

원 저

眞武湯이 배양 인체 메산지움 세포증식과 기질 침착에 미치는 영향

안영민, 안세영, 두호경, 이태원¹⁾, 박재경²⁾

경희대학교 한의과대학 신계내과학교실, 경희대학교 의과대학 신장내과학교실¹⁾, 경희의료원 동서의학연구소²⁾

The Effects of *Jinmu-tang* on Mesangial Cell Proliferation, Fibronectin Synthesis and Expression of ICAM-1, β 1-Integrin, MHC-Class II

Young-Min Ahn, Se-Young Ahn, Ho-Kyung Doo, Tae-Won Lee¹⁾, Jae-Kyung Park²⁾

Department of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Department of Internal medicine, College of Medicine, Kyunghee University¹⁾, WHO Collaborating Center for Traditional Medicine, Kyunghee Medical Center²⁾

Objectives : The progression of renal disease can be identified as a glomerulosclerosis by histological examination, and the basic mechanism of glomerulosclerosis is mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation.

ICAM-1, β 1-integrin and MHC-class II are known to attribute to the progression of glomerulosclerosis. They mediate cell-cell or cell-matrix interactions and are expressed in response to injury and inflammation.

Up to now, there have been few satisfactory regimens to treat glomerular diseases except minimal change nephrotic syndrome, which can be improved by steroid therapy. Studies were performed in order to investigate whether *Jinmu-tang* has suppressive effects on some factors associated with the progression of glomerular disease, mesangial cell proliferation, fibronectin synthesis, ICAM-1, β 1-integrin and MHC-class II expression.

Methods : Studies were performed with the method of surface enzyme immunoassays or flow cytometry after addition of peripheral blood mononuclear cells(PBMC) supernatants treated with *Jinmu-tang*, using the cultured human mesangial cells.

Results :

1. The suppressive effect of *Jinmu-tang* on mesangial cell proliferation was higher than that of hydrocortisone.
2. *Jinmu-tang* has some suppressive effects on fibronectin synthesis, ICAM-1, expression, β 1-integrin expression and MHC-class II expression of mesangial cells, but was lower than hydrocortisone.

Conclusions : *Jinmu-tang* generally shows some immunosuppressive effects. We carefully suggest that the above prescription may be applied to prevent the progression of renal disease or can be used as an adjuvant of or a substitute for steroid therapy. (J Korean Oriental Med 2000;21(3):40-50)

Key Words: *Jinmu-tang*, Mesangial cell proliferation, Mesangial fibronectin synthesis, ICAM-1 expression, β 1-integrin expression, MHC-class II expression.

서 론

· 접수 : 2000년 7월 8일 · 수정 : 9월 27일 · 채택 : 10월 2일
· 교신저자 : 안세영, 서울시 동대문구 회기동1 경희의료원한방
병원 신계내과
(Tel. 02-958-9152, E-mail. ajhj@unitel.co.kr)

대부분의 원발성 사구체신염과 이차적 사구체질환
은 결국에는 비가역적인 신손상과 이로 인한 신기능

의 현저한 저하를 특징으로 하는 만성신부전으로 이행하게 된다. 이러한 사구체질환에서 공통적으로 관찰되는 특징적 조직 소견은 메산지움의 확장이며, 메산지움의 확장을 일으키는 구성 요소로는 메산지움 세포의 증식과 메산지움 기질 축적이며¹⁶⁾, 이에 대한 기전으로 면역학적 손상이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 즉 손상된 사구체에서 cytokine이 분비되면 이 cytokine에 자극된 림프구들이 사구체내로 이동하게 되는데, 이때 cytokine은 메산지움 세포 증식과 메산지움 기질축적 뿐만 아니라, ICAM-1의 발현증가⁹⁾와 $\beta 1$ -integrin 발현증가^{10,11)}, MHC-class II molecule 발현증가^{12,13)} 등으로 메산지움 세포증식과 메산지움 기질축적을 촉진시키게 된다고 알려져 있다.

그러나 현재까지 이러한 만성 진행성사구체질환에 대한 확실한 치료법은 없는 상태이며 스테로이드나 cyclophosphamide 등의 면역억제제와 각각의 증상에 따른 대증요법 등이 시행되고 있는데, 미세변화 신증후군을 제외한 나머지 질환에서는 뚜렷한 효과를 입증할 만한 근거가 없는 상황이며, 이러한 약제의 장기복용으로 인한 부작용으로 치료에 제한도 따르게 된다.

따라서, 한약제의 투여로 사구체 손상과 관련된 면역학적 억제효과를 관찰할 수 있다면 만성진행성 사구체질환에 대한 안전하고 효율적인 새로운 치료방법의 하나가 될 수 있을 것이다.

이에 저자는 한의학 문헌과 그간 임상에서 신장질환에 응용되고 있는 韓藥處方중 眞武湯을 선택한 후 이들 약물의 효과를 실험적 방법으로 규명하는 한편 현재 임상에 사용되고 있는 스테로이드 제제와의 효능을 비교 검토하고자 실험실 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 약제

1) 약제의 종류

본 실험에 사용하는 약제는 모두 경희의료원 한방병원 약제부에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 眞武湯(진무탕)의 구성내용과 사용량은 다음과 같다 (Table 1).

2) 약제의 추출

총량 200g으로 환산한 상기약제를 각각 1,500ml의 증류수에 넣어 4시간동안 가열추출하고 여과한 여액을 rotary evaporator(Model NE-1, 東京理化學株式會社, 日本)로 감압 농축한 후 동결건조기(Model FD-1, 東京理化學株式會社, 日本)로 건조시켰다.

동결 건조된 각 약제 1차 추출물 1g씩을 10 ml의 증류수로 용해시킨 후 95℃ 수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출하였고, 이들 추출물을 원심분리용 시험관에 담아 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 수거하였다. 이 상청액을 직경 0.2 μ m의 여과지를 통과시켜 여과멸균하였으며, 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다.

