

원 저

## 當歸芍藥散, 越婢加朮湯이 Mesangial Cell 증식과 ICAM-1 및 $\beta 1$ -integrin 발현에 미치는 영향

장원만, 안세영, 두호경  
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

### The Effects of *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* on Mesangial Cell Proliferation and on ICAM-1 and $\beta 1$ -integrin Expression

Won-Man Jang, Se-Young Ahn, Ho-Kyung Doo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objectives :** This experiment was conducted to investigate the suppressive effects of *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* on the expression of ICAM-1 and  $\beta 1$ -integrin, which mediate cell-cell or cell-matrix interaction, and on the proliferation of mesangial cells.

**Methods :** After in vitro culturing of human mesangial cells with the supernatant which was obtained from the monocytes separated from human blood with Con-A, hydrocortisone, *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* respectively, we evaluated suppressive effects by measuring the mesangial cell surface enzyme immunoassay or flow cytometry.

**Results :** The results are summarized as follows :

1. *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* induced marked suppressive effects on the mesangial cell proliferation in the 50% and 25% supernatant concentration stimulating experiments, but hydrocortisone had little effect in these experiments.
2. *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* induced marked suppressive effects on ICAM-1 and  $\beta 1$ -integrin expression, but were less effective than hydrocortisone was.

**Conclusions :** Based on these results, *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* were found to be effective in the suppression of mesangial cell proliferation and in ICAM-1 and  $\beta 1$ -integrin expression. Further in vitro investigations as conducted above, with the in vivo experiments reflected, may prove that *Dangguijakyak-san* and *Wuelbigachul-tang* contribute to the prevention of the glomerular disease. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(3):140-148)

**Key Words:** Mesangial Cell, ICAM-1,  $\beta 1$ -integrin, *Dangguijakyak-san*, *Wuelbigachul-tang*

## 서 론

원발성 사구체 신염의 대부분과 많은 경우의 이차

적 사구체 신염은 면역학적 기전이 중요한 역할을 하며<sup>1,2)</sup>, 그 조직학적 특징은 사구체내 세포의 증식과 세포외기질(extra-cellular matrix; ECM)의 증가이다<sup>3)</sup>.

이러한 면역학적 손상은 cytokine들에 매개되어 메산지움 세포에서 ICAM-1 발현이 증가되어 림프구들과 부착을 견고히 하거나<sup>4,5)</sup>,  $\beta 1$ -integrin 발현이 증가

· 접수 : 2000년 9월 16일 · 수정 : 10월 24일 · 채택 : 10월 25일  
· 교신저자 : 장원만, 서울시 동대문구 회기동1 경희의료원 한방병원 한방6내과의사실  
(Tel. 02-958-9155,6, E-mail : page94@netsgo.com)

되어 collagen, fibronectin과 결합하면 메산지움 세포의 증식과 세포외기질 생산이 증가하여 진행성 사구체 경화증이 발생하게 된다<sup>4-9)</sup>.

東洋醫學에 있어서 사구체질환은 風水, 浮腫, 尿濁, 虛勞 등의 범주에 속하는 것으로 현대 臨床에서는 活血化癥, 宣肺利水, 清熱利水, 利水消腫, 溫陽補腎, 益氣養陰 등의 다양한 치법이 응용되고 있다<sup>1)</sup>.

본 저자들은 현재 사구체질환에 사용되는 서양의학적 약물들의 부작용<sup>2,4,5,7,8,10)</sup>을 감소시킬 수 있는 방법에 있어서 이들 약제들과 병용투여 혹은 대체할 수 있는 東醫學的 方劑의 연구를 목적으로, 浮腫에 사용되는 當歸芍藥散<sup>11)</sup>과 越婢加朮湯<sup>11)</sup>의 만성 진행성 사구체 질환의 면역억제 효능으로 메산지움 세포 증식억제, ICAM-1 및  $\beta$ 1-integrin 발현억제를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험약제

#### 1) 약제의 종류

본 실험에 사용된 약제는 當歸芍藥散과 越婢加朮

湯으로 모두 경희의료원 한방병원 약제부에서 구입하여 정선하여 사용하였으며, 각 處方의 內容과 分量은 Table 1, 2와 같다.

