메톡시플라본 성분인 nobiletin (**Fig. 1A**)의 세포 독성을 알아보기 위해 HRMC에 1-20 µM 농도의 nobiletin을 처리하여 3일간 배양한 결과 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(**Fig. 1B**). 또한, HRMC를 33mM 고혈당 자극 조건에서 1-20 µM 농도의 nobiletin을 처리한 후 3일간 배양한 결과 세포 독성을 나타내지 않았으며(**Fig. 1C**), 고혈당 자극에 의해 10%~20%가량 증식된 HRMC의 증식이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

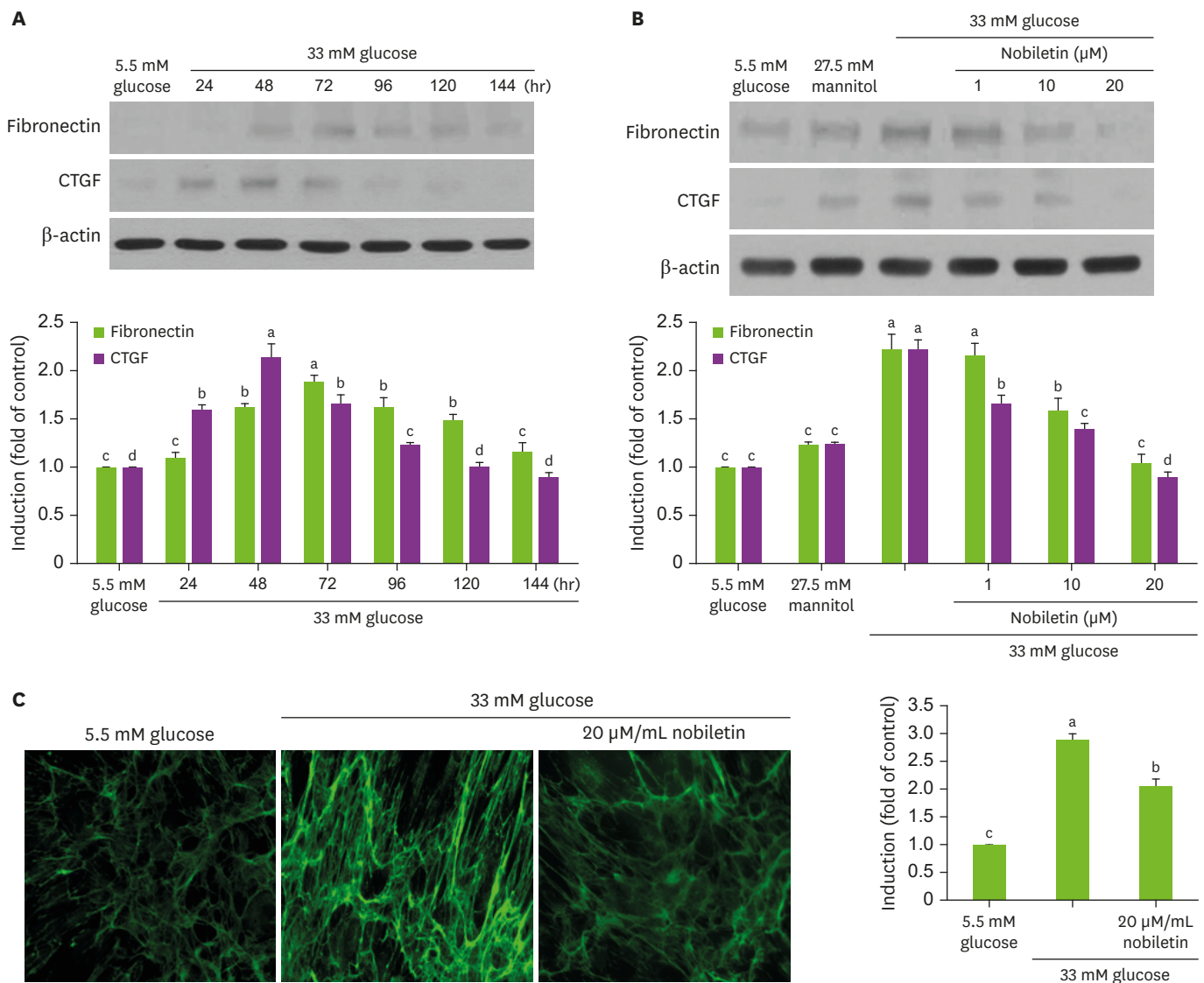
### HRMC에서의 세포외 기질 축적 단백질 생성 억제 효과

본 연구는 nobiletin의 고혈당으로 유도된 HRMC에서 세포외 기질 축적에 관여하는 단백질인 collagen IV 분비, fibronectin 그리고 CTGF [9,15]의 발현 억제 효능을 확인한 결과는 **Fig. 2**와 같다.

