

만성신부전 한약제제 WHW의 신장세포에서의 Staurosporine 유도 세포사멸에 대한 억제 효과

배효상¹, 윤철호², 박용기^{3*}

1 : 동국대학교 일산한방병원 사상체질과, 2 : 동국대학교 분당한방병원 한방내과,
3 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Effect of WHW, a polyherbal medicine for the treatment of chronic renal failure on staurosporin-induced apoptosis in MDCK cells

Bae-Hyo Sang¹, Cheol-Ho Yoon², Yong-Ki Park^{3*}

1 : Department of Sassang Constitutional Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, Goyang 410-773, South Korea,
2 : Department of Internal Medicine, Orient Medical College, Dongguk University Bundang Oriental Hospital, Seongnam 463-865, South Korea,
3 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 707, South Korea,

ABSTRACT

Objectives : WHW is a polyherbal medicine for the treatment of chronic renal failure (CRF). WHW previously reported various biological property such as anti-inflammation, anti-oxidation and anti-renal fibrosis in CRF. This study aimed to investigate the anti-apoptotic effect of WHW on staurosporin(SSP)-induced apoptosis in canine kidney epithelial cells (MDCK).

Methods : MDCK cells were treated with different concentrations of WHW (0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/ml) for 1 h, and then induced apoptosis by treatment of SSP (1 μ M) for 24 h. Cell viability was measured by WST-1 assay. The expression of apoptotic proteins such as caspase-3, Bax and Bcl-2 was determined by Western blot. Caspase-3 activity and ROS levels were also measured by their commercial available assay kits. Cell apoptosis was observed by Hoechst and DNA fragmentation.

Results : WHW significantly increased the cell viability on SSP-treated MDCK cells. WHW inhibited SSP-induced expression of apoptotic proteins such as caspase-3 and Bax, and significantly decreased caspase-3 activity in MDCK cells. WHW significantly decreased SSP-induced production of ROS, and suppressed SSP-induced chromatin condensation and DNA fragmentation in MDCK cells.

Conclusions : These results suggest that WHW has an anti-apoptotic effect in renal cells through suppressing the expression of apoptotic proteins, ROS production and DNA damages.

Key words : Anti-apoptosis, chronic renal failure, MDCK, polyherbal medicine, staurosporin, WHW

서론

세포사멸은 세포가 여러 가지 유전자들 및 그 발현 단백질들에 의한 조절로 죽는 방식을 의미하며 아포토시스(apoptosis)

를 통한 세포사멸로 신호전달 단계(Signalization phase), 조절과 실행단계(Control & execution phase) 및 구조적 변화 단계(Structural alteration phase)로 구분된다¹⁾. 세포사멸은 발생과정상 불필요하거나 노화된 세포나 각종 손상을 입은 세

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2012년 6월 10일 · 수정 : 2012년 6월 24일 · 채택 : 2012년 6월 26일

포를 제거하기 위해 유전적으로 결정되어지는 세포자살 프로그램의 활성화에 의해서 일어나는 세포사멸(programmed cell death)의 한 형태로 정상적인 태아의 발달과 노화, 그리고 면역기능과 조혈계의 유지에 중요한 역할을 하며, 세포사멸의 비정상적인 조절은 암의 초기발생과 화학요법에 저항성을 지니는 종양세포의 형성, 자가면역질환, 후천성 면역결핍증, 그리고 신경 퇴화 등에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾.

신장은 체내의 배설물과 잉여분의 수분을 소변을 통해 배설하는 기관으로 체내 수분과 전해질 양 조절, 삼투압 유지, 산과 염기 평형 유지 등 배설과 재흡수를 통해 체내 균형을 안정적으로 유지하는데 기여하고 있으며, 구조적으로 혈압 조절, 적혈구 성분인 에리스로포이에틴(erythropoietin) 분비, 비타민 D를 활성화시키는 기능을 한다³⁾. 신장은 기능적, 형태적 손상을 입으면 신장 질환이 유발되는데 부종과 더불어 급만성 신부전, 사구체 신장염, 요독증 등 신장질환을 유발하며 일단 한번 손상을 받으면 손상을 받게 된 요인 제거 후에도 신장 기능이 저하된 상태로 남게 되는 경우가 많다.

만성신부전(chronic renal failure; CRF)은 신장이 오랜 시간에 걸쳐 서서히 점차적으로 손상되어 배설기능이 정상치의 25% 이하로 떨어져서 사구체 여과기능이 영구적으로 감소됨으로써 신장 기능의 회복이 거의 불가능한 상태를 의미하며 현재 치료법으로 혈당과 혈압 조절, 식이요법 등이 이용되고 있으나 모두 신장의 기능을 회복시키지는 못하며 결국 혈액 투석이나 복막투석, 신장이식 등 대체요법 단계로 가게 되는 만성 난치질환이다⁴⁾.

