

시호의 사구체 메산지움 세포 증식억제 효능 및 작용기전 연구

이병철, 안영민, 두호경, 안세영
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Anti-Proliferation Effects and Its Mechanism of *Bupleurum falcatum* on Human Mesangial Cell

Byung-Cheol Lee, Young-Min Ahn, Ho-Kyung Doo and Se-Young Ahn

Dept. of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea.

Objective : Mesangial cell proliferation and excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins is the common pathologic feature of glomerulosclerosis, and platelet-derived growth factor (PDGF) BB-chain, transforming growth factor beta1 (TGF- β 1), cyclin dependent kinases (CDK) and CDK inhibitors mediated in these pathophysiological processes. *Bupleurum falcatum* which is one of the most widely used components in traditional oriental medicines, has multiple pharmacological effects, such as antipyretic, analgesic, immune modulating, anti-inflammatory, anti-allergic, anti-thrombotic, anti-atherosclerotic, and antitussive effects.

Methods : In this study, we evaluated the influence of *Bupleurum falcatum* on mesangial cell proliferation, DNA synthesis and expression of PDGF-BB chain, TGF- β 1, CDK1, CDK2, CDK4, p21 and p27 in fetal bovine serum (FBS)-activated human mesangial cell.

Results : *Bupleurum falcatum* reduced the mesangial cell proliferation and DNA synthesis more than control and captopril. And in the ELISA analysis of TGF- β 1, and RT-PCR of PDGF-BB chain, CDK1, CDK2, CDK4, p21, and p27, *Bupleurum falcatum* inhibited the expression of TGF- β 1 protein and PDGF-BB, CDK1, CDK2 gene and promoted that of p21 gene in a dose-dependent manner in comparing with control and captopril.

Conclusions : These results suggest that *Bupleurum falcatum* may inhibit the mesangial cell proliferation and DNA synthesis by regulation of PDGF-BB and TGF- β 1 expressions, and by modulation of CDK1, CDK2 and p21 expression.

Key Words: *Bupleurum falcatum*, Mesangial cell, PDGF-BB, TGF- β 1, CDK2, p21

I. 緒 論

신부전으로 이행하게 되는 사구체 경화증의 일반적인 병리조직소견은 메산지움 세포(mesangial cell)의 증식과 메산지움 기질(extracellular matrix: ECM)

의 축적으로 요약된다. 그간 수많은 in vitro와 in vivo연구를 통해 이러한 메산지움 세포 증식과 기질 축적에 관여하는 인자들이 연구되었고, 이중 대표적인 성장인자인 platelet-derived growth factor(PDGF) BB-chain과 transforming growth factor(TGF)- β 1, 그리고 세포주기를 조절하는 cyclins과 이와 결합하는 cyclin dependent kinases(CDK) 및 이를 억제하는 cyclin-dependent kinase(CDK) inhibitor 등이 중요한 매개 인자로 밝혀졌다^{1,2,3,4}.

시호는 해열(antipyretic), 진통(analgesic), 면역조

· 접수 : 2004. 8. 16 · 채택 : 2004. 9. 7
· 교신저자 : 안세영, 서울시 동대문구 회기동 1
경희의료원 부속한방병원 한방 6내과
(Tel. 02-958-9153 Fax. 02-958-9158
E-mail : ajhj@unitel.co.kr)
· 본 연구는 2003년도 경희대학교 교비 자유공모과제(20030329)
지원비에 의해 수행되었음.

질(immune modulative), 항 염증(anti-inflammatory), 항 알레르기(anti-allergic), 항 혈전(anti-blood clot) 작용과 동맥경화 예방(anti-atherosclerotic) 및 진해(antitussive)작용 등의 다양한 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다^{5,6}.

최근 시호가 포함된 시령당이 IgA신증 환자의 혈뇨 및 단백뇨 발생억제 및 신기능 보호효능을 가지고 있으며⁷, 시호를 포함한 또 다른 복합처방인 시박탕은 쥐의 메산지움 세포증식을 현저하게 억제하는 효능을 나타내는 것으로 보고되었다⁸. 또한 단미시호는 실험적 anti-GBM nephritis에서 항염작용이 있으며⁹, aminonucleoside로 유발된 nephrosis에서 단백뇨 억제와 죽돌기(foot processes)의 융합을 억제하는 효능이 보고되었다¹⁰. 아울러, 시호와 함께 시박탕의 주요 구성 약재인 소엽이 메산지움 증식성 사구체신염 모델쥐에 유의한 효과가 있다고 밝혀졌고¹¹, 또 다른 구성 약재인 후박 역시 메산지움 세포의 증식을 억제하는 효능이 있는 것으로 보고되었다¹². 이처럼 시호 및 시호를 포함한 복합처방에서의 신기능 보호작용과 메산지움 세포증식 억제 효능에 대한 다양한 연구가 있으나, 이에 관계되는 기전, 즉 PDGF-BB와 TGF- β 1 등의 증식관련 인자 및 CDK와 CDK inhibitor와 같은 세포주기 조절인자에 대한 연구는 아직까지 없다.