먼저 33 mM 고혈당으로 자극한 HRMC를 6일간 배양하여 대표적 경화인자인 fibronectin과 CTGF의 발현을 확인한 결과 fibronectin은 48시간부터 발현이 증가하여 72시간에 최대 발현을 나타냈으며 CTGF는 24시간부터 발현이 점차 증가하여 48시간에 최대 발현을 나타내는 것으로 나타났다 (**Fig. 2A**). HRMC에 33 mM 고혈당을 처리하여 72시간 동안 자극을 가한 후 western blot을 실시한 결과 33 mM 고혈당으로 자극한 HRMC에서는 collagen IV의 분비가 증가하는 것을 확인하였고, 여기에 1-20 µM의 nobiletin을 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (**Fig. 1E**). 또한 세포 내에서 생성되는 collagen IV 또한 nobiletin에 의해



**Fig. 1.** Chemical structure of nobiletin (A), and cell viability (B, C) and collagen IV secretion (C) and cellular expression (D) of HRMC challenged with 33 mM glucose in the absence and presence of nobiletin. HRMC were treated with 1–20  $\mu$ M nobiletin for 3 days in the culture media of 33 mM glucose. Nobiletin was dissolved DMSO as stock solution and then dilute with culture media. Cells were also incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. For the secretion of collagen IV (C), culture media were subjected to western blot analysis with a primary antibody against collagen IV. Immunocytochemical analysis (D) was performed for cellular collagen IV localization visualized with Cy3-conjugated anti-rabbit IgG and nuclear counterstaining was done with DAPI. Magnification, 400-fold. The bar graphs (means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ . HRMC, human renal mesangial cells; DMSO, dimethyl sulfoxide; IgG, immunoglobulin G; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; SEM, standard error of the mean.

