

Mesangial 세포에서 고포도당에 의해 유도되는 insulin-like growth factor 분비 촉진작용에 대한 ginsenosides의 차단 효과

배춘식[†] · 임도선[†] · 윤병철 · 정문진² · 윤경철³ · 박수현^{4*}

전남대학교 수의과대학 및 생물공학연구소, ⁴기능성 식품센터,

¹을지대학교 보건과학대학 치위생학과, ²조선대학교 치과대학 구강조직학교실, ³전남대학교 의과대학 안과학교실

Received December 3, 2007 / Accepted December 11, 2007

Ginsenosides Protect the High Glucose-induced Stimulation of IGFs in Mesangial Cells. Chun-Sik Bae[†], Do-Seon Lim[†], Byeong-Cheol Yoon, Moon-Jin Jeong², Kyung-Chul Yoon³ and Soo-Hyun Park^{4*}. College of Veterinary Medicine, Biotechnology Research Institute, ⁴Functional Food Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, ¹Department of Dental Hygiene, Eulji University, Gyenggi-do 461-713, Korea, ²Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea, ³Department of Ophthalmology, Chonnam National University, Medical School and Hospital, Gwangju 501-757, Korea. - *Panax ginseng* C. A. MEYER is one of the most widely used herbal medicines in the Asian countries and has diverse functions including anti-diabetic action. The dysfunctions of mesangial cells in hyperglycemic conditions are implicated in the development of diabetic nephropathy. Insulin-like growth factors (IGFs) are also associated with the onset of diabetic nephropathy. Thus, we examined the effect of ginsenosides against high glucose-induced dysfunction of primary cultured rat mesangial cells. In the present study, high glucose increased IGF-I and IGF-II secretion in mesangial cells. Ginsenoside total saponin (GTS) prevented high glucose-induced increase of IGF-I and IGF-II secretion in mesangial cells. In addition, GTS prevented high glucose-induced increase of lipid peroxide formation and decrease of GSH contents. GTS also ameliorates high glucose-induced increase of arachidonic acid release and decrease of prostaglandin E₂. In conclusion, GTS prevented high glucose-induced dysfunction of mesangial cells via inhibition of oxidative stress and arachidonic acid pathways.

Key words : Ginsenosides, mesangial cells, high glucose, diabetic nephropathy, insulin-like growth factor-I

서 론

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 주요한 원인으로 고혈당증에 의해 mesangial 세포 기질이 확대로 인한 사구체 비후 및 사구체 경화증을 일으켜 신장기능 장애가 일어나는 질환이다[18,24,26,29]. 이러한 mesangial 세포의 비대 및 경화를 유발하는 여러 인자들 중 Insulin-like growth factor-I (IGF-I) 및 IGF-II는 직접 신장에서 합성이 되고 있는 대표적인 세포 성장 인자로 1형 및 2형 당뇨병모델에서 당뇨병성 신증을 유발하는 것으로 보고되고 있다[9,25,27].

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오래 전부터 우리나라를 중심으로 중국 및 일본에서 신체 기능을 강화시켜주는 강장제(tonic agent)로서 민속의약으로 혹은 한방 처방의 한 성분으로 해서 널리 이용되어 오고 있다[14]. 인삼(total ginseng saponin: GTS)은 화학적 구조에 따라 크게 panaxadiol (PD) 및 panaxatriol (PT)로 나뉘어 진다[35]. 이러한 인삼은

예로부터 당뇨병 등의 예방 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[28]. 인삼의 항당뇨 효과는 몇몇 연구자들에 의해서도 알려지고 있다[5,31]. 그럼에도 불구하고 당뇨신증에 대한 효과는 알려져 있지 않고 있으며 더욱이 이들에 대한 조절 기전에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있다.

고포도당은 생체 내 여러 신호전달계에 변화를 일으킨다. 여러 신호 전달 물질중 산화성 스트레스의 증가는 당뇨병에서 신증을 포함한 여러 미세 혈관계의 합병증을 유발하는데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[12]. 당뇨병 시 mesangial 세포에서도 산화성 스트레스 증가가 관찰되었다[4]. Arachidonic acid (AA)는 세포막의 구성성분으로 염증시에 증가하는 세포전달물질로 알려져 있으며 당뇨병의 발병에도 관여하는 것으로 보고되고 있다[13]. 이러한 보고들은 당뇨병 시 산화성 스트레스 및 arachidonic acid가 중요한 역할을 한다는 것을 시사해 주고 있다. 그러나 이에 대한 직접적인 연구는 아직까지 이루어 지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 ginsenoside 처리 시 고포도당에 의한 mesangial 세포의 IGF-I 및 IGF-II의 차단효과 및 이와 관련된 산화성 스트레스 및 AA의 신호전달계와의 관련성을 알아보려고 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-62-530-2832, Fax : +82-62-530-2809

E-mail : parksh@chonnam.ac.kr

[†]The first two authors contributed equally to this work.

