

六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲이 메산지움세포 증식, Fibronectin 합성 및 MHC-class II 발현에 미치는 影響

이진신, 안세영, 두호경

경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Effects of Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang, Silbi-um on Mesangial cell Proliferation, Fibronectin Synthesis, MHC-class II Expression

Jin-Sin Lee, Sae-Young Ahn, Ho-Kyung Doo

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objective : To analyze the effects of Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang, Silbi-um on mesangial cell proliferation, fibronectin synthesis and MHC-class II expression.

Methods : Laboratory studies were performed with the method of surface enzyme immunoassays or flow cytometry after addition of peripheral blood mononuclear cells(PBMC) supernatants treated with medications using the cultured human mesangial cells.

Results : 1. Silbi-um produces more suppressive effect than control group and hydrocortisone group on the mesangial cell proliferation. In Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang and Silbi-um, mesangial cell proliferation significantly decreased than in hydrocortisone group

2. In the 'without fetal bovine serum' study, Yukmijihwang-tang take more suppressive effect than Control group on the fibronectin synthesis. In the 'with fetal bovine serum' study, Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang, Silbi-um all have suppressive effect, but it hasn't any statistical significance.

3. Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang, Silbi-um all have a suppressive effect on the MHC-class II expression.

Conclusions : Herb medicine generally show a suppressive effect on the suppression of the mesangial cell proliferation, fibronectin synthesis and MHC-class II expression.

Key Word : Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang, Silbi-um, Mesangial cell proliferation, Fibronectin synthesis, MHC-class II expression.

I. 緒 論

면역학적 손상, 고혈압, 당뇨병같은 대사장애 등에 의해서 유발되는 신질환의 조직을 관찰하면 원인 질환에 상관 없이 사구체경화증¹⁾이 특징적으로 관찰되며, 손상의 원인이 제거되더라도 대개는 만성신부전으로 진행된다²⁾.

사구체 경화증에서의 조직학적 특징은 메산지움세포의 증식과 메산지움 기질 축적이며, 이 기전에는 면역학적 기전이 중요하게 관여한다.

사구체내에 존재하거나 혈행내를 순행하던 항원이 사구체내에서 사구체 구성성분과 면역반응을 일으킬 때에 cytokine이 매개하는데, 이 cytokine에 자극된 림프구들이 사구체내로 이동하면 fibronectin의 합성과 MHC-class II의 발현을 증가시켜서³⁾ 메산지움 세포 증식과 메산지움 기질축적을 보다 촉진시킨다고 알려져 있다.

그러나 이에 대한 서양의학적 치료는 보조적이고 대증적인 방법이 위주로서, hydrocortisone, cyclophosphamide 등

이 쓰이고 있으나 minimal change nephrotic syndrome을 제외한 나머지 질환에서는 뚜렷한 효과를 거두지 못하고 있고, 장기복용으로 인한 부작용 때문에 치료에 제한이 따르고 있다⁴⁾.

만성진행성 사구체 질환으로 나타나는 증상들은 한의학에서는 水腫, 尿濁, 虛損, 癱閉, 腰痛의 범주에 속하며, 利水, 通泄, 解毒, 補腎, 補脾 등의 다양한 治法이 사용되어 왔다. 하지만, 한약처방이 메산지움세포의 증식과 기질의 축적에 미치는 영향에 대한 연구가 없었으며, 면역학적 기전을 이용한 실험방법으로 한약의 효능을 연구한 보고도 없으므로,

Table 1. 六味地黃湯

藥物名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix	16
山藥	Dioscoreae Radix	8
山茱萸	Corni Fructus	8
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	6
白茯苓	Hoelen	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
總量		50

Table 2. 澤瀉湯

藥物名	生藥名	重量(g)
澤瀉	Alismatis Rhizoma	30
赤茯苓	Poria	30
枳殼	Aurantii Fructus	30
猪苓	Polyporus	30
木通	Akebiae Caulis	30
檳榔	Arecae Semen	30
黑牽牛	Pharbitidis Semen	30
總量		210

Table 3. 實脾飲

藥物名	生藥名	重量(g)
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4.50
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	4.50
厚朴	Magnoliae Cortex	4.50
澤瀉	Alismatis Rhizoma	4.50
香附子	Cyperii Rhizoma	4.50
砂仁	Amomi Fructus	4.50
枳實	Aurantii Immaturus Fructus	4.50
陳皮	Citri Pericarpium	4.50
大腹皮	Arecae Pericarpium	4.50
木香	Aucklandiae Radix	4.50
茯苓	Poria	4.50
猪苓	Polyporus	4.50
燈心	Junci Medulla	4.50
總量		58.50

이에 대한 연구가 필요한 상황이다.

이에 저자는 한의학 문헌과 그간 임상에서 신장질환에 널리 사용되고 있는 韓藥處方들을 검토하여 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲 등의 處方들을 선택한 후

이들 약물이 메산지움 세포증식, 메산지움 기질축적, 면역반응에 미치는 효과를 실험적 방법으로 규명하여 만성 사구체 질환에 대한 새로운 치료법을 찾고자 다음과 같은 연구를 시행하게 되었다.

II. 材料 및 方法

1. 시료

1) 시료의 종류

본 실험에 사용된 시료는 모두 경희의료원 한방병원 약제부에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

약제는 六味地黃丸⁵⁾, 澤瀉湯⁶⁾, 實脾飲⁷⁾으로 각 처방의 내용 및 분량은 Table 1, 2, 3과 같다.