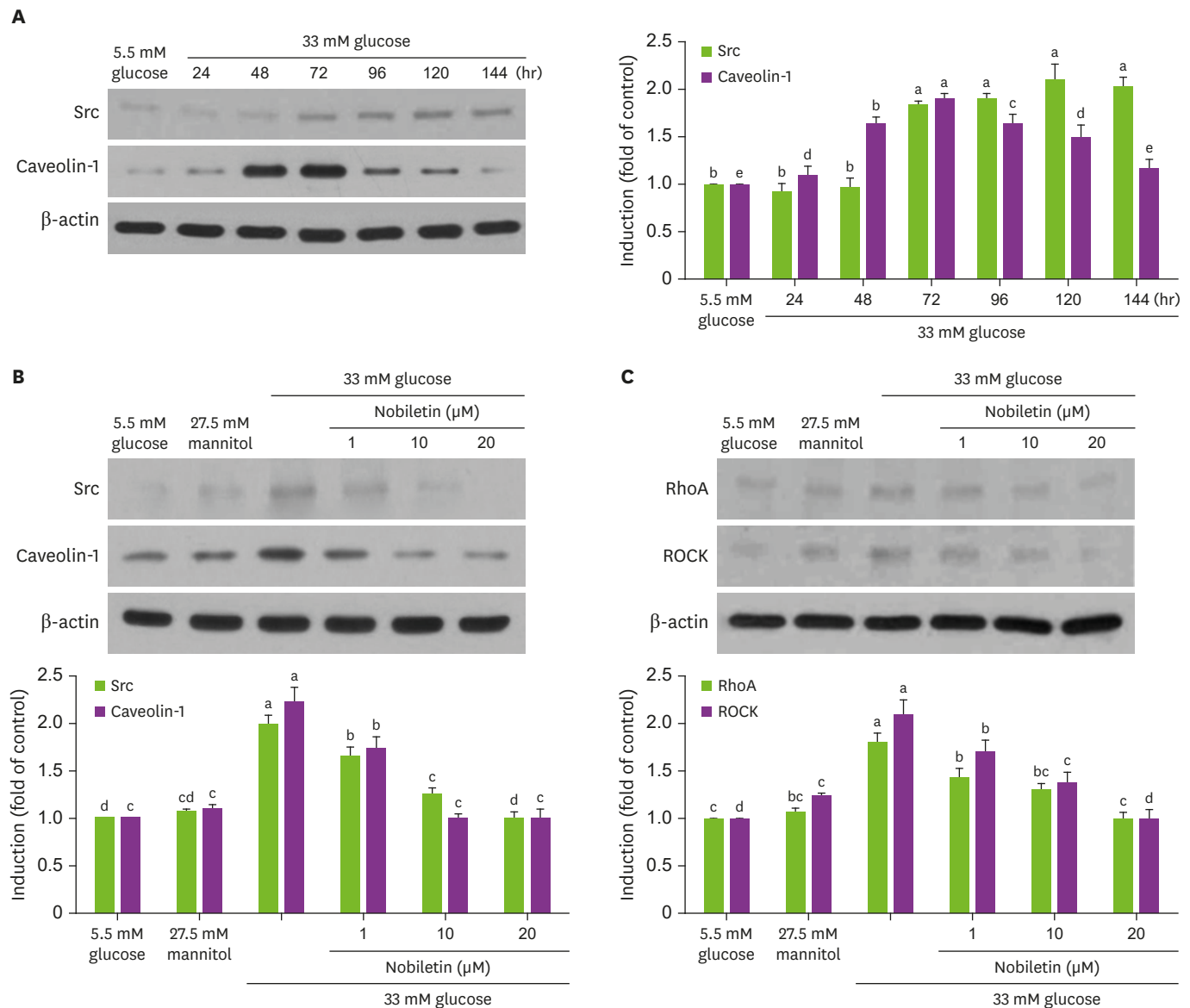


**Fig. 2.** Temporal induction of fibronectin and CTGF by high glucose (A), their inhibition by nobiletin (B), and immunocytochemical staining (C) showing inhibition of fibronectin induction by nobiletin. HRMC were treated with 1–20  $\mu$ M nobiletin for 3 days in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Cell lysates were subject to western blot analysis with a primary antibody against fibronectin and CTGF (A, B).  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The bar graphs (means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) in the bottom panels represent quantitative results of blots. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ . Fibronectin was visualized by staining with a green FITC-conjugated IgG (magnification, 400-fold). CTGF, connective tissue growth factor; SEM, standard error of the mean; FITC, fluorescein isothiocyanate; IgG, immunoglobulin G.

감소하였다 (Fig. 1D). Collagen IV와 더불어 fibronectin 그리고 CTGF 단백질을 확인한 결과 고혈당에 의해 각각의 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, nobiletin의 처리에 의해 감소하였다 (Fig. 2B and C).

### 고혈당에 의한 HRMC에서의 caveolin-1 발현과 확인

33 mM 고혈당으로 자극한 HRMC를 6일간 배양하여 caveolin-1의 발현과 Src의 발현을 확인한 결과, caveolin-1은 48과 72시간에 발현이 급격히 증가하였으며 Src 또한 72시간부터 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 3A). HRMC를 고혈당에 노출시켜 nobiletin을 처리하여 3일간 배양한 후 caveolin-1의 발현과 Src의 발현을 확인한 결과 33 mM 고혈당 자극에



**Fig. 3.** Temporal induction of Src and caveolin-1 by high glucose (A) and their inhibition by nobiletin (B) and western blot data (C) showing inhibition of RhoA and ROCK induction by nobiletin. HRMC were treated with 1–20  $\mu$ M nobiletin for 3 days in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Cell lysates were subject to western blot analysis with a primary antibody against Src, caveolin-1, RhoA and ROCK (A, B).  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The bar graphs (means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) in the bottom panels represent quantitative results of blots. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

RhoA, Ras homolog family member A; ROCK, Rho-associated protein kinase; SEM, standard error of the mean.

서 증가한 caveolin-1과 Src 단백질이 nobiletin에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 3B). 또한 caveolin-1에 의해 영향을 받는 세포 내 신호 전달 경로인 Rho GTPase 경로 [11]에 관여하는 단백질인 RhoA-ROCK의 발현을 확인한 결과 고혈당에 의해 발현이 증가되었으며 nobiletin에 의해 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였다.