이에 본 연구에서는 시호가 PDGF-BB와 TGF- β 1, 그리고 CDK, CDK inhibitor 등의 발현을 조절함으로써 메산지움 세포의 증식을 억제할 것이라는 가설 하에 배양 사람 메산지움 세포를 이용하여 시호가 세포증식과 DNA합성 및 PDGF-BB, TGF- β 1, ACE (angiotensin converting enzyme), CDK1, CDK2, CDK4, CDK inhibitor 1A (p21), CDK inhibitor 1B (p27) 등의 발현에 미치는 영향을 대표적인 ACE 억제제인 captopril과의 대조 연구를 통해 관찰하였다.

II. 實驗 方法

1. 약제의 추출

건조된 시호 100 g을 1,000 ml의 물에 넣고 stirring extractor (Iwai Co. Ltd., Japan)에서 2시간 동안 100℃로 증탕한 후 체로 걸러 얻어진 용액을 20,000 rpm으로 원심 분리하였다. 원심분리 후 상청액만을 수거하여 이를 100-150 mesh를 이용하여 정제한 후, 이를 다시 감압농축기 (Falling film vacuum evaporator, Iwai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 농축시킨 후 분사식 건조기 (Spray dryer, Iwai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 최종적으로 시호 추출분말을 얻었다. 최종적으로 얻어진 시호 추출분말의 중량은 6 g으로, 수거율은 6%였다. 본 실험에는 시호 추출물을 식염수에 녹여 0.45 μ m syringe filter로 멸균한 후 사용하였다.

2. 메산지움 세포의 배양

정상 신조직을 신세포암으로 신절제술을 시행한 환자에서 얻어, 사구체를 분리한 후 분리된 사구체를 collagenase 처리하여 메산지움 세포만을 선택 배양하였다¹³. 메산지움 세포의 배양은 15% 우태아 혈청과 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 1% (v/v) nonessential amino acids, 5 μ g/ml transferrin and 5 ng/ml selenium 등이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)의 배양액에서 5% CO₂ 세포배양기를 이용하여 배양하였다. 메산지움 세포의 확인은 형태학적 확인과 factor VIII과 cytokeratin과 epithelial membrane antigen에 대한 음성반응, smooth α -actin과 myosin에 대한 양성반응을 통해 확인하였다. 본 연구에는 3대째 계대배양 중인 메산지움 세포를 사용하였다.

3. 메산지움 세포의 세포활성 측정

메산지움 세포의 활성 측정은 modified 3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 이용하여 시행하였다¹³. 메산지움 세포를 96-well plate

에 세포수가 1×10^4 cells/well이 되게 분주하여 세포를 안착시킨 후 다양한 농도의 시호와 양성대조군인 250 μ M captopril을 넣고 48시간동안 반응시킨 후 cell monolayer로 세척한 다음 phosphate-buffered saline (PBS)에 10 mg/ml MTT를 녹인 용액 20 μ l를 첨가하여 3시간동안 반응시켰다. 이후 배양액을 제거하고 100 μ l의 acid isopropanol을 첨가하여 5분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 메산지움 세포의 DNA 합성과 세포증식 측정

DNA 합성은 3 H-thymidine이 trichloroacetic acid (TCA)-insoluble material로 결합하는 성질을 이용하여 측정하였다¹³. 메산지움 세포를 24-well dish에 4×10^4 cells/well의 농도로 부유시켜 정착시킨 후 우태아 혈청이 포함되지 않은 배양액에서 48시간동안 배양시켰다. 시호의 DNA합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 메산지움 세포에 각각 250과 500 μ g/ml의 시호와 250 μ M의 captopril을 첨가하여 28시간동안 반응시키고, 마지막 4시간에 3 H-thymidine (1 μ Ci/ml, Amersham, Uppsala, Sweden)을 첨가하여 배양하였다. 이후 10% 우태아 혈청을 다시 첨가하여 28시간동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 세포를 5% TCA로 2회 세척하여 다시 5분간 반응시킨 후 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)에 0.25 N NaOH을 녹인 용액 0.75 ml를 첨가한 후 half-milliliter aliquots로 중화시킨 후 β -counter를 이용하여 DNA를 측정하였다.

위의 실험과 동시에 세포증식을 측정하기 위해 메산지움 세포에 각각 250과 500 μ g/ml의 시호와 250 μ M의 captopril을 첨가하여 18시간동안 반응시키고 10% 우태아 혈청을 첨가하여 다시 48시간 배양한 후 수거한 세포의 수를 계산하였다.

본 연구에서는 시호 및 captopril을 첨가하지 않은 대조군과 시호 250과 500 μ g/ml을 첨가하여 반응시킨 실험군, 그리고 250 μ M의 captopril을 첨가한 양성 대조군으로 나누어 실험을 진행하였다.