재료 및 방법

재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12 (D-MEM/F-12) 와 Class IV collagenase 는 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. D-glucose, streptomycin, penicilin, insulin, fungizon, pentobarbital sodium, Hanks' balanced salts (HBSS), D-valine media, RPMI media 및 reduced GSH는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Total ginsenoside, penoxatriol 및 penoxadiol은 한국인삼연초연구원 (대전, 한국)에서 구입하였다. ^{125}I -IGFs 및 ^3H -arachidonic acid는 Amersham international (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. PGE₂ assay kit은 R & D system (Minneapolis, Minnesota, USA)에서 구입하였다.

Mesangial 세포의 초대배양

실험에 사용할 수컷 Sprague-Dawley 랫트(8-10주령) 를 24시간 절식시킨 다음 pentobarbital sodium (1 ml/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 후 신속하게 isolated 3 claps method를 이용하여 신장을 분리하고, 신동맥을 통하여 streptomycin과 penicillin (100 U/ml)이 포함된 30 ml의 HBSS 용액을 서서히 관류시켜 혈액을 완전히 제거한 후 HBSS에 옮겨서 사구체가 존재하는 신피질을 신장으로부터 분리하였다. 분리한 피질 조직을 가능한 세절한 다음 HBSS와 함께 30, 60 mesh에 여과시킨 후 다시 통과된 시료를 20 mesh에 여과하여 HBSS 용액에 세척하였다. 사구체가 함유되어 있는 HBSS 용액을 다시 한번 120× g, 30초간 원심분리하여 상층액만을 취하고 다시 1,000× g, 1분간 원심분리시켜 침전된 시료를 채취하였다. 채취된 시료를 RPMI 1640 (Sigma)에 세척한 다음 1,000× g, 1분간 원심분리 하였다. 정제된 사구체를 피막을 제거하기 위하여 collagenase (750 IU/ml, Sigma)에 15분간 37°C에서 서서히 교반한 다음 무혈청 RPMI 1640 배지에 3번 계속 세척하였다. 이와 같은 과정을 통하여 얻어진 사구체 세포들을 세포배양 접시에 500 사구체/cm가 되도록 분주한 다음 D-valine으로 치환된 Minimum Essential Media Eagle (Sigma)에서 5% CO₂, 95% O₂인 CO₂ 배양기에서 흔들리지 않도록 고정하여 72시간 동안 배양시킨다. 이때 D-valine 배지, HEPES, streptomycin, penicillin (100 U/ml) 0.25% fungizon, insulin (0.013 µg/ml) 그리고 20% fetal bovine serum을 함유하도록 하고, 이후 CO₂ 배양기에 배양시켰다. 계대 배양시에는 5 mM의 포도당을 함유한 DMEM/F-12를 사용하였다.

시료의 전 처리

시료중 IGF들은 대부분 IGF binding proteins (IGFBPs)와

결합된 형태로 존재하므로 IGFBP로부터 IGFs을 분리하기 위하여 acid-ethanol 추출[7]과 formic acid 추출[3] 방법에 의하여 분리하였다. IGF-I의 분리는 혈청 200 µl에 acid-ethanol (2 M HCl:ethanol=1:7) 800 µl를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치하여 유리형과 결합형을 분리시켰다. 이 후 3000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 유리 IGF-I을 함유하는 상층액 500 µl에 0.855 M trizma base를 200 µl 넣어 분석에 사용하였다. 간장, 신장 및 태반 조직은 각 조직 0.25 g에 1% trifluoroacetic acid (TFA) 2 ml를 넣어 균질마쇄기 (Polytron Co, U.S.A)로 마쇄 후 원심분리하여 상층액을 취한 다음 acid-ethanol 추출법으로 IGFBP로부터 IGF-I을 분리하여 농도를 측정하였다.

