

桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯, 桃紅四物湯이 메산지움세포 증식과 Fibronectin 합성에 미치는 影響

권영구, 안영민, 안세영, 두호경

경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Experimental Studies Of The Kaejibokryungwhan, Sobokchugeotang And Dohongsamultang On The Mesangial Cell Proliferation And Fibronectin Synthesis

Kwon Young-Ku, Ahn Young-Min, Ahn Se-Young, Doo Ho-Kyung

Department of 6th Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

In order to investigate the effects of Kaejibokryungwhan, Sobokchugeotang and Dohongsamultang on mesangial cell proliferation and fibronectin synthesis, laboratory study was performed.

The results are summarized as follows;

1. Mesangial cell proliferation was significantly decreased in the Kaejibokryungwhan group and the Dohongsamultang group compared with the Control group.

In the Sobokchugeotang group, the mesangial cell proliferation activity was lesser than Control group, but it was statistically non-significant.

In Kaejibokryungwhan group, the Sobokchugeotang group and Dohongsamultang group, mesangial cell proliferation was significantly decreased compared with the Hydrocortisone group

2. In the group, which contained fetal bovine serum, fibronectin synthesis was decreased in the Kaejibokryungwhan group, the Sobokchugeotang group and Dohongsamultang group compared with Control group, but the difference was statistically non-significant.

In Kaejibokryungwhan group, Sobokchugeotang group and Dohongsamultang group, fibronectin was less decreased compared with that of Hydrocortisone group.

3. In the group, which contained fetal bovine serum, fibronectin synthesis was significantly decreased in Kaejibokryungwhan group and Sobokchugeotang group than those of Control group.

In Dohongsamultang group, the fibronectin synthesis was decreased than Control group, but the difference was statistically non-significant. In Sobokchugeotang group, the fibronectin synthesis was decreased than Hydrocortisone group, but it was statistically non-significant.

According to the above results, the mesangial cell proliferation and fibronectin synthesis could be reduced by Kaejibokryungwhan group significantly.

Key Words: 瘀血, Kaejibokryungwhan, Sobokchugeotang, Dohongsamultang, Mesangial cell proliferation, Fibronectin synthesis

· 접수 : 2002년 12월 28일 · 채택 : 2002년 2월 11일
· 교신저자 : 권영구, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원한방병원 신계내과
(Tel. 02-958-9155, E-mail : doctor09@orgio.net)
· 2000년 2월 경희대학교 한의과대학 신계내과학교실 석사학위수여 논문임.

I. 緒 論

진행성 신손상의 특징은 손상의 원인에 상관없이 사구체가 반응하는 유형이 비교적 한정되어 있다는 것이다¹. 즉 면역학적 손상, 고혈압, 대사장애 등에 의해서 발생하는 신질환을 일정기간이 경과한 후 조직검사하여 신조직의 변화를 관찰하면, 원인질환에 상관없이 사구체경화증이 특징적으로 관찰된다는 것이다.^{1,2}

사구체경화증이란 정상적인 사구체 조직이 손상에 의해 섬유아세포나 교원질섬유, 간엽기질에 의하여 경화증이 진행되는 것으로, 신조직검사상 모세혈관의 폐쇄, 메산지움 세포 또는 내피세포의 증식과 괴사, 메산지움 세포와 기질의 증가, 세뇨관의 위축, 간질의 섬유성 변화 등이 관찰된다. 이와 같은 사구체경화증의 기본 병변은 메산지움 세포의 증식과 세포의 기질의 증가이며 현재까지는 일차적인 신질환이나 신조직에 손상이 초래되면 메산지움 세포는 수축하여 사구체의 여과면적을 감소시키고, 이로 인하여 상승된 사구체내압은 메산지움 세포와 내피세포들의 지속적인 손상을 초래하여 사구체경화증을 진행시키는 주요 요인이 된다고 알려져 있다.³

그러나 이같은 질환에 대한 서양의학적 치료는 보조적이고 대증적⁴인 방법이 위주로서, hydrocortisone, cyclophosphamide 등이 쓰이고 있으나 뚜렷한 효과를 거두지 못하고 있으며 장기복용으로 인한 부작용으로 치료에 제한이 따르고 있다.

동양의학에 있어서의 瘀血은 서양의학에 있어서의 혈액순환장애, 혈액성분의 변화 및 결제조직의 증식변성으로 귀납되어진다⁵는 최근 임상 및 실험적 연구보고 등이 있다. 이를 토대로 만성적인 신손상에서

관찰되는 이같은 사구체경화증을 한의학적 관점에서 판단하면, '瘀血'의 개념과 매우 유사하다고 볼 수 있다.