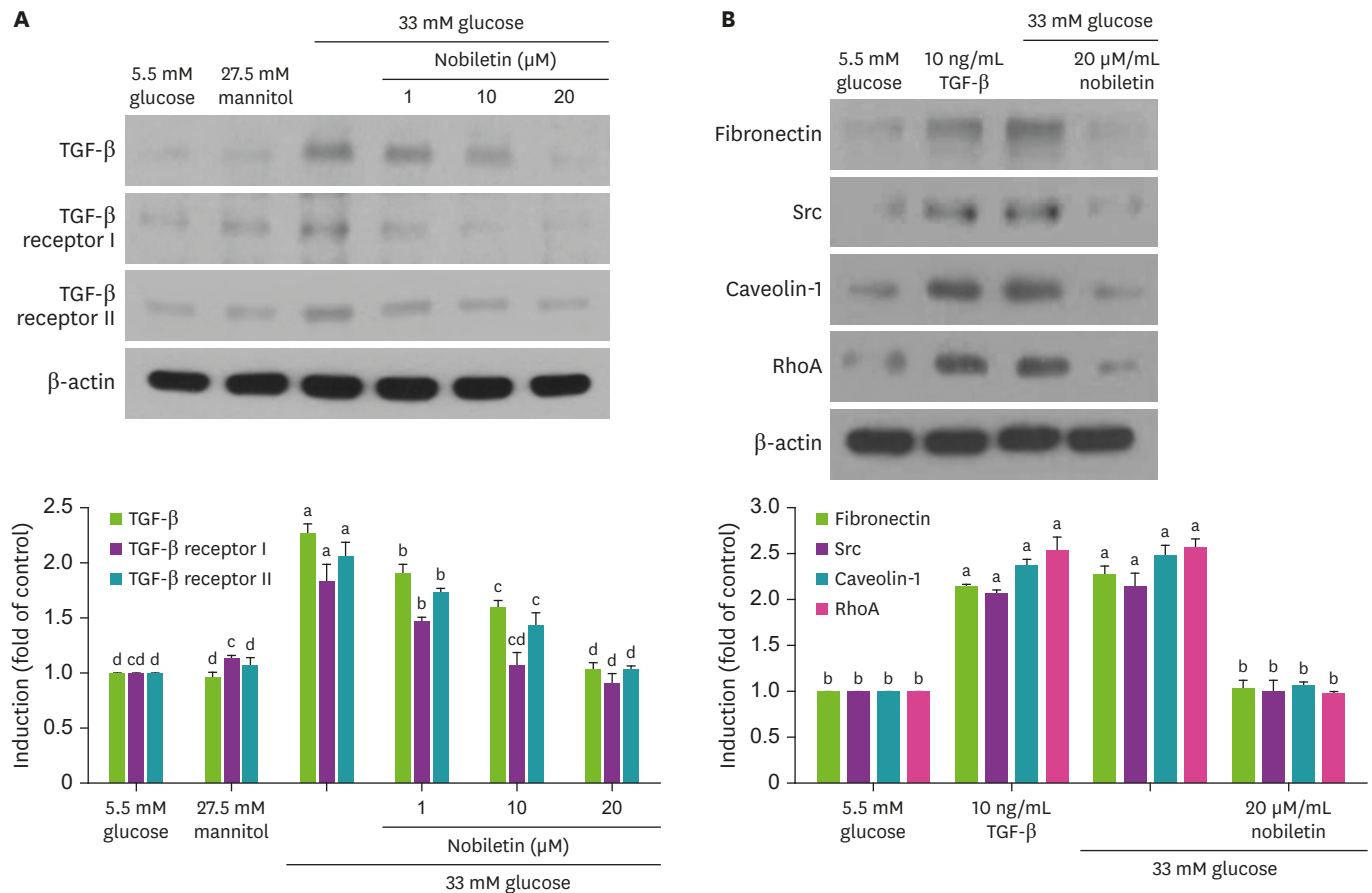
### Nobiletin의 TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 관련 세포 신호전달 억제 효과