2) 시료의 추출

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

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

일차 추출된 각 약제 동결건조 분말을 1g씩 취한 후 증류수를 10ml씩 가하여 위와 같은 방법으로 이차가열추출, 원심분리후 여과멸균하여 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

3) 시험관내 시료농도의 결정

(1) 말초혈액 단핵세포의 분리 및 배양
건강한 정상인으로부터 정맥혈 400ml를 채혈한 다음 채혈액을 1500×g에서 15분간 원심침전하였다. 혈액백을 plasma extractor로 옮겨 혈장을 분리

한 후 단핵구를 포함하는 buffy-coat 층을 70ml 분리하였다. 분리된 buffy-coat에 동량의 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)용액을 가하여 희석하였다. 희석된 buffy-coat 30ml를 15ml의 Ficoll-Hypaque solution(비중 1.077)위에 중첩시킨 다음 400×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 Ficoll-Hypaque층과 plasma층 사이에 형성된 단핵세포층을 수거하여 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 $2,000 \mu g/ml \sim 15.6 \mu g/ml$ 이 되도록 한 다음 $37^\circ C$, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양하였다.

(2) 시료농도의 결정

72시간 후 각 well에 MTS-PMS 시약을 $20 \mu l$ 씩 가한 다음 $37^\circ C$, 5% CO_2 배양기에서 4시간 추가배양 후 spectrophotometer 파장 492 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

시험관내에 사용할 시료의 농도는 대조군에 비하여 흡광도 값이 현저히 낮아지기 직전의 농도로 하였는데, 본 실험에 사용된 시료의 농도는 六味地黃丸 추출물과 實脾飲 추출물이 각각 $100 \mu g/ml$, 澤瀉湯 추출물은 $60 \mu g/ml$ 이었다.

2. 메산지움세포의 배양

신절제술로 얻어진 건강한 사람의 신장으로부터 신피질을 박리하여 3×3 mm 정도의 크기로 분절한 후 직경 $500 \mu m$, $250 \mu m$ 및 $100 \mu m$ 의 stainless steel mesh

에 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 $2 mg/ml$ 의 collagenase로 $37^\circ C$ 에서 15분간, 그리고 0.05 % trypsin-0.53mM EDTA 용액으로 5분간 처리하였다. 그 후 $75 cm^2$ 조직배양 플라스크(Costar, MA, USA)에 사구체를 넣고 Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEZ, Gibo)에 20% 우태아 혈청과 100 unit/ml의 penicillin, $100 \mu g/ml$ 의 streptomycin, $10 \mu g/ml$ 의 insulin이 첨가된 배양액으로 배양하였다.

세포가 단층을 형성하면 0.05% trypsin- 0.53mM EDTA용액을 처리하여 낱개의 세포로 유리시켜 2차, 3차 계대배양하였다. 본 연구에서는 4대째 계대배양중인 메산지움세포를 이용하였는데, 미오신 섬유 양성반응과 공통백혈구 항원 및 factor VIII 음성, 그리고 D-Valine 대체배지에서의 성장, puromycin 저항성 등의 특성을 나타내어 메산지움세포임을 재차 확인하였다.

3. 단핵세포 배양상청액의 제조

Ficoll-Hypaque 밀도구배방법으로 수확된 단핵세포를 우태아혈청이 10%되게 첨가된 RPMI 1640 배양액에 $2 \times 10^6/ml$ 의 세포농도로 부유시킨후 여기에 phytohemagglutinin- P(PHA-P) 및 Con-A를 각각 $10 \mu g/ml$ 이 되도록 첨가하였다. 이들 세포를 96well plate well당 5ml 씩 분주하고 여기에 drug cytotoxicity 시험에서 결정된 약제농도 (60 or $100 \mu g/ml$)만큼 각각의 약제를 첨가하여 $37^\circ C$, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간 후 각 well로부터 배양상청액을 수거하여 사용시까지

$-70^\circ C$ 냉동고에 보관하였다.

정상군은 RPMI 1640 배양액만으로 배양하였고, 대조군은 RPMI 1640 배양액에 PHA-P와 Con-A를 첨가하되 아무 약제를 첨가하지 않았으며, hydrocortisone 투여군은 RPMI 1640 배양액에 PHA-P와 Con-A를 첨가하고 hydrocortisone을 가하였다.

4. 메산지움세포의 증식 시험

4대째 계대배양 중인 메산지움세포를 낱개의 세포로 수거하여 우태아 혈청이 10%, insulin이 $10 \mu g/ml$ 첨가된 DMEM 배양액에 $2 \times 10^4/ml$ 의 농도로 부유시킨 다음 96well flat-bottomed microplate의 각 well당 $100 \mu l$ 씩 분주하여 $37^\circ C$, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 여기에 각각의 약제가 처리된 단핵세포 배양상청액을 25% 및 50%되게 첨가한 다음 $37^\circ C$, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간후 각 well에 MTS-PMS 용액을 $20 \mu l$ 씩 분주하여 4시간후 추가배양한 다음 spectrophotometer 파장 492nm에서 그 흡광도를 측정하였으며 실험은 삼중반복으로 하였다.