이에 저자는 瘀血에 관한 數種의 처방이 사구체경화증에 미치는 임상적 효능을 검증하기 위해 활성화된 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells : PBMC)를 각 동의병제와 함께 배양한 상청액이, 약물첨가 없이 PBMC만을 배양한 경우나 hydrocortisone과 함께 배양한 경우에 비하여 인체 메산지움세포의 증식과 기질단백인 fibronectin 분비에 직접적으로 영향을 주어 단핵세포 침윤과 메산지움병변을 억제할 수 있는지를 조사한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 실험 약제

1) 약제의 종류

본 실험에 사용하는 약제는 경희의료원 한방병원 약제부에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

桂枝茯苓丸⁶, 少腹逐瘀湯⁷ 및 桃紅四物湯⁸의 구성 내용과 용량은 다음과 같다.

- (1) 桂枝茯苓丸
- (2) 少腹逐瘀湯
- (3) 桃紅四物湯

2) 약제의 추출

총량 200g으로 환산한 상기약제를 각각 1,500ml의 종류수에 넣어 4시간동안 가열추출하고 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,

(1) 桂枝茯苓丸

약물명	생약명	학명	중량(g)
桂枝	Cinnamomi Ramulus	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl.	6
牡丹皮	Moutan Cortex	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.	6
桃仁	Persicae Semen	<i>Prunus persica</i> L. Batsch.	6
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	6
赤茯苓	Poria	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf.	8
총 량			32

(2) 少腹逐瘀湯

약물명	생약명	학명	중량(g)
小茴香	Foeniculi Fructus	<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>	1
乾 薑	Zingiberis Rhizoma	<i>Zingiberis officinale Rosc.</i>	1
玄胡索	Corydalidis Tuber	<i>Corydalis turtschaninovii BESS.</i>	4
沒 藥	Myrrha	<i>Commiphora myrrha ENGEL.</i>	8
當 歸	Angelicae gigantis Radix	<i>Angelica gigas NAKAI</i>	12
川 芎	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale MAKINO</i>	8
桂 枝	Cinnamomi Ramulus	<i>Cinnamomum cassia PRESL</i>	4
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	<i>Paeonia lactiflora PALL.</i>	8
蒲 黃	Typhae Pollen	<i>Typha orientalis PRESL</i>	12
五靈脂	Trogopterorum Faeces	<i>Trogopterus xanthipes MILNE-EDWARDS</i>	8
총 량			64

(3) 桃紅四物湯

약물명	생약명	학명	중량(g)
當 歸	Angelicae gigantis Radix	<i>Angelica gigas NAKAI</i>	8
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	<i>Paeoniae lactiflora PALL.</i>	8
川 芎	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale Makino</i>	4
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	<i>Rehmannia glutinosa (GAERTNER) LIBOSCH.</i>	8
桃 仁	Persicae Semen	<i>Prunus persica(L.) BATSCH.</i>	4
紅 花	Carthami Flos	<i>Carthamus tinctorius L.</i>	4
총 량			36

東京理化學株式會社, Japan)로 전조시켰다.

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

1차 추출된 각 약제 동결건조 분말을 1g씩 취한 후 증류수를 10ml씩 가하여 위와 같은 방법으로 2차 가열추출, 원심분리후 여과멸균하여 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

3) 시험관내 약제농도의 결정

(1) 말초혈액 단핵세포의 분리 및 배양

건강한 성인으로부터 정맥혈 400ml를 채혈한 다음 채혈액을 1,500rpm에서 15분간 원심침전하였다. 혈액액을 Plasma extractor로 옮겨 혈장을 분리한 후 단핵구를 포함하는 Buffy-coat 70ml를 분리하였다. 분

리된 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. 원심분리후 Ficoll-Hypaque 층과 플라스마 층 사이에 형성된 단핵세포층을 수거하여, PBS 용액으로 2회 세척하고 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 10%되게 첨가된 Rosewell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배양액에 세포농도가 2×10⁴/ml의 농도가 되도록 하였다. 여기에 Concanavalin-A(Con A)가 20μg/ml의 농도가 되도록 추가한 다음 96well flat-bottomed microplate well 당 100μl 씩 분주하였다. 단핵세포가 분주된 각 well에 2배수로 계단 희석된 각 약제를 100μl씩 가하여 최종농도가 2,000μg/ml~15.6μg/ml이 되도록 한 다음 세포배양기에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 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 μ l씩 가한 다음 세포배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 4시간 추가배양한 후 Spectrophotometer 파장 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

시험관내에 사용할 약제의 농도는 대조군에 비하여 흡광도 값이 현저하게 낮아지기 적전의 농도로 하였는데, 본 실험에 사용한 각각의 실험약물 농도는桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯이 각 100 μ g/ml, 桃紅四物湯이 60 μ g/ml였다.

