

신장 근위세뇨관 세포에서 고평도당에 의한 IGF-I 분비 촉진작용에 있어서 인삼의 차단효과

정호경* · 임슬기* · 박민정* · 배춘식* · 윤경철** · 한호재* · 박수현*^{*,#}

*전남대학교 수의과대학 바이오치료 산업인력 양성팀, 동물의학연구소 **전남대학교 의과대학 안과학교실
(2009년 2월 18일 접수; 2009년 3월 6일 수리)

The Protective Effect of Ginseng Saponin against High Glucose-Induced Secretion of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I in Primary Cultured Rabbit Proximal Tubule Cells

Ho-Kyoung Jung*, Suel Ki Lim*, Min Jung Park*, Chun Sik Bae*,
Kyung Chul Yoon**, Ho Jae Han* and Soo-Hyun Park*^{*,#}

**Bio-therapy Human Resources Center, animal medical institute Department of Veterinary Physiology,
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*

***Department of Ophthalmology, Chonnam National University Medical School and Hospital, Gwangju 500-757, Korea
(Received February 18, 2009; Accepted March 6, 2009)*

Abstract : Diabetic nephropathy is associated with the dysfunction of proximal tubule cells. Insulin-like growth factor 1 (IGF-I) has also been considered to play an important role in the development of diabetic nephropathy. Ginsenosides have been used as a remedy for diabetes in Asian countries. Therefore, we examined the preventive effect of ginsenosides against high glucose-induced alteration of IGF-I secretion in the primary cultured proximal tubule cells. In present study, Ginseng saponin (GS) completely blocked high glucose-induced stimulation of IGF-I secretion in proximal tubule cells, whereas panaxatriol (PT) and panaxadiol (PD) partially suppressed. In addition, high glucose stimulated cAMP formation and protein kinase C (PKC) activity from cytosolic to membrane fraction. GS completely prevented high glucose-induced stimulation of cAMP and PKC activity while PT and PD partially did. Furthermore, high glucose-induced stimulation of IGF-I was blocked by the treatment of PKI (protein kinase A inhibitor) and bisindolylmaleimide I (protein kinase C inhibitor). In conclusion, GS prevented high glucose-induced dysfunction of proximal tubule cells.

Key words : Ginsenosides, diabetic nephropathy, proximal tubule cells, IGF-I, cAMP, protein kinase C

서 론

신장은 당뇨병 환자의 주된 사망 요인의 하나로 인식되고 있는 당뇨병성 신증 발병의 주요한 기관이다. 이러한 당뇨병성 신증은 말기신부전증 원인의 약 25%를 차지하고, 혈액투석 환자의 약 30%를 차지하고 있으며, 당뇨병 환자에서 주된 사망 요인의 하나가 되고 있다.¹⁾ 이러한 당뇨병성 신증은 고혈당증에 의해 유도되며 사구체에서 여과된 물질 재흡수의 65-70%를

담당하는 근위세뇨관 세포의 기능변화들이 당뇨병성 신증을 포함한 다양한 신장 질환을 일으키는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.²⁾ 최근에는 신장 근위세뇨관 세포의 비대가 당뇨병성 신증의 발병에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다.³⁾ 여러 인자들 중 Insulin-like growth factor-I(IGF-I)는 주로 간에서 생성이 되지만 직접 신장에서도 합성이 되고 있는 대표적인 세포 성장 인자로 1형 및 2형 당뇨병모델에서 당뇨병성 신증을 유발하는 것으로 보고되고 있다.^{4,5)}

고려 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가피 나무과(Araliaceae) 인삼속에 속하는 다년생 초본류로서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 갖는 것으로 알려지고 있다.⁶⁾ 인삼 (total

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 062-530-2832; (팩스) 062-530-2809
(E-mail) parksh@chonnam.ac.kr

ginsenoside)은 화학적 구조에 따라 크게 panaxadiol(PD) 및 panaxatriol(PT)로 나뉘어지며 각각의 기능이 서로 상이한 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ 이러한 인삼은 예로부터 당뇨병 등의 예방 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.⁸⁾ 인삼의 항당뇨 효과는 몇몇 연구자들에 의해서도 알려지고 있다.^{9,10)} 그럼에도 불구하고 당뇨병성 신증에 대한 효과는 알려져 있지 않고 있으며 더욱이 이들에 대한 조절 이전에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있다.