5. RNA의 분리

메산지움 세포를 10 cm² dish에 세포수가 1×10^6 cells/dish의 농도로 부유시켜 정착시킨 후 우태아 혈청이 함유되지 않은 배양액에서 48시간동안 배양한 후 메산지움 세포에 각각 250과 500 μ g/ml의 시호와 250 μ M의 captopril을 첨가하여 18시간동안 반응시켰다. 이후 10% 우태아 혈청을 첨가하여 2시간동안 배양시켜 상청액을 제거하고 수거한 세포에서 RNA Zol B (TELTEST; Friendswood, TX, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다.

6. ACE, PDGF-BB chain, CDK1, CDK2, CDK4, p21, p27의 역전사 연쇄중합반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)

Angiotensin converting enzyme (ACE)¹⁴과 PDGF-BB¹³, CDK1, CDK2, CDK4¹⁵, p21, p27⁴의 mRNA 발현은 반정량 (semi-quantitative) 역전사 연쇄중합반응을 이용하여 측정하였다. 메산지움 세포에서 분리한 1 μ g의 RNA에 PCR buffer와 5 mM의 MgCl₂, 1 mM의 dNTP, 20 U의 RNasin, 2.5 μ M의 Oligo (dT), 100 U의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 혼합하여 42°C에서 50분, 70°C에서 15분씩 반응시켰다. 역전사를 통해 얻어진 각각의 complementary DNA (cDNA)에 PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 2 U Taq polymerase, 5 pM의 primers를 혼합하여 Eppendorfs Mastercycler Gradient PCR device (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였다. 사용한 각각의 primer의 염기 서열은 ACE의 경우 5'- GCCTCCCCAACAAGACTGCCA -3'과 5'- CCACATGTCTCCCAGCAGATG -3'을, PDGF-BB의 경우 5'- GAAGGAGCCTGGGTTCCTG -3'과 5'- TTTCTCACCTGGACAGGTCG -3'를, CDK1의 경우 5'- TCAAAGCTGGCTCTTGGGA -3'과 5'- CCTGGTTCCATTGGGA -3'를, CDK2의 경우 5'- GCTTTCTGCCATTCTCATCG -3'과 5'- GTCCCCAGAGTCCGAAAGAT -3'를, CDK4의 경

우 5'- ACGGGTGTAAAGTGCCATCTG -3'과 5'- TGGTGTCTCGGTGCCTATGGGA -3'를, p21의 경우 5'- AGCAGAGGAAGACCATGTGG -3'과 5'- AGGCAGAAGATGTAGAGCGG -3'를, p27의 경우 5'- AACGTGCGAGTGTCTAACGG -3'과 5'- CTTCCATGTCTCTGCAGTGC -3'를, 그리고 대조군으로 사용한 GAPDH의 경우 5'- TGGTATCGTGAAGGACTCATGAC -3'과 5'- ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC -3'를 각각 사용하였다. 각각의 연쇄중합반응의 주기수 (cycle)와 신장단계 온도 (annealing temperature)는 PDGF-BB와 CDK4와 GAPDH의 경우 63°C에서 25 cycle, CDK1, CDK2, p21, p27는 63°C에서 30 cycle, ACE는 63°C에서 42cycle로 시행하였으며, 예상 연쇄중합반응 결과물의 염기 크기는 ACE의 경우 389 bp, PDGF-BB의 경우 226 bp, CDK1의 경우 848 bp, CDK2의 경우 316 bp, CDK4의 경우 464 bp, p21의 경우 250bp, p27의 경우 154bp, 그리고 대조군인 GAPDH의 경우 450 bp였다. 이상의 과정을 통해 얻어진 각각의 연쇄중합반응 결과물은 ethidium bromide로 염색하여 2% 아가로스 젤 (agarose gel)에서 확인한 후 각각의 발현도를 densitometry를 이용하여 측정하였다. 측정된 발현도는 대조군인 GAPDH를 1로 산정하여 이에 대한 값으로 환산하여 표시하였다.

7. TGF-β1의 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 측정

메산지움 세포의 TGF-β1 농도는 각각의 실험약재와 반응시켜 얻은 배양 상청액을 수거한 후 human TGF-β1 ELISA assay kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 측정하였다. 메산지움 세포를 24-well dish에 세포수가 4×10^4 cells/dish의 농도로 부유하여 정착시킨 후 우태아 혈청이 함유되지 않은 배양액에서 48시간동안 배양하였다. 48시간 후 메산지움 세포에 각각 250과 500 μg/ml의 시호와 250 μM의 captopril를 첨가하여 28시간동안 반응시키고, 여기에 10% 우태아 혈청이 함유된

배양액에서 2시간 동안 배양한 후 상청액을 수거하였다. 수거된 각각의 상청액과 표준 TGF-β1 용액 200 ml씩을 recombinant human TGF-β1 sRII이 coating된 microplates에 넣고, 순서대로 200 ml의 TGF-β1 conjugate, 200 ml의 substrate solution, 50 ml의 stop solution을 첨가하여 반응시킨 후 450 nm에서 ELISA reader를 이용하여 TGF-β1 농도를 정량하였다.