2. 메산지움 세포의 배양

신절제술로 얻어진 사람의 정상 신장으로부터 신피질을 박리하여 3×3mm정도의 크기로 분절한 후 직경 500 μ m, 250 μ m 및 100 μ m의 stainless steel mesh에 차례로 통과시켜 100 μ m mesh위에 모여진 사구체를 수거하였다. 수거된 사구체를 Hank's Balance Salt Solution(HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 1회 세척한 다음 2mg/ml의 collagenase로 37°C에서 15분간, 그리고 0.05% trypsin-0.53mM Ethylene-diamine-tetra acetic acid(EDTA) 용액으로 5분간 처리하였다. 그후 75cm² 조직배양 플라스크(Costar, MA, USA)에 사구체를 넣고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, GIBCO)에 20% 우태아 혈청과 100unit/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin, 10 μ g/ml의 insulin이 첨가된 배양액으로 배양하였다.

세포가 단층을 형성하면 0.05% Trypsin-0.53mM EDTA용액으로 처리하여 날개의 세포로 유리시켜 2차, 3차 계대배양하였다. 미오신 섬 유 양성반응과 공통백혈구 항원 및 factor VIII 음성, 그리고 D-Valine 대체배지에서의 성장, puromycin 저항성 등의 특성을 나타내어 메산지 움세포임을 재차 확인하였다. 본 연구에서는 4대째 계대배양중인 메산지움세포를 이용하였다.

3. 단핵세포 배양상청액의 제조

Ficoll-Hypaque 밀도구배방법으로 수확된 단핵세포를 우태아 혈청이 10%되게 첨가된 RPMI 1640 배양액에 2×10 6 /ml의 세포농도로 부유시킨 다음 여기에 phytohemagglutinin-P(PHA-P) 및 Con-A를 각각 10 μ g/ml이 되도록 첨가하였다. 이들 세포를 96well plate에 well당 5ml씩 분주하고 여기에桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯은 100 μ g/ml, 桃紅四物湯은 60 μ g/ml로 첨가하여 세포배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 72시간 배양하였다. 72시간 후 각 well로부터 배양상청액을 수거하여 사용시까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

정상군은 RPMI 1640 배양액만으로 배양하였고, 대조군으로는 RPMI 1640 배양액에 PHA-P와 Con-A를 첨가하되 아무 약제를 첨가하지 않은 대조군, RPMI 1640 배양액에 PHA-P와 Con-A를 첨가하고 hydrocortisone을 가한 hydrocortisone 투여군으로 하였다.

4. 메산지움세포의 증식 시험

4대째 계대배양 중인 메산지움세포를 날개의 세포로 수거하여 우태아 혈청이 10%, insulin이 10 μ g/ml로 첨가된 DMEM 배양액에 2×10 6 /ml의 농도로 부유시킨 다음 96well flat-bottomed microplate의 각 well당 100 μ l씩 분주하여 세포배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 여기에 각각의 약제가 처리된 단핵세포 배양 상청액을 25% 되게 첨가한 다음 세포배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 72시간 배양하였다. 72시간 후 각 well에 MTS-PMS 용액을 20 μ l씩 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, 10 μ g/ml의 insulin이 첨가된 DMEM 배양액에 1×10 6 /ml의 세포농도로 조정하였다. 이를 다시 24well plate well당 1ml씩 분주하고 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 각각

의 약제가 처리된 단핵세포 배양상청액이 25%되게 조정된 배양액을 well당 1ml씩 첨가하여 세포배양기에서 37°C, 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°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well로부터 배양액을 수거하여 fibronectin 분석시까지 -70°C에 보관하였다. 각 검체로부터의 fibronectin의 측정은 fibronectin enzyme immuno assay(EIA) kit(Cat# MK115, Takara)를 이용하여 측정하였다.

6. 통계처리

결과는 실험 검체를 측정하여 평균±표준편차로 표시하였다. 통계적 유의성 검정은 SPSS®(Statistical Package for Social Science)를 사용하여 Paired Sample Test법으로 검증하였으며, P value< 0.05를 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 成 積

1. 메산지움 세포증식에 미치는 영향

흡광도가 대조군은 1.004±0.018, 정상군은 1.030±0.055로 나타나 Mitogen에 의한 메산지움세포 증식자극이 충분히 이루어지지 않은 상태로 실험이 진행되었다.

약제실험에서는桂枝茯苓丸군이 0.863±0.043, 少腹逐瘀湯군이 0.953±0.070, 桃紅四物湯군이 0.989±0.020으로서, 대조군 1.004±0.018에 비해 높은 억제효과가 나타났으며, 이중桂枝茯苓丸군과桃紅四物湯군은 통계학적 유의성이 있었다(P< 0.05).