#### 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 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상청액을 수거하였다. 이 상청액을 직경 0.2 $\mu$ m의 여과지를 통과시켜 여과 멸균하였으며, 사용할 때까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

일차 추출된 각 약제 동결건조 분말을 1g 씩 취한 후 증류수를 10ml 씩 가하여 95℃ 수조에서 3시간 동안 2차 가열 추출하였다. 3시간 후 가열 추출된 각 약제를 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 불용성 물질을 침전시키고 상청액을 수거하여 0.2 $\mu$ m의 여과

Table 1. The Composition of Dangguijakyak-san

藥物名	生藥名	學名	重量
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	8
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	8
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	<i>Poria cocos</i> (SCHW) WOLF	4
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	<i>Atractyodes macrocephala</i> KOIDZ	4
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	<i>Alisma plantago-aquatica var. orientale</i> SAMUELS	6
赤芍藥	<i>Paeonia Radix Rubra</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	12
總量			42g

Table 2. The Composition of Wuelbigachul-tang

藥物名	生藥名	學名	重量
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	<i>Ephedra sinica</i> STAPP	18
石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	Gypsum	28
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	<i>Zingiber officinale</i> ROSC	11
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH	7.5
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	<i>Zizyphus jujuba</i> MILL.	9.5
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	<i>Atractyodes macrocephala</i> KOIDZ.	15
總量			89g

지를 통과시켜 여과 멸균한 다음 사용 시까지  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

### 3) 시험관내 약제농도의 결정

#### (1) 말초혈액 단핵세포의 분리 및 배양

건강한 정상인으로부터 정맥혈 400ml를 채혈한 다음 1,500 rpm에서 15분간 원심 침전시켰다. 이를 plasma extractor로 옮겨 혈장을 분리한 후 단핵구를 포함하는 buffy-coat 층 70ml를 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. Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) 위에 중첩시킨 다음 1,500 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 Ficoll-Hypaque 층과 plasma 층 사이에 형성된 단핵세포층을 수거하여 PBS 용액으로 2회 세척하고 우태아 혈청이 10%되게 첨가된 Rosewell Pare Memorial Institute(RPMI) 1640 배양액에 세포농도가  $2 \times 10^6/ml$ 로 되도록 하였다. 여기에 Concanavalin-A(Con A)가  $20\mu g/ml$ 의 농도가 되도록 추가한 다음 96well flat-bottomed microplate의 well 당  $100\mu l$  씩 분주하였다. 림프구가 분주된 각 well에 2배수로 계단희석된 각 약제를  $100\mu l$ 씩 가하여 최종 농도가  $15.6\mu g/ml \sim 2,000\mu g/ml$ 이 되도록 한 다음  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 4시간 추가 배양한 후, spectrophotometer 파장 492 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

시험관내에 사용할 약제의 농도는 대조군에 비하여 흡광도 값이 현저하게 낮아지기 직전의 농도로 하였는데, 當歸芍藥散 · 越婢加朮湯의 약물농도는 각각  $100\mu g/ml$ 였다.

### 2. 메산지움세포의 배양

신 절제술로 얻어진 정상인의 신장으로부터 신피질을 박리하여  $3 \times 3$  mm정도의 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  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간, 그리고 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액으로 5분간 처리하였다. 그후  $75\text{cm}^2$  조직배양 플라스크(Costar, MA, USA)에 사구체를 넣고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEZ, Gibco)에 20% 우태아 혈청과  $100\text{unit}/ml$ 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 EDTA용액을 처리하여 날개의 세포로 유리시켜 2차, 3차 계대배양 하였다. 본 연구에서는 4대째 계대배양 중인 메산지움 세포를 이용하였는데, myosin 섬유 양성반응과 공통백혈구 항원 및 factor VIII 음성, 그리고 D-Valine 대체배지에서 성장, puromycin 저항성 등의 특성을 나타내어 메산지움 세포임을 재차 확인 하였다.

### 3. 단핵세포 배양상청액의 제조

Ficoll-Hypaque 밀도구배방법에 의해 수확된 단핵 세포를 우태아혈청이 10%되게 첨가된 RPMI 1640 배양액에 세포농도가  $2 \times 10^6/ml$ 의 농도로 부유시킨 다음 여기에 phytohemagglutinin-P(PHA-P) 및 Con-A를 각각  $10\mu g/ml$ 이 되도록 첨가하였다. 이들 세포를 96well plate의 well당 5ml 씩 분주하여 여기에 drug cytotoxicity 시험에서 결정된 약제농도( $100\mu g/ml$ )만큼 각각의 약제를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간 후 각 well로부터 배양상청액을 수거하여 사용시 까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 냉동고에 보관하였다.

#### 4. 메산지움 세포의 분열능 시험

4대째 계대배양 중인 메산지움 세포를 낱개의 세포로 수거하여 우태아 혈청이 10%, insulin이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가된 DMEM 배양액에 2 $\times 10^4/\text{ml}$ 의 농도로 부유시킨 다음 96well flat-bottomed microplate의 각 well당 100 $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 여기에 각각의 약제가 처리된 단핵세포 배양 상청액을 25% 및 50% 되게 첨가한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양하였다. 72시간 후 각 well에 MTS-PMS 용액을 20 $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4시간 후 추가 배양한 다음 spectrophotometer 파장 492nm에서 흡광도를 측정하였으며 실험은 삼중반복으로 하였다.