고혈당 자극으로 인한 TGF- $\beta$ 1의 발현과 수용체의 발현을 확인한 결과 고혈당 자극에 의해 HRMC에서의 TGF- $\beta$ 1의 발현과 그 수용체의 발현이 증가하였으며 여기에 1–20  $\mu$ M의 nobile-

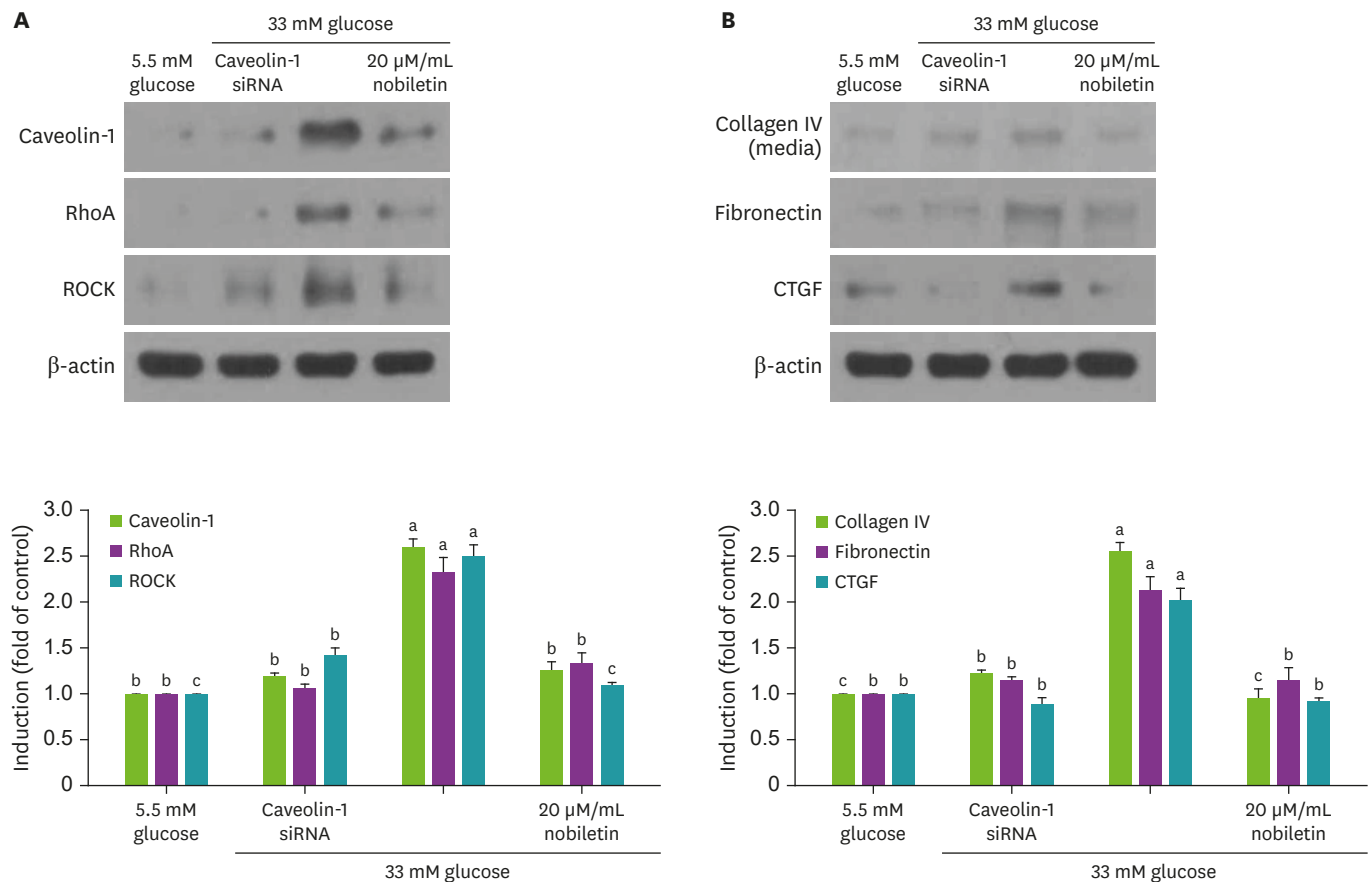
tin을 처리한 결과 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A). 또한 TGF- $\beta$ 1이 경화를 유도하는지 알아보기 위해 HRMC에 10 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1 단백질을 처리한 후 관련 단백질인 fibronectin의 발현을 확인한 결과 10 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1 단백질을 처리한 경우와 고혈당 자극을 처리한 경우 비슷한 수준으로 fibronectin의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, nobiletin에 의해 control 수준으로 감소하였다 (Fig. 4B). 또한, caveolin-1, Src 그리고 RhoA 단백질의 발현 역시 10 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1 단백질 처리와 고혈당 자극에 의해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며, nobiletin 처리 시 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B).