8. 통계 분석

통계분석은 GraphPad PRISM statistical package (ver 2.00, Graphpad software inc., San Diego, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법으로 분석하였고, Tukey's post-hoc test로 사후 검정하였다. 각각의 결과는 평균 ± 표준편차 (mean ± standard deviation)로 표시하였고, 양방 검정 유의도 (Two-tailed p value)는 p값이 < 0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 結果

1. 시호의 메산지움 세포활성도

시호로 인한 세포독성의 가능성 배제와 실험 농도결정을 위해 각각의 농도로 조정된 시호를 메산지움 세포와 48시간 동안 반응시킨 후 MTT 활성을 이용하여 세포활성도를 측정하였다. MTT 결과 시호를 첨가하지 않은 경우의 흡광도는 2.303 ± 0.012 으로서, 250 μg/ml의 시호를 첨가한 경우의 흡광도 2.342 ± 0.056 및 500 μg/ml의 시호를 첨가한 경우의 흡광도 2.434 ± 0.188 과 차이가 없어 250과 500 μg/ml의 시호농도에서 세포독성의 가능성이 배제되었고, 이 농도에서 이후의 연구를 진행하였다.

2. 시호의 메산지움 세포의 증식과 DNA합성에 대한 영향

메산지움 세포는 우태아 혈청 첨가 후 74100 ± 1900 cells/well에서 171200 ± 8800 cells/well로 유의한 증식이 유발되었다. 그러나, 250과 500 μg/ml

의 시호, 그리고 250 μM captopril을 첨가한 후 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시호농도에서 134900 ± 12300 cells/well, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시호농도에서 105000 ± 7000 cells/well, 그리고 250 μM captopril 농도에서 135600 ± 6200 cells/well로 유의하게 세포증식이 억제되었다 (Fig. 1A). 동시에 시행한 DNA합성 실험에서도 우태아 혈청 첨가 전 3146 ± 33.9 cpm/well에서 첨가 후 10466 ± 468.4 cpm/well로 DNA합성이 증가하였다. 반면 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시호농도에서 5216 ± 144.2 cpm/well로, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시호농도에서 2269 ± 211.0 cpm/well로, 그리고 250 μM captopril 농도에서 2581 ± 146.7 cpm/well로 유의하게 DNA 합성이 억제되었다 (Fig. 1B).

3. 시호가 ACE, PDGF-BB, TGF- β 1 발현에 미치는 영향

시호가 메산지움 세포증식 억제에 관여하는 작용 기전을 알아보기 위해 ACE, PDGF-BB 유전자의 발현을 역전사 연쇄중합반응을 이용하여 관찰하였으며, TGF- β 1 단백질 발현은 ELISA 측정방법을 이용하

여 분석하였다. 대조군에서의 mRNA 발현을 1로 산정했을 때, ACE의 mRNA 발현은 250 μM captopril에 의해 0.508 ± 0.143 로 유의하게 감소하였으나, 시호는 유의한 억제효능을 나타내지 못하였다. PDGF-BB의 mRNA 발현은 250 μM captopril에 의해 0.882 ± 0.067 로, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시호에 의해 0.608 ± 0.042 로 유의한 억제효능을 나타내었다 (Fig. 2A). 또한 TGF- β 1 단백질 발현은 대조군의 1800.336 ± 113.187 pg/ml에 비해 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 시호에 의해 1448.507 ± 102.392 pg/ml로 유의하게 감소하였다 (Fig. 2B).

4. 시호가 CDK1, CDK2, CDK4 발현에 미치는 영향
시호가 메산지움 세포주기에 관여하는 기전을 연구하기 위해 역전사 연쇄중합반응을 이용하여 CDK1, CDK2, CDK4의 유전자발현을 관찰하였다. 대조군에서의 mRNA 발현을 1로 산정했을 때, 250 μM captopril에 CDK1 mRNA는 0.722 ± 0.120 으로 억제되었으며, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 시호에 의해 CDK1과 CDK2 mRNA는 각각 0.563 ± 0.243 과 0.650 ± 0.103 으로 유의하게 억제되었으나, CDK4의 mRNA