IGF-II의 분리는 혈청 50 µl에 0.5% Tween 20을 함유하는 8.0 M formic acid 100 µl를 넣어 진탕하고 350 µl의 acetone 첨가하였다. 이 후 3,500× g에서 15분간 4°C에서 원심분리하여 상층액 200 µl에 1.75 M trisma base 85.7 µl를 넣어 분석에 사용하였다. 이후 formic acid-acetone 추출법으로 IGF binding proteins로부터 IGF-II를 분리하여 농도를 측정하였다.

IGFs 방사면역 측정법

혈청내의 IGFs 농도는 [^{125}I]-IGFs에 polyclonal anti-IGFs를 사용한 방사면역 측정법(radioimmunoassay, RIA)을 이용하였다. 이를 요약하면, IGFs RIA 완충액으로 0.5% BSA, 0.12 M NaCl, 0.1% sodium azide를 함유한 0.04 M 인산 완충액 (pH 7.4)을 사용하였다. IGFs 표준액과 시료에 1,000배 희석시킨 polyclonal anti-IGFs 50 µl를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 시험관에 [^{125}I]-IGFs (20,000 cpm/100 µl)을 첨가하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 이 후 horse serum 50 µl와 12% polyethylene glycol #8000 (PEG) 1 ml를 첨가하여 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter (Wallac Wizard 1470, Turku, Finland)로 측정하였다.

Lipid peroxide (LPO)형성

LPO 형성은 Ohkawa 등[22]의 방법에 따라 malonaldehyde의 양으로 측정하였으며, 간략히 요약하면 다음과 같다. 세포들을 수확한 후 초음파로 세포를 분쇄한 후, 반응용액[8% SDS 100 µl, 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA) 200 µl, 20% acetic acid 200 µl]을 넣은 후 95°C에서 60분간 반응시켰다. 이후, 얼음으로 차게한 물에 식힌 후, 비특이적인 적색 색소를 제거하기 위하여 n-butanol-pyridine 혼합액(15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000× g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 이 시료를 spectrofluometry (Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 emission 파장 553 nm 및 excitation 파장 515 nm에서 측정하여 nmol/mg protein으로 표시하였다. 단백질량은 Bradford 방법[2]에 의해서 측정하고, 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

GSH contents 측정

GSH 함량은 Anderson의 방법[1]으로 측정하였다. 0.248 mg/ml NADPH (143 mM sodium phosphate, 6.3 mM Na-EDTA, pH. 7.5를 함유하고 있는) 용액 700 μ l, 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 용액 100 μ l와 증류수 198 μ l를 cuvette에 넣어 30°C에서 15분간 데운 후 시료 2 μ l를 넣고 섞은 다음 266 U/ml GSSG reductase 10 μ l를 첨가하여 412 nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였고 단위는 μ g/mg protein으로 나타내었다. 단백질량은 Bradford 방법[2]에 의해서 측정하고, 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

[³H]-Arachidonic acid 방출실험

초대배양한 랫트 mesangial 세포에 있어서 AA 방출실험들은 Xing 등[32]의 방법을 통해 실시하였다. 간략히 살펴보면, 세포들을 35 mm 배양접시에서 1 μ Ci [³H]AA/ml으로 24 시간 전배양시킨 후 5 mg/ml BSA와 20 mM HEPES를 함유한 DMEM/F-12 세 번 세척한 후 시약을 처리하였다. 길항제 실험에서는 본 실험 30분 전에 전처리를 하였으며, 이후 95% 공기 - 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 1시간 배양시킨 후 상층액을 수거하여 이를 ethylene glycol-bis (β -amino ethyl ether)-N,N,N', N'-tetra acetic acid (EGTA) 및 EDTA를 최종 농도가 각각 5 mM 되어있는 얼음으로 차게 한 tube로 옮겼다. 세포파편을 제거하기 위해 원심분리후 그 상층액만을 liquid scintillation counter (LS 6500, Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA)로 방사선 활성도를 측정하였다. 그리고 배양접시에 붙어있는 세포들은 0.1% SDS 1 ml로 세포를 용해시킨 후 세포를 수확하였고, 900 μ l씩을 각각 취하여 방사선 활성도를 측정하여 total치로 기준을 삼았으며 나머지는 단백질 정량을 위해 사용하였다.