### Caveolin-1의 사구체 경화 억제 효능

33 mM 고혈당 자극 시 HRMC에서 증가하는 caveolin-1 단백질과 사구체 경화증과의 직접적인 관련성을 알아보기 위해 siRNA transfection으로 HRMC에서의 caveolin-1의 발현을 억제시켰다. 그 후 33 mM 고혈당 자극을 통해 caveolin-1과 RhoA-ROCK의 발현을 확인한 결과 고혈당에 의해 증가되는 caveolin-1의 발현이 siRNA에 의해 억제됨을 확인하였고, 이에 따른 세포 내 신호전달 단백질인 RhoA-ROCK의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며 여기에 20  $\mu$ M/mL



**Fig. 4.** Effect of nobiletin on TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1 receptor I and II induction (A). HRMC were treated with 1–20  $\mu$ M nobiletin for 3 days in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. In other experiments, cells were cultured with 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 absence and presence of 20  $\mu$ M nobiletin for 3 day (B). Cell lysates were subject to 8%–12% SDS-PAGE and western blot analysis with a primary antibody against TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1 receptor I and II, fibronectin, Src, caveolin-1 and RhoA (A and B).  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n = 3) in the bottom panels represent quantitative results of blots. Values not sharing a common letter are significantly different at p < 0.05. TGF, transforming growth factor; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; RhoA, Ras homolog family member A; SEM, standard error of the mean.



**Fig. 5.** Effect of nobiletin and silencing of caveolin-1 genes on expression of caveolin-1, RhoA, ROCK, collagen IV, fibronectin or CTGF in the presence of 33 mM glucose (A and B). Caveolin-1 siRNA-transfected HRMC were incubated in 33 mM glucose for 3 day. Cell lysates were subject to 8%–12% western blot analysis with a primary antibody against caveolin-1, RhoA, ROCK, collagen IV, fibronectin or CTGF.  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) in the bottom panels represent quantitative results of blots. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$ . RhoA, Ras homolog family member A; ROCK, Rho-associated protein kinase; CTGF, connective tissue growth factor; siRNA, small interfering RNA; HRMC, human renal mesangial cells; SEM, standard error of the mean.

의 nobiletin을 처리한 경우에도 caveolin-1과 RhoA-ROCK 단백질의 발현이 control 수준으로 감소하는 효과를 보였다. 또한 caveolin-1의 발현을 억제시킨 HRMC에서 세포외 기질 축적에 관여하는 단백질인 collagen IV 분비, fibronectin 그리고 CTGF의 발현을 확인한 결과 caveolin-1의 발현을 억제시킨 경우 각각의 단백질 발현이 control 수준으로 감소하는 것을 확인하였으며, 20  $\mu$ M/mL의 nobiletin을 처리한 경우 또한 같은 결과를 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 5).

## 고찰

당뇨병은 우리나라 사망원인 중 4위를 차지하는 것으로 알려져 있을 만큼 흔하게 발생하는 질환이며 지금도 발병률이 꾸준히 증가하고 있는 심각한 만성질환의 하나이다. 이러한 당뇨병의 증가는 당뇨합병증의 증가로 이어지게 되는데 그 중에서도 당뇨병성 신장병증의 증상인 사구체 경화증은 가장 흔하게 나타나는 신장 합병증으로 당뇨병으로 인한 말기 신부전증의 원인이 되는 질환이다 [1]. 만성 고혈당에 의한 사구체경화증의 증상으로는 신장 mesangium의 확장, 세포외 기질의 축적, 신장 여과기능의 저하 등과 같은 다양한 증상을 나타내