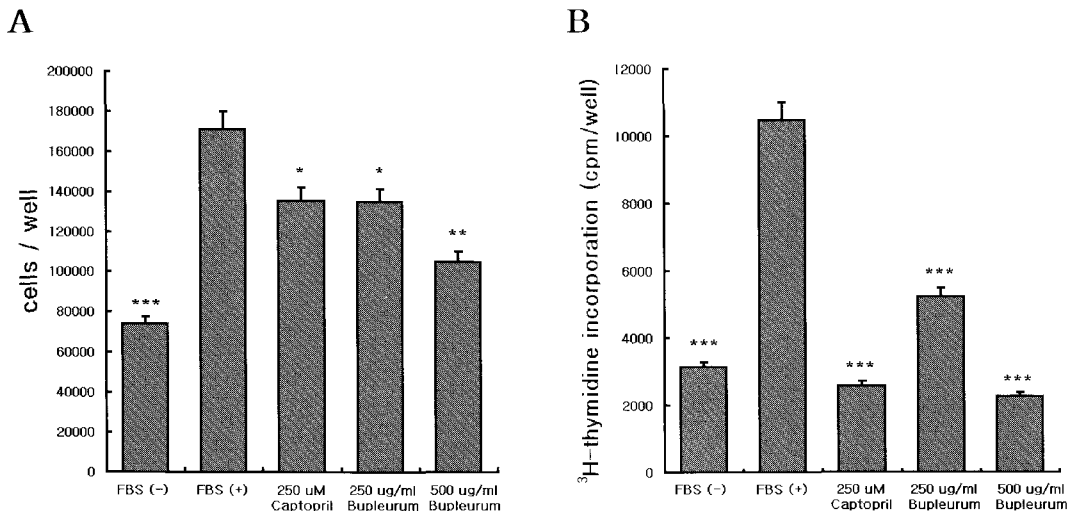


Fig. 1. Effect of *Magnolia officinalis* on FBS-activated mesangial cell proliferation, DNA synthesis, and TGF- β 1 expression. **A:** Mesangial cells were incubated with the 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Bupleurum falcatum* and 250 μM captopril for 18 h, and then was activated by 10% FBS for 48 h. The cell proliferation was measured by the direct cell counting. **B:** In the parallel, the amount of ^3H -thymidine incorporation into TCA was measured using β -counter. FBS (+) indicates 10% FBS-stimulated mesangial cells. Results present mean \pm S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with FBS (+), each done in 4 separate experiments.

발현은 시호에 의해 억제되지 않았다 (Fig. 2C).

5. 시호가 p21, p27 발현에 미치는 영향

시호가 메산지움 세포주기의 조절에 미치는 기전을 알아보기 위해 시행한 p21과 p27의 유전자 발현

에 대한 역전사 연쇄중합반응에서 대조군에서의 mRNA 발현을 1로 산정했을 때, 500 $\mu\text{g/ml}$ 시호에서만 p21의 mRNA 발현을 1.336 ± 0.317 로 유의하게 증가시켰다. 그러나 p27의 발현에는 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 2D).