3) 시험관내 약제농도의 결정

(1) 말초혈액 단핵세포의 분리 및 배양

건강한 정상인으로부터 정맥혈 400ml를 채혈한 다음 채혈액을 1500 rpm에서 15분간 원심침전하였다. 혈액액을 plasma extractor로 옮겨 혈장을 분리한 후 단핵구를 포함하는 buffy-coat 70ml를 분리하였다. 분리된 buffy-coat에 동량의 phosphate-buffered saline

Table 1. The Galenical and Botanical Names of Jinmu-tang

Oriental herb	Galenical name	Botanical name	gm
白茯苓	Hoelen	<i>Poria cocos</i> Wolff	12
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	<i>Paeoniae lactiflora</i> PALL.	12
附子(炮)	<i>Aconiti lateralis Preparata Radix</i>	<i>Aconitum carmichaeli</i> DEBX	12
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	<i>Atractyodes macrocephala</i> KOIDZ	8
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	<i>Zingiber officinale</i>	6
Total			36

(PBS, pH 7.4) 용액을 가하여 회석하였다. 회석된 buffy-coat 30ml를 15ml의 Ficoll-Hypaque solution(비중 1.077, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) 위에 중첩시킨 다음 400 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리후 Ficoll-Hypaque 층과 플라스마 층 사이에 형성된 단핵세포층을 수거하였다. PBS 용액으로 2회 세척하고 우태아 혈청이 10%되게 첨가된 RPMI 1640 배양액에 세포농도가 $2 \times 10^6/ml$ 의 농도가 되도록 하였다. 여기에 Concanavalin-A(Con-A)가 $20 \mu g/ml$ 의 농도가 되도록 추가한 다음 96well flat-bottomed microplate well 당 $100 \mu l$ 씩 분주하였다. 단핵세포가 분주된 각 well에 2배수로 계단희석된 각 약제를 $100 \mu l$ 씩 가하여 최종농도가 $2000 \mu g/ml \sim 15.6 \mu g/ml$ 이 되도록 한 다음 $37^\circ C$, 5%CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다.

(2) 약제농도의 결정

72시간 후 각 well에 MTS-PMS 시약((3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)

-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt ; MTS)

-(phenazine methosulfate ; PMS)(Promega, Madison, USA)을 $20 \mu l$ 씩 가한 다음 $37^\circ C$, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 추가 배양한 후 spectrophotometer 파장 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험관내에 사용할 약제의 농도는 대조군에 비하여 흡광도 값이 현저하게 낮아지기 직전의 농도로 하였고, 본 실험에 사용한 한약의 약물농도는 $100 \mu g/ml$ 였다.

2. 메산지움세포의 배양

신절제술로 얻어진 사람 정상신장으로부터 신피질을 박리하여 3×3 mm 정도의 크기로 분절한 후, 직경 $500 \mu m$, $250 \mu m$ 및 $100 \mu m$ 의 stainless steel mesh에 차례로 통과시켜 $100 \mu m$ mesh위에 모여진 사구체를 수거하였다. 수거된 사구체를 Hank's Balance Salt Solution(HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 1회 세척한 다음 $2mg/ml$ 의 collagenase로 $37^\circ C$ 에서 15분간, 그리고 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액으로 5분간 처리하였다. 그후 $75cm^2$ 조직배양 플라스크

(Costar, MA, USA)에 사구체를 넣고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEZ, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 20% 우태아 혈청과 $100unit/ml$ 의 penicillin, $100 \mu g/ml$ 의 streptomycin, $10 \mu g/ml$ 의 insulin이 첨가된 배양액으로 배양하였다.

세포가 단층을 형성하면 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액을 처리하여 낱개의 세포로 유리시켜 2차, 3차 계대배양하였다. 메산지움 세포의 확인은 미오신 섬유 양성반응과 공통백혈구 항원 및 factor VIII 음성, 그리고 D-valine 대체배지에서 성장, puromycin 저항성 등의 특성을 나타내어 메산지움세포임을 확인하였다. 본 연구에 이용된 메산지움세포는 4대째 계대배양중인 메산지움 세포를 이용하였다.

3. 단핵세포 배양상청액의 제조

Ficoll-Hypaque 밀도구배방법에 수확된 단핵세포를 우태아혈청이 10%되게 첨가된 RPMI 1640 배양액에 세포를 $2 \times 10^6/ml$ 의 농도로 부유시킨 다음 여기에 phytohemagglutinin-P(PHA-P) 및 Con-A를 각각 $10 \mu g/ml$ 이 되도록 첨가하였다. 이들 세포를 6well plate의 각 well당 5ml씩 분주하고 여기에 약물 세포독성 시험에서 결정한 한약제농도로 각각의 약제를 첨가하여 $37^\circ C$, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간 후 각 well로부터 배양상청액을 수거하여 사용시까지 $-70^\circ C$ 냉동고에 보관하였다.

대조군으로는 RPMI 배양액에 PHA-P와 Con-A를 첨가하되 약제는 첨가하지 않은 대조군과 RPMI 배양액에 PHA-P와 Con-A를 첨가하고 hydrocortisone을 가한 hydrocortisone군으로 하였다.

4. 메산지움세포의 증식 시험

4대째 계대배양 중인 메산지움세포를 낱개의 세포로 수거하여 우태아 혈청이 10%, insulin이 $10 \mu g/ml$ 로 첨가된 DMEM 배양액에 $2 \times 10^6/ml$ 의 농도로 부유시킨 다음 96well flat-bottomed microplate의 각 well당 $100 \mu l$ 씩 분주하여 $37^\circ C$, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 여기에 각각의 약제가 처리된 단핵세포 배양 상청액을 25% 및 50%가 되게

첨가한 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간후 각 well에 MTS-PMS 용액을 20μl 씩 분주하여 4시간 추가배양한 다음 spectrophotometer 파장 492nm에서 그 흡광도를 측정하였으며 실험은 삼중반복으로 하였다.