#### 5. ICAM-1 및 $\beta 1$ -integrin 발현도의 측정

4대째 계대배양 중인 메산지움 세포를 수거하여 10% 우태아 혈청, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin이 첨가된 DMEM 배양액에 5 $\times 10^4/\text{ml}$ 의 농도로 조정된 다음 96well plate의 well당 4 $\text{ml}$ 씩 분주한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 각 약제를 처리된 단핵세포 상청액이 25%가 되게 첨가된 DMEM 배양액으로 교체한 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액을 처리하여 낱개의 세포로 수확한 다음 우태아 혈청이 5%되게 첨가된 PBS 용액으로 2회 세척하였다. 이들 세포에 anti- $\beta 1$  monoclonal Ab(phaminogen, USA) 및 anti-ICAM-1 monoclonal antibody(Becton Dickinson, USA)를 각각 처리하여 4 $^{\circ}\text{C}$  ice water에서 1시간 동안 반응시켰다. 음성대조군은 isotype이 같은 mouse IgG를 처리하였다. 1시간 후 bovine serum albumin이 0.5%가 되게 첨가된 cold PBS 용액으로 2회 세척한 후, FITC가 부착된 goat anti-mouse antibody 시약을 각각의 세포에 처리하여 4 $^{\circ}\text{C}$  ice water에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 재차 2회 세척한 후, 0.4 ml의 1% paraformaldehyde용액에 부유시킨 다음, flow cytometer에서 그 형광광도를 측정하여 각 molecule의 발현정도를 측정하였다.

#### 6. 각 군에 대한 구분

단핵세포 배양상청액을 제조할 때, Con-A를 포함하여 어떠한 약제도 첨가하지 않은 군을 media군으로 하였고, Con-A만 첨가한 군을 대조군, Con-A와 함께 hydrocortisone과 當歸芍藥散 및 越婢加朮湯을 각각 첨가배양한 군을 hydrocortisone군 및 當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군으로 하여 실험을 실행하였다.

#### 7. 통계처리

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

### 성 적

#### 1. 메산지움 세포증식에 대한 각 군의 영향

메산지움 세포증식에 대한 실험에서는 50% 및 25% 배양상청액 농도로 자극한 실험 모두에서 media군이 1.124 $\pm$ 0.022 및 1.030 $\pm$ 0.055로 대조군의 1.016 $\pm$ 0.050 및 1.004 $\pm$ 0.018에 비해 오히려 높아 Con-A에 의한 메산지움 세포증식 유도가 충분히 이루어지지 않았다.

50% 배양상청액 농도자극 실험에서 當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군은 각각 0.926 $\pm$ 0.020(P<0.05) 및 0.966 $\pm$ 0.023으로 대조군(1.016 $\pm$ 0.050)에 비하여 메산지움 세포증식을 더욱 억제하였다.

25% 배양상청액 농도자극 실험에서 當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군은 각각 0.816 $\pm$ 0.045(P<0.05) 및 0.978 $\pm$ 0.018(P<0.05)로 대조군(1.004 $\pm$ 0.018)에 비하여 메산지움 세포증식을 더욱 억제하였다(Table 3, Fig. 1).

#### 2. ICAM-1 발현에 대한 각 군의 영향

ICAM-1 발현에 대한 실험에서는 media군의 2.06에 비해 대조군이 17.69로 Con-A에 의한 ICAM-1의 발현유도가 충분히 이루어졌다.

當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군은 각각 8.90 및 9.77로 대조군(17.69)에 비하여 ICAM-1 발현을 더욱 억

**Table 3.** The Comparisons between Control and Experimental group in Mesangial Cell Proliferation Stimulated with 50%, 25% Supernatant Concentration

Group	OD(50%)	OD(25%)
Media	1.124±0.022	1.030±0.055
Control	1.016±0.050	1.004±0.018
Hydrocortisone	1.148±0.047	1.013±0.012
<i>Dangguijakyak-san</i>	0.926±0.020*	0.816±0.045*
<i>Wuelbigachul-tang</i>	0.966±0.023	0.978±0.018*

OD : Optical Density, mean±SD(standard deviation)  
\* P<0.05 VS. Control

**Table 4.** The Comparisons between Control and Experimental group in ICAM-1 Expression

Group	FI
Media	2.06
Control	17.69
Hydrocortisone	5.44
<i>Dangguijakyak-san</i>	8.90
<i>Wuelbigachul-tang</i>	9.77

FI : Fluorescence Intensity

**Table 5.** The Comparisons between Control and Experimental group in  $\beta$ 1-integrin Expression

Group	FI
Media	321.09
Control	465.00
Hydrocortisone	343.49
<i>Dangguijakyak-tang</i>	418.36
<i>Wuelbigachul-tang</i>	448.06

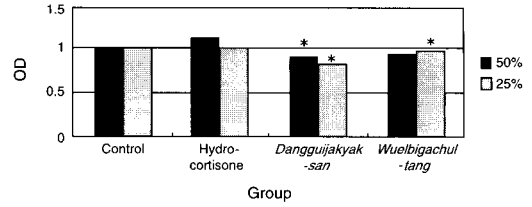
FI : Fluorescence Intensity

제하였으나, hydrocortisone군(5.44)에 비하여 발현억제 효과가 상대적으로 낮았다(Table 4, Fig. 2).