5. 메산지움세포의 fibronectin 합성도 측정

4대째 계대배양중인 메산지움세포를 수거한 다음 10%의 우태아 혈청, $10 \mu g/ml$ 의 insulin이 첨가된 DMEM 배양액에 $1 \times 10^5/ml$ 의 세포농도로 조정된 다음 이를 24well plate well당 1ml씩 분주한 다음 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 각각의 약제가 처리된 단핵세포 배양상청액이 25%되게 조정된 배양액을 well당 1ml씩 첨가하여 $37^\circ C$, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간후 배양액을 수

거하고 각 well을 PBS 용액으로 2회 세척한 다음 우태아 혈청이 첨가되지 않은 DMEM 기초배지를 각 well에 1 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well로부터 배양액을 수거하여 fibronectin 분석시까지 -70°C에 보관하였다. 각 검체로부터의 fibronectin 측정은 fibronectin EIA kit(Cat# MK115 Takara)를 이용하여 측정하였다. 약술하면 anti-fibronectin antibody가 coating된 microplate에 표준 검체 및 검체를 100 µl씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨다음 각 well을 세척완충액으로 4회 세척하였다. 여기에 peroxidase가 부착된 2차 anti-fibronectin antibody를 각 well당 100 µl씩 분주하여 실온에서 15분간 발색시켰다. 15분 후 IN H₂SO₄ 반응정지액을 각 well에 100 µl씩 가한 다음 spectrophotometer 파장 450nm에서 그 흡광도를 구한 다음 표준곡선상에서 각 검체의 fibronectin 합성량을 구하였다.

6. MHC-class II(HLA-DR molecule) 발현도 측정

4대제 계대배양중인 메산지움세포를 수거하여 10% 우태아 혈청, 10 µg/ml insulin이 첨가된 DMEM 배양액을 5 × 10⁶/ml의 농도로 조정된 다음, 6well plate well당 4 ml씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 각 약제를 처리된 단핵세포 상층액이 25%되게 첨가된 DMEM 배양액으로 교체한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양이 끝나면 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액을 처리하여 날개의 세포로 수확한 다음 우태아 혈청이 5%되게 첨가된 PBS 용액으

로 2회 세척하였다. 이들 세포에 anti-HLA DR(Becton Dickinson, USA) monoclonal antibody를 처리하여 4°C ice water에서 1시간 반응시켰다. 음성 대조군은 isotype이 같은 mouse IgG를 처리하였다. 1시간 후 bovine serum albumin이 0.5%되게 첨가된 cold PBS 용액으로 2회 세척한 후 FITC가 부착된 goat anti-mouse antibody 시약을 각각의 세포에 처리하여 4°C ice water에서 1시간 반응시켰다. 이들 세포를 재차 2회 세척하고, 0.4 ml의 1% paraformaldehyde 용액에 부유시킨 다음 flow cytometer에서 그 형광도를 측정하여 각 molecule의 발현정도를 측정하였다.

7. 통계분석

통계처리는 SPSS(Statistical Package for Social Science)를 사용하여 Paired Sample Test로 검증하였다.

III. 結果

1. 메산지움세포 증식에 미치는 영향

50%와 25% 농도로 자극한 메산지움 증식유도실험에서 대조군의 흡광도는 각각 1.016 ± 0.050, 1.004 ± 0.018이며, 정상군은 1.124 ± 0.022, 1.030 ± 0.055으로 mitogen에 의한 메산지움세포 증식자극이 충분히 이루어지지 않은 상태로 실험이 진행되었다.

50% 농도로 자극한 약제실험에서는 澤瀉湯군이 1.013 ± 0.014으로 대조군 1.016 ± 0.050, hydrocortisone 대조군 1.148 ± 0.047에 비해 유의한(P<0.05) 메산지움세포 증식억제효과를 나타냈다. 또한 25% 농도로 자극한 약제실험에서는 六味地黃湯군이 0.962 ± 0.040,

澤瀉湯군이 0.984 ± 0.067, 實脾飲군이 0.876 ± 0.041으로서 대조군 1.004 ± 0.018에 비해 억제효과를 나타냈으며, 이중 實脾飲군은 통계학적 유의성(P<0.05)이 있었다.

한편 실험약제군 모두 hydrocortisone 대조군 1.013 ± 0.012에 비해서는 유의한(P<0.05) 메산지움세포 증식 억제효과를 나타내었다. (Fig. 1, Table 4)

2. Fibronectin 합성에 미치는 영향

Fibronectin 합성 유도실험에서 대조군의 흡광도가 with fetal bovine serum과 without fetal bovine serum에서 각각 10645 ± 417, 7412 ± 17이었으며 정상군이 7455 ± 77, 5012 ± 201으로 mitogen에 의한 fibronectin 합성자극이 충분히 이루어졌다.

약제실험에서는 with fetal bovine serum에서 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲의 흡광도가 각각 8205 ± 35, 8600 ± 28, 10100 ± 141으로 대조군 10645 ± 417에 비해 합성 억제효과가 관찰되었고, 특히 육미지황탕군은 hydrocortisone투여군 8322 ± 463보다 억제효과가 높았다.

without fetal bovine serum에서는 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲이 각각 5195 ± 35, 6120 ± 254, 6945 ± 148으로 대조군 7412 ± 17에 비해 합성억제효과가 관찰되었고, 六味地黃湯에서는 통계학적 유의성(P<0.05)이 있었다. 또, 육미지황탕군은 hydrocortisone군의 6395 ± 35에 비하여 높은 억제효과가 있었으나, 유의성은 없었다.(Fig. 2, Table 5)

Table 4. The Comparisons between Control and Experimental group in mesangial cell proliferation stimulated with 50%, 25% supernatant concentration