당뇨병성 신증의 발병에는 다양한 신호전달 물질이 관여하는 것으로 보고되고 있다. cAMP는 당뇨병성 신증 발병인자로 알려져 왔다.^{11,12)} 이러한 cAMP는 신장세포에서 다양한 반응을 나타내어 병태생리학적 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다.¹³⁾ 1형 및 2형 당뇨병 환자의 섬유아세포 및 혈소판에서 protein kinase C(PKC)의 활성이 증가되는 것으로 보고되고 있다.^{14,15)} 이러한 보고들은 당뇨병 시 cAMP 및 PKC 활성이 중요한 역할을 한다는 것을 말해 주고 있다. 그러나 이에 대한 직접적인 연구는 아직까지 이루어 지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 ginsenoside 처리 시 고포도당에 의한 신장 근위세뇨관 세포의 기능장애 및 이와 관련된 신호전달계에 대해서 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Newzeland white rabbit(1.8~2.1 kg)은 대한실험동물(용인, 한국)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12(D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. D-glucose는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Total ginsenoside, panaxatriol 및 panaxadiol은 한국 인삼 연초 연구원(대전, 한국)에서 구입하였다. ³H-cAMP assay kit 및 [³²P]-PKC assay kit는 Dupont/NEN(Boston, MA, USA)으로부터 구입하였다.

2. 토끼 신장 근위세뇨관 세포의 초대배양

토끼 신장 근위세뇨관 세포의 초대배양은 Chung 등의 방법¹⁶⁾을 변형한 것으로 수컷 토끼(1.3~1.8 kg)를 희생 한 후 신동맥과 정맥을 그대로 유지한 채 즉시 신장을 적출해 지방과 주위조직을 제거한 다음 기본배지에 penicillin G 192 IU/ml와 streptomycin 200 µg/ml을 첨가하여 얼음으로 차게 한 배지에 보관하였다. 적출된 신장은 신동맥에 끝이 무딘 18호 주사바늘을 삽입하여 외과용 실로 고정한 후 혈액이 완전히 제거될 때까지 멸균된 PBS로 관류시킨다. 이어서 0.5%

iron oxide 용액으로 피질이 암회색으로 될 때까지 관류시킨 후 항생제가 첨가된 기본배지로 관류시켰다. 피막을 박리시킨 후 외과용 가위를 사용하여 피질부만을 약 0.5 cm 정도의 조각으로 잘라내어, 멸균된 조직 균질기로 3-4회 갈아 두 층(254 µm와 85 µm)의 나일론망을 통과시킨 후 85 µm 나일론망에 걸린 세포만을 수집하여, DME/F-12 배지가 채워진 시험관으로 옮긴다. 이들 중 산화철을 포함하고 있는 사구체 세포는 멸균된 막대자석을 이용하여 제거하고, 근위세뇨관은 60 µg/ml collagenase class와 60 µg/ml soybean trypsin inhibitor로 상온에서 각각 3분씩 처리한 후 원심분리하여 3회(1,000 rpm, 5분) 세척하였다. 이렇게 준비된 근위세뇨관을 2가지 성장인자(insulin 5 µg/ml, transferrin 5 µg/ml)가 첨가된 기본배지에 희석하여 35 mm 플라스틱 배양접시에 접종하였다. 배양은 95% air와 5% CO₂를 함유한 배양기에서 37°C를 유지하였고 배지는 접종 후 첫날 교체하고 그 이후는 3~4일 마다 교환하였다. 단, 세포의 활성 및 생화학적 측정을 위해서는 매 실험 24시간 전에 배지를 교환하였다.