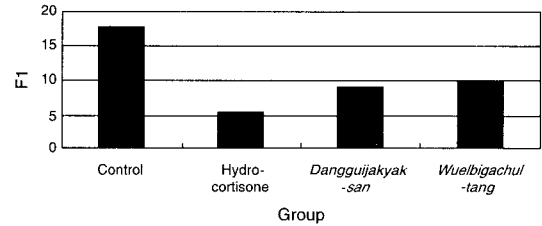
### 3. $\beta$ 1-Integrin 발현에 대한 각 군의 영향

$\beta$ 1-integrin 발현에 대한 실험에서는 media군의 321.09에 비해 대조군이 465.00로 Con-A에 의한  $\beta$ 1-integrin의 발현유도가 충분히 이루어졌다.

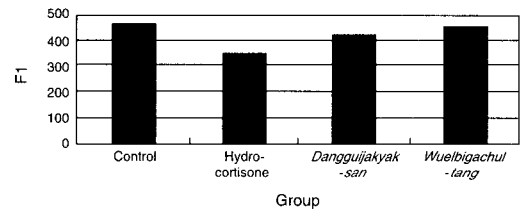
當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군은 각각 418.36 및 448.06으로 대조군(465.00)에 비하여  $\beta$ 1-integrin 발현을 더욱 억제하였으나, hydrocortisone군(343.49)에 비하여 발현억제 효과가 상대적으로 낮았다(Table 5, Fig. 3).



**Fig. 1.** The effects of *Dangguijakyak-san*, *Wuelbigachul-tang* on mesangial cell proliferation as optical density.



**Fig. 2.** The effects of *Dangguijakyak-san*, *Wuelbigachul-tang* on ICAM-1 expression as fluorescence intensity.



**Fig. 3.** The effects of *Dangguijakyak-san*, *Wuelbigachul-tang* on  $\beta$ 1-integrin expression as fluorescence intensity.

## 고 찰

신기능의 영구적, 비가역적인 손상을 특징으로 하는 만성신부전의 원인으로는 사구체 신염이 약 40% 정도로 가장 많이 보고되고 있고<sup>1,3)</sup>, 최근 면역학적인 기전이 원발성 사구체 신염의 대부분과 많은 경우의 이차적 사구체 신염에 있어 중요한 역할을 한다는 것이 알려지게 되었다<sup>1,3,10)</sup>. 이러한 사구체 신염의 중요한 조직학적 특징은 사구체경화증(glomerulosclerosis)으로 기본병변은 메산지움 세포의 증식과 세포외기질의 증가이다<sup>1)</sup>.

사구체간질(mesangium)은 사구체간질세포(mesangial cell)와 이를 둘러싸고 있는 세포외기질로 구성되는데, 그 역할은 죽세포와 더불어 모세혈관의 지주역

할을 할뿐만 아니라 면역복합체나 여러 거대분자의 포식작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>.

한편, 인체면역반응에 관여하는 면역세포로 림프계세포와 염증세포, 및 조혈계 세포들은 서로 다른 기능을 가진 세포들이 직접 접촉을 하거나 또는 이들 세포들이 분비하는 단백질에 의하여 자극을 전달하여 효율적인 기능을 가지게 되는데, 이들 세포들이 분비하는 분자량이 작은 단백을 cytokine이라 한다<sup>12)</sup>. 이러한 cytokine에는 IL-1(interleukin-1), IL-6(interleukin-6), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )와 PDGF(platelet derived growth factor), IFN- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ ) 외에 다양한 종류의 cytokine이 존재하여 서로간에 상승, 길항작용 등을 통해 면역반응을 매개한다

7,9,12-15)

사구체질환을 유발시키는 면역학적 손상은 사구체 내에 정상적으로 존재하는 세포뿐만 아니라 단구세포나 혈소판과 같은 침윤세포들로부터 cytokine이 분비되고, 분비된 cytokine은 서로간의 network를 이루거나 prostaglandin 등의 secondary messenger를 통해 매산지움 세포의 증식을 초래하는 것으로 보고되고 있다<sup>3,9,13-15)</sup>.

과거 염증반응에 대한 연구의 주 관심은 염증에 의한 매개물질이나 화학주행물질 및 cytokine 등의 역할에 관한 것들이었으나, 최근 보고에는 염증반응의 단계별로 세포간의 유착과 이를 조절할 것으로 사료되는 유착분자에 대한 관심이 증가하고 있다.