PGE2 함량 측정

Mesangial 세포의 배지 200 μ l를 수확하여 PGE₂ ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 세포를 수확하여 단백질 양을 측정하여 이를 환산하였다.

통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P값<0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means \pm S.E 로 하였다.

결 과

GTS, PD 및 PT에 의한 고포도당의 IGFs 분비 및 세포 성장 효과 차단작용

*in vitro*에서 고혈당 조건 시 IGF-I 분비 상황을 알아보기 위하여 25 mM 포도당을 48 hr 동안 처리한 결과 IGF-I 분비

는 증가하였다. 이러한 현상은 IGF-II 분비에서도 같은 결과를 볼 수 있었다(Fig. 1). GTS가 고포도당의 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비 촉진 작용이 차단되는지를 알아보기 위하여 고포도당 처리 30분전에 GTS를 농도별로(0~10⁻⁵ g/ml) 처리하였다. 본 실험에서 GTS는 10⁻⁶ g/ml 이상에서 고포도당에 의한 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비 증가 작용을 차단시켰다(Fig. 1). 이러한 GTS의 고혈당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용 차단 효과가 GTS의 어떠한 분획에서 이루어지는지를 알아보기 위하여 GTS, PD 및 PT를 전처리하여 고포도당을 처리 후 IGFs 분비작용을 실시하였다. 실험결과 GTS, PD 및 PT 모두 고포도당의 IGF-I 및 IGF-II 분비 촉진작용을 차단하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 PD 및 PT 모두가 고포도당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용을 차단한다는 것을 시사해준다. 아울러 이러한 작용이 mesangial 세포의 세포 성장에도 관여하는 지를 알아본 결과 고포도당 처리 시 세포 성장은 증가하였으며 GTS, PD 및 PT 처리 시 이러한 작용은 차단되었다(Fig. 3).

GTS, PD 및 PT에 의한 고포도당의 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비 차단작용에 있어서 산화성 스트레스 및 AA 관련성
산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 thio-babutaric acid (TBA)를 이용한 LPO 형성을 측정하였다. 본

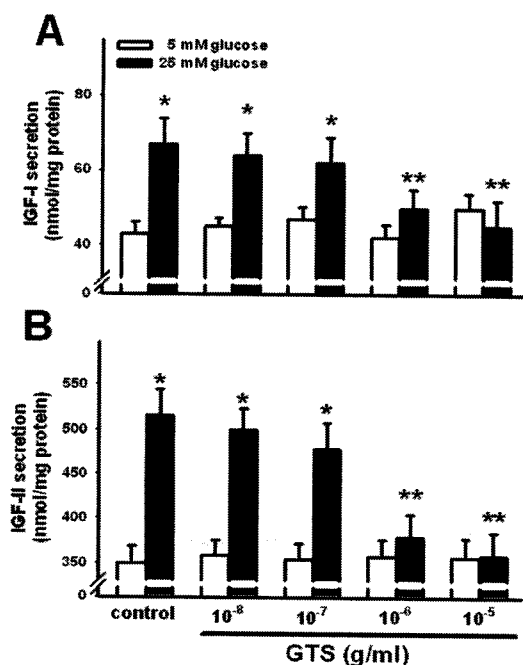


Fig. 1. Dose dependent effect of GTS against high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were incubated with different dosage of GTS (0 to 10⁻⁵ g/ml) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * p<0.05 vs. control, ** p<0.05 vs. 25 mM glucose alone.

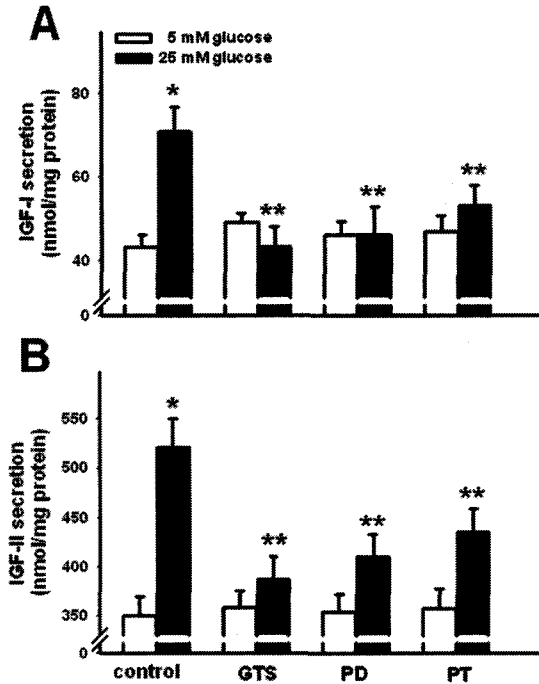


Fig. 2. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^5 g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p<0.05$ vs. control, ** $p<0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