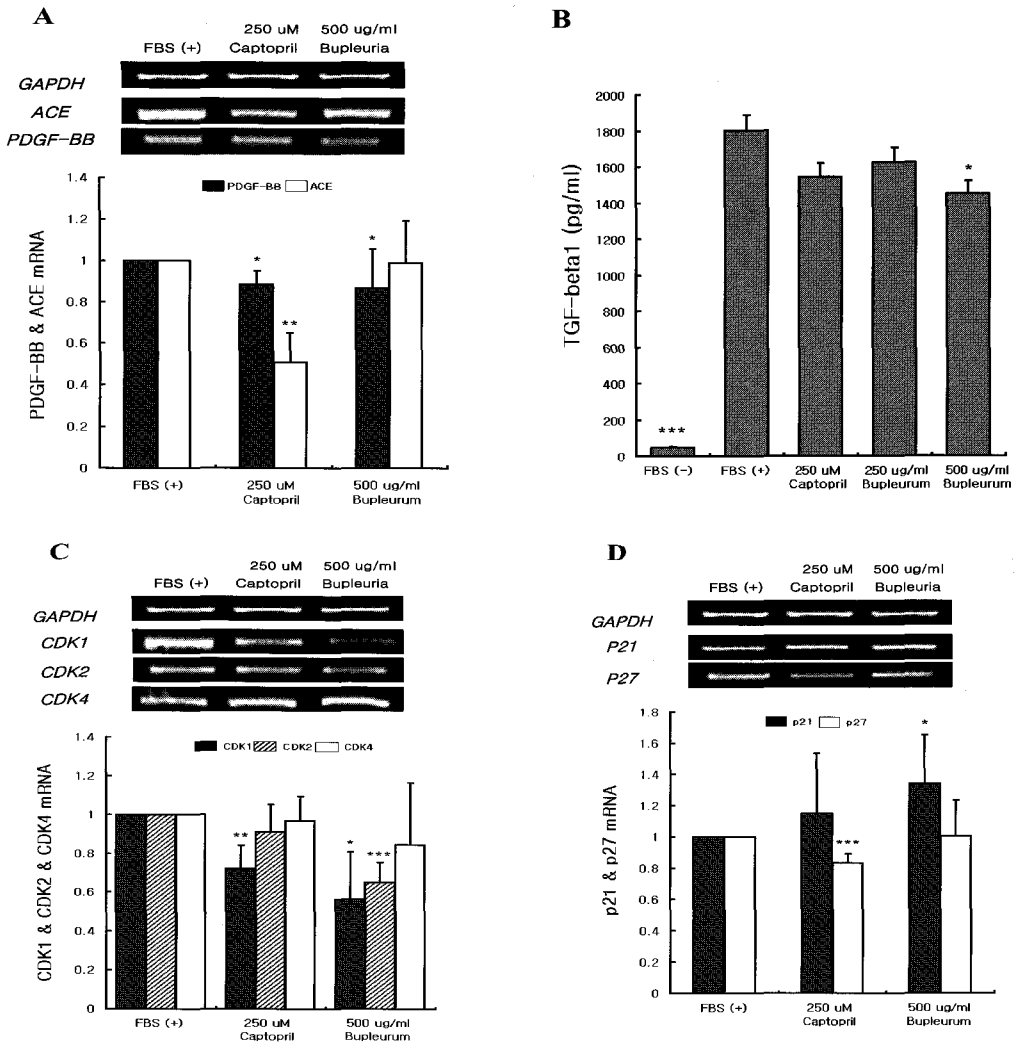


Fig. 2. Inhibitory effect of *Bupleurum falcatum* on FBS-activated ACE, PDGF-BB, CDK1, CDK2, CDK4, p21, p27 and TGF- β 1. Mesangial cell were incubated with the 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ *Bupleurum falcatum* and 250 μM captopril for 18 h, and were activated with 10% FBS for 2 h. Cells were collected, and total RNA was isolated for RT-PCR. Supernatant were harvested for TGF- β 1 ELISA assay. **A:** GAPDH, ACE and PDGF-BB mRNA level. **B:** TGF- β 1 protein level. Results present mean \pm S.D. **C:** GAPDH, CDK1, CDK2 and CDK4 mRNA expression. **D:** GAPDH, p21 and p27 mRNA expression. Results of each mRNA are calculated by comparing with the optical density of 10% FBS adjusted as 1.00. FBS (+) indicates 10% FBS-stimulated mesangial cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with 10% FBS (+), each done in 3 separate experiments.

IV. 考 察

일반적으로 만성 신부전으로 이행하게 되는 만성 사구체 신염, 특히 IgA 신증과 메산지움 증식성 사구체 신염, 반월형성 사구체 신염 등에서 관찰되는 소견으로는 사구체 세포의 증식, 사구체 기질의 팽창 등으로 요약할 수 있다. 그리고 이러한 메산지움 세포의 증식과 기질의 상호결합에 있어 성장인자, 염증관련 인자 및 세포주기 조절인자 등이 병리원인으로 작용한다는 것이 밝혀졌다^{1,2,3,4}. 즉 발현된 성장인자에 의해 다양한 전사인자의 유도가 발생하며 이와 함께 cyclins과 CDKs와 CDK inhibitors와 ECM proteins, 그리고 ECM-degrading proteinases 등의 유전자 발현을 매개하게 되는 것이다. 그 결과 세포증식과 증식 억제, 분화, 경화, 세포자연사, 기질 축적 그리고 섬유화 등이 발생하게 된다^{3,4}. 따라서 한약을 포함한 만성 사구체 신염의 새로운 치료 방법의 개발 및 효능 판정에 있어 이러한 성장 인자 및 전사인자 등에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 중요하다.

본 실험에서 사용한 우태아 혈청 유발 메산지움 세포증식 모델은 사구체 신염의 병태생리와 약물의 효능 및 기전 연구에 널리 이용되는 모델로서, 우태아 혈청으로 메산지움 세포를 자극하면 세포에서의 PDGF-BB와 TGF- β 의 발현을 증가시키고, 이와 함께 CDKs, fibronectin (FN), type IV collagen, laminin 등의 합성을 유도하여, 결국 메산지움 세포의 증식과 기질의 축적을 야기하게 된다^{1,2,13}.

PDGF는 강력한 세포분열작용을 가진 성장인자로서 세포의 증식과 기질 단백질의 축적을 매개하며, PDGF중 PDGF-BB는 메산지움 세포증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹. 수많은 실험적 동물모델과 IgA 신증 등에서 PDGF-BB와 그 수용체의 발현이 증가되어있는 것이 확인되었고, PDGF-BB를 정상 쥐에 투여했을 때 선택적으로 메산지움 세포의 증식과 기질 축적을 유발하는 것으로 보고되고 있다^{16,17}. 또한 anti-Thy 1.1 메산지움 증식성 신염모델 쥐에 PDGF-BB의 길항제를 투여

했을 때 메산지움 세포증식과 기질축적을 감소시키는 것으로 보고되고 있다¹⁸.