Hydrocortisone 투여군 1.013±0.012에 비해서도 모두 유의한 증식 억제효과가 있었다(P< 0.05).(Table 1)

2. Fibronectin 합성에 미치는 영향

대조군이 with fetal bovine serum과 without fetal bovine serum에서 각각 흡광도가 10645±417, 7412

±17로서, 정상군 7455±77, 5012±201보다 높게 나타나 fibronectin 합성자극이 충분히 이루어졌다고 볼 수 있다.

약제실험에서는 with fetal bovine serum에서는桂枝茯苓丸군, 少腹逐瘀湯군, 桃紅四物湯군이 각각 9130±141, 8917±109, 9885±148로 나타나 대조군 10645±417보다 높은 억제효과를 나타냈으나 유의성은 없었으며 hydrocortisone 투여군 8322±463보다는 억제효과가 낮았다.

without fetal bovine serum에서는桂枝茯苓丸군, 少腹逐瘀湯군, 桃紅四物湯군이 각각 6530±70, 5915±106, 6545±120으로 나타나 대조군 7412±17보다 높은 억제효과를 나타내었으며,桂枝茯苓丸군과少腹逐瘀湯군은 유의성이 있었다(P< 0.05). 少腹逐瘀湯군 5915±106은 hydrocortisone 투여군 6395±35에 비해 높은 억제효과가 나타났으나 유의성은 없었다.(Table 1)

IV. 考 察

메산지움은 메산지움 세포(mesangial cell)와 기질(mesangial matrix)로 구성되는데, 메산지움 세포는 세포체부터 사구체기저막까지 뻗어 있는 많은 세포질 돌기를 갖고 있는 매우 불규칙한 모양이며, 기질은 메산지움 세포들 사이사이의 공간이다. 최근 메산지움 세포의 실험실내 배양이 가능해진 이후 배양된 메산지움 세포에 여러 종류의 cytokine이나 대사과정

Table 1. The Comparisons Between Control And Experimental Group In Mesangial Cell Proliferation Stimulated With 25% Supernatant Concentration

Group	Optical density(OD)
Normal	1.030±0.055 ^a
Control	1.004±0.018
Hydrocortisone	1.013±0.012
Kaejibokryungwhan	0.863±0.043 ^{b,c}
Sobokchugeotang	0.953±0.070 ^c
Dohongsamultang	0.989±0.020 ^{b,c}

^a mean ± SD(standard deviation)

^b statistically significant value compared with Control(P< 0.05).

^c statistically significant value compared with Hydrocortisone(P< 0.05).

*Normal : no mitogen group

Control : mitogen group

Table 2. The Comparisons Between Control And Drugs In Fibronectin Synthesis

Group	With fetal bovine serum	Without fetal bovine serum
Normal	7455 ± 77 ^a	5012 ± 201
Control	10645 ± 417	7412 ± 17
Hydrocortisone	8322 ± 463	6395 ± 35
Kaejibokryungwhan	9130 ± 141	6530 ± 701
Sobokchugeotang	8917 ± 109	5915 ± 1061
Dohongsamultang	9885 ± 148	6545 ± 120

^a mean ± SD(standard deviation)^b statistically significant value compared with Control
(P< 0.05).*Normal : no mitogen group
Control : mitogen group

물질인 지질, 포도당 등을 반응시키고 이에 따라서 나타나는 변화들을 측정함으로써 메산지움 세포의 여러 중요한 기능이 알려지게 되었는데^{9,11}, 족세포와 더불어 사구체모세혈관 내강들의 사이사이에 존재하여 모세혈관의 지주역할과 면역복합체나 여러 거대 분자의 포식작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{4,12} 사구체의 세포외기질은 주로 mesangial matrix와 basement membrane으로 이루어져 있으며, 그 성분은 type IV collagen이 외에 glycoprotein의 일종인 fibronectin, laminin, thrombospondin 등으로 구성되어 있으며, 메산지움 세포가 이 기질들을 생성하는 기능을 가지고 있다.

Fibronectin은 메산지움을 구성하는 풍부한 기질 단백의 하나로서, 세포유착, 분화, 유주에 따른 배아 형성, 손상치유, 치혈 등에 있어 중요한 역할을 하는 일련의 고분자당단백질이며, 메산지움 세포에서 fibronectin이 다양으로 함유된 extracellular matrix가 합성된다.³

정상적인 신장에서 fibronectin은 사구체의 기저막과 메산지움을 따라 존재하고 있다가 사구체가 손상되는 동안 흔히 증가되는데, 대사성질환이나 염증상태에서의 macrophage, T-림프구, tubular epithelial cell, mesangial cell 등에서 생산되는 Interleukin(IL)-1, platelet derived growth factor(PDGF), transforming growth factor(TGF)- β , Interferon(IFN)- γ 등의 cytokine 들에 의해 mesangial cell이나 fibroblast에서의 합성이 촉진되며, 그 결과 extracellular matrix(ECM) 조직을