3. 시료의 전 처리

시료중 IGF들은 대부분 IGF-BPs와 결합된 형태로 존재하므로 IGF-BP로부터 IGFs를 분리하기 위하여 acid-ethanol extraction¹⁷⁾와 formic acid extraction¹⁸⁾ 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. 그 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 IGF-BP로부터 IGF-I을 분리하여 농도를 측정하였다.

4. IGFs 방사면역 측정법

혈청내의 IGFs 농도는 [¹²⁵I]-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 1000배 희석시킨 polyclonal anti-IGFs 50 µl을 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 시험관에 [¹²⁵I]-IGFs(20,000 cpm/100 µl)을 첨가하여 4에서 18시간 반응시켰다. 그 후 horse serum 50 µl와 12% polyethylene glycol #8000(PEG) 1 ml를 첨가

하여 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter (Wallac Wizard 1470, Turku, Finland)로 측정하였다.

5. cAMP 측정

세포 내에서 cAMP의 분해를 억제하고자 IBMX(100 μ M)로 30분간 37°C에서 전배양 하였다. EDTA(4 mM) 용액으로 세포를 균질화 시킨 후 5분간 끓여 3,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 냉장 보관하였다. cAMP 측정은 Amersham에서 구입한 cAMP assay system (TRK 432)을 이용하였다. 이 방법을 간단히 설명하면 EDTA (4 mM) 용액만을 이용하여 영점을 잡은 후 cAMP를 이용하여 표준 곡선을 잡았다. 준비된 시료와 3 H-cAMP를 100 μ l씩 동량을 섞고 곧바로 binding protein 100 μ l를 첨가한 후 3초간 섞었다. 1,000 rpm으로 20초간 원심분리 시켜 시험관 벽에 붙은 시료들을 모은 다음 차가운 곳에 2 시간 정도 방치한 후 cold charcoal 200 μ l를 첨가하였다. 이후 2,000 rpm으로 3분간 원심분리 시킨 후 상층액만 200 μ l씩 취하여 scintillation vial에 담아 scintillation solution 4 ml를 첨가한 후 방사선량을 측정하였다. 이후 단백질량을 정량하여 cAMP pmole/mg protein으로 나타내었다.

6. Protein kinase C 측정

세포내 PKC를 측정하기 위해 세포를 완충액 A [10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.25 M sucrose, 0.2 mM CaCl_2 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 10 μ g/ml leupeptin, 10 mM benzamidine] 으로 균질화한 후 EDTA를 첨가한 후 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 취해 100,000 g로 1 시간 동안 다시 원심분리하여 상층액(cytosolic fraction)을 수거하여 냉장 보관하였다. 이 때 침전된 부분을 완충액 B [20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.25 M sucrose, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100] 으로 부유시킨 후 냉소에서 20분간 보관한 후 100,000 g로 다시 원심분리하여 상층액(membranous fraction)을 수거하였다. 이렇게 수거된 부분은 먼저 단백질량을 측정한 후 각 5 μ g씩을 채취하여 실시하였다. PKC의 양은 Amersham에서 구입한 PKC assay system(RPN 77)을 이용하여 실시하였다. 그 방법을 요약하면 다음과 같다. Mg-ATP와 γ - 32 P-ATP를 동량이 되게 배합을 한다. 미리 준비해 둔 샘플을 25 μ l씩을 eppendorf tube에 담는다. 이곳에 Mg-ATP와 γ - 32 P-ATP 혼합액 5 μ l씩을 각각 첨가한다. 3초간 교반한 후 1000 rpm으로 2-3분간 원심시킨 후 37°C에서 15분간 보관한다. 그 후 stop solution을 10 μ l씩 처리한 후 다시 3초간 교반하여 1000 rpm으로 2분간 원심시킨다. 일정한

용기에 binding paper를 준비한 후 sample 순서대로 35 μ l씩 떨어뜨린 후 말린다. Binding paper가 완전히 건조되면 5% 초산으로 세척하여 비특이적인 결합을 제거한다(5분씩 3회 실시). 세척이 끝난 후 binding paper를 scintillation vial에 넣은 다음 scintillation solution을 4 μ l씩 분주한 후 방사선량을 측정한다. 최종값은 pmole/mg protein/min으로 나타냈다.

7. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P 값 < 0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 mean \pm SE로 하였다.

결 과

1. GTS, PD 및 PT에 의한 고평도당의 IGFs 분비 및 세포 성장 효과 차단작용

*in vitro*에서 고평도당 조건 시 IGF-I 분비 상황을 알아보기 위하여 25 mM 포도당을 48 시간 동안 처리한 결과 IGF-I 분비는 증가하였다(Fig. 1). GTS가 고평도당의 IGF-I 분비 촉진 작용이 차단되는지를 알아보기 위하여 고평도당 처리 30분전에 GTS를 농도별로 (0 ~ 10^{-5} g/ml) 처리하였다. 본 실험에서 GTS는 10^{-6} g/ml 이상에서 고평도당에 의한 IGF-I 분비 증가 작용을 차단시켰다(Fig. 1). 이러한 GTS의 고평도당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용 차단 효과가 GTS의 어떠한 분획에서 이루어지는지를 알아보기 위하여 GTS, PD 및 PT를 전 처리하여 고평도당을 처리 후 IGFs 분비작용을 실시하였

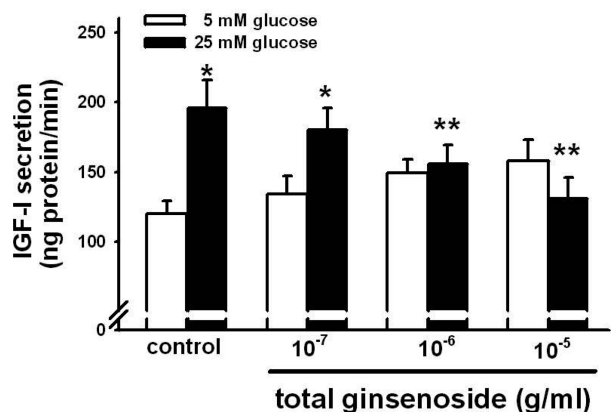


Fig. 1. Dose dependent effect of GTS against high glucose-induced secretion of IGF-I. Primary cultured rabbit proximal tubule cells were incubated with different dosage of GTS (0 to 10^{-5} g/ml) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are mean \pm SE of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *p < 0.05 vs. control, **p < 0.05 vs. 25 mM glucose alone.

다. 실험결과 GTS, PD 및 PT 모두 고포도당의 IGF-I 분비 촉진작용을 차단하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 PD 및 PT 모두가 고포도당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용을 차단한다는 것을 시사해준다. 아울러 이러한 작용이 신장 근위세뇨관 세포의 세포 성장에도 관여하는 지를 알아본 결과 고포도당 처리 시 세포 성장은 증가하였으며 GTS, PD 및 PT 처리 시 이러한 작용은 차단되었다(Fig. 3).

2. GTS, PD 및 PT에 의한 고포도당의 IGF-I 분비 차단작용에 있어서 cAMP 및 PKC 관련성

cAMP와의 관련성을 알아보기 위하여 GTS, PD 및 PT를

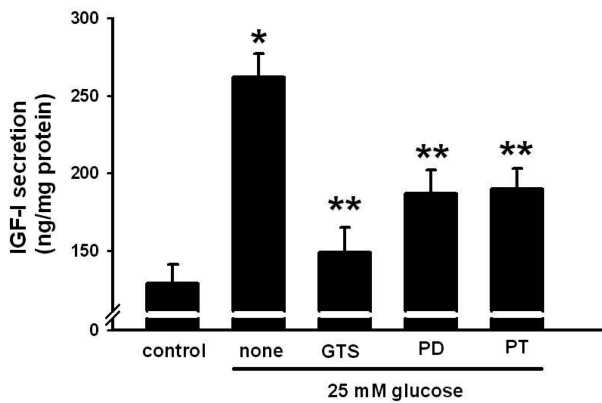


Fig. 2. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced secretion of IGF-I. Primary cultured rabbit proximal tubule cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^{-5} g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are mean \pm SE of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