Group	OD [†] (50%)	OD [†] (25%)
Normal [‡]	1.124 ± 0.022	1.030 ± 0.055
Control [‡]	1.016 ± 0.050	1.004 ± 0.018
Hydrocortison	1.148 ± 0.047	1.013 ± 0.012
Yukmijihwang-tang	1.023 ± 0.033 [†]	0.962 ± 0.040 [†]
Taeksa-tang	1.013 ± 0.014 [†]	0.984 ± 0.067 [†]
Silbi-um	1.025 ± 0.031 [†]	0.876 ± 0.041 [†]

*Statistically significant value compared with Control (P<0.05)
[†]Statistically significant value compared with Hydrocortison (P<0.05)
[‡]O.D. = optic density
[§]Normal = No mitogen group
[‡]Control = Mitogen group

Table 5. The Comparison between Control and drugs in Fibronectin expression

Group	with fetal bovine serum	without fetal bovine serum
Normal	7455 ± 77	5012 ± 201
Control	10645 ± 417	7412 ± 17
Hydrocortison	8322 ± 463	6395 ± 35
Yukmijihwang-tang	8205 ± 35	5195 ± 35*
Taeksa-tang	8600 ± 28	6120 ± 254
Silbi-um	10100 ± 141	6945 ± 148

* statistically significant value compared with Control (P<0.05)

3. MHC-class II 발현에 미치는 영향

MHC-class II 발현유도실험에서 대조군의 흡광도는 19.61, 정상군은 2.01로 mitogen에 의한 MHC-class II 발현자극이 충분히 이루어졌다.

약제실험에서는 六味地黄湯, 澤瀉湯, 實脾飲의 흡광도는 각각 15.63, 13.61, 13.06으로서 대조군 19.61에 비해 유의한(P<0.05) MHC-class II 발현 억제 효과를 나타내었으나, hydrocortison 군 6.19에 비해서는 억제효과가 상대적으로 적은 것으로 나타났다. (Fig. 3, Table 6)

IV. 考 察

사구체성 신질환은 면역학적 손상, 고혈압, 당뇨병같은 대사장애 등에 의해서 유발되는데, 이로 인해 신사구체 여과속도가 30%내지 50%까지 감소될 정도로 신원이 파괴되면, 손상의 원인이 제거되더라도 만성신부전으로 진행된다. 이와같은 손상기전에는 조직학적 특징이 있는데, 메산지움세포의 증식과 메산지움 기질의 축적이다.

메산지움은 mesangial cell 및 matrix¹⁰⁾로 이루어진 모세혈관내의 연결망으로 이미 형성된 면역복합체 및 항원 등의 물질들이 모여드는 곳으로⁹⁾, 사구체를

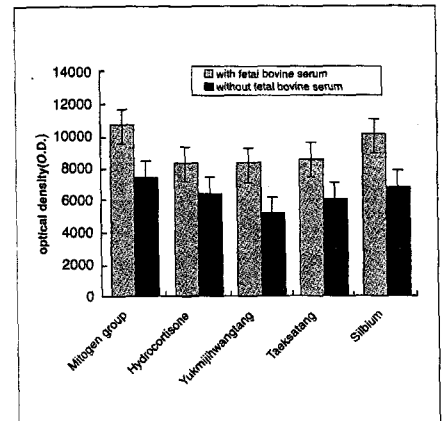


Fig. 2. The suppressive effect of Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang and Silbi-um on Fibronectin synthesis

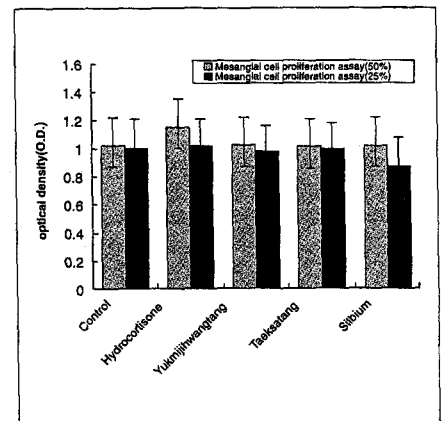


Fig. 2. The suppressive effect of Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang and Silbi-um on Fibronectin synthesis

지지하는 축의 역할을 하는 세포이다.

Fibronectin은 메산지움을 구성하는 단백질의 하나로, 세포유착, 분화, 유주에 따른 배아형성, 손상치유, 지혈 등에 있어 중요한 역할을 하는 일련의 고분자 당단백질이며, 메산지움 세포에서 합성되는 extracellular matrix(ECM)에 다량으로 함유되어 있다.

정상적인 신사구체에서 fibronectin^{10,11)}은 사구체의 기저막과 메산지움을 따라 존재하다가 사구체가 손상되면 증가하는데, 대사성질환이나 염증상태에서의 macrophage, T-lymphocyte,

Table 6. The comparison between control and drugs in MHC-class II expression

Group	Optic density
Normal	2.01
Control	19.61
Hydrocortisone	6.19
Yukmijihwang-tang	15.63*
Taeksa-tang	13.61*
Silbi-um	13.06*

* statistically significant value compared with Control

tubular epithelial cell, mesangial cell 등에서 생산되는 interleukin (IL)-1^{12,13}, IL-6^{14,15}, platelet derived growth factor(PDGF)^{16,17}, IGF-1, transforming growth factor(TGF)- β ¹⁸, Interferon(IFN)- γ 같은 cytokine들의 면역반응을 통해 mesangial cell에서의 합성이 촉진되며, 이로 인하여 메산지움 기질축적이 발생하게 된다.