이 축적되어 메산지움 기질축적이 발생하게 된다.¹³

이같은 사구체내 세포증식과 세포외 기질증가는 여러 진행성 신손상의 중요한 특징¹이다. 즉 메산지움 세포증식과 기질축적이 의해 메산지움 확장이 발생하면 이는 사구체모세혈관의 내강(capillary lumen)을 압박하여 사구체의 여과면적이 감소하여 사구체 내압을 상승시키게 되므로, 메산지움 세포와 내피세포들이 지속적으로 손상되고 그 결과 사구체경화증이 유발되며 결국 만성신부전 같은 비가역적 신손상으로 진행하게 되는 것이다.

그 치료에 있어서는 메산지움 세포증식과 메산지움 기질축적에 면역학적기전이 중요한 역할을 한다고 밝혀진^{4,12} 이후 현재 이에 대한 치료로서 hydrocortisone, cyclophosphamide 등의 면역억제제가 치료법으로 사용되고 있다. 그러나 Minimal change nephrotic syndrome을 제외한 나머지 질환에서는 뚜렷한 효과를 입증할만한 근거가 없는 상황이며 이러한 약제의 장기복용으로 인한 부작용으로 그 치료의 대상환자도 제한되고 있다. 따라서 현재까지 만성 진행성 사구체질환에 대한 확실한 치료법은 없는 상태이며 면역억제제와 각각의 증상에 따른 대증요법만이 만성 사구체질환의 치료법으로 시행되고 있다.^{4,12}

이같은 서양의학적 치료의 제한으로 인해, 한약제를 이용한 치료가 임상에서 이루어지고 있지만 한약제가 메산지움세포의 증식억제와 기질의 축적억제에 미치는 영향이나 유효성에 대한 연구가 없는 상황이므로 이에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

이에 본인은 진행성 신손상의 특징인 사구체경화증을 한의학적 관점에서 판단하여 桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯, 桃紅四物湯을 선택한 후 이들 약물이 매산지움 세포증식의 억제와 매산지움 기질축적에 대한 억제효과가 있는지를 실험적 방법으로 규명하여 신손상에 대한 새로운 치료법을 모색하고자 다음과 같은 방법으로 본 연구를 시행하였다.

정상인의 정맥혈에서 분리배양한 단핵세포에 mitogen을 첨가하여 면역반응을 일으킨 후, 여기에 桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯, 桃紅四物湯의 실험약제를 가한 실험군과 배양액만으로 배양한 정상군, 배양액에 mitogen을 첨가하되 아무 억제를 첨가하지 않은 대조군, 배양액에 mitogen을 첨가하고 hydrocortisone을 가한 hydrocortisone 투여군을 설정하고, 실험약제가 매산지움 세포증식억제와 세포외 기질증가억제에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 매산지움 세포의 증식과 fibronectin의 합성을 관찰하였다.

본 연구에서는 매산지움세포의 증식과 세포외 기질의 증가를 일으키기 위해 인체 단핵세포의 배양액을 이용하였는데, 이는 사구체내에 단핵구의 침윤이 초기에 나타난 후 매산지움에 기질단백 축적이 일어나고 후에 경화증이 초래되는 현상이 동물 모델들에서 관찰되었으며¹⁴, 각종 사구체질환 환자들의 사구체에서도 단핵구, 림프구 등의 단핵세포들이 관찰되는 사실에 기인한 것이다^{15,16}. 이는 임 등¹⁷에 의한 논문에서, 활성화된 단핵세포는 매산지움세포의 백혈구 접착 분자들의 발현을 증가시켜 단핵세포 등의 백혈구들의 사구체내 침윤을 더욱 자극하고, 이 세포들에 의해 매산지움세포의 증식이 억제되며 fibronectin의 분비가 증가됨으로써 기질의 확장과 사구체경화증을 유도할 것으로 생각된다는 것과 일치한다.

대조군으로 hydrocortisone을 선택한 이유는 hydrocortisone은 거식세포와 단핵구내 IL-1, IL-6 mRNA의 전사를 차단함으로서 IL-1, IL-6 생성 및 분비를 억제하며, 단핵구의 IL-2, IL-4, IFN- γ , Tumor necrosis factor(TNF)- α 유전자 발현 및 mRNA 전사를 억제하며, 혈관내에 순환하고 있는 림프구를 림프조

직으로 돌려보냄으로써 백혈구 수는 증가하나 상대적인 림프구 결핍증을 유발하고, 염증부위로 단핵구가 이동하는 것을 차단하고, 화학주성물질, 혈관확장물질 및 혈관의 투과도를 증가시키는 물질들의 합성 분비 및 작용을 억제함으로써 광범위한 면역억제 및 항염증작용을 나타내어⁴, 매산지움 세포증식억제와 세포외기질 합성, intercellular adhesion molecule(ICAM)-1, β 1-integrin, major histocompatibility complex(MHC)-class II 밸현 등의 억제효과가 있는 것으로 보고^{4,12}되고 있어 본 실험의 대조군으로 채택하게 되었다.