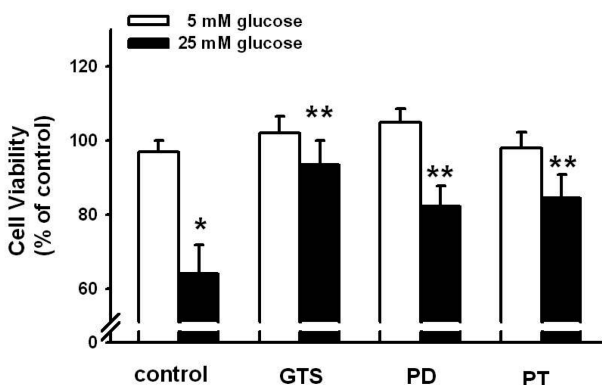


Fig. 3. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced decrease of cell proliferation. Primary cultured rabbit proximal tubule cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^{-5} g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are mean \pm SE of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

전 처리하여 고포도당을 8시간 처리 후 cAMP 함량을 측정하였다. 실험 결과 고포도당 처리 시 cAMP 함량은 대조군에 비해 증가하였으며, 이러한 작용은 GTS에 의해서 완벽하게 차단되는 것으로 나타났다. 아울러 PD 및 PT 처리 시 역시 GTS에 비해서는 못하지만 부분적으로 차단되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 나아가 GTS에 의한 고포도당 차단 작용에 PKC가 관련하는지를 알아보았다. 고포도당 처리 시 PKC 활성은 증가하였으며 이러한 작용은 GTS, PD 및 PT 처리 시 유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 실제적으로 고포도당 처리 시 IGF-I 분비 촉진 작용은 cAMP 신호전달계의 protein kinase A 억제제인 PKI 처리 및 PKC 억제제인 bisindolylmaleimide I 처리 시 차단되어 이상의 결과를 뒷받침 해주고 있다(Fig. 6).

고 찰

본 실험에서 고포도당 처리 시 신장 근위세뇨관 세포의 IGF-I 분비는 증가하였다. 이는 생체 신장 모델에서 IGF-I 투여 시 신장 근위세뇨관의 기능이상이 야기되어 당뇨병성 신증이 유발되었다는 보고들과 일치한다고 할 수 있으며 *in vivo*의 상황을 나타낸다고 할 수 있다.^{19,20} 본 연구결과는 신장의 사구체 세포인 mesangial 세포에서 고혈당증에 의해 증가된 IGF-I 이 사구체 비대를 야기하여 당뇨병성 신증을 유도한다는 보고에 근거를 할때, 신장 근위세뇨관 세포에서도 증가된 IGF-I이 근위세뇨관 세포의 세포 비대를 야기하여 당뇨병성 신증에 관여할 것으로 추측되어지고 있다.²¹ 신장 근위세뇨관 세포의 비대는 당뇨병성 신증의 주요한 한 현상으

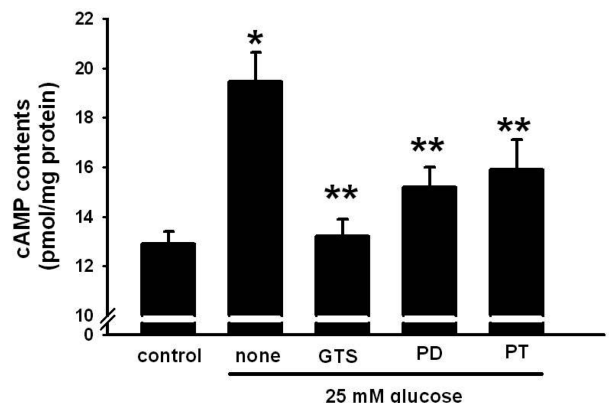


Fig. 4. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced cAMP contents. Primary cultured rabbit proximal tubule cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^{-5} g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 8 hr. Values are mean \pm SE of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