WHW(modified Wenpitang-Hab-Wulingsan)은 한방임상에서 만성 신부전 환자의 요독증 증상이 비신양허(脾腎陽虛)로 탁음(濁陰)이 상역(上逆)하여 발생하는 것에 기초하여 이수제(利水劑)인 오령산에 비신양허를(脾腎陽虛)를 도우는 온비탕을 가감하여 만든 복합처방 약물이다⁵⁻⁸⁾. WHW에 대한 실험 연구로는 신장 세뇨관세포에서 TGF-beta에 의해 유도되는 섬유화 억제효과⁹⁾, 허혈/재관류 및 요관폐쇄에 의한 신부전 마우스에서의 항산화 및 신부전 개선효과¹⁰⁻¹²⁾, 항염증효과¹³⁾, 항당뇨효과¹⁴⁾, 당뇨병성 신증 흰쥐모델에서의 개선효과¹⁵⁾ 및 독성시험에 따른 안전성¹⁶⁾ 등의 다중약리 효과가 보고된 바 있다.

본 연구에서는 WHW의 신장세포에서의 세포사멸에 대한 보호효과를 확인하기 위해서 protein kinase C 저해제인 staurosporin에 의해 세포사멸을 유도한 신장세포(Maddin-Darby canine kidney, MDCK)에서 WHW 처리에 따른 세포사멸 관련 단백질들의 발현 변화 및 세포의 형태적·생리적 변화를 조사하였으며, 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용된 WHW의 구성약재인 만삼(蔓蓼, radix of *Codonopsis pilosula* Nannf.), 단삼(丹蓼, radix of *Salvia miltiorrhiza* Bge.), 반하(半夏, rhizoma of *Pinellia*

ternata Breit.), 황련(黃連, rhizoma of *Coptis chinensis* Franch.), 오수유(吳茱萸, fructus of *Evodia rutaecarpa* Benth.), 음양곽(淫羊藿, herba of *Epimedium koreanum* Nakai), 대황(大黃, rhizoma of *Rheum palmatum* L.), 자소엽(紫蘇葉, herba of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo), 감초(甘草, radix of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), 인진호(茵陳蒿, herba of *Artemisia capillaris* Thunb.), 택사(澤瀉, rhizoma of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* Samuels.), 복령(茯苓, whole fungi of *Poria cocos* Schw.), 백출(白朮, rhizoma of *Atractylodes macrocephala* Koidz.), 저령(猪苓, whole fungi of *Polyporus umbellatus* Fries), 계지(桂枝, ramulus of *Cinnamomum cassia* Presl.)는 각각 원료성적서가 첨부된 규격화 약재를 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입한 후 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 대한약전과 대한약전외한약(생약)규격집에 따라 검정하여 사용하였다.

2) 세포

개의 신장세포인 Maddin-Darby canine kidney(MDCK) 세포를 ATCC(NBL-2, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 penicillin G(100U/ml), streptomycin(100 ug/ml) 및 10% FBS가 포함된 Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM) 배지를 배양액으로 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 배양하였다.

2. 방법

1) 약물 제조

WHW의 물추출물을 제조하기 위해서 GMP 시설업체인 (주)한풍제약(서울, 한국)으로부터 50 kg 구성약재에 물 1000 L를 넣고 98°C에서 3시간 동안 열수추출하였으며, 연조엑스(수득량: 19.1 kg)를 수득한 후 다시 700 mmHg, 55°C에서 15시간 감압 건조하여 건조엑스(수득율: 23.7%)를 제조하였다. WHW 건조엑스는 냉장 보관하면서 실험직전 멸균된 증류수에 완전히 용해시키고 0.45 μm Syringe filter로 여과하여 실험 시료로 사용하였다.

2) 세포사멸 유도

MDCK 세포(5×10⁵ cell/ml in cell culture medium)를 배양용기에 분주하여 하룻밤 배양한 후 다음 날 완전 배지를 모두 제거한 다음 혈청이 제거된 배지로 교환하였다. 여기에 비특이적 protein kinase 저해제(non-selective protein kinase inhibitor)인 staurosporin(SSP: Sigma S6942, Sigma-aldrich, St. Louis, USA)을 1 μM(final concentration) 농도로 처리한 후 24시간 배양함으로써 세포사멸을 유도하였다.