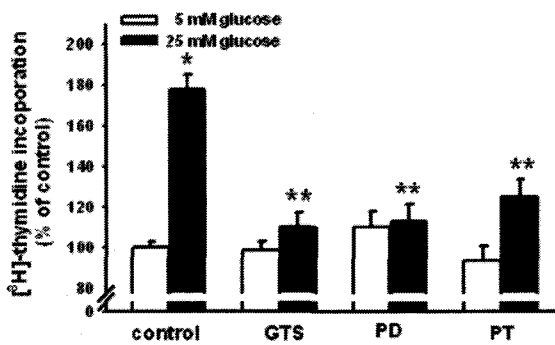


Fig. 3. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced stimulation of [³H]-thymidine incorporation. Mesangial cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^6 g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p<0.05$ vs. control, ** $p<0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

실험에서 고포도당은 LPO 형성을 증가시켰으며 이러한 작용은 GTS, PD 및 PT 처리 시 차단되는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 아울러 GSH 함량을 측정된 결과 역시 고포도당 처리 시 감소하였으며 이러한 작용은 GTS, PD 및 PT 처리 시 차

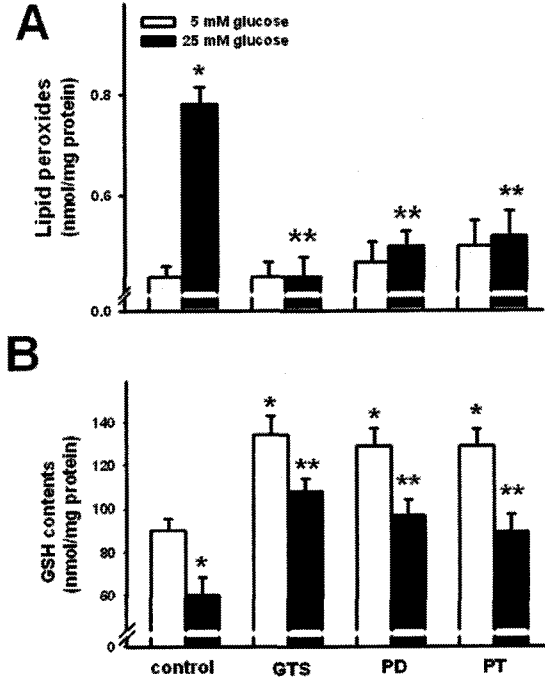


Fig. 4. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced stimulation of lipid peroxide formation (A) and decrease of GSH contents (B). Mesangial cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^5 g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p<0.05$ vs. control, ** $p<0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

단되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4B). 나아가 GTS에 의한 고포도당 차단 작용에 AA가 관련하는지를 알아보았다. 고포도당 처리 시 [³H]-AA 분비 작용은 증가하였으며 이러한 작용은 GTS, PD 및 PT 처리 시 유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 실제적으로 AA 하위 단계 물질인 PGE₂ 함량을 측정된 결과 고포도당에 의해서 PGE₂ 함량은 증가하였으며 이러한 GTS, PD 및 PT 처리 시 유의성 있게 억제되었다(Fig. 5B).

고 찰

본 실험에서 고포도당 처리 시 mesangial 세포의 IGF-I 및 IGF-II 분비는 증가하였다. 이는 당뇨병 생체 모델인 Non-Obese Diabetic (NOD) 마우스 및 streptozotocin에 의해 유도된 당뇨쥐의 mesangial 세포에서 IGF-I이 증가한다는 보고[8,21]와 일치하여 *in vivo*의 상황을 나타낸다고 할 수 있다. Werner 등[30] 역시 당뇨병성 신증 시 IGF-II가 증가한다고 하여 본 연구결과를 뒷받침 해주고 있다. 이러한 사구체 mesangial 세포에서 증가된 IGF-I 및 IGF-II은 몇몇 연구자들의 보고에 근거할 때 사구체 비대를 야기하여 당뇨병성 신증