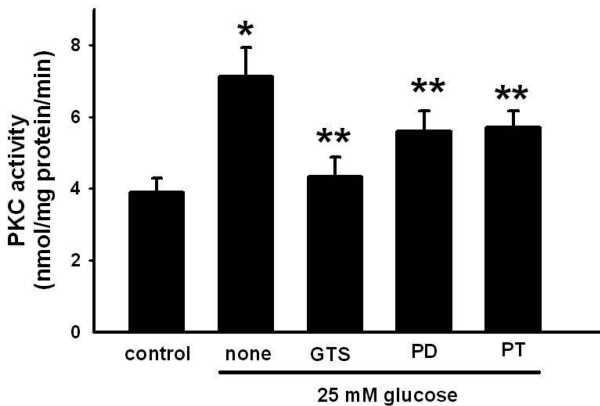


Fig. 5. Effect of GTS, PD, and PT against high glucose-induced PKC activity. Primary cultured rabbit proximal tubule cells were incubated with GTS, PD, and PT (10^{-5} g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 8 hr. Values are mean \pm SE of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

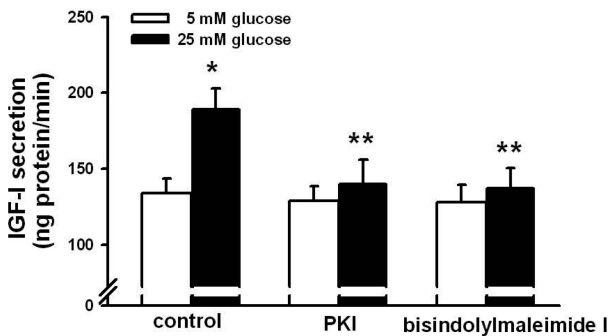


Fig. 6. Effect of PKI and bisindolylmaleimide I against high glucose-induced secretion of IGF-I. Primary cultured rabbit proximal tubule cells were incubated with PKI (protein kinase A inhibitor) and bisindolylmaleimide I (protein kinase C inhibitor, 10^{-5} g/ml, respectively) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr. Values are mean \pm SE of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. 25 mM glucose alone.

로 인정이 되고 있다.²²⁾ 이전 본 연구진은 이미 근위세뇨관 세포가 고포도당에 노출 시 근위세뇨관 세포가 세포 비대를 증가 시켜 세포 성장이 억제된다는 것을 보고 하였다.²³⁾ 본 실험 연구 결과는 고포도당에 의한 IGF-I 분비가 당뇨병성 신장 근위세뇨관 세포의 비대에 관여하고 있다는 간접적 증거를 말해주고 있다. 본 실험에서는 GTS 처리 시 고포도당에 의한 IGF-I 분비 작용 및 세포 성장 억제(비대) 작용이 차단되었다. 더욱이 PD 및 PT를 처리하여도 GTS에 비해 약했지만 유의성 있게 고포도당의 IGF-I 분비 촉진 작용을 차단하였다. 이는 PD 및 PT의 각각의 성분만으로도 신장 근위세뇨관 세포에서 항당뇨 신증 효과가 있음을 나타내주고 있

다. 특히 이는 PD 및 PT 자체 성분들이 상이한 작용을 해서 신장 근위세뇨관 세포의 세포 성장을 억제하여 항당뇨 신증 효과를 나타내고 있는 것으로 추측되고 있다. 최근에 Cho 등²⁴⁾은 PT 계열인 ginsenoside Re 처리 시 Kang 등²⁵⁾은 PD 계열인 Rg3 처리 시 당뇨병성 신증이 완화되었다고 하여 본 연구결과를 뒷받침 해주고 있다. 아울러 본 연구결과와 비교해 보면 PD 및 PT에 의한 당뇨병성 신증의 근위세뇨관 세포 기능이상 회복이 당뇨병성 신증의 완화에 기여할 수 있을 것으로 판단이 된다. PD 및 PT 성분을 다시 분획화하여 이들의 효과를 알아보는 연구가 향후 필요할 것으로 사료된다.