이중 백혈구 접착분자들인 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1 ; 세포간 유착분자)과 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1 ; 혈관세포유착분자)은 면역글로불린 superfamily의 일원으로 내피세포와 매산지움 세포에 기본적으로 또는 cytokine에 의해 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>5,7,8,16)</sup>.

특히 ICAM-1은 80-114 kD의 세포표면 당단백이며  $\beta 2$ -integrin에 속하는 중요한 세포유착분자인 LFA-1의 배위자(ligand)<sup>17)</sup>로서 매산지움 세포를 비롯한 혈관내피세포, 탐식세포, B세포, T세포 등의 표면에 발현되는데, 이 ICAM-1이 발현되면 염증반응 초기에 백혈구와 내피세포의 유착은 물론 B 세포, T 세

포 및 NK 세포의 활성화나 염증세포의 이동과 동원 등에도 작용하여 단순히 유착이외의 세포 기능에도 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>12,13)</sup>.

그러므로 손상된 사구체에서 cytokine이 분비되면서 이에 자극된 림프구들이 사구체 내피세포로 이동하게 되고, 매산지움 세포에서는 ICAM-1의 발현이 증가되어, 사구체에 존재해 있거나 이동해온 림프구와의 부착을 견고히 함으로써 면역반응을 지속적으로 유지시켜주고 동시에 부착된 림프구에서는 또 다른 여러 가지 cytokine들이 분비되면서 사구체 손상을 촉진시키게 된다<sup>1,2,3)</sup>.

또한, 인테그린(integrin)은 세포부착을 매개하는 세포표면의 단백질수용체의 가족으로서 세포와 세포, 세포와 세포외기질의 결합을 매개하는 초기 매개역할을 한다<sup>6,9,14,16,18)</sup>. 이 중 기질 단백질수용체인  $\beta 1$ -integrin은 세포외기질에 대한 수용체로서, 세포유착분자 및 혈관세포유착분자와 함께 면역 또는 염증반응에서 일어나는 세포와 세포간 또는 세포와 기질간의 상호작용에 중요한 역할을 하며 이러한 작용은 cytokine들에 의해 조절된다고 한다<sup>5,7,8,13)</sup>.

매산지움 세포표면에는 이러한  $\beta 1$ -integrin을 가지고 있어서 염증상태의 면역반응이 촉진되어 cytokine이 분비되면, 매산지움 세포의  $\beta 1$ -integrin의 발현이 증가하고 여기에 collagen, fibronectin 등이 결합하면 매산지움 세포의 증식과 세포외기질의 생산이 증가하여 진행성 사구체 경화증이 발생하게 된다<sup>5,9)</sup>.

東洋醫學에서 사구체 질환은 風水, 浮腫, 尿濁, 虛勞 등의 범주에 속하는 것으로 대개 風·寒·濕의 外邪侵襲 후에 續發하는 病證으로 風熱, 風寒, 寒濕 등이 야기하는 毒氣에 腎臟이 受傷되거나, 邪氣가 內結하여 濕熱이 내증하여 氣血이 凝滯되고 氣機가 失常되어 손상된 所致이다<sup>1)</sup>.

본 논문에서는 임상적에서 浮腫治療에 사용되고 있는 東醫方劑 중에서 當歸芍藥散과 越婢加朮湯의 사구체 질환에 대한 효능에 관하여 연구를 실시하였다.

東洋醫學에서 浮腫을 巢<sup>19)</sup>는 “水病者 由脾腎虛故也 腎虛不能宣通水氣 脾虛又不能制水 故水氣盈溢 滲入皮膚 流遍四肢 所以通身腫也”라 하였고, 素問·水

熱穴論<sup>20)</sup>에서는 “腎者 胃之關也 關門不利 故聚水而從其類也 上下溢於皮膚 故爲跗腫…勇而勞甚 則腎汗出, 腎汗出逢於風 內不得入於臟腑 外不得越於皮膚 客於玄府 行於皮裏 傳爲跗腫”이라 했으며, 素問·陰陽別論<sup>21)</sup>에서는 “三陰結謂之水”, 張<sup>21)</sup>은 “凡水腫等證 乃肺脾腎三臟相干之病 蓋水爲至陰 故其本在腎 水化於氣 故其標在肺 水惟畏土 故其制在脾”라 하여 風·寒·濕의 邪氣가 人體에 侵入하거나, 飲食起居失常하거나, 勞倦內傷 등으로 인하여, 人體의 津液代謝를 담당하는 脾氣의 運行輸布, 肺氣의 通調水道, 腎氣의 開闔調節, 三焦의 氣化作用이 失調되어 水液이 停滯되어 肌膚에 泛溢하여 發生하는 것으로 파악하고 있다<sup>1)</sup>.