5. 메산지움세포의 fibronectin 분비능 측정

4대째 계대배양중인 메산지움세포를 수거한 다음 10%의 우태아 혈청, 10μg/ml의 insulin이 첨가된 DMEM 배양액에 1×10⁵/ml의 세포농도로 조정하였다. 이를 다시 24well plate well당 1ml씩 분주하고 24시간 배양하였다. 24시간후 배양액을 제거하고 각각의 약제를 처리된 단핵세포 배양상청액이 25%가 되게 조정된 배양액을 well당 1ml씩 첨가하여 세포배양기에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 72시간 배양하였다. 72시간후 배양액을 수거하고 각 well을 PBS 용액으로 2회 세척한 다음 우태아 혈청이 첨가되지 않은 DMEM 배양액을 기초배지로 각 well에 1ml씩 분주하여 세포배양기에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well로부터 배양액을 수거하여 fibronectin 분석시까지 -70℃에 보관하였다. 각 검체로부터의 fibronectin의 측정은 fibronectin enzyme immuno assay(EIA) kit(Cat# MK115, Takara)를 이용하여 측정하였다. 약술하면 anti-fibronectin antibody가 coating된 microplate에 표준검체 및 검체를 100μl씩 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 다음 각 well을 세척완충액으로 4회 세척하였다. 여기에 peroxidase가 부착된 2차 anti-fibronectin antibody를 각 well당 100μl씩 분주하여 실온에서 15분간 발색시켰다. 15분후 1N H₂SO₄ 반응정지액을 각 well에 100μl씩 가한 다음 spectrophotometer 파장 450nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선상에서 각 검체의 fibronectin양을 구하였다.

6. β1-integrin, ICAM-1 및 MHC-class II(HLA-DR molecule) 발현도의 측정

4대째 계대배양중인 메산지움세포를 수거하여 10% 우태아 혈청, 10μg/ml insulin이 첨가된 DMEM

배양액에 5×10⁴/ml의 농도로 조정한 다음, 6well plate well당 4ml씩 분주한 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간후 배양액을 제거하고 각 약제를 처리된 단핵세포 상청액이 25%가 되게 첨가된 DMEM 배양액으로 교체한 다음, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양이 끝나면 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액을 처리하여 날개의 세포로 수확한 다음, 우태아 혈청이 5%가 되게 첨가된 PBS용액으로 2회 세척하였다. 이들 세포에 Anti-β1 monoclonal antibody(Phaminogen, San Diego, CA, USA) 및 Anti-ICAM-1 monoclonal antibody (Becton Dickinson, Mountain view, CA, USA) 및 Anti-HLA DR monoclonal antibody(Becton Dickinson, Mountain view, CA, USA)를 각각 처리하여 4℃ 냉수조에서 1시간 반응시켰다. 음성대조군은 Isotype이 같은 mouse IgG를 사용하였다. 1시간후 bovine serum albumin이 0.5%가 되게 첨가된 cold PBS용액으로 2회 세척한 후, FITC가 부착된 goat anti-mouse antibody 시약을 각각의 세포를 처리하여 4℃ ice water에서 1시간 반응시켰다. 이들 세포를 2회 세척한 다음 0.4ml의 1% paraformaldehyde용액에 부유시킨 다음, flow cytometer에서 그 형광광도를 측정하여 각 molecule의 발현정도를 측정하였다.

7. 통계처리

통계처리는 SPSS(Statistical Package for Social Science)를 사용하여 paired sample test법으로 검증하였다.

결 과

1. 眞武湯이 메산지움 세포증식에 미치는 영향

메산지움 세포에 50%의 단핵세포 배양 상청액을 가한 실험에서 흡광도는 眞武湯이 1.015±0.040으로서 hydrocortisone군(1.148±0.047)에 비해 메산지움 세포 증식억제효과를 보였다(P<0.05).

메산지움 세포에 25%의 단핵세포 배양 상청액을 가한 실험에서 흡광도는 眞武湯이 0.888±0.080으로

서 hydrocortisone군(1.013±0.012)에 비해 메산지움 세포 증식 억제효과를 나타내었다(P<0.05)(Fig. 1, Table 2).

2. 眞武湯이 메산지움 fibronectin 발현에 미치는 영향

fibronectin 발현도는 mitogen 자극후 7412±17로서 자극전의 5012±20보다 현저히 증가되었다.

眞武湯을 가한 후 흡광도는 6175±134으로 대조군(7412±17)에 비해 유의한 억제를 보였으나(P<0.05), hydrocortisone군(6395±35)과는 차이가 없었다(Fig. 2, Table 2).

3. 眞武湯이 메산지움 ICAM-1 발현에 미치는 영향

ICAM-1 발현도는 mitogen 자극후 17.69로서, 자극전의 2.06에 비해 현저히 증가되었다.

眞武湯을 가한 경우 ICAM-1 발현도는 12.92으로서 대조군의 17.69에 비해 유의한 ICAM-1 발현 억제

효과를 나타내었고(P<0.05), hydrocortisone군(5.44)에 비해서는 억제효과가 적었다(Fig. 3, Table 2).

4. 眞武湯이 메산지움 β 1-Integrin 발현에 미치는 영향

β 1-integrin 발현도는 mitogen 자극후 465.00로서 자극전 321.09에 비해 현저히 증가되었다.

眞武湯을 가한 경우 β 1-integrin 발현도는 451.41으로서 대조군의 465.00에 비해 큰 차이가 없었다(P<0.05), hydrocortisone군의 343.49에 비해서는 억제효과가 적었다(P<0.05)(Fig. 4, Table 2).

5. 眞武湯이 메산지움 MHC-class II 발현에 미치는 영향

MHC-class II 발현도는 mitogen 자극후 19.61으로서 자극전의 2.01에 비해 현저히 증가되었다.