3) 세포 생존율 측정

WHW에 의한 MDCK 세포에서의 독성농도와 SSP에 의한 세포사멸 유도 후 세포생존율 변화에 대한 효과를 확인하기 위해서 WST-1 assay를 수행하였다. 먼저 6-well culture

plate에 MDCK 세포(5×10^5 cell/ml)를 분주하여 하룻밤 배양하여 WHW를 0.2, 0.5, 1 mg/ml 농도로 처리한 후 1시간 또는 24시간 배양하였다. 여기에 SSP(1μ M)를 처리한 후 24시간 배양하고 WST-1 시약(Roche Diagnostic Co., IN, USA)을 200 μ l/well 씩 넣은 후 37°C CO₂ incubator에서 암실상태를 유지하면서 정지함으로써 2시간 반응 시켰다. 반응액을 96-well plate에 100 μ l/well씩 옮겨서 Microplate Reader에서 420 nm 흡광도를 측정하였으며, SSP를 처리하지 않은 정상세포군의 세포생존율을 기준으로 약물처리군의 생존율로 계산하였다. 또한 SSP에 의해 세포사멸이 유도된 세포에서의 WHW에 의한 형태 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

4) Western blot

SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포로부터 증가되는 세포사멸유도 단백질(caspase-3, Bax)과 세포생존유도 단백질(Bcl-2)의 발현에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 먼저, MDCK 세포에 WHW를 1시간 동안 처리한 다음 SSP(1μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 각 세포를 수거하여 1× PBS로 3회 씻은 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)를 이용해서 lysis시켰다. 이후 단백질이 들어있는 상등액을 회수하여 각 sample에 존재하는 단백질을 정량하고, 30 μ g 단백질을 2× sample buffer와 섞어 12% SDS-polyacrylamide gel (1.5 M Tris base, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 30% acrylamide, 10% ammonium persulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 gel상의 단백질을 nylon membrane으로 옮기고 각 membrane은 항체와 비특이적 결합을 막기 위해 5% skim milk로 실온에서 1시간 반응 시켰다. 반응을 끝낸 membrane에 5% skim milk에서 30분간 반응시킴으로써 blocking한 후 caspase-3, Bax, Bcl-2에 대한 일차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 0.05% Tween이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)로 3회 세척하였다. Membrane을 anti-IgG conjugated HRP 이차항체와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 3회 세척하고 ECL용액을 이용하여 x-ray 필름에 감광시킴으로써 결과를 확인하였다.

5) Caspase-3 활성 측정

SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포로부터 증가되는 caspase-3에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 Caspase-3 colorimetric activity assay kit(Merck Millipore, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 즉, MDCK 세포(5×10^5 cell/ml)를 6-well culture plate에 분주하여 하룻밤 배양한 다음 WHW를 1시간 동안 처리하고 SSP(1μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 수거한 다음 cell lysis buffer 50 μ l를 넣어 용해시키고 10분 동안 ice에 정지하였다. 반응액을 10,000 ×g에서 1분 간 원심분리하여 상층액(cytosol fraction)을 수거한 다음 새 튜브로 옮기고 단백질을 정량하여 100 μ g 당 10 mM DTT가 포함된 2× 반응액(reaction buffer) 50 μ l 씩 넣었다. 여기에 다시 4 mM

DEVD-pNA 기질을 5 μ l 넣은 후 37°C에서 2시간 반응시킨 후 400–405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) ROS 농도 측정

SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포로부터 증가되는 ROS에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 OxiSelect™ ROS assay kit(Koma Biotechnology, Seoul, South Korea)를 이용하여 측정하였다. 즉, MDCK 세포(5×10^5 cell/ml)를 96-well culture plate에 분주하여 하룻밤 배양한 다음 WHW를 1시간 동안 처리하고 SSP(1μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 제거한 다음 HBSS 용액으로 2–3회 세척한 후 1× DCFH-DA 용액 100 μ l를 넣은 후 37°C에서 1시간 반응하였다. 여기에 1 M NaOH를 넣어 세포를 분해시킨 후 일정량을 검은색 96 well plate로 옮겨 480 nm(Ex.) 및 530 nm(Em.)에서 형광도를 측정하였다. ROS의 농도는 DCF 표준용액을 이용하여 0–10 μ M 범위에서 얻은 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

7) Hoechst 염색

MDCK 세포에서 SSP에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 Hoechst 염색을 수행하였다. 먼저 MDCK 세포(5×10^5 cell/ml)를 4-well cell culture slide에 분주하여 하룻밤 배양하여 WHW를 1시간 동안 처리한 다음 SSP(1μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. Cell culture slide를 1× PBS로 2회 세척한 후 10% formalin을 처리하여 실온에서 30분 간 고정시키고 다시 1× PBS로 2회 세척한 다음 hoechst 33342(Sigma, MO) 염색시약으로 실온에서 30분 간 염색하였다. 염색된 cell culture slide를 다시 1× PBS로 2회 세척한 후 형광현미경 하에서 핵의 변연부 응축 정도를 관찰하였다.