한편, 靈樞·癰疽篇<sup>22)</sup>에서는 “中焦出氣如露 上注溪谷而滲孫脈 津液和調 變化而赤爲血”이라고 하여 津液과 血은 相互轉化하여 滋潤과 營養作用을 하게 된다. 金匱要略<sup>1)</sup>에서는 “少陽脈卑 少陰脈細 男子則小便不利 婦人則經水不通 經爲血 血不利則爲水 名曰血分”이라고 하였으며, 東醫寶鑑<sup>23)</sup>에서는 “經脈不行 血化爲水 四肢紅腫則曰血分皆水氣之所由作也”라고 하여 여성에 있어서 經脈이 循行되지 않으므로, 血이 水로 變化해서 水腫이 發生한다고 하였다. 瘀血은 血液이 體內에 瘀滯된 것으로서 經脈 外에 넘쳐 皮下 組織사이에 쌓여 있는 것도 있고, 또는 血液運行的 阻害로 經脈 內에 滯留되거나 器管 內에 瘀積된 것도 있는데, 李<sup>24)</sup>는 “水腫經前血腫後…經水斷而後腫 名曰血分 乃瘀血化水 閉塞胞門…先浮腫而後經水不通 名曰水分”라고 하여 水腫이 瘀血에 기인한다고 했다. 요약하면 水腫이 津液代謝의 障礙로 水液이 停蓄되어 發生하는 病變이고 瘀血은 血의 病變이며, 津液과 血은 同源으로 相互轉化하므로<sup>25)</sup> 瘀血로 因하여 津液代謝의 障礙가 招來되면 水腫이 發生할 수 있고, 水濕의 停滯가 氣血의 瘀滯를 造成하여 水腫을 더욱 加重시킬 수 있다<sup>25)</sup>.

이러한 理論에 기초하여 浮腫은 臨床에서 瘀水交阻型, 風熱犯肺型, 濕熱壅滯型, 氣滯水停型, 腎陽虛衰型, 氣陰兩虛型 등으로 辨證類型을 분류하여, 그에 따른 治法으로 活血化瘀, 宣肺利水, 清熱利水, 利水消腫, 溫陽補腎, 益氣養陰 등을 사용한다<sup>1)</sup>.

본 논문에 사용된 方劑를 살펴보면, 當歸芍藥散은 張仲景의 金匱要略<sup>1)</sup>에 수록된 處方으로, 그 效能에 대하여 “婦人懷妊腹中疝痛當歸芍藥散主之”라 하였다. 浮腫과 관련하여 陰水證 瘀血水腫에 活血化瘀의 目的으로 사용되고<sup>26)</sup>, 腎臟疾患 治療와 관련되어서는 瘀血이 主가 되고 血虛와 水滯를 동반한 裏寒證 病態의 慢性 腎炎이나<sup>27)</sup>, 陰證 虛證 경향이 있는 絲球體 腎炎이나 腎症候群에 사용된다<sup>28,29)</sup>.

越婢加朮湯은 張仲景의 金匱要略<sup>1)</sup>에서 “風水 惡風 一身悉腫 脈浮不渴 續無汗出 無大熱 越婢湯主之”라고 越婢湯에 대해서 최초로 언급하였는데, 여기에 白朮을 가하여 外感風寒으로 인한 風水泛溢에 疏風解表, 宣肺利水의 目的으로 사용되고<sup>26)</sup>, 腎臟疾患 治療와 관련되어서는 水滯型의 實證病態로 浮腫이 있으면서 땀이 나고, 小便不利가 있는 후<sup>27)</sup>, 陽證 實證 경향이 있는 腎炎 혹은 腎症候群에 사용된다<sup>28)</sup>.

현재 사구체질환의 치료에는 병발되는 혈압의 조절, 식이요법, 과로를 피하는 일반적인 치료가 신부전의 가속화를 막는데 중요하다<sup>1)</sup>. 약물치료에 있어서는 메산지움의 증식이 면역학적인 기전에 관여하므로 hydrocortisone, cyclophosphamide, Cyclosporine A(CsA) 등의 면역억제제가 사용되고 있다<sup>3)</sup>. Glucocorticoids는 활성화된 T 림프구에 의한 INF- $\gamma$ 나 IL-2 같은 cytokine들의 생산을 억제하며, CsA는 T 림프구의 활성화를 억제할 뿐만 아니라 IL-2의 생산도 억제하여 많은 종류의 세포에 이차적인 영향을 미친다<sup>5,7,8)</sup>.

그러나 이들 약제들은 부작용이 심각하게 나타나는데, 스테로이드의 부작용으로는 소아에서 성장장애가 가장 문제되고 있으며, 위장장애, 골다공증, 당뇨병, 백내장, 감염증 등이 보고<sup>10)</sup>되고 있고, 세포독성 약제인 cyclophosphamide는 백혈구 감소증, 탈모, 출혈성 방광염, 생식선 독성 및 드물게는 악성 종양을 유발하는 부작용이 있으며<sup>2)</sup> 면역억제제인 CsA는 고혈압, 고지혈증, 과모발증, 치은과다증식증, 고요산혈증 및 일시적인 급성신부전 등 사구체경화증이나 혈관병변과 같은 신독성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>2,5,8)</sup>.