TGF- β 1은 조직 복구와 상처 치유, 염증과정 조절 등의 다양한 기능을 가진 사이토카인 (cytokine)으로서, 사구체 메산지움 세포에서 proteoglycans, fibronectin, collagen 등의 합성을 촉진한다². 따라서 TGF- β 1의 지나친 발현은 사구체 경화증과 기질 축적을 유발하는 반면, TGF- β 1 길항제는 실험적 사구체 신염에서의 사구체 경화증을 예방하는 역할을 나타낸다¹⁹.

본 연구에서 시호의 메산지움 세포 증식과 이로 인한 사구체경화증에 미치는 영향을 관찰하기 위해 메산지움 세포증식과, DNA합성, PDGF-BB와 TGF- β 1의 발현을 측정하였다. 특히 TGF- β 1의 경우 유전자 발현과 단백질 합성의 차이를 고려하여 ELSIA 분석방법으로 측정하였다. 그 결과 시호는 메산지움 세포증식과 DNA합성, PDGF-BB와 TGF- β 1의 발현을 억제하였다. 이러한 결과는 시호가 PDGF-BB와 TGF- β 1의 발현을 억제함으로써 메산지움 세포의 증식을 억제한다는 것을 의미한다.

세포증식은 궁극적으로 세포주기 조절인자에 의해 지배를 받는데, 적절한 자극에 의해 세포분열이 시작되면 세포는 초기 G1 세포주기로 접어들며 이후 cyclins과 특히 cyclin-dependent kinases (CDKs)의 활성화에 의해 S, G2, M의 세포주기를 차례로 거쳐 분열하게 된다. 이때 D-type cyclin은 CDK4-6와, cyclin E는 CDK2와, cyclin A는 CDK2 cdc2와, 그리고 cyclin B는 cdc2와 각각 결합하여 세포주기를 촉진하며³, 그리고 CDK inhibitor인 p21과 p27은 CDK2, CDK4, CDK6 등을 억제하는 작용으로 세포주기를 억제하게 된다⁴.

이중 CDK2는 G1/S 세포주기의 전환과 DNA합성에 필요하며, 기존의 연구를 통해 CDK2의 활성화 증가가 DNA합성의 증가와 세포증식에 필수적이라는 사실이 in vitro와 in vivo실험을 통해 확인되었다. 또한 만성 사구체질환에서도 역시 메산지움 세포의 증식에 CDK2의 발현이 증가된다고 보고되고 있다³.

p21은 만성 사구체질환을 포함한 여러 가지 병리

적인 환경에 의해 DNA가 손상될 경우 활성화되는 tumor suppressor gene인 p53에 의해 발현되어 S 세포주기를 유도하는 CDK2, CDK4, CDK6의 활성을 저해함으로써 세포증식을 일시적으로 정지시키거나 (growth-arrest), 혹은 apoptosis 유도 유전자인 Bax에 의해 세포사멸을 유발시키는 (apoptosis-inducing) 작용으로 세포증식을 조절하는 핵심적인 역할을 한다³. 최근 CDK2 억제 및 p21 촉진작용을 가진 roscovitine이 우태아 혈청 유도 메산지움 세포증식을 억제하며, anti-Thy 1.1 실험적 메산지움 사구체 신염 모델 쥐에서 collagen type IV, laminin, fibronectin 등의 합성을 억제하고 신기능을 개선시키는 작용을 나타낸다고 보고되었다⁴. 따라서 CDK2 억제와 p21의 활성 촉진은 PDGF-BB와 TGF-β1과 같은 성장인자의 차단과 더불어 만성 사구체 신염에서의 중요한 치료방법중의 하나가 된다.

본 연구에서 시호에 의해 CDK1과 CDK2의 발현이 억제되었으며, p21의 발현은 촉진되었다. 이러한 결과는 시호가 PDGF-BB, TGF-β1 같은 성장인자의 조절 뿐 아니라 세포주기의 조절에도 관여한다는 것을 의미하는 것이며, 또한 시호가 ACE 억제작용이 뚜렷하지 않음에도 불구하고 강력한 세포증식 억제작용을 나타내는 것에 대한 근거를 제시해준다고 할 수 있다. 따라서 시호는 증식성 사구체 신염의 치료에 응용되었을 때 captopril과 같은 ACE 억제제 및 roscovitine와 같은 CDK2 억제제에서와 같이 사구체 경화증 및 섬유화의 예방 과 치료 및 신기능 개선에 유의한 효능²⁰을 나타낼 것으로 사료되며, 또한 이는 그간 한의학에서 신장질환의 치료에 시호를 다양하게 응용해온 근거를 설명하는 것이다.