이와같이 메산지움 세포의 증식과 메산지움 기질의 축적을 유발하는 기전에는 면역학적 기전이 관여하는데, 사구체의 면역학적 손상기전에는 두 가지가 있다¹⁹. 첫째는 사구체내에 존재하는 항원이 사구체내의 구성성분과 서로 반응하여 면역복합체성 사구체 신염을 유발하는 것이고, 둘째는 순환혈액내에 존재하는 가용성 면역복합체가 사구체조직내에 침착되어 일어나는 손상이다. 이 두 기전외에도 사구체내 세포구성 요소에 대한 세포독성 항체작용이 사구체 손상에 관여한다.

주조직 적합항원(MHC antigen)²⁰은 면역반응에 있어서 중요한 물질로, 사람의 6번 염색체에 위치하고, HLA-A, -B, -C를 가지는 class I molecule과 HLA-DR, -DQ, -DP를 가지는 class II molecule로 구분한다. Class I molecule이 RBC를 제외한 모든 유핵 세포에 존재하여 cytotoxic T cell(CD8

T세포)에 의해 인지되는 반면에, class II molecule은 β 세포와 단핵구에 존재하여 helper T cell(CD4 T세포)과 반응하여 다양한 면역반응을 일으킨다. B 림프구 표면에는 MHC class I과 MHC-class II이 모두 존재하지만 휴식기의 T 림프구 표면에는 MHC-class I만이 표현되었다가 T림프구가 항원 자극을 받아 활성화되면 MHC-class II를 표현하게 된다.

메산지움 세포에서 cytokine이 자극되면 MHC-class II가 생성되는데, 이는 helper T cell의 활성화보조분자인 CD4와 결합하여 helper T cell에 항원 정보를 제공하고, helper T cell은 IL-2를 만들어낸다. 이때 생성된 IL-2는 B 세포 활성화 등의 여러 가지 면역학적 반응을 유발하게 되어, 이로 인해 사구체로 면역세포들이 유입, 침윤되어 결국 사구체 손상이 촉진되게 된다.

이같은 사구체내 세포증식과 세포의 기질증가는 여러 진행성 신손상의 중요한 특징이다. 즉 메산지움 세포증식과 기질축적에 의해 메산지움이 팽창하면 이는 사구체 모세혈관의 내강(capillary lumen)을 압박하여 사구체의 여과면적이 감소하여 사구체 내압을 상승시키게 되므로, 메산지움 세포와 내피세포들이 지속적으로 손상되고, 침윤성이 증가되어, 그 결과 사구체경화증이 유발되며

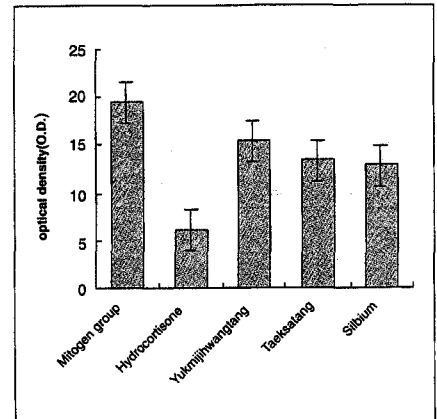


Fig. 3. The effects of Yukmijihwang-tang, Taeksa-tang and Silbi-um on MHC-class II expression

결국 만성신부전 같은 비가역적 신손상으로 진행하게 되는 것이다.

메산지움 세포증식과 기질축적에 면역학적 기전이 중요한 역할을 한다고 밝혀진 이후 이에 대한 치료로서 hydrocortisone²¹, cyclophosphamide²² 등의 면역억제제가 사용되고 있다. 그러나 minimal change nephrotic syndrome²³을 제외한 나머지 질환에서는 뚜렷한 효과를 입증할만한 근거가 없는 상황이며 이러한 약제의 장기복용으로 인한 부작용으로 그 치료의 대상환자도 제한되고 있다. 따라서 면역억제제와 각각의 증상에 따른 대증요법만이 만성 사구체 질환의 치료법으로 시행되고 있다.

이러한 서양의학적 치료의 제한으로 인해, 한의학적 치료가 임상에서 이용되고 있으나, 한약제가 메산지움세포의 증식억제와 기질의 축적억제에 미치는 영향에 대해 연구한 보고는 없을 뿐만 아니라, 면역학적 기전을 이용한 실험방법으로 한약의 유효성에 대한 보고가 없는 상황이므로 이에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

이에 저자는 한의학 문헌과 그간 임상에서 신장질환에 널리 사용되고 있는 韓藥處方들을 검토하여 六味地黃湯, 澤

瀉湯, 實脾飲 등의 韓藥 處方들을 선택한 후 이들 약물이 메산지움 세포증식, 메산지움 기질축적, 나아가 면역반응에 미치는 효과를 실험적 방법으로 규명하여 만성사구체질환에 대한 새로운 치료법을 찾고자 다음과 같은 연구를 시행하게 되었다.