약제실험에서는 眞武湯을 가한 경우 MHC-class II 발현도가 17.94로서 대조군(19.61)에 비해 유의한 발

Table 2. The Effects of *Jinmu-tang* on the Mesangial Cell Proliferation, Fibronectin Synthesis and Expression of ICAM-1, β 1-Integrin and MHC-class II Expressed as Optical Density

	Mesangial cell proliferation		Fibronectin synthesis	ICAM-1 expression	β 1-Integrin expression	MHC-class II expression
	50% supernatant	25% supernatant				
Control	1.016±0.05	1.004±0.01	7412±17	17.69	465.00	19.61
Hydrocortisone	1.148±0.04	1.013±0.01	6395±35	5.44	343.49	6.19
<i>Jinmu-tang</i>	1.015±0.04**	0.888±0.08**	6175±13*	12.92*	451.41*	17.94*

* P<0.05 VS. control ** P<0.05 VS. hydrocortisone

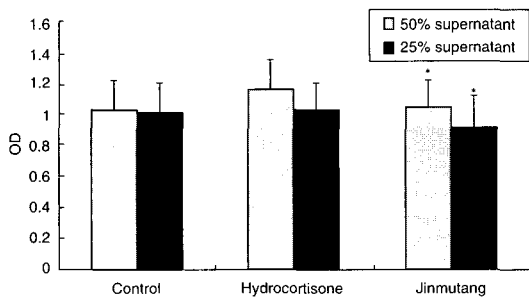


Fig. 1. The effects of *Jinmu-tang* on the mesangial cell proliferation expressed as optical density.
* P<0.05 VS. hydrocortisone

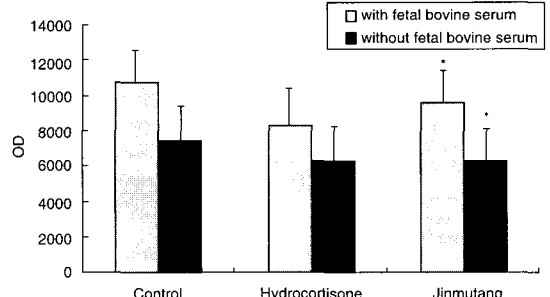


Fig. 2. The effects of *Jinmu-tang* on the fibronectin synthesis by cultured human mesangial cells expressed as optical density.
* P<0.05 VS. control

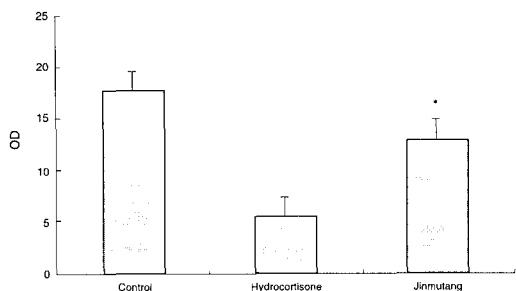


Fig. 3. The effects of *Jinmu-tang* on the ICAM-1 expression in cultured human mesangial cells.
* P<0.05 VS. control

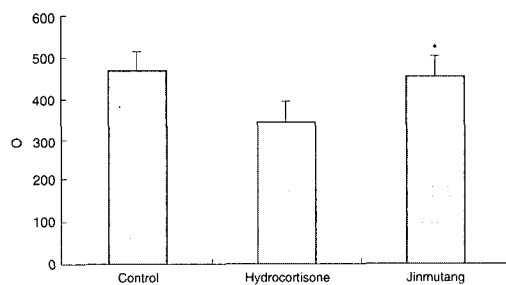


Fig. 4. The effects of *Jinmu-tang* on the β 1-Integrin expression in cultured human mesangial cells.
* P<0.05 VS. control

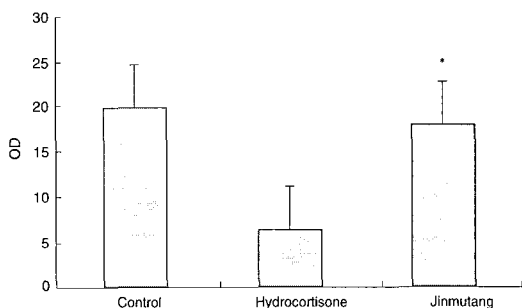


Fig. 5. The effects of *Jinmu-tang* on the MHC-class II expression in cultured human mesangial cells.
* P<0.05 VS. control

현 억제효과를 나타내었고(P<0.05), hydrocortisone군 (6.19)에 비해서는 억제효과가 적었다(Fig. 5, Table 2).

고 안

비가역적인 신손상과 이로 인한 사구체 여과기능의 현저한 저하를 특징으로 하는 만성신부전으로 진행하게 되는 대부분의 원발성 및 이차성 사구체질환에서 공통적으로 관찰되는 사구체의 주된 조직소견은 메산지움의 확장이며, 이의 주된 요소는 메산지움 세포증식과 기질축적이라고 알려져 있다^{1,5)}. 또한, 이러한 메산지움 세포증식과 메산지움 기질축적에 면역학적 기전이 중요한 역할을 한다고 밝혀진^{7,8)} 이후 현재 이에 대한 치료로서 스테로이드나 cyclophosphamide 등의 면역억제제가 치료법으로 사용되고 있다. 그러나 미세변화 신증후군을 제외한 나머지 신질

환에서는 아직 뚜렷한 효과가 없는 상황이며, 이러한 약제의 장기복용으로 인한 부작용으로 치료대상환자의 제한도 따르게 된다. 결론적으로 현재까지 만성 진행성 사구체질환에 대한 확실한 치료법은 없는 상태이며 면역억제제와 각각의 증상에 따른 대증요법이 만성사구체질환의 치료법으로 시행되고 있다^{7,8)}.

이처럼 치료법의 제한으로 인해 임상에서 한약의 투여가 시도되고 있지만, 한약제가 메산지움세포의 증식과 기질의 축적에 미치는 영향에 대해 연구한 보고가 없을 뿐만 아니라, 면역학적 기전을 이용한 실험방법으로 한약의 안정성 및 유효성에 대한 보고가 없는 상황이어서 이에 대한 연구가 필요한 상황이라고 할 수 있다.

이에 저자는 한의학 문헌과 그간 임상에서 신장질환에 널리 사용되고 있는 韓藥處方들을 검토하여 眞武湯을 선택한 후, 메산지움 세포증식 억제 그리고 메산지움 기질축적 억제효과가 있는지, 나아가 면역억제효과가 있는지에 대하여 실험적 방법으로 규명함으로써 그간 사용되어온 한약처방의 효능을 검증하고, 가능하다면 만성사구체질환에 대한 새로운 치료법을 찾고자 다음과 같은 연구를 시행하게 되었다.