게 된다 [16]. 본 연구에서는 nobiletin이 고혈당으로 유도된 신장 HRMC에서 세포외 기질 축적과 TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1으로 이어지는 세포신호 전달 체계에 의한 사구체 경화증 억제 효능을 알아보려고 하였다 [11]. Nobiletin은 감귤류 및 감귤류의 껍질에 함유되어 있는 폴리메톡시플라본 계열의 생리활성 물질로서 항산화, 항 염증, 항암작용을 하는 것으로 널리 알려져 있으며, 이러한 생리활성은 nobiletin의 구조적인 특성과 더불어 높은 투과성과 친유성으로 인한 세포 내에서 다양한 메커니즘을 조절하는 것으로 알려져 있다 [4,13].

HRMC를 33 mM의 고혈당 자극에 3일간 노출시키게 되면 세포의 과증식이 일어나게 되고 [7,15], 이러한 자극은 세포 내에서 경화와 관련된 collagen IV의 생성 및 분비 증가, fibronectin과 CTGF 단백질 발현의 증가를 가져오게 된다 [3,7,15]. 여기에 nobiletin을 처리하였을 때 세포의 과증식과 세포외 기질 축적 단백질의 발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 세포외 기질의 축적과 비후를 유발하고 다양한 세포 내 신호 전달 체계를 활성화시키는 원인이 되는 것으로 알려져 있는 대표적 경화 유발 단백질인 TGF- $\beta$ 1의 발현 또한 감소시켰으며, TGF- $\beta$ 1과 관련된 세포 내 신호전달 경로를 확인하기 위해 [6,8,17] 경화증과 결체조직의 리모델링에 관여한다고 알려진 caveolin-1과의 연관성을 살펴보았다. caveolin-1은 신장 세포에서 주요한 섬유화 관련 세포신호 전달 체계를 조절하는 인자로 알려져 있으며 [18], 다양한 자극에 의해 당뇨병성 신장병증의 진행을 유발하는 것으로 보고되었다 [10]. 동물 실험에서 caveolin-1의 조절은 경화 인자들의 세포외 기질 축적과 당뇨병으로 인해 유발되는 단백뇨를 억제함으로써 1형, 2형 당뇨병으로 발생하는 당뇨병성 신장병증을 억제하는 것으로 알려졌다 [10,18]. TGF- $\beta$ 1과 caveolin-1 모두 당뇨병성 신장병증에 있어서 경화를 유발하는 것으로 알려졌다나 아직까지 둘 사이의 직접적인 관계에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구에서 HRMC에 10 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1 단백질을 처리하여 33 mM 고혈당 자극을 처리한 그룹과 비교한 결과 TGF- $\beta$ 1을 처리한 경우 고혈당에 노출시킨 경우와 마찬가지로 fibronectin의 발현이 증가함과 동시에 세포 내 caveolin-1 발현이 증가하는 것을 확인하였으며 이와 관련된 신호 전달인자인 Src과 RhoA의 발현 또한 증가하는 것으로 미루어 보아 고혈당에 노출시킨 경우와 마찬가지로 TGF- $\beta$ 1 처리에 의해 Src-caveolin-1-RhoA로 이어지는 신호 전달 체계가 활성화되며 nobiletin의 처리에 의해 유의적인 감소를 보이는 것을 확인하였다. 또한 고혈당에 의해 증가하는 caveolin-1에 의한 당뇨병성 신장병증의 증상을 확인하기 위해 caveolin-1 유전자를 knockout 시킨 후 경화 인자들의 발현과 caveolin-1과 관련된 Rho GTPase의 발현을 확인한 결과 각각의 인자들의 유의적인 상관관계를 확인할 수 있었으며 고혈당 자극에 의해 증가된 단백질들이 nobiletin에 의해 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 보았을 때 고혈당으로 유도되는 당뇨병성 신장병증에 있어서 caveolin-1 단백질 발현의 조절은 경화증을 예방할 수 있는 중요한 요인임을 확인하였으며, nobiletin은 이를 효율적으로 조절할 수 있는 가능성을 가지는 기능성 물질임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 nobiletin을 이용한 cavolin-1의 발현 억제와 고혈당으로 인한 TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 그리고 세포 내 신호 전달 경로인 Rho GTPase [6,8]로 이어지는 세포 신호 전달 체계의 억제는 당뇨병성 신장병증에 대한 표적으로서 다양한 세포 내 경화 관련 신호 전달 경로를 억제할 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 요약