만성 진행성 사구체 질환의 주된 원인인 메산지움 세포증식과 기질축적을 관찰하는 방법으로는 직접 메산지움 세포증식 정도를 검사하거나, 기질의 주요 구성요소인 collagen, fibronectin 발현도를 검사하는 방법 외에도 cytokine 자극으로 활성화되어 나타나는 ICAM-1 발현도검사, $\beta 1$ -integrin 발현도검사, MHC-class II molecule 발현도검사 등의 면역학적 방법이 있는데 본실험에서는 메산지움 세포 증식과 fibronectin 발현, MHC-class II molecule 발현을 관찰하는 연구를 시행하였다.

정상인의 정맥혈에서 분리배양한 단핵세포에 mitogen을 첨가하여 면역반응을 일으킨 후, 여기에 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲의 실험약제를 가한 실험군과 배양액만으로 배양한 정상군, 배양액에 mitogen을 첨가하되 아무 약제를 첨가하지 않은 대조군, 배양액에 mitogen을 첨가하고 hydrocortisone을 가한 hydrocortisone 투여군으로 선정하고, 실험약제가 메산지움 세포증식, fibronectin의 합성, MHC-class II 발현에 미치는 영향을 관찰하는 실험을 진행하였다.

대조군으로 hydrocortisone을 선택하였는데, 이는 거식세포와 단핵구내 IL-1, IL-6 mRNA의 전사를 차단함으로써 IL-1, 6 생성 및 분비를 억제하고, 단핵구의 IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α^{24} 유전자 발현 및 mRNA 전사를 억제하며, 혈관내 순환하고 있는 림프구를 림

프조직으로 돌려보냄으로써 백혈구 수는 증가하나 상대적인 림프구 결핍증을 유발하고, 염증부위로 단핵구가 이동하는 것을 차단하고, 화학주성물질, 혈관 확장물질 및 혈관의 투과도를 증가시키는 물질들의 합성 분비 및 작용을 억제함으로써 광범위한 면역억제 및 항염증 작용을 나타내어, 메산지움 세포증식억제와 세포외기질 합성, MHC-class II 발현 등의 억제효과가 있는 것으로 보고되고 있어 본실험의 대조군으로 채택하게 되었다.

만성진행성 사구체질환으로 나타나는 증상을 東洋醫學적으로 고찰하면 水腫, 尿濁, 虛損, 癱閉, 腰痛 등의 범주에 속한다. 그 原因으로는 風熱, 風寒, 寒濕 등이 惹起하는 毒氣에 腎臟이 損傷되거나, 邪氣가 內結하여 濕熱이 內蒸하여 氣血이 凝結되고 氣機가 失常되어 損傷된다^{25,26,27,28}.

따라서 臨床에서도 각각의 東洋醫學적인 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 應用處方도 매우 다양하다.

이에 저자는 韓醫學 文獻과 그간 臨床에서 신장질환에 널리 사용되고 있는 韓藥處方들을 검토하여 腎水不足의 대표적인 처방인 六味地黃湯과 浮腫에 사용되는 澤瀉湯, 實脾飲을 선택하였다.

본 실험에 사용된 각각의 處方을 살펴보면, 六味地黃湯은 錢乙의 小兒藥證直訣에 地黃圓이라는 이름으로 最初로 收錄된 처방으로 “治腎怯失音 顛開不合 神不足 目中白睛多 面色晄白等”라 하였다. 以後 諸醫家들에 의하여 腎水不足, 陰虛陽亢, 先天元氣不足, 腎精不足으로 發生하는 諸症에 광범위하게 使用되었는데²⁹, 근대에 尹³⁰은 滋陰補腎의 基礎

方劑로 體內 生活 에너지源의 부족으로 代謝가 沈衰된 狀態 卽 陰虛로 인하여 發生하는 모든 病症을 本方에 加減하여 治療한다고 하였다.

六味地黃湯의 實驗的 研究로 柳³¹는 馬杉腎炎에 有效하다 하였고, 李³²는 腎性高血壓 白鼠에 血漿 renin 活性도를 抑制하여 血壓을 降下시킨다고 보고하였으며, 杜³³은 六味地黃湯에 鹿茸을 加한 煎湯液이 急性腎不全에 有效하다고 하였다.

澤瀉湯은 張의 金匱要略의 痰飲咳嗽 病脈證并治論에 最初로 收錄된 處方으로 心下有支飲 其人苦冒眩을 治療한다 하였고, 醫學入門 水腫門³⁴의 “陽水熱渴 二便閉 汗下分消要得宜”節에 “治水腫 大小便秘澀”하는 효능이 있다고 하였다.

澤瀉湯에 관한 實驗的 研究로 南³⁵은 利尿效果가 있어서, 高脂血症과 高血壓에 尤호한 效果가 있음을 보고하였다.

實脾飲은 龔의 萬病回春에 收錄된 方劑로 이는 同書 鼓脹門의 分消湯에서 生薑一味만을 去한 것으로 “治水腫, 治中滿成鼓脹, 兼治脾虛發腫脹飽悶”한다고 하였다. 그러므로 利水중에 疏氣를 兼하는 것으로, 行氣利濕藥으로 治標하고 아울러 健脾胃藥으로 治本하는 處方으로³⁶, 臨床에서는 腎疾患에 利水를 目的으로 多用되는 處方이다.

實脾飲에 대한 연구로 劉³⁷는 血清中의 creatinine, BUN, uric acid 및 ALT 活性도의 증가를 억제하는 효과가 있다고 하였다.