따라서 이들 약물들의 부작용을 감소시킬 수 있는 방법들이 절실히 요구되는 실정에서, 최근 杜 등<sup>30)</sup>은

스테로이드 의존성 빈혈재발형 신증후군 환자에게 柴芩湯과 스테로이드를 병용 치료하여 재발율을 크게 감소시켰다는 임상보고를 하였고, 또한, 黃<sup>30)</sup>은 IgA 신증 환자의 말초혈액에서 분리한 림프구를 Con-A로 자극하여 柴芩湯 등 東醫方劑 및 스테로이드를 단독 또는 병용하여 실험실 연구를 통한 세포 분열 억제력을 관찰하기도 하였으나, 아직까지 東醫方劑를 이용하여 메산지움 세포증식억제, 세포유착분자인 ICAM-1 및 세포부착을 매개하는  $\beta 1$ -integrin의 발현억제를 통한 면역학적 효과를 관찰한 연구는 없는 실정이다.

이에 저자들은 서양의학의 스테로이드나 CsA와 같은 면역억제제의 부작용을 감소시키거나 대체할 수 있는 방법으로 유사한 효능을 지니면서 인체에 유해한 독성을 미치지 않는 약제의 개발을 생각하여, 본 연구에서는 臨床的으로 浮腫에 사용되는 東醫方劑의 만성 진행성 사구체 질환의 면역억제 효능을 검토하기 위하여 當歸芍藥散과 越婢加朮湯을 선정하고 실험실 연구를 통하여 메산지움 세포증식억제, ICAM-1 및  $\beta 1$ -integrin 발현억제를 관찰하였다.

실험의 결과를 요약하면, 메산지움 세포증식에 대한 50% 및 25% 배양상청액 농도 자극 실험에서는 Con-A 자극으로 인한 메산지움 세포증식 유도가 충분히 이루어지지 않았으나, 當歸芍藥散과 越婢加朮湯군은 대조군에 비하여 메산지움 세포증식을 더욱 억제하였다.

ICAM-1과  $\beta 1$ -integrin 발현에 대한 실험에서는 Con-A 자극으로 인하여 발현유도가 충분히 이루어졌다. 當歸芍藥散과 越婢加朮湯군은 대조군에 비해서 모두 ICAM-1과  $\beta 1$ -integrin의 발현을 더욱 억제하였으나, hydrocortisone군 보다는 상대적으로 발현억제 효과가 없었다.

이상의 결과로 볼 때, 본 실험은 정상인의 단핵세포와 메산지움 세포를 사용하여 in vitro 상태에서 시행한 실험으로서 실제 질환군에서의 면역억제 효과를 판정하기에는 부족한 점이 있다. 그러나 當歸芍藥散과 越婢加朮湯은 메산지움 세포증식억제와 ICAM-1 및  $\beta 1$ -integrin 발현억제에 유의한 효과가 관

찰이 되어, 향후 실제 질환군을 대상으로 in vivo 상태를 반영할 수 있는 추가 임상실험을 통하여, hydrocortisone 등의 부작용을 감소시키기 위한 병용 투여 혹은 이들 약물들을 대체함으로써 면역기전에 의한 사구체 질환의 치료에 기여할 수 있으리라 사료된다.

## 결론

當歸芍藥散, 越婢加朮湯의 사구체 질환에 대한 면역억제효과를 알아보기 위하여, 정상인의 말초혈액에서 분리한 단핵세포에 Con-A와 상기 東醫方劑 및 hydrocortisone을 투여하여 얻은 배양상청액을 수거한 후 정상인에서 신절제술로 얻어진 메산지움 세포에 첨가 배양하여, 메산지움 세포 수의 증가정도와 ICAM-1 및  $\beta 1$ -integrin 발현정도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 50% 배양상청액 자극실험에서 當歸芍藥散군은 대조군에 비하여 메산지움 세포증식을 유의하게 억제하였고( $P<0.05$ ), 越婢加朮湯군도 대조군에 비하여 메산지움 세포증식을 더욱 억제하였으나 통계학적인 유의성은 없었다.
2. 25% 배양상청액 자극실험에서 當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군은 대조군에 비하여 메산지움 세포증식을 유의하게 억제하였다( $P<0.05$ ).
3. 當歸芍藥散군과 越婢加朮湯군은 대조군에 비하여 ICAM-1 및  $\beta 1$ -integrin 발현을 더욱 억제하였으나, hydrocortisone군에 비해서는 상대적으로 발현억제 효과가 낮았다.