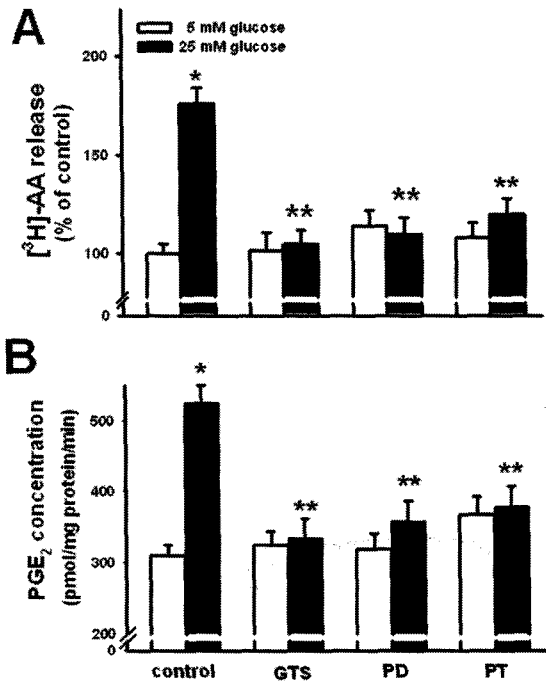


Fig. 5. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced stimulation of arachidonic acid release (A) and prostaglandin E₂ synthesis (B). Mesangial cells were incubated with GTS, PD, and PT (10⁻⁵ g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * p<0.05 vs. control, ** p<0.05 vs. 25 mM glucose alone.

을 유도한다는 것을 시사해 주고 있다[6,10]. Mesangial 세포의 성장 촉진 작용은 당뇨병성 신증의 주요한 한 현상으로 인정이 되고 있다[9,23]. 본 실험에서는 GTS 처리 시 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용 및 세포 성장 작용이 차단되었다. 이는 고포도당에 의한 IGFs 분비가 당뇨병성 사구체 경화증의 특징인 mesangial 세포 성장촉진 작용에 관여하고 있다는 간접적 증거를 말해주고 있다. 더욱이 PD 및 PT를 처리하여도 GTS에 비해 약했지만 유의성 있게 고포도당의 IGFs 분비작용을 차단하였다. 이는 PD 및 PT의 각각의 성분만으로도 항당뇨 신증효과가 있음을 나타내주고 있다. 특히 이는 PD 및 PT 자체 성분들이 상이한 작용을 해서 mesangial 세포의 기능 이상을 억제하여 항당뇨 신증 효과를 나타내고 있는 것으로 추측되고 있다. PD 및 PT 성분을 다시 분획화 하여 이들의 효과를 알아보는 연구가 향후 필요할 것으로 사료된다.

Ginseng의 항당뇨효과에 대한 연구결과는 여러 연구자에 의해 보고되고 있다 [5,15]. Ginseng의 항당뇨 신증 보고는 최근에서야 발표 되었지만[16], 이들의 작용기전 대해서는 거의 알려지고 있지 않고 있다. 여러 가지 신호전달 물질중 하나인 AA는 당뇨병성 신증의 발병에 중요한 역할을 담당

하는 신호전달 물질로 알려져 있다[13]. 본 실험결과는 ginsenoside가 지질막 신호전달 물질인 AA 분비 작용을 차단시켜 당뇨병성 신증의 발병을 억제한다고 말해주고 있다. 아울러 고포도당 처리 시 AA 대사산물 중에 cyclooxygenase (COX)에 의해 PGE₂의 생성이 증가되어 당뇨병성 신증시에 COX-2 신호전달계가 관여한다는 최근 보고와 일맥상통하였으며[33], ginsenoside의 고포도당에 의한 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비 차단 효과는 AA 및 PGE₂ 신호전달계의 억제를 통해서 작용하는 것으로 추측이 된다. 본 연구진이 아는 한 ginsenosides의 항당뇨 신증효과에 대한 AA 및 PGE₂의 관련성에 대한보고는 본 연구결과가 처음이다.