메산지움 증식에 미치는 영향을 관찰한 본 실험결과 50%와 25% 농도로 자극한 메산지움 증식유도실험에서 mitogen에 의한 메산지움세포증식자극이 충분히 이루어지지 않았으며, 약제실험에서는 50% 농도로 자극한 실험에서는 澤瀉湯이 정상군, 대조군, hydrocor-

tisone 투여군에 비해 유의한 메산지움 세포 증식억제효과를 나타내었으며, 六味地黃湯과 實脾飲에서는 유의한 효과가 없었다. 또한 25%의 상청액 농도로 자극한 실험에서는 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲이 대조군에 비해 억제효과를 나타냈으며, 實脾飲만이 통계학적 유의성을 나타내었고, hydrocortisone 투여군에 비해서는 모두 유의한 메산지움세포 증식 억제효과를 나타내었다.

한편, 대조군이 정상군에 비해 mitogen에 의한 세포증식자극이 유도되지 않았으며, 알려진 바와는 다르게 메산지움 세포증식 억제실험에서 각각 50%와 25% 상청액 자극실험 모두에서 hydrocortisone이 메산지움 세포증식 억제효과가 없는 것으로 나타난 반면 다른 실험에서는 면역억제효과를 나타내었는데, 이는 mitogen자극에 의해 분비된 cytokine들간의 상호작용에 의해 세포증식 cytokine의 영향이 상쇄된 반면 세포증식억제 cytokine의 영향이 보다 크게 작용한 것으로 사료되나, 이에 대한 자세한 고찰은 mitogen으로 사용한 con-A로 자극하여 얻은 상청액을 분석하여 본실험에 주된 작용을 일으킨 특정 cytokine을 규명함으로써 정확한 판정이 가능할 것으로 여겨진다.

Fibronectin 합성에 미치는 영향을 관찰한 본 실험결과 serum bovine으로 실험한 경우와 serum bovine 없이 실험한 경우 모두에서 mitogen에 의한 fibronectin 합성 자극이 충분히 이루어졌다.

약제실험에서는 serum bovine으로 실험한 경우에 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲 모두에서 대조군에 비해 fibronectin 합성 억제 경향성이 관찰되었고, serum bovine 없이 실험한 경우에 모든 실험약물에서 대조군에 비해서 합성이 억제하

였고, 六味地黃湯에서는 통계학적으로 유의한 효과가 있었다. 모든 약물군에서 대조군에 비해 fibronectin 합성억제의 경향성을 보였으며, without fetal bovine serum에서의 육미지황탕군은 유의한 합성억제 효과가 있었고, hydrocortisone 군에 비교해서 유의한 합성억제효과가 관찰되었다.

MHC-class II 발현유도실험에서 대조군의 흡광도는 19.61이고 정상군은 2.01으로서 mitogen에 의한 MHC-class II 발현자극이 충분히 이루어졌다. 약제실험에서는 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲이 대조군에 비해 유의한 MHC-class II molecule 발현 억제효과를 나타내었으나, hydrocortisone군에 비해서는 억제효과가 상대적으로 적은 것으로 나타났다.

이상과 같이 각각의 실험약제에서 대조군에 비해 메산지움세포 증식억제, fibronectin 합성 억제, MHC-class II 발현 억제효과를 나타내었으며, hydrocortisone군과의 비교에서는 메산지움 세포증식 억제실험과 fibronectin 합성 억제효과에서 六味地黃湯은 상대적으로 좋은 억제효과를 나타내었다.

따라서, 위의 한약제를 골수억제, 성장장애, 신독성 등의 hydrocortisone 부작용으로 사용에 제한이 따르는 환자에게 단독 또는 hydrocortisone과 병행하여 사용 할 수 있을 것으로 사료되며, hydrocortisone의 사용량을 줄일 수 있는 효과를 기대할 수 있겠으나, 이는 추후 실험 약제와 hydrocortisone의 병용 실험을 통해 확인해야 할 것이다.

또한 본 실험이 정상인의 림프구와 정상인의 메산지움 세포를 사용하여 시행된 실험으로서 본실험의 결과를 실제 질환군에 적용시켜 메산지움 세포증식 억제와 메산지움 기질축적 억제효과 및

면역억제효과가 있다고 판정하기에는 부족한 점이 있으므로, 향후 질환군을 대상으로 하는 대조실험과 실제 환자를 대상으로 한 in vivo 상태에서의 임상실험이 필요하리라 사료된다.

V. 結 論

六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲이 메산지움 세포증식, Fibronectin 합성 및 MHC-class II 발현에 미치는 영향을 규명하기 위해 시행한 실험실 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 메산지움 세포증식 억제효과를 관찰한 실험에서 25% 상청액으로 자극한 실험에서 實脾飲群에서 대조군에 비해 유의한 증식억제효과가 나타났으며 hydrocortisone투여군에 비해서는 모든 약제실험군에서 유의한 증식 억제효과가 나타났다.

2. Fibronectin 합성 억제효과를 'without fetal bovine serum'로 관찰한 실험에서 六味地黃湯群에서 대조군에 비해 유의한 증식억제 효과가 있었으며, hydrocortisone보다도 유의한 억제효과가 관찰되었다. 'with fetal bovine serum'으로 관찰한 실험에서는 실험군 모두에서 억제 경향성을 관찰할 수 있었다.