본 연구에서는 고혈당으로 인해 유발되는 당뇨병성 신장병증의 대표적인 증상인 사구체 경화증을 완화시키는 nobiletin의 효능에 대해 알아보고자 하였다. 신장 세포인 HRMC를 이용하여 고혈당에서의 세포외 기질 축적 단백질의 발현과 경화에 관여하는 신호 전달 억제 효능을 확인한 결과 nobiletin은 고혈당의 자극에 의해 증가하는 섬유화 단백질인 collagen IV, fibronectin 그리고 CTGF의 발현을 억제하였으며, 여기에 관여하는 TGF- $\beta$ 1-Src-caveolin-1 신호 전달 경로를 통해 사구체 경화증을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 nobiletin은 고혈당으로 유도된 당뇨병성 신장병증에 있어 사구체 경화증을 예방하는 기능성 성분으로서의 활용 가능성을 확인하였다.

## REFERENCES

- Ban CR, Twigg SM. Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4(3): 575-596.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 Suppl 1: S30-S33.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Pozzi A, Voziyan PA, Hudson BG, Zent R. Regulation of matrix synthesis, remodeling and accumulation in glomerulosclerosis. *Curr Pharm Des* 2009; 15(12): 1318-1333.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Fukuda N, Tahira Y, Matsuda H, Matsumoto K. Transforming growth factor-beta as a treatment target in renal diseases. *J Nephrol* 2009; 22(6): 708-715.  
[PUBMED](#)
- Li J, Lim SS, Lee JY, Kim JK, Kang SW, Kim JL, et al. Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation: possible renoprotective role in diabetic nephropathy. *J Nutr Biochem* 2012; 23(4): 320-331.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Ungefroren H, Witte D, Lehnert H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- $\beta$ -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn* 2018; 247(3): 451-461.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Li J, Lim SS, Lee ES, Gong JH, Shin D, Kang IJ, et al. Isoangustone A suppresses mesangial fibrosis and inflammation in human renal mesangial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236(4): 435-444.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Peng F, Wu D, Gao B, Ingram AJ, Zhang B, Chorneyko K, et al. RhoA/Rho-kinase contribute to the pathogenesis of diabetic renal disease. *Diabetes* 2008; 57(6): 1683-1692.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)- $\beta$ /SMAD signaling through an interaction with the TGF- $\beta$  type I receptor. *J Biol Chem* 2001; 276(9): 6727-6738.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Van Krieken R, Krepinisky JC. Caveolin-1 in the pathogenesis of diabetic nephropathy: potential therapeutic target? *Curr Diab Rep* 2017; 17(3): 19.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Lu Y, Tang L, Li Y, He Q. High glucose-induced fibronectin upregulation in cultured mesangial cells involves caveolin-1-dependent RhoA-GTP activation via Src kinase. *Mol Med Rep* 2016; 14(1): 963-968.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Youn K, Lee S, Jun M. Discovery of nobiletin from citrus peel as a potent inhibitor of  $\beta$ -amyloid peptide toxicity. *Nutrients* 2019; 11(11): 2648.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

13. Huang H, Li L, Shi W, Liu H, Yang J, Yuan X, et al. The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016: 2918796.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Wilson HM, Stewart KN. Glomerular epithelial and mesangial cell culture and characterization. *Methods Mol Biol* 2012; 806: 187-201.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Li J, Kang SW, Kim JL, Sung HY, Kwun IS, Kang YH. Isoliquiritigenin entails blockade of TGF- $\beta$ 1-SMAD signaling for retarding high glucose-induced mesangial matrix accumulation. *J Agric Food Chem* 2010; 58(5): 3205-3212.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(1): 4-11.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Kim DY, Kang MK, Park SH, Lee EJ, Kim YH, Oh H, et al. Eucalyptol ameliorates Snail1/ $\beta$ -catenin-dependent diabetic disjunction of renal tubular epithelial cells and tubulointerstitial fibrosis. *Oncotarget* 2017; 8(63): 106190-106205.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Shihata WA, Putra MR, Chin-Dusting JP. Is there a potential therapeutic role for caveolin-1 in fibrosis? *Front Pharmacol* 2017; 8: 567.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)