정상인의 정맥혈에서 분리한 단핵구를 배양하되 mitogen을 첨가하고, 眞武湯을 가한 군을 실험군으로 하고, 대조군으로는 배양액에 mitogen을 첨가하되 아무 약제를 첨가하지 않은 대조군과 배양액에 mitogen을 첨가하고 hydrocortisone을 가한 hydro-

cortisone군을 설정하여, 실험약제가 메산지움세포증식, ICAM-1, β 1-integrin, MHC-class II 발현에 미치는 영향을 비교 관찰하는 실험을 진행하였다.

대조군으로 hydrocortisone을 선택한 이유는 hydrocortisone은 거식세포와 단핵구내 interleukin-1(IL-1)^{14,16)}, interleukin-6(IL-6)^{17,18)}의 mRNA의 전사를 차단함으로써 IL-1, IL-6의 생성과 분비를 억제하며, interferon- γ (IFN- γ)¹⁹⁾, tumor necrosis factor- α (TNF- α)²⁰⁾ 유전자 발현 및 mRNA 전사를 억제하며, 상대적인 림프구 결핍증을 유발하고, 염증부위로 단핵구가 이동하는 것을 차단하고, 화학주성물질의 합성, 분비 및 작용을 억제하는 등 광범위한 면역억제 및 항염증작용을 나타내며⁸⁾, 메산지움 세포증식억제와 세포외기질 합성, ICAM-1, β 1-integrin 및 MHC-class II 발현 등의 억제효과가 있는 것으로 알려져²⁸⁾있어 본 실험의 대조군으로 채택하게 되었다.

그리고, 이러한 실험에 앞서 본 연구에서 사용할 실험약제의 선정을 위한 東洋醫學的인 고찰을 시행하였다. 메산지움 세포증식과 메산지움 기질축적을 특징으로 하는 만성진행성 사구체질환으로 나타나는 증상은 東洋醫學의 風水, 關格, 小便不通, 尿異常, 浮腫, 血尿, 尿濁, 虛損, 癰閉 등의 다양한 범주에 해당한다고 할 수 있으며, 그 원인도 다양하여 風熱, 風寒, 寒濕 등이 야기하는 毒氣에 腎臟이 손상되거나, 邪氣가 內結하여 濕熱이 內蒸하여 氣血이 凝結되고 氣機가 失常되어 손상된 것이라 할 수 있다²¹⁾. 즉 메산지움 세포증식과 메산지움 기질축적은 어느 특정 사구체질환이라기보다는 대부분의 사구체질환에서 관찰되는 조직소견으로서 그 증상 역시 사구체질환으로 나타날 수 있는 모든 증상을 포괄하며 東洋醫學的으로 고찰하였을 때에도 거의 모든 腎病證의 범주에 해당한다고 할 수 있다.

따라서 임상에서도 각각의 東洋醫學的인 病因論과 病證論에 따른 辨證施治의 정신에 입각하여 利水, 通泄, 解毒, 補腎, 補脾 등의 다양한 治法들을 응용할 수 있겠으며 응용처방도 매우 다양하다²¹⁾.

이에 저자는 韓醫學 文獻과 그간 임상에서 신장질환에 널리 사용되고 있는 한약처방들을 검토하여 眞

武湯을 선택하게 되었다.

본 실험에 사용된 眞武湯은 漢代 張仲景의 傷寒論에 나오는 處方으로서 溫陽利水하는 效能이 있어 腎陽이 虛衰하여 水氣가 內停되어 나타나는 小便不利, 四肢沈重疼痛, 惡寒腹痛, 下利와 四肢浮腫 등에 應用하는데, 그 處方 내용은 茯苓 芍藥 生薑 白朮 附子로 구성되어 있다. 張仲景은 傷寒論에서 “太陽病 發汗 汗出不解 其人仍發熱 心下悸 頭眩 身瞤動 振振欲地者 眞武湯主之”이라 하였고, “少陰病 二三日不已 至四五日 腹痛 小便不利 四肢沈重疼痛 自下利者 此爲有水氣 其人或咳 或小便利 或下利 或嘔者 眞武湯主之”라 하여 眞武湯이 腎陽虛寒으로 인한 水腫을 치료하는 대표적인 方劑라는 것을 論說하였다^{22,23)}.

전술한 메산지움 확장이 비가역적인 신손상으로 이행하게 되는 기전을 살펴보면 메산지움 세포증식과 기질축적에 의해 메산지움 확장이 발생하고 이는 사구체모세혈관 내강을 압박하여 사구체 모세혈관표면적이 작아져 사구체 여과면적의 감소가 일어나게 되고 이에 따라 상승된 사구체 내압은 메산지움 세포와 내피세포들에 지속적인 손상을 초래하여 그 결과 사구체경화증(glomerular sclerosis)이 유발되게 되고²⁴⁾ 결국은 만성신부전과 같은 비가역적인 신손상으로 진행하게 된다.

그리고, 최근연구에 의하면 이러한 비가역적인 사구체 손상을 유발시키는 메산지움 세포증식과 기질축적의 원인으로 면역학적 기전이 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 즉 인체면역반응에 관여하는 면역세포로는 림프계세포(B 세포, T 세포)와 염증세포, 그리고 이외 조혈계세포들이 있는데 이들은 서로 직접 접촉하거나 혹은 이들 세포들이 분비하는 단백질에 의하여 항원자극이 다른 면역세포에 전달되어 보다 강력한 면역기능을 수행하게 되며, 이때 이들 세포들에서 분비되는 분자량이 작은 단백을 cytokine이라 부른다¹⁹⁾. 그리고 이러한 cytokine에는 성장인자로 작용하는 IL-1^{14,16)}, IL-6^{17,18)}, TNF- α ²⁰⁾와 PDGF^{25,26)}, IFN- γ ¹⁹⁾외에 다양한 종류가 존재하여 서로간에 상승, 길항작용 등을 통해 면역반응을 매개한다^{19,27)}. 그러나 사구체질환을 유발시키는 면역학적 손상과 혈액동학

적 손상 또는 당뇨병성신증과 같은 대사성변화상태에서는 사구체 내에 정상적으로 존재하는 세포뿐만 아니라 단구세포나 혈소판과 같은 침윤세포들로부터 cytokine이 분비되고 분비된 cytokine은 서로간의 network이나 prostaglandin등의 secondary messenger를 통해 메산지움의 증식을 유발시켜 사구체 경화에 관여하게 된다²⁸⁻³⁰⁾.