3. MHC-class II expression의 발현 억제효과를 관찰한 실험에서 六味地黃湯, 澤瀉湯, 實脾飲에서 대조군에 비해 유의한 억제효과를 나타내었으나, hydrocortisone에는 미치지 못하였다.

이상의 실험을 통해 六味地黃湯群은 fibronectin 합성 억제효과와 MHC-class II 발현억제, 澤瀉湯群은 MHC-class II 발현억제에, 實脾飲群은 메산지움세포 증식억제와 MHC-class II 발현 억제에 유의한 효과가 있다는 것을 알

게되었다. 또 hydrocortisone群과의 비교에서는 메산지움 세포증식 억제실험과 fibronectin 합성억제실험에서 六味地黃湯은 상대적으로 좋은 억제효과를 나타내었다.

VI. 參考文獻

- Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988; 318(25): 1657-66.
- 서울대학교 의과대학. 신장학. 서울: 서울대학교출판부; 1991, pp.77-106.
- 진동규. 배양된 인형 Mesangial 세포에서 배양액차이에 따른 Interleuin-6의 변화. *대한신장학회지* 1996; 15(1): 1-7.
- 연세대학교 신장질환연구소. 신장학. 서울: 의학문화사; 1999, pp 1-8, 13-6, 405-8, 427-440, 781-791.
- 錢乙. 小兒藥證直訣(下). 서울: 쑤친문화社; 1973, p.1.
- 李克光. 金匱要略. 서울: 아올로스出版社; 1994, pp.342-3.
- 龔廷賢. 萬病回春. 北京: 人民衛生出版社; 1987, p.170-1.
- Couchman JR, Beavan LA, McCarthy KJ. Glomerular matrix: synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney Int* 1994; 45(2): 328-35.
- 김현철, 박성배. 임상 신장학. 대구: 계명대학교출판부; 1997, pp.29-31.
- Ignotz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261(9):4337-45.
- Goyal M, Wiggins R. Fibronectin mRNA and protein accumulation, distribution, and breakdown in rabbit anti-glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol* 1991;1(12):1334-42.
- Dinarelo CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J* 1988;2:108-115.
- Lovett DH, Martin M, Bursten S, Szamel M, Gems D, Resch K. Interleukin I and glomerular mesangium IL-1 dependent stimulation of mesangial cell protein kinase activity. *Kidney Int* 1988; 34:26-35.
- Ruef C, Budde K, Lacy J, Northemann W, Bauman M, Sterzel RB, et al. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int* 1990; 38:249-251.
- Coleman DL, Ruef C. Interleukin-6 : An autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int* 1992; 41: 604-6.
- Shultz PJ, Dicorleto PE, Silver BJ, Abboud HE : Mesangial cell express PDGF mRNAs and proliferative in response to PDGF. *Am J Physiol* 1988;255: F674-F686.
- 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(3): 1056-60.
- Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 1990; 86(2): 453-62.
- 김세종. 면역학. 서울: 고려의학; 1994, pp.1-13, 16-21, 83-98, 134-145, 147-160.
- 김명재, 홍성표, 박재경, 이태원, 임천규. 신이식 전후에 말초 혈액 단핵구의 cytokine 생산과 ICAM-1 및 제 2형 주조직적합항원 발현에 대한 연구. *대한내과학회* 1998; 55(6): 1070-7.
- Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Effects of methylprednisolone on glomerular and medullary mRNA levels for extracellular matrices in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1991; 40(5): 874-81.
- Rodriguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, Lopez-Farre A, Ortega G, Hernandez L, et al. Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1989; 35(2): 632-7.
- Border WA. Distinguishing minimal-change disease from mesangial disorders. *Kidney Int* 1988; 34(3): 419-34.
- Camussi G, Turello E, Tetta C, Bussolino F, Baglioni C. Tumor necrosis factor induces contraction of mesangial cells and alter their cytoskeletons. *Kidney Int* 1990; 38: 795-802.
- 杜鎬京. 東醫腎系內科學. 서울: 東洋醫學研究院; 1989, pp. 391-404.
- 安世永 譯. 東醫臨床內科學. 서울: 法人文化社; 1999, pp. 414-39.
- 陳貴廷, 楊思樹. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1992, pp.489-493.
- 黃文東. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社; 1986, pp.285-300.
- 李鳳敦. 症狀鑑別治療. 서울: 成輔社; 1992, pp.467-8.
- 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울: 明寶出版社; 1994, pp.319-21.
- 柳志允. 六味地黃湯 및 八味地黃湯 投與가 抗改良型 馬杉腎炎에 미치는 影響. *圓光韓醫大論文集* 1983; 3: 541-64.
- 李彥珍. 六味地黃湯 煎湯液이 腎性高血壓 白鼠의 血壓 및 血漿 renin 活性度에 미치는 影響. *圓光大學校 大學院* 1985; 209-29.
- 杜鎬京, 曹東鉉, 孫淑英, 金仁仙, 韓陽熙, 安世永 등. 加味五 散 加味六味地黃湯 및 食醋가 Gebtamicin sulfate로 유발된 白鼠 急性腎不全에 미치는 影響. *경희의학* 1991; 7(3): 287-311.
- 李挺. 編註醫學入門(外集卷一). 서울: 大星文化社; 1990, pp.103-9.
- 南相璟. 澤瀉湯의 效能에 關한 實驗的研究. *慶熙大學校 大學院* 1985; 1-21.
- 楊思樹, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大全. 北京: 北京科學技術出版社; 1993, pp.537-47.
- 劉東昊. 實脾飲 및 理陰煎이 Genta-micin sulfate로 誘發된 白鼠의 腎損傷에 미치는 影響. *慶熙大學校 大學院* 1993;1-54.