8) DNA fragmentation

MDCK 세포에서 SSP에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 DNA fragmentation을 수행하였다. 먼저 MDCK 세포(5×10^5 cell/ml)를 100 mm culture dish에 분주하여 하룻밤 배양하여 WHW를 1시간 동안 처리한 다음 SSP(1μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배지 중 떠 있는 세포와 dish에 붙어 있는 세포를 모두 수거한 후 1× PBS로 2회 세척한 후 lysis 용액(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM EDTA, 0.1% NP-40)을 100 μ l 씩 넣어 ice에서 5분 간 정지하였다. 이를 4°C에서 1,000 ×g로 5분 간 원심분리한 후 상등액을 수거하고 10% SDS 용액 10 μ l와 50 mg/ml RNase A 용액 10 μ l를 가하여 55°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 25 mg/ml proteinase K 용액 10 μ l를 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 10 M ammonium acetate 용액을 65 μ l 씩 넣고 500 μ l의 ice-cold 100% ethanol을 가하여 -70°C에서 1시간 정지하였다. 다시 4°C에서 14,000 ×g로 20분 간 원심분리한 후 DNA pellet을 ice-cold 80% ethanol로 2회 세척한 다음 pellet을 공기 중에서 완전히 건조시켰다. DNA pellet을 TE buffer(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)로 녹이고 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 순도

를 측정한 다음 5 μ g의 DNA를 EtBr이 함유된 2% agarose gel에 loading하고 60 V에서 2시간 동안 전기영동한 후 UV transilluminator에서 fragmented DNA를 관찰하였다.

8) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준오차(mean \pm SE)를 계산하고, p<0.05 수준에서 Student t-test를 사용하여 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 세포생존율에 대한 효과

MDCK 세포에서 WHW에 의한 세포독성을 WST-1 assay 방법으로 확인한 결과, WHW를 2 mg/ml 농도로 처리하였을 때 세포생존율이 89.98 \pm 2.91%로 측정되어 정상세포에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 따라서 이후 실험에서는 독성이 없는 농도인 1 mg/ml 이하에서 실시하였다.

한편 SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포에서 WHW에 의한 세포 생존율을 확인한 결과, SSP 처리군에 비해서 WHW를 0.5 mg/ml(P <0.001)과 1 mg/ml(P <0.001) 처리하였을 때 세포생존율이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 또한 세포의 형태적 관찰에서도 SSP 처리군에 비해 WHW를 처리한 세포의 경우 정상세포와 유사한 형태를 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 1C).

2. 세포사멸유도 단백질 발현에 대한 효과

SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포에서 WHW에 의한 세포사멸 관련 단백질들의 발현에 대한 효과를 Western blot 방법으로 확인한 결과, SSP의 처리는 세포사멸유도 단백질인 caspase-3와 Bax의 발현을 증가시켰으며, 세포생존유도 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소시켰다(Fig. 2A). 반면 SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포에 WHW를 처리하였을 때 caspase-3와 Bax의 발현은 농도 의존적으로 감소하였으며, Bcl-2의 발현은 증가하는 것을 확인하였다. 또한 WHW의 처리는 SSP에 의해 세포사멸이 유도된 세포로부터 증가하는 caspase-3의 활성을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 2B).

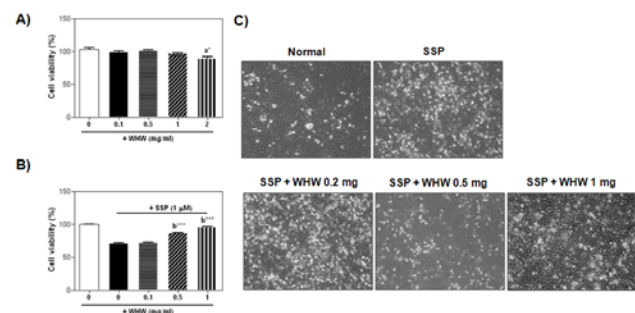


Fig. 1. Effect of WHW on cell viability in MDCK cells. A) Cells were treated with WHW for 24 h, and then measured cell viability

by WST-1 assay. B) Cells were treated with WHW for 1 h, and then stimulated with SSP (1 μ M) for 24 h. Cell viability by WST-1 assay. All data present mean \pm SE of three independent experiments. P <0.01 and P <0.001 vs. Cells alone (a) or SSP-treated cells (b). C) Cell morphology was observed by microscope (\times 40).