따라서, 만성 진행성 사구체 질환의 주된 원인은 메산지움 세포증식과 기질축적이라 할 수 있겠다. 그리고 이를 관찰하는 방법으로는 직접 메산지움 세포증식 정도를 검사하거나, 기질의 주요 구성요소인 collagen, fibronectin 발현도를 검사하는 방법 외에도 cytokine자극으로 활성화되어 나타나는 ICAM-1 발현도 검사, β 1-integrin 발현도 검사, MHC-class II molecule 발현도 검사, mRNA 발현도 검사 등의 면역학적 실험방법이 있는데 본 실험에서는 메산지움 세포 증식과 ICAM-1 발현도, β 1-integrin 발현도, MHC-class II molecule 발현도 등을 관찰하는 연구를 시행하였다. 각각의 의의 및 본 실험 결과를 살펴보면 다음과 같다.

실험약제가 메산지움 증식에 미치는 영향을 관찰한 본 실험 결과 메산지움 세포에 50%, 25%의 단핵세포 배양 상청액을 가한 실험 모두에서 眞武湯이 hydrocortisone에 비해 유의한 메산지움 세포 증식억제효과를 나타내었다.

또한, 알려진 바와는 다르게^{7,8)} 메산지움 세포증식 억제실험에서 hydrocortisone이 메산지움 세포증식 억제효과가 없는 것으로 나타난 반면 다른 실험에서는 면역억제효과를 나타내었다. 이는 mitogen 자극에 의해 분비된 cytokine들간의 상호작용에 의해 세포증식 cytokine의 영향이 상쇄된 반면 세포증식억제 cytokine의 영향이 보다 크게 작용한 것으로 사료되나, 이에 대한 자세한 고찰은 mitogen으로 사용한 Concanavalin-A로 자극하여 얻은 상청액을 분석하여 본실험에 주된 작용을 일으킨 특정 cytokine을 규명함으로써 정확한 판정이 가능할 것으로 여겨진다.

사구체의 세포외 기질(extracellular matrix : ECM)은 주로 메산지움 기질(mesangial matrix)와 기저막

(basement membrane)으로 이루어져 있으며, 그 성분은 type IV collagen이외에 glycoprotein의 일종인 fibronectin, laminin, thrombospondin등으로 구성되어 있다^{31,32)}.

이중 fibronectin은 collagen과 함께 ECM의 주요 구성요소로서 당노를 비롯한 대사성 질환이나 염증상태에서의 macrophage, T 세포, 메산지움 세포, tubular epithelial cell 등에서 생산되는 IL-1, PDGF, IGF-1, TGF- β , IFN- γ 등의 cytokine들이 메산지움 세포에서의 collagen과 fibronectin의 합성을 촉진시켜 메산지움 기질 등을 비롯한 세포외 기질의 축적이 발생하게 되고³³⁾ 그 결과 메산지움 기질축적이 발생하게 된다³⁴⁾. 실험약제가 메산지움 fibronectin 발현에 미치는 영향을 관찰한 본 실험 결과 眞武湯이 대조군에 비해 유의한 메산지움 fibronectin 발현 억제효과를 나타내었지만, hydrocortisone에 비해서는 억제효과가 적었다.

세포간 접착물질(intercellular adhesion molecule-1 : ICAM-1)은 면역글로불린(immunoglobulin : Ig) superfamily의 일원으로서 염증반응 초기에 백혈구와 내피세포의 유착은 물론 염증세포의 이동과 동원에 관여하며¹⁹⁾ 내피세포와 메산지움 세포에 기본적으로 발현되거나 또는 cytokine에 의해 발현된다^{6,35-40)}. 특히 ICAM-1은 β 1-integrin에 속하는 중요한 세포유착분자인 LFA-1의 배위자(ligand)로서 메산지움 세포를 비롯한 혈관내피세포, 탐식세포, 활성화된 B세포, T세포 등의 표면에 발현되는데 이 ICAM-1이 발현되면 T세포 활성화, B세포 활성화, NK cell 활성화, 내피와 상피 등에 백혈구의 접착이 촉진되어 다양한 면역반응이 일어나게 된다¹⁹⁾. 즉 손상된 사구체에서 cytokine이 분비되면 이 cytokine에 자극된 림프구들이 사구체 모세혈관내로 이동하게 되고, 메산지움 세포에서는 ICAM-1의 발현이 증가되어 사구체에 존재해 있거나 이동해 온 림프구와의 부착을 견고히 해 줌으로써 면역반응을 지속적으로 유지시켜 주고 동시에 부착된 림프구에서는 또다른 여러 가지 cytokine들이 분비되면서 사구체 손상을 촉진시키게 된다. 실험약제가 ICAM-1 발현에 미치는 영향을 관

찰한 본 실험결과 眞武湯이 대조군에 비해 유의한 ICAM-1 발현 억제효과를 나타내었으나 hydrocortisone에 비해서는 상대적으로 억제효과가 적은 것으로 나타났다.