한편 산화성 스트레스의 증가는 당뇨병성 신증 발병의 중요한 매개체로 알려져 있다[17,34]. 본 실험 결과에서도 mesangial 세포에 고포도당 처리 시 LPO의 생성이 증가되어 IGFs의 분비 증가에 영향을 주고 있는 것으로 관찰되었다. Ginsenoside의 항산화 효과는 여러 문헌에 의해서 보고되고 있다[19,20]. 더욱이 본 실험에서는 ginsenoside 처리 시 고포도당에 의해서 감소되었던 내인성 항산화제인 GSH양이 회복되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 ginsenoside에 의한 GSH 함량 차단 작용은 고포도당에 의한 산화성 스트레스 억제에 기인하기도 하지만 자체의 GSH 함량 증가 작용에 기인하기도 하는 것으로 사료 된다. 이러한 ginsenoside에 의한 결과는 고포도당 상태의 mesangial 세포에 산화성 스트레스 및 IGF 의존적 신호전달계를 억제할 수 있기 때문에 ginsenoside를 당뇨병성 신증의 치료제로 사용될 수 있다는 것을 시사해주고 있다[11]. 결론적으로 ginsenoside는 고포도당에 의한 산화성 스트레스 및 AA 분비 작용을 억제, IGFs 분비를 완화시켜 사구체의 mesangial 세포의 세포 성장을 억제함으로써 사구체 경화증을 발병을 억제하여 당뇨병 신증의 발병에 억제할 것으로 추측된다. 이러한 연구는 향후 당뇨병성 신증의 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

요 약

인삼은 고전적으로 항당뇨 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. Insulin-like growth factor (IGF) 역시 당뇨병성 신증의 발병 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 mesangial 세포에서 고포도당에 의한 IGF 분비에 대한 ginsenoside의 차단 효과 및 이와 관련된 신호전달계를 알아보았다. 결과는 다음과 같다. 고포도당에 의해 증가되었던 IGF-I 및 IGF-II 분비 촉진 작용은 GTS, PD 및 PT 처리 시 차단되었으며, 세포 성장 촉진작용에서도 같은 효과를 볼 수 있었다. 아울러 고포도당에 의한 산화성 스트레스 증가, GSH 감소, AA 방출 증가 작용 및 PGE₂ 합성 증가 작용은 GTS 처리시 현저하게 차단되었으며 PD 및 PT 처리 시 역시 억제 되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 볼 때 me-

sangial 세포에서 ginsenoside는 산화성 스트레스 및 arachidonic acid 활성 경로를 억제하여 고포도당에 의한 IGFs 분비 작용을 차단하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(R01-2005-10295-0) 지원을 받아 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