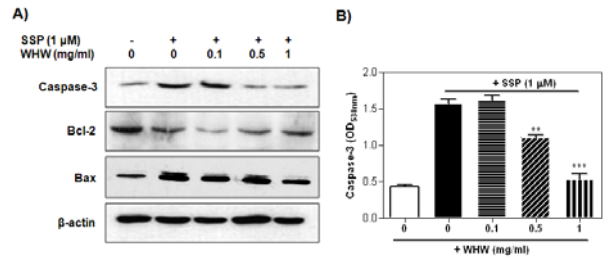


Fig. 2. Effect of WHW on SSP-induced expression of apoptotic proteins in MDCK cells. Cells were treated with WHW for 1 h, and then stimulated with SSP (1 μ M) for 24 h. The expression of caspase-3, Bcl-2 and Bax protein was determined by Western blot. B) Caspase-3 activity was measured by Caspase-3 colorimetric activity assay kit. All data present mean \pm SE of three independent experiments. P <0.001 vs. SSP-treated cells.

3. ROS 생성에 대한 효과

SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포로부터 다량 생성되는 ROS에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 세포 배양액 내 ROS를 농도를 측정된 결과, SSP 처리군에 비해 WHW를 0.1 mg/ml(P <0.05), 0.2 mg/ml(P <0.01), 1 mg/ml(P <0.01) 농도로 처리하였을 때 농도 의존적이며 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

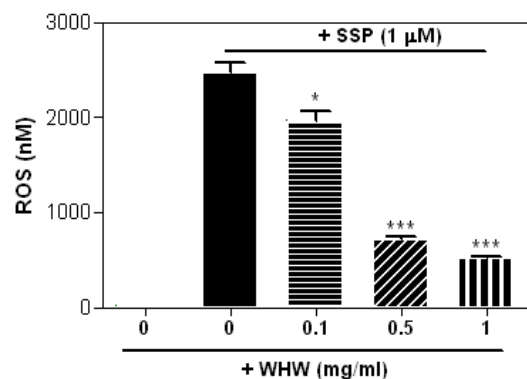


Fig. 3. Effect of WHW on SSP-induced production of ROS in MDCK cells. Cells were treated with WHW for 1 h, and then stimulated with SSP (1 μ M) for 24 h. The concentration of ROS was measured in culture supernatants by OxiSelect™ ROS assay kit. All data present mean \pm SE of three independent experiments. P <0.05 and P <0.001 vs. SSP-treated cells.

4. 세포사멸에 대한 효과

SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포로부터 관찰되는 핵의 응축(DNA condensation)에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 Hoechst 염색을 실시하였다. 그 결과, SSP 처리군에서는 세포사멸이 진행됨에 따라 핵의 응축으로 Hoechst 염색이 더 진하게 되어 밝게 보이는 세포들이 많이 관찰되었으며, WHW를 처리한 세포에서는 농도에 의존적으

로 Hoechst에 염색된 세포사멸 유도 세포가 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

또한 SSP에 의해 세포사멸이 유도된 MDCK 세포로부터 관찰되는 핵의 분절현상(DNA laddering)에 대한 WHW의 효과를 확인하기 위해서 DNA fragmentation을 확인한 결과, SSP 처리군에 비해 WHW를 처리한 세포에서는 농도에 의존적으로 DNA의 분절현상이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5).

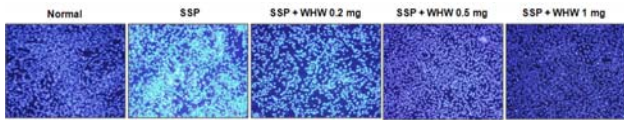


Fig. 4. Effect of WHW on SSP-induced apoptosis in MDCK cells. Cells were treated with WHW for 1 h, and then stimulated with SSP (1 μ M) for 24 h. Cells were stained with Hoechst 33342, and then observed fluorescence microscope ($\times 40$).