Integrin은 세포부착을 매개하는 세포표면의 단백질 수용체로서 세포와 세포, 세포와 기질(extracellular matrix : ECM)의 결합을 매개하는 초기 매개역할을 한다¹⁹⁾. 이중 $\beta 1$ -integrin은 ECM의 수용체로서 ICAM-1과 면역 또는 염증반응에서 일어나는 세포와 세포간 또는 세포와 기질간의 상호작용에 중요한 역할을 하며 이러한 작용은 cytokine들에 의해 조절된다고 한다^{10,11)}. 이에 collagen, laminin에 대한 수용체인 $\alpha 1\beta 1$ 과 fibronectin에 대한 수용체인 $\alpha 5\beta 1$, laminin에 대한 수용체인 $\alpha 6\beta 1$ 등이 있는데, 이는 주로 세포와 기질사이의 부착기능을 수행한다. 메산지움 세포는 표면에 $\beta 1$ -integrin을 가지고 있어 메산지움 세포의 $\beta 1$ -integrin에 세포외기질이 결합하면 그 부착을 견고하게 하여 항원항체반응을 지속적으로 유지시켜 준다. 실험약제가 $\beta 1$ -integrin 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 眞武湯이 대조군에 비해 유의한 $\beta 1$ -integrin 발현 억제효과를 나타내었으나, hydrocortisone에 비해서는 상대적으로 적은 억제효과를 보였다.

주조직 적합항원(major histocompatibility antigen : MHC antigen)에는 HLA-A, -B, -C를 가지는 class I molecule과 HLA-DR, -DQ, -DP의 class II molecule이 있는데, class I molecule은 적혈구를 제외한 모든 유핵세포에 존재하여 cytotoxic CD8 T cell에 의해 인지되며, class II molecule은 B세포와 단핵구에 존재하여 helper CD4 T cell과 반응하여 다양한 면역반응을 일으킨다. B 림프구 표면에는 제1형 주조직적합항원(class I major histocompatibility complex antigen : MHC class I)과 제2형 주조직적합항원(class II major histocompatibility complex antigen : MHC-class II)이 모두 존재하지만 휴식기의 T 림프구 표면에는 MHC-class I만이 표현되었다가 T림프구가 항원자극을 받아 활성화되면 MHC-class II를 표현하게 된다. 메산지움 세포가 cytokine에 자극되면 MHC-class II를 생

성하여 helper T cell의 활성화조분자인 CD4와 결합하여 helper T cell에 항원정보를 제공하고 다시 helper T cell은 IL-2를 만들어 내며 생성된 IL-2는 B 세포 활성화 등의 여러 가지 면역학적 반응을 유발하게 되어 이로 인한 사구체로의 면역세포들의 유입, 침윤이 일어나 결국 사구체손상이 촉진되게 된다^{12,13)}. 실험약제가 MHC-class II 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 眞武湯이 대조군에 비해 유의한 발현 억제효과를 나타내었으나, hydrocortisone에 비해서는 억제효과가 상대적으로 적었다.

이상과 같이 각각의 실험에서 眞武湯은 메산지움 세포증식, fibronectin 발현과 ICAM-1, $\beta 1$ -integrin, MHC-class II 발현에 어느 정도 억제효과를 나타내었다.

따라서, 위의 실험약제를 hydrocortisone 부작용으로 사용에 제한이 따르는 환자에게 단독투여하거나 hydrocortisone과의 병행투여로 그 작용을 강화시켜 사용량을 줄일 수 있는 효과를 기대할 수 있겠으나, 이는 추후 실험약제와 hydrocortisone과의 병용실험을 통해 확인해야 할 것이다.

또한, 본 실험이 정상인의 단핵세포와 정상인의 메산지움 세포를 사용하여 시행된 실험으로서 본실험의 결과를 실제 환자에 직접 적용시켜 메산지움 세포증식 억제와 메산지움 기질축적 억제효과 및 면역 억제효과가 있다고 판정하기에는 부족한 점이 있으므로, 향후 질환군을 대상으로 하는 대조실험과 실제 환자를 대상으로 한 in vivo 상태에서의 임상실험이 필요하리라 사료된다.

결론

眞武湯이 메산지움 세포증식과 ICAM-1 발현, $\beta 1$ -integrin 발현, MHC-class II 발현에 미치는 영향을 규명하기 위해 시행한 실험실 연구 결과에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 眞武湯이 메산지움 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 실험에서 메산지움 세포에 50%와 25%의 단핵세포 배양 상청액을 가한 실험 모두에서

hydrocortisone에 비해 유의한 메산지움 세포 증식억제효과를 나타내었다.

2. 眞武湯이 메산지움 fibronectin 합성과 ICAM-1, β 1-integrin, MHC-class II 발현 억제효과를 나타냈으나, hydrocortisone에 비해서는 억제효과가 적었다.