이상의 결과들로 미루어볼 때 當歸芍藥散과 越婢加朮湯은 모든 실험에서 유의한 효과를 관찰할 수 있었다. 그러므로 이들 東醫方劑들은 향후 실제 질환군을 대상으로 in vivo 상태를 반영할 수 있는 추가 임상실험을 통하여 면역기전에 의한 사구체 손상에 스테로이드와 병용투여 하거나 대신함으로써 이들 질환의 치료에 도움이 될 것으로 사료된다.



참고문헌

1. 杜鎬京. 東醫腎系學(上). 서울:東洋醫學研究院. 1991:8,225-242,310,320,347,359-360.
2. 연세대학교 신장질환연구소. 신장학. 서울:의학문화사. 1999:1-4,427,433-435,481-486, 782.
3. 김현철, 박성배. 임상 신장학. 제3판. 대구:계명대학교출판부. 1997:29-34,41,260,274. 393,439-454,527.
4. 박수길, 김순배, 박정식, 홍창기, 김미정, 이재담, 고창순. 저비중 지단백이 백서 메산지움 배양세포의 증식과 교원질 생성에 미치는 영향. 대한신장학회지. 1992;11(3): 214-220.
5. 임천규, 홍성표, 박재경, 안재형, 이태원, 조병수, 양문호, 김명재. 내피세포와 메산지움세포의 접착분자 발현에 대한 혼합 백혈구 반응과 Hydrocortisone 및 Cyclosporine의 영향. 대한내과학회지. 1997;52(2): 156-162.
6. 진동규. The Patterns of Integrin Subunit Distribution in Glomerular Diseases. 대한신장학회지. 1999;18(3): 380-388.
7. Coleman DL, Ruef C. Interleukin-6: An autocrine regulator of mesangial cell growth. Kidney Int. 1992;41:604-606.
8. 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.
9. Richard O. Hynes. Integrins : A Family of Cell Surface Receptor. Cell Press 1987; 48:549-554.
10. 임천규, 박재경, 안재형, 이태원, 김명재. Immune Complex-induced Increases in Collagen Production by Cultured Mesangial Cells Modulated by Dexamethasone and Heparin. 대한신장학회지. 1992;11(3): 207-211.
11. 張仲景. 仲景全書 傷寒論 金匱要略方論, 서울:大星文化社. 1984:199,387,403-404, 428.
12. 김세종. 면역학. 서울:고려의학. 1994:128, 144-145,148-150.
13. Brady HR. Leukocyte adhesion molecules. Kidney Int. 1994;45:1285-1300.
14. Cosio FG. Cell-matrix adhesion receptors : Relevance to glomerular pathology. Am J Kidney Dis. 1992; 20:294.
15. 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(5):8-14.
16. Wuthrich RP. Intercellular adhesion molecules and vascular cell adhesion molecule-1 and the kidney. J Am Soc Nephron 1992;3:1201.
17. Rothlein R, Wegner C. Role of intercellular adhesion molecule-1 in the inflammatory response, Kidney Int. 1992;41:617-619.
18. Fatima Jaffer, Cristian Saunders, Pamela Shultz. Regulation of Mesangial Cell Growth by Polypeptide Mitogen. Am J Path. 1989;135(2):261-269.
19. 巢元方. 諸病源候論. 台北:其宗印刷公司. 中華民國65年:216
20. 洪元植. 精校 黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1981:31,49,127.
21. 張介賓. 景岳全書(下卷). 서울:여강출판사. 1987: 467,469.
22. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院. 1985:298,345.
23. 許俊. 原本東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1994: 499
24. 李梴. 醫學入門. 서울:大星文化社. 1989: 409
25. 徐平. 實用中醫腎病學. 上海:上海中醫學院出版社. 1992:29,831-842.
26. 安世永. 東醫臨床內科學 II. 서울:法仁文化社. 1999:416,419,422,425,428,433.
27. 曹基湖, 辛吉祚. 서양의학자의 한방진료학. 서울:集文堂. 1998:304-305,337-338, 354.
28. 曹基湖. 한방처방의 동서의학적 해석방법론. 서울:高麗醫學. 1999:147-150,320-325, 388-390.
29. 菊谷 豊彦. 保險適用製劑による 腎炎ネフロゼの漢方治療. 現代東洋醫學. 1986;7(2): 43-45.
30. 杜鎬京, 趙秉洙. 스테로이드 의존型 頻回 再發型 腎症候群의 治療에 있어서 韓方製劑인 柴 湯과 洋方藥物인 스테로이드의 併用效果에 對한 研究. 경희의학. 1996;12(2):180-185.
31. 黃相皓. IgA腎症에서 柴苓湯, 柴朴湯, 清腸湯, 小蘗飲子가 免疫抑制에 미치는 影響. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 1992.