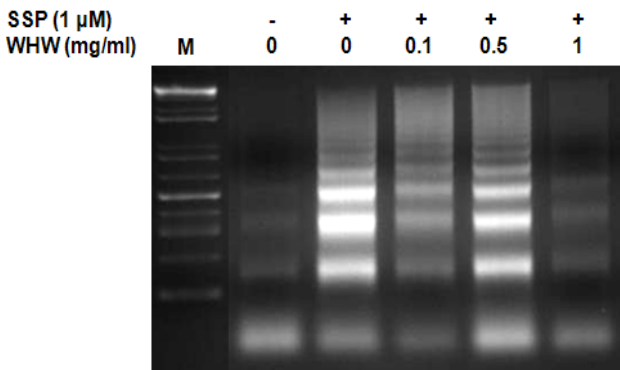


Fig. 5. Effect of WHW on SSP-induced DNA fragmentation in MDCK cells. Cells were treated with WHW for 1 h, and then stimulated with SSP (1 μ M) for 24 h. Genomic DNA isolated from the cell was separated on 1.5% agarose gel. The ladder pattern of DNA fragmentation represented the apoptotic death of cells.

고찰

신부전은 신장 기능 중 사구체 여과율 저하로 인한 진행성 배설 기능 장애를 주요 병리적 특징으로 하는 만성질환이며, 식이요법과 약물 등의 보존요법으로 상당 기간은 조절되지만 신장 기능이 정상의 10~15% 정도로 떨어지게 되면 생명보존을 위해 투석이나 신장이식과 같은 신대체요법이 필수적인 질환이다^{3,4}. 한편, 신장조직에서의 세포사멸은 정상적인 장기의 발생과 분화 외에 면역반응, 종양세포의 성장 및 조절, 그리고 세뇨관 간질의 손상과 사구체 경화를 초래함으로써 각종 신장질환의 주요 병태생리 기전에 관여하고 있다^{17,18}. 세포사멸을 유발하고 자극하는 인자들로써 염증성 사이토카인, 안지오텐신 II, 질산(nitric oxide), 산소 라디칼, endothelins, atrial natriuretic peptide(ANP), 성장인자 등이 있으며, 이들은 동시에 세포의 증식과 비후에도 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 즉, 다양한 신장질환에서 세포사멸이 관여되어 있으며 특히 급만성 신부전에서의 세포사멸에 대한 역할은 세포증식 조절 외 사구체 경화증 등 신장질환의 발병 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다¹⁹. 따라서 최근에는 신부전과 같은 신장질환에 있어 세포사멸을 억제하는 약물의 투여로 신장 손상을 줄이거나

예방할 수 있다는 연구가 활발히 진행되고 있다²⁰.

WHW는 한방임상에서 오령산과 온비탕을 가감하여 만든 복합약물로 현재 본 연구진에 의해 만성신부전 한약제제로 개발 중에 있으며, WHW의 효능에 대해서는 허혈/재관류 및 요관폐쇄 방법에 의해 급만성 신부전이 유발된 마우스의 신장 조직에서의 섬유화와 콜라겐 침착 및 사구체 경화 억제효과⁹, 신장조직손상에 대한 항산화 및 신장보호효과¹⁰⁻¹², 염증억제¹³, 항당뇨¹⁴, 당뇨병성 신부전이 유발된 흰쥐에서의 체중유지, 혈당강하, 인슐린합성증가 및 췌장과 신장조직 보호효과¹⁵ 등 다양한 약리효능이 보고된 바 있다. 최근 한약의 신부전 개선효과에 대한 실험연구로 현삼(*Picrorhiza scrophulariiflora*)의 신장 절제 유도 신부전 흰쥐에서의 사구체 경화 억제효과²¹, 동충하초와 광방기(*Radix Aristolochiae Fangchi*)의 급성신부전 흰쥐에서의 간질 섬유화 억제효과^{22,23}, 백출(*Atractylodis Rhizoma Alba*)이 당뇨흰쥐에서 췌장 및 신장에 미치는 효과²⁴ 등이 보고된 바 있다. 한편, Staurosporine은 protein kinase C(PKC) 저해제로서 미토콘드리아와 caspase 활성화에 관여함으로써 세포사멸을 유도하기 때문에 일반적인 세포사멸 유도제로 사용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 staurosporine을 MDCK 세포에 처리하여 세포사멸모델을 제작하였으며, WHW의 신장세포 사멸에 대한 억제효과를 확인하였다²⁵.