한약제의 선정은 사구체경화증을 한의학적 관점에서 볼 때 瘀血의 개념과 매우 유사하다고 판단하였기 때문에, 한약 처방으로 瘀血치료에 많이 이용되는 桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯, 桃紅四物湯을 이용하였다.

瘀血은 한의학의 독특한 병리개념으로서 체내일정부위에 혈액이 停滯된 것을 의미하며¹⁸, 형성된 후에는 기혈운행에 영향을 미쳐 장부기능을 실조시킴으로서 다양한 질병을 야기하는 중요병인의 하나로 인식되고 있다¹⁹.

최근에는 혈액유동의 不暢, 장부 또는 국부조직의 혈액이 停滯된 것, 각종 원인에 의한 內出血·外出血, 혈액내의 汚穢하고 不潔한 대사산물의 貯留 및 炎症, 肌肉皮膚의 각종 조직의 증식과 변성 등이 瘀血의 형태와 일치한다고 보는 여러 의가들에 의해 瘀血로 유발되는 諸病證과 그 치료방법에 대한 연구가 활발하게 시도되어지고 있다^{5,17,20-22}.

본 연구에서 사용한 처방인 桂枝茯苓丸, 少腹逐瘀湯, 桃紅四物湯에 대해 살펴보면, 桂枝茯苓丸은 張機의 <仲景全書>에 수록된 처방으로 活血祛瘀, 理氣止痛, 痛經破血, 舒肝消積의 效果가 있어 婦人의 妊娠中에 瘀血積으로 인한 胎動, 下血不止 혹은 血瘀로 因한 經水不調 및 男女를 不問하고 瘀血로 인한 腹部拘攣上衝과 頭眩, 心下悸 등에 응용된다²³.

桂枝茯苓丸을 구성하는 각 약물의 性味와 功能을 살펴보면^{24,25}, 桂枝는 溫無毒辛甘하고 發汗解肌 溫經通脈 助陽化氣하며, 茯苓은 平無毒甘淡하고 利水瀉濕 健脾寧心하며, 牡丹皮는 微寒無毒苦辛하고 清熱

涼血 活血散瘀하며, 桃仁은 平無毒苦甘하고 活血祛瘀 潤腸通便하며, 茯苓은 微寒無毒苦酸하고 養血柔肝 緩中止痛 敗陰收汗한다.

少腹逐瘀湯은 王清任의 <醫林改錯>⁷에 수록된 처방으로 活血祛瘀, 溫經止痛의 效能으로, 少腹積塊疼痛, 或單有積塊而無疼痛, 或疼痛而無積塊, 或少腹脹滿, 或經期腰痠 少腹脹, 月經不調, 其色或紫或暗, 或有積塊, 或崩漏兼少腹疼痛 등에 사용한다²¹.

少腹逐瘀湯을 구성하는 각 약물의 性味와 效能을 살펴보면^{24,25}, 小茴香은 溫無毒辛하고 溫腎散寒 和胃理氣하며, 乾薑은 熱無毒辛하고 溫中逐寒 回陽通脈 하며, 玄胡索은 溫無毒辛苦하고 活血散瘀 理氣 止痛 하며, 没藥은 平無毒苦하고 散血祛瘀 消腫定痛하며, 當歸는 溫無毒甘辛하고 補血和血 調經止痛 潤燥滑腸 하며, 川芎은 溫無毒辛하고 活血行氣 祛風止痛하며, 桂枝는 溫無毒辛甘하고 發汗解肌 溫經通脈 助陽化氣 하며, 赤芍藥은 微寒無毒苦하고 清熱涼血 散瘀止痛 하며, 蒲黃은 平無毒甘하고 收澁止血 行血祛瘀하며, 五靈脂은 溫無毒苦甘하고 活血散瘀 止痛한다.

桃紅四物湯은 吳謙의 <醫宗金鑑>⁸에 수록된 처방으로, <太平惠民和劑局方>²⁶에 記載된 補血, 調血의 效能이 있는 四物湯에 活血化瘀하는 桃仁과 紅花를 加하여 活血祛瘀, 溫經止痛을 치료목적으로 많이 이용되고 있다²⁷.