References

- Anderson, M. E. 1989. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* **113**, 548-554.
- Bowsher, R. R., W. H. Lee, J. M. Apathy, P. J. O'Brien, A. L. Ferguson and D. P. Henry. 1991. Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. I. An improved extraction procedure and radioimmunoassay for human and rat fluids. *Endocrinology* **128**, 805-814.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Catherwood, M. A., L. A. Powell, P. Anderson, D. McMaster, P. C. Sharpe and E. R. Trimble. 2002. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int.* **61**, 599-608.
- Cho, W. C., W. S. Chung, S. K. Lee, A. W. Leung, C. H. Cheng and K. K. Yue. 2006. Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and anti-hyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **21**, 173-179.
- Cummings, E. A., E. B. Sochett, M. G. Dekker, M. L. Lawson and D. Daneman. 1998. Contribution of growth hormone and IGF-I to early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* **47**, 1341-1346.
- Daughaday, W. H. and P. Rotwein. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Rev.* **10**, 68-91.
- Elliot, S. J., L. J. Striker, M. Hattori, C. W. Yang, C. J. He, E. P. Peten and G. E. Striker. 1993. Mesangial cells from diabetic NOD mice constitutively secrete increased amounts of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* **133**, 1783-1788.
- Fan, Y. P. and R. H. Weiss. 2004. Exogenous attenuation of p21 (Waf1/Cip1) decreases mesangial cell hypertrophy as a result of hyperglycemia and IGF-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 575-584.
- Flyvbjerg, A., D. Landau, H. Domene, L. Hernandez, H. Gronbaek and D. LeRoith. 1995. The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism* **44**, 67-71.
- Francki, A., K. Motamed, T. D. McClure, M. Kaya, C. Murri, D. J. Blake, J. G. Carbon and E. H. Sage. 2003. SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *J. Cell Biochem.* **88**, 802-811.
- Ha, H. and H. B. Lee. 2001. oxidative stress in diabetic nephropathy: basic and clinical information. *Curr. Diab. Rep.* **1**, 282-287.
- Kamata, K., M. Hosokawa, T. Matsumoto and T. Kobayashi. 2006. Altered arachidonic acid-mediated responses in the perfused kidney of the streptozotocin-induced diabetic rat. *J. Smooth Mus. Res.* **42**, 171-187.
- Kiefer, D. and T. Pantuso. 2003. Panax ginseng. *Am. Fam. Physician* **68**, 1539-1542.
- Kim, H. Y. and K. Kim. 2007. Protective effect of ginseng on cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta-cells. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2816-2823.
- Kim, H. Y., K. S. Kang, N. Yamabe, R. Nagai and T. Yokozawa. 2007. Protective effect of heat-processed American ginseng against diabetic renal damage in rats. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8491-8497.
- Lee, H. B., J. Y. Seo, M. R. Yu, S. T. Uh and H. Ha. 2007. Radical approach to diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* **106**, S67-S70.
- Lenz, O., S. J. Elliot and W. G. Stetler-Stevenson. 2000. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 574-581.
- Li, N., B. Liu, D. E. Dluzen and Y. Jin. 2007. Protective effects of ginsenoside Rg2 against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 458-463.
- Liao, B., H. Newmark and R. Zhou. 2002. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons *in vitro*. *Exp. Neurol.* **173**, 224-234.
- Miyatake, N., K. Shikata, J. Wada, H. Sugimoto, S. Takahashi and H. Makino. 1999. Differential distribution of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetic rat kidney. *Nephron* **81**, 317-323.
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- Okada, T., J. Wada, K. Hida, J. Eguchi, I. Hashimoto, M. Baba, A. Yasuhara, K. Shikata and H. Makino. 2006. Thiazolidinediones ameliorate diabetic nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms. *Diabetes* **55**, 1666-1677.
- Park, C. W., J. H. Kim, J. H. Lee, Y. S. Kim, H. J. Ahn, Y. S. Shin, S. Y. Kim, E. J. Choi, Y. S. Chang and B. K. Bang. 2000. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent. *Diabetologia* **43**, 1544-1553.
- Segev, Y., R. Eshet, O. Yakir, N. Haim, M. Phillip and D. Landau. 2007. Systemic and renal growth hormone-IGF 1 axis involvement in a mouse model of type 2 diabetes.

- Diabetologia*. **50**, 1327-1334.
26. Sheetz, M. J. and G. L. King. 2002. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *J.A.M.A.* **288**, 2579-2588.
 27. Thraikill, K. M. 2000. Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility. *Diabetes Technol. Ther.* **2**, 69-80.
 28. Waki, I., H. Kyo, M. Yasuda and M. Kimura. 1982. Effects of a hypoglycemic component of ginseng radix on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals. *J. Pharmacobiodyn.* **5**, 547-554.
 29. Wardle, E. N. 1996. How does hyperglycaemia predispose to diabetic nephropathy? *Q.J.M.* **89**, 943-951.
 30. Werner, H., Z. Shen-Orr, B. Stannard, B. Burguera, C. T. Jr. Roberts and D. LeRoith. 1990. Experimental diabetes increases insulinlike growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes* **39**, 1490-1497.
 31. Xie, J. T., S. R. Mehendale, A. Wang, A. H. Han, J. A. Wu, J. Osinski and C. S. Yuan. 2004. American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. *Pharmacol. Res.* **49**, 113-117.
 32. Xing, M., L. Tao and P. A. Insel. 1997. Role of extracellular signal-regulated kinase and PKC alpha in cytosolic PLA2 activation by bradykinin in MDCK-D1 cells. *Am. J. Physiol.* **272**, C1380-1387.
 33. Xu, Z. G., S. L. Li, L. Lanting, Y. S. Kim, N. Shanmugam, M. A. Reddy and R. Natarajan. 2006. Relationship between 12/15-lipoxygenase and COX-2 in mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **69**, 512-519.
 34. Yamagishi, S., K. Fukami, S. Ueda and S. Okuda. 2007. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr. Drug Targets.* **8**, 952-959.
 35. Yip, T. T., C. N. Lau, Y. C. Kong, K. H. Yung, J. H. Kim and W. S. Woo. 1985. Ginsenoside compositions of Panax ginseng C.A. Meyer tissue culture and juice. *Am. J. Chin. Med.* **13**, 89-92.