세포가 생명체 내에서 성장 및 분화 과정을 거쳐 그 기능을 발휘한 후 아토포시스(apoptosis)라는 예정된 죽음을 맞게 되는데 아토포시스를 통한 세포사멸은 tumor necrosis factor(TNF), caspases, NF- κ B, stress-activated protein kinase(SAPK), Bcl-2 family 등 여러 유전자들 및 그 발현 단백질들에 의해 조절되며 여러 신호전달계가 관여하고 있다. 이 중 caspase는 cysteine proteinase로서 현재까지 약 10종의 caspases가 보고되었으며, 세포사멸과정에서 발생하는 활성기산소에 의해 미토콘드리아로부터 유리되는 cytochrome C가 Apaf-1에 결합하면 caspase-9의 활성화를 통해 caspase-8, -9, -3, -6, -7의 활성화의 단계적 반응에 의해 세포사멸을 유도하게 된다²⁶. Caspase-3는 cysteine proteinase의 일환으로 세포 내에서는 비활성 효소원으로 존재하지만 다양한 자극에 의해 DNA가 손상되면 활성화됨으로써 세포사멸 신호전달에 매우 중요한 조절자 역할로 작용하게 된다. 본 연구에서 WHW는 신장세포에서 staurosporine에 의해 유도되는 세포사멸로부터 증가되는 caspase-3의 발현을 유의적으로 억제시켰을 뿐 아니라 caspase-3의 활성도 감소시켰다. 또한 세포사멸 유도 단백질 중 하나인 Bax의 발현을 감소시키고 생존단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시킴으로써 세포사멸을 억제할 수 있는 것으로 나타났다²⁶. Bax는 세포사멸 과정에 중요한 역할을 하는 단백질로 주로 세포질에 존재하지만 DNA 손상 등 자극이 전해지면 사립체 외막으로 이동하여 투과를 유발함으로써 cytochrome c를 유리시켜 세포사멸을 유도하게 된다²⁶.

한편 세포사멸은 형태학적 또는 생화학적 변화를 동반하게 되는데 짧은 시간 내 수분을 소실하게 되고 이온들의 균형이 깨지면서 삼투압이 파괴되어 세포가 수축되고, chromatin이 응축하면서 한 개 또는 여러 개의 dense sphere를 형성하며, DNA 분절, 핵막의 수포를 형성(blebbing) 하게 된다

27). 본 연구에서 WHW는 SSP로 세포사멸이 유도된 신장 세포에서 핵의 응축(condensation)과 분절화(fragmentation) 현상을 감소시킴으로써 세포사멸 억제효과를 나타내었다.

세포 내 활성산소종(ROS)은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사과정을 통해 생성된다. 특히 DNA 손상에 따른 스트레스가 가해지면 caspase계가 활성화되어 미토콘드리아로부터 과도하게 생성되는 ROS는 미토콘드리아 기능 이상을 초래하며 세포독성에 의해 DNA 손상을 유도하고 p53 유도와 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 활성화를 통해 세포사멸을 유도한다. 본 연구에서 WHW는 SSP로 세포사멸이 유도된 신장세포로부터 ROS의 생성을 유의적으로 감소시킴으로써 산화 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

결론적으로, 만성신부전 한약제제인 WHW는 신장세포에서 SSP에 의해 유도되는 세포사멸유도 단백질의 발현을 억제시키고 항산화효과를 통해 세포사멸로부터 신장세포를 보호하는 것으로 나타났다. 이는 기존의 WHW의 만성신부전에서의 우수한 치료효능 보고와 더불어 WHW가 만성신부전에서의 진행을 막고 핵심 병태생리를 효과적으로 차단함으로써 우수한 치료제로 개발될 수 있음을 시사한다.

결론

본 연구에서는 staurospoeine으로 세포사멸이 유도된 MDCK 신장세포에서 WHW의 세포사멸 억제효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. WHW는 staurospoeine-유도 신장세포사멸에서 세포생존도를 유의적으로 증가시켰다.
2. WHW는 staurospoeine-유도 신장세포사멸에서 세포사멸 유도 단백질인 caspase-3와 Bax의 발현을 억제시켰으며, 세포생존 단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시켰다.
3. WHW는 staurospoeine-유도 신장세포사멸에서 산화물질인 ROS의 생성을 유의적으로 감소시켰다.
4. WHW는 staurospoeine-유도 신장세포사멸에서 핵의 응축과 DNA의 분절을 억제함으로써 세포사멸을 억제시켰다.