桃紅四物湯을 구성하는 각 약물의 性味와 效能을 살펴보면^{24,25}, 熟地黃은 甘微溫無毒하고 滋陰補血 益精填髓하며, 白芍藥은 苦酸微寒無毒하고 養血柔肝 緩中止痛 敗陰收汗하며, 川芎은 辛溫無毒하고 活血行氣 祛風止痛하며, 當歸는 甘辛溫無毒하고 補血和血 調經止痛 潤燥滑腸하며, 桃仁은 苦甘平無毒하고 活血祛瘀 潤腸通便하며, 紅花는 辛溫無毒하고 活血痛經 散瘀止痛한다.

메산지움 세포증식억제에 미치는 영향에 관한 실험은 mitogen에 의한 메산지움세포 증식자극이 충분히 이루어지지 않은 상태에서 이루어졌으며, 모든 억제실험군에서 대조군에 비해 높은 증식억제효과를 나타냈고 桂枝茯苓丸군과 桃紅四物湯군은 통계학적인 유의성이 있었다. 또한 이 두 가지 억제실험군은

hydrocortisone 투여군에 비해서도 유의성있는 증식 억제효과를 나타내었다.

hydrocortisone 투여군의 경우 대조군에 비해 증식 억제효과가 나타나지 않았는데, 이는 hydrocortisone이 mixed leukocyte reaction(혼합백혈구반응)중에 분비되는 cytokine의 분비를 억제함으로써 표적세포의 vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1과 ICAM-1의 발현을 둔화시키는 간접적인 예방효과를 가지며 이미 생성된 cytokine에 의한 접착분자 발현증가에 대해서는 직접적인 억제효과를 가지지 못함을 시사 한다²⁸는 내용과 일치하게 나타난 것으로 사려된다.

Fibronectin의 합성억제에 미치는 영향을 관찰한 실험에서 with fetal bovine serum에서는 모든 억제실험군에서 대조군보다 높은 억제효과를 나타냈으나 유의성은 없었으며, hydrocortisone 투여군보다는 억제효과가 낮았다.

without fetal bovine serum에서는 모든 억제실험군에서 대조군보다 높은 억제효과를 나타내었으며, 桂枝茯苓丸군과 少腹逐瘀湯군은 유의성이 있었다 ($P<0.05$). 少腹逐瘀湯군은 hydrocortisone 투여군에 비해서도 높은 억제효과가 나타났으나 유의성은 없었다.

이상과 같이 각 실험약제에서 대조군에 비해 메산지움 세포증식억제와 fibronectin 합성 억제효과를 나타내었으며, 전체적으로 볼 때 桂枝茯苓丸이 두 실험에서 모두 유의한 억제효과를 나타내었다. 이로써 사구체경화증에 대한 瘀血의 관점에서의 접근이 어느 정도 유효하게 나타났다고 생각되며, 이 결과를 토대로 골수억제, 성선장애, 신독성 등의 hydrocortisone 부작용이 발생하는 환자의 경우 위 약제를 hydrocortisone과 병용투여하는 방법 등을 통해 그 사용량을 줄일 수 있을 것이라고 사려되므로 실제 질환군을 대상으로 하는 추가연구가 필요할 것이다.

본 논문에서는 in vitro상태로 실험이 진행되었는데, 세포를 배양하여 실험에 이용하는 것은 여러 가지 한계성을 가지고 있다²⁹. 즉 생체내에서 세포는 자신의 혈장이나 혈장의 초여과액에 노출되어 영향을 받고 있으나 실험실내에서 배양하고 있는 세포는 자

신과는 다른 혈청에 노출되게 된다. 혈청은 일종의 병적인 용액으로서 혈소판이나 혈액응고 체계가 활성화되면서 발생하는 여러 종류의 성장인자나 염증 매개물질들을 포함하고 있다. 즉 실험에 이용되는 세포들은 생체내에서와 다른 환경에서 성장하기 때문에 실험실내에서의 실험 결과를 생체내에서의 결과와 일치시킬 수는 없다. 아울러 실험실내 세포 배양을 이용한 실험에서의 문제점은 계대배양이 진행되면서 세포의 성질이나 기능에 변화가 온다는 점이다. 즉 배양되는 세포가 혈청내의 여러 성장인자나 염증 매개물질에 노출되면서 세포의 성질이 변화되어 계대배양이 계속 진행된 세포는 초회배양시 얻을 수 있는 세포와는 그 성격상 많은 차이가 있다는 사실이다.

따라서 본 연구의 결과를 토대로 *in vivo* 상태의 연구가 반드시 필요하다고 하겠다.

V. 結 論

桂枝茯苓丸, 小腹逐瘀湯 및 桃紅四物湯이 메산지움 세포증식억제와 fibronectin 합성억제에 미치는 영향을 규명하기 위해 실험설 연구를 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

메산지움 세포증식 억제효과를 관찰한 실험에서는桂枝茯苓丸군과 桃紅四物湯군에서 대조군에 비해 유의한 증식억제효과가 나타났으며, hydrocortisone 투여군에 비해서는 모든 약제실험군에서 유의한 증식억제효과가 나타났다.