이상의 결과로 볼 때 시호는 사구체 경화증의 주요 원인으로 밝혀진 PDGF-BB, TGF-β1과 같은 성장관련 인자를 억제함과 동시에, CDK1, CDK2 등의 세포주기 촉진 인자의 억제 그리고, p21과 같은 세포주기 억제 인자의 촉진 등을 통하여 메산지움 세포의 증식과 DNA 합성을 억제하는 것으로 여겨진다. 따라서 시호는 신장질환의 진행 억제와 신기능 보호에 다양하게 응용될 수 있으며, 추후 임상연

구를 통한 효능 판정 및 확인이 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Floege J, Johnson RJ. Multiple roles for platelet-derived growth factor in renal disease. *Miner Electrolyte Metab.* 1995;21:271-82.
2. Shankland SJ, Johnson RJ. TGF-beta in glomerular disease. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24:168-73.
3. Shankland SJ, Hugo C, Coats SR, Nangaku M, Pichler RH, Gordon KL, Pippin J, Roberts JM, Couser WG and Johnson RJ: Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1996;50:1230-9.
4. Otsuki T, Yata K, Sakaguchi H, Kurebayashi J, Matsuo Y, Uno M, Fujii T, Eda S, Isozaki Y, Yawata Y, Yamada O, Wada H, Sugihara T, Ueki A. Interleukin 10 abolishes the growth inhibitory effects of all-trans retinoic acid on human myeloma cells. *Br J Haematol.* 2002; 116:787-95.
5. Park KH, Park J, Koh D, Lim Y. Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma. *Phytother Res.* 2002;16:359-63.
6. Kim N, Park IS. Purification of saponin compounds in *Bupleurum falcatum* by solvent partitioning and preparative LC. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65:1648-51.
7. Yoshikawa N, Ito H, Sakai T, Takekoshi Y, Honda M, Awazu M, Ito K, Iitaka K, Koitabashi Y, Yamaoka K, Nakagawa K, Nakamura H, Matsuyama S, Seino Y, Takeda N, Hattori S, Ninomiya M. A prospective controlled study of sairei-to in childhood IgA nephropathy with

- focal/minimal mesangial proliferation. Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1997;39:503-6.
8. Ono T, Yashiro M, Muso E, Honda G, Yoshida H, Sasayama S. Inhibitory effects of the herbal medicine Saiboku-to on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrology*. 1998;4: 367-72.
 9. Hattori T, Ito M, Suzuki Y. Studies on antinephritic effects of plant components in rats (1). Effects of saikosaponins original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1991;97:13-21.
 10. Abe H, Orita M, Konishi H, Arichi S, Odashima S. Effects of saikosaponin-d on aminonucleoside nephrosis in rats. *Eur J Pharmacol*. 1986;120: 171-8.
 11. Makino T, Nakamura T, Ono T, Muso E, Honda G. Suppressive effects of *Perilla frutescens* on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Biol Pharm Bull*. 2001;24:172-5.
 12. Lee BC, Doo HK, Lee HJ, Jin SY, Jung JH, Hong SJ, Lee SH, Kim SD, Park JK, Leem KH, Ahn SY. The inhibitory effects of aqueous extract of *Magnolia officinalis* on human mesangial cell proliferation by regulation of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 expression. *J Pharmacol Sci*. 2004;94:81-5.
 13. Grandaliano G, Ranieri E, Monno R, Gesualdo L and Schena F: Ramipril inhibits in vitro human mesangial cell proliferation and platelet-derived growth factor expression. *Exp Nephrol*. 1999;7:229-35.
 14. Kida T, Ikeda T, Nishimura M, Sugiyama T, Imamura Y, Sotozono C, Nishida K, Kinoshita S, Yoshimura M, Nakamura K and Inokuchi N: Renin-angiotensin system in proliferative diabetic retinopathy and its gene expression in cultured human muller cells. *Jpn J Ophthalmol*. 2003;47:36-41.
 15. Schmidt BA, Rose A, Steinhoff C, Strohmeyer T, Hartmann M and Ackermann R: Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res*. 2001;61:4214-21.
 16. Wang ZQ, Liang KH, Pahl MV, Vaziri ND. Effect of heparin on mesangial cell growth and gene expression of matrix proteins. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:3052-7.
 17. Terada Y, Yamada T, Nakashima O, Sasaki S, Nonoguchi H, Tomita K, Marumo F. Expression of PDGF and PDGF receptor mRNA in glomeruli in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:817-9.
 18. Floege J, Ostendorf T, Janssen U, Burg M, Radeke HH, Vargeese C, Gill SC, Green LS, Janjic N. Novel approach to specific growth factor inhibition in vivo: Antagonism of platelet-derived growth factor in glomerulonephritis by aptamers. *Am J Pathol*. 1999;154:169-79.
 19. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruuslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature*. 1990;346:371-4.
 20. Praga M, Hernandez E, Montoyo C, Andres A, Ruilope LM and Rodicio JL: Long-term beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with nephrotic proteinuria. *Am J Kidney Dis*. 1992;20:240-8.