이상의 결과에서 보면 眞武湯이 각각의 실험에서 유의한 억제효과를 나타내었으나, hydrocortisone에 비해서는 상대적으로 적은 억제효과를 나타내 hydrocortisone 부작용으로 사용에 제한이 있는 환자에 단독투여나 hydrocortisone 병행투여에 응용할 수 있겠다. 그러나, 이 실험이 정상인을 대상으로 실험실 상태에서 행해진 실험으로 위의 결과만으로 眞武湯이 실제 임상에서의 면역억제효과유무를 판별하기에는 부족한 면이 있다고 할 수 있다. 따라서, 향후 본 실험에서 나타난 眞武湯에 대한 추가실험과 질환군에서의 대조실험 및 생체내 상태를 반영할 수 있는 임상실험이 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. 박수길, 김순배, 박정식, 홍창기. 저비중 지단백이 백서 배양세포의 증식과 교원질 생성에 미치는 영향. 대한신장학회지. 1992;11:214-221.
2. Border WA. Distinguishing minimal-change disease from mesangial disorder. *Kidney Int.* 1988;34:419-425.
3. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med.* 1988;318:1657-1666.
4. Liliane Morel-Maroger Strike, Paul D. Killen, Emil Chi. The composition of glumerulosclerosis. *Lab Invest.* 1984;51:181-192.
5. Pamela J. Shultz, M.D. and Leopoldo Raij, M.D.. The glomerular mesangium : Role in initiation and progression of renal injury. *Am J Kidney Dis.* 1991;17:8-14.
6. Wuthrich RP. Intercellular adhesion molecules and vascular cell adhesion molecule-1 and the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1992;3:1201.
7. 김현철, 박성배. 임상 신장학. 제3판. 서울:계명대학교출판부 1997:29-31.
8. 연세대학교 신장질환연구소. 신장학. 서울:의학문화사. 1999:1-7,405-408,428-439,781-791.
9. Robert Rothlein and Craig Wegner. Role of intercellular adhesion molecule-1 in the inflammatory response. *Kidney Int.* 1992;41:617-619.
10. Tae-Won Lee, Jai-Kyung Park, Jae-Hyun Ahn, Chun-Gyoo Ihm. Role of mononuclear cells of IgA nephropathy on ICAM-1 expression in mesangial cells. *The Kor J Int Med.* 1998;13:27-32.
11. Ruoslahti E. Integrins, *J Clin Invest.* 1991;87:1.
12. 김명재, 홍성표, 박재경, 이태원, 임천규. 신이식 전후에 말초 혈액 단핵구의 cytokine 생산과 ICAM-1 및 제 2형 주조직적합항원 발현에 대한 연구. 대한내과학회지. 1998;55: 1070-1078.
13. Robert W. Schrier, M.D. Carl W. Gottschalk, M.D.. *Disease of the kidney.* 15th edition III. Boston/Toronto/London:Little, Brown and Company. 2879-2910.
14. 안재형, 박재경, 이태원, 임천규, 김명재. 장기 혈액투석 환자의 혈장 IL-1, TNF α , IL-6농도 및 말초혈액 단핵세포에서의 생산능. 대한신장학회지. 1993;12: 633-648.
15. Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 1988;2:108-115.
16. Lovett DH, Martin M, Bursten S, Szamel L, Gemsa D, Resch K. Interleukin I and glomerular mesangium IL-1 dependent stimulation of mesangial cell protein kinase activity. *Kidney Int.* 1988;34:26-35.
17. 진동규. 배양된 인형 mesangial 세포에서 배양액차이에 따른 interleuin-6의 변화. 대한신장학회지. 1996;15:1-7.
18. Ruef C, Budde K, Lacy J, Northemann W, Bauman M, Sterzel RB, Coleman DL. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int.* 1990;38:249-251.
19. 김세종. 면역학. 서울:고려의학. 1994:1-13,16-21,83-98,134-145,147-160.
20. Silver BJ, Jaffer FE, Abboud HE. Platelet derived growth factor synthesis in mesangial cells : Induction by multiple peptide mitogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:1056-1060.
21. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울:東洋醫學研究院. 1993:393-

- 401,410-411,435-452,510-513,540-541.
22. 李尙仁, 金東傑, 盧昇鉉, 金暎鐘, 朱榮丞. 方劑學. 서울:永林社. 1992:155-156.
 23. 蔡仁植. 傷寒論譯註. 서울:高文社. 1991:492-493.
 24. John R. Couchman, Lesley A. Beavan, and Kelvin J. McCarthy. Glomerular matrix : Synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney Int.* 1994;45:328-335.
 25. 박수길, 김순배, 양원석, 박정식, 홍창기. Epidermal growth factor와 transforming growth factor- β 가 백서 메산지움 배양세포의 증식과 교원질 생성에 미치는 영향. *대한신장학회.* 1993;12:1-9.
 26. Shultz PJ, Dicorleto PE, Silver BJ, Abboud HE. Mesangial cell express PDGF m RNAs and proliferative in response to PDGF. *Am J Physiol.* 1988;255:F674-F686.
 27. Fatima Jaffer, Cristian Saunders, Pamela Shultz. Regulation of mesangial cell growth by polypeptide mitogen. *Am J pathology.* 1989;135:261-269.
 28. Camussi G, Tutta C, Bussolino F, Baglioni C. Tumor necrosis factor induces contraction of mesangial cells and alter their cytoskeletons. *Kidney Int.* 1990;38:795-802.
 29. Coleman DL, Ruef C. Interleukin-6: An autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int.* 1992;41:604-606.
 30. Topley N, Floege J, Wessel K, Hass R, Radeke HH, Kaever V, Resch K. Prostaglandin E2 production is synergistically increased in cultured human glomerular mesangial cells by combination of IL-1 and tumor necrosis factor- α . *J Immunol.* 1989;143:1989-1995.
 31. Ayo SH, Rodink RA, Garoni J, Glass II WF, Kreiberg JJ. High glucose cause an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol.* 1990;136:1336-1339.
 32. Jurgen Floege, Richard J. Johnson, Katherine G, Hiroyuki I. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int.* 1991;40:477-488.
 33. Robert AB, Flanders KC, Kondaiah P, Thompson NL, Obberghen-Schilling EV, Wakefield L, Rossi P, Crombrughe BD, Heine U, Sporn MB. Transforming growth factor- β : Biochemistry and roles in embryonesis, tissue remodeling, and carcinogenesis. *Recent prog in Horm Res.* 1988;44:157-197.
 34. Shaul G. Massry, M.D. Richard J. Glasscock, M.D. *Textbook of Nephrology.* 2nd edition. Williams & Wilkins 1991:1334-1342.
 35. 임천규, 홍성포, 박재경, 안재형, 이태원, 조병수. 내피 세포와 메산지움세포의 접착분자 발현에 대한 혼합 백혈구 반응과 hydrocortisone 및 cyclosporine의 영향. *대한내과학회지* 1997;52:156-164.
 36. Dong Kyu Jin. The patterns of integrin subunit distribution in glomerular disease. *대한신장학회지.* 1999;18:380-389.
 37. Brady HR. Leukocyte adhesion molecules. *Kidney Int.* 45:1285.
 38. Brennan DC, Jevnikar AM, Takei F, Reubin-Kelley VE. Mesangial cell accessory functions : Mediation by intercellular adhesion molecule-1. *Kidney Int.* 1990;38:1039.
 39. ChunGyoo Ihm, JaeKyung Park, TaeWon Lee, ByoungSoo Cho. Effect of glucose and cytokine on the expression of cell adhesion molecules on mesangial cells. *Kidney Int.* 1995;48:39-42.
 40. Cosio FG. Cell-matrix adhesion receptors : Relevance to glomerular pathology. *Am J Kidney Dis.* 1992; 20:294.