이상의 결과로 볼 때 만성신부전 한약제제 WHW는 신장세포에서 세포사멸을 억제함으로써 신장조직을 보호할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업 연구비 지원(B090075)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Paweletz N, Walther Flemming: pioneer of mitosis

- research. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 ; 2 : 72-5.
2. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 ; 35 : 495-516.
3. Kim SK. Chronic renal failure. The Korea National Institute of Health, Korea centers for disease control & prevention. 2007 ; 21 : 1-15.
4. Blagg CR, Scribner BH. Diet, drugs and dialysis in the management of chronic renal failure. *Prog Biochem Pharmacol.* 1972 ; 7 : 452-97.
5. Nam HS, Cho CS, Kim CJ. A study on the healing mechanism of herbal medicine, Oryoungsan. Daejeon university Institute of Oriental Medicine. 2001 ; 10 : 157-66.
6. Kang YH, Kwon OS, Choi HS, Lee JH. Effect of the Oryoungsan on the injured liver in CCL4-treated rats. *The Journal of Dong Guk Oriental Medicine.* 1996 ; 5 : 131-47.
7. Lee JJ, Lee TW, Chang HH, Kim HJ, Ihm CG, Kim MJ. Inhibitory effects of Siryungtang and Onbitang on oxidation of low density lipoprotein. *The Kor J Nephrology.* 2001 ; 20 : 478-85.
8. Lee YK, Kang SB. The research study on the symptoms of Wuling-san compared with other 5 herbal medicines-based on Kangpind-Shanghanlun. *The Journal of East-West Medicine.* 2011 ; 36 : 1-9.
9. Lee SI, Kim HJ, Baek MC, Park KM, Park Y, Yoon CH, Boo YC. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san, an oriental herbal prescription, attenuates epithelial-mesenchymal transdifferentiation stimulated by TGF-beta1 in kidney cells. *Phytother Res.* 2007 ; 21 : 548-53.
10. Seok YM, Kim J, Choi KC, Yoon CH, Boo YC, Park Y, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney ischemia/reperfusion injury in mice. A role for antioxidant enzymes and heat-shock proteins. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 112 : 333-40.
11. Seok YM, Kim J, Park MJ, Boo YC, Park YK, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney fibrosis induced by ischemia/reperfusion in mice. *Phytother Res.* 2008 ; 22 : 1057-63.
12. Jung KJ, Kim J, Park YK, Yoon YR, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san reduces ureteral obstructive renal fibrosis by the reduction of oxidative stress, inflammation, and TGF-beta/Smad2/3 signaling. *Food Chem Toxicol.* 2010 ; 48 : 522-9.
13. Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114 : 439-45.

14. Bae HS, Nam JS, Jung JK, Oh SY, Park YK. Anti-diabetic effect of Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbology*. 2008 ; 23(3) : 85-91.
15. Jung HW, Jung JK, Ramalingam M, Yoon CH, Bae HS, Park YK. Anti-diabetic effect of Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Pharmacol*. 2012 ; 44 : 97-102.
16. Park YK, Oh TW, Bae HS, Yoon CH. Thirteen-week repeated-dose oral toxicity study of the Modified Wenpitang-Hab-Wulingsan(WHW(R)) in Sprague-Dawley rats. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(3) : 43-51.
17. Gobé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 1999 ; 56 : 1299-304.
18. Couser WG, Nangaku M. Cellular and molecular biology of membranous nephropathy. *J Nephrol*. 2006 ; 19 : 699-705.
19. Busuioc M, Gusbeth-Tatomir P, Covic A. The management in chronic kidney disease (CKD). *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2008 ; 112 : 896-901.
20. Sen K, Lindenmeyer MT, Gaspert A, Eichinger F, Neusser MA, Kretzler M, Segerer S, Cohen CD. Periostin is induced in glomerular injury and expressed de novo in interstitial renal fibrosis. *Am J Pathol*. 2011 ; 179 : 1756-67.
21. Feng JX, Li HY, Liu ZQ, Zhou ZM, Tian JW, Liang M. Effect of the ethanol extract of *Picrorhiza scrophulariiflora* on the progression of chronic kidney disease in a rat remnant kidney model. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010 ; 30 : 1505-8.
22. Zhu YF, Chen YP, Rui HL, Dong HR, Hu Z. Protective effects of *Hirsutella sinensis* on renal interstitial fibrosis : experiment with rat model of chronic aristolochic acid nephropathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007 ; 87 : 2667-71.
23. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999 ; 26 : 463-71.
24. Han YK, Park YK. Effect of *Atractylodis Rhizoma Alba* water extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Kor J Herbology*. 2011 ; 26(4) : 23-30.
25. Khan SM, Dauffenbach LM, Yeh J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *BBRC*. 2000 ; 269 : 542-5.
26. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins : mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ*. 2006 ; 13 : 1378-86.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press. 1989 ; 86-9.