Fibronectin합성 억제효과를 관찰한 실험에서는桂枝茯苓丸군과 少腹逐瘀湯군에서 대조군에 비해 유의한 합성억제효과를 나타냈다.

이상의 실험결과들로 미루어 볼 때桂枝茯苓丸이 메산지움 세포증식억제와 fibronectin합성 억제효과가 있음을 알 수 있었으며, 향후 질환군을 대조군으로 하는 *in vivo* 실험이 필요할 것으로 사려된다.

參考文獻

1. Wayne A. Border. Distinguishing minimal-change disease from mesangial disorder. *Kid Int* 1988;34:419-25.
2. Saulo K, Geouge S, Iekuni I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988;318:1657-66.
3. John RC, Lesley AB, Kevin JM. Glomerular matrix : Synthesis, Turnover and role in mesangial expansion. *Kid Int*, 1994;45:328-35.
4. 연세대학교 신장질환연구소. 신장학. 서울: 의학문화사; 1999, pp.1-7, 405-9, 428-39, 781-91.
5. 鄧士賢. 活血化瘀藥的藥理與應用. 雲南中醫雜誌 1985;5:50-3.
6. 張仲景. 仲景全書. 서울: 大星文化社; 1989, pp.427-8.
7. 王清任. 醫林改錯. 台北: 台聯國風出版社; 1975, pp.61-2.
8. 吳謙. 醫宗金鑑(中). 서울: 大星文化社; 1983, p.443.
9. Eiji IR, Bernd S, Klemens B, Michael K. Formation of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 1989;134:843-55.
10. Nigel W. Cytokine growth factors and glomerulonephritis. *Nephron* 1991;57:257-61.
11. Wayne AB, Seiya O, Lucia RL, Erkki R. Transforming growth factor β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kid Int* 1990;37:689-95.
12. 김현철, 박성배. 임상 신장학. 대구: 계명대학교출판부; 1997, pp.24-9.
13. Adler S, Striker LJ, Striker GE, Hibbert J, Couser WG. Studies of progressive glomerular sclerosis in the rat. *Am J Pathol* 1986;123:553-62.
14. George FS, Ramzi SC, Emil RU. Modulation of Ia and leukocyte common antigen expression in rat glomeruli during course of glomerulonephritis and aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1984;51:524-33.
15. Editorial Review. Macrophages in acute glomerular inflammation. *Kid Int* 1994;45:945-52.
16. Marina N, Giuseppe R. New insights into circulating cell-endothelium interaction and their significance for glomerular pathophysiology. *Am J Kid Dis* 1995;26: 541-8.
17. 田賢哲. 脾下逐瘀湯 煎湯液이 CCl4로誘發된 白鼠肝損傷에 미치는影響에 關한 研究. 慶熙韓醫大 大學

- 院; 1978.
18. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울: 成輔社; 1993, pp.371-5.
 19. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울: 고문사; 1993, pp.304-6.
 20. 康舜洙. 漢醫學에서의 瘀血에 대한 概念. 大韓韓醫學會誌 1984;5(1):138-40.
 21. 申鎮湜. 實驗的 肝瘀血에 미치는 桂枝茯苓丸 및 그 加味方의 效果에 關한 研究. 慶熙大學校 大學院; 1985.
 22. 徐嵩年. 運用活血化瘀治療則治療腎小球腎炎體會. 中醫雜誌 1985;9:32-3.
 23. 楊蘊祥, 劉翠英. 古今名方. 河南: 河南科學技術出版社; 1983, p.184.
 24. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社; 1992, pp.124-5, 193-6, 302-4, 334-5, 344-5, 401-2, 409-10, 412-4, 423-6, 578-83.
 25. 黃宮綉. 本草求真. 北京: 人民衛生出版社; 1987, pp.5-6, 41-2, 59, 78, 83-4, 106-8, 113-4, 137-8, 214-6, 226-30, 232-3.
 26. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社; 1972, p.78.
 27. 汪昂. 醫方集解. 서울: 大星文化社; 1993, pp.162-7.
 28. 임천규, 홍성표, 박재경, 안재형, 이태원, 조병수 등. 내피세포와 메산지움세포의 접착분자 발현에 대한 혼합 백혈구 반응과 Hydrocortisone 및 Cyclosporine 의 영향. 대한내과학회지 1997;52(2):156-64.
 29. Lovett DH, Sterzel RB, Kashgarian M, Ryan JL. Neutral proteinase activity produced in vitro by cells of the glomerular mesangium. *Kid Int* 1983;23:342-9.