Ginseng의 항당뇨 효과에 대한 연구 결과는 많이 보고되고 있지만 항당뇨 신증 효과에 대한 연구결과는 몇몇 연구자들에 의해서만 보고되고 있다.^{26,27)} Park 등⁷⁾은 streptozotocin 처리에 의한 신장의 사구체 비대가 인삼추출물 처리 시 호전되었다고 하였으며, Kim 등²⁶⁾ 역시 한국 인삼 처리 시 STZ에 의한 당뇨병성 신장증이 완화 되었다고 하였다. Ginseng의 항당뇨 신증 보고는 이들의 작용기전 대해서는 거의 알려지고 있지 않고 있다. 여러 가지 신호전달 물질중 하나인 cAMP는 당뇨병성 신증의 발병에 중요한 역할을 담당하는 신호전달 물질로 알려져 있다.^{28,29)} 본 연구진의 이전 보고에서도 고포도당 처리 시 신장 근위세뇨관 세포에서 cAMP 활성이 증가하였다고 하여 본 연구결과를 뒷받침해주고 있다.³⁰⁾ 본 실험결과는 ginsenoside가 신호전달 물질인 cAMP 분비 작용을 차단시켜 당뇨병성 신증의 발병을 억제한다고 말해주고 있다. 본 연구진이 이는 한 ginsenosides의 항당뇨 신증 효과에 대한 신장 근위세뇨관 세포에서 cAMP의 관련성에 대한보고는 본 연구결과가 처음이다.

한편 PKC 활성 증가는 당뇨병성 신증 발병의 중요한 매개체로 알려져 있다.^{31,32)} Koya와 King³¹⁾은 고혈당증은 단구 세포에서 diacylglycerol (DAG)/PKC 경로를 활성화시키고, 이들의 활성은 STZ에 의해 유도된 당뇨 랫트의 망막, 대동맥, 심장 및 사구체와 고포도당 조건에 배양되는 혈관 세포나 조직에서 현저히 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서도 비록 세포의 차이는 있지만 고포도당 처리 시 total PKC 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 또한 Whiteside³²⁾등이 보고한 당뇨 랫트의 사구체와 초대 배양된 mesangial 세포에서의 PKC 활성도가 증가한다는 보고와 일치하는 결과라고 볼 수 있겠다. 본 연구진에 의한 이전 보고에서도 고포도당 처리 시 신장 근위세뇨관 세포에서 PKC 활성이 현저하게 증가하였다고 보고하였다.²³⁾ 더욱이 본 실험에서는 ginsenoside 처리 시 고포도당에 의해서 증가되었던 PKC 활성이 회복되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 ginsenoside에 의한 결과는 고포도당 상태의 신장 근위세뇨관 세포에 산화성 스트레스 및 IGF

의존적 신호전달계를 억제할 수 있기 때문에 ginsenoside를 당뇨병성 신증의 치료제로 사용될 수 있다는 것을 시사해주고 있다.³³⁾ 결론적으로 ginsenoside는 고포도당에 의한 cAMP 및 PKC 활성 작용을 억제, IGFs 분비를 완화시켜 신장 근위세뇨관 세포의 세포 성장을 억제함으로써 사구체 경화증 발병을 억제하여 당뇨병 신증의 발병에 억제할 것으로 추측된다. 이러한 연구는 향후 당뇨병성 신증의 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

요 약

인삼은 전통적으로 항당뇨 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. Insulin-like growth factor (IGF)-I 역시 당뇨병성 신증의 발병 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 신장 근위세뇨관 세포에서 고포도당에 의한 IGF-I 분비에 대한 ginsenoside의 차단 효과 및 이와 관련된 신호전달계를 알아보았다. 결과는 다음과 같다. 고포도당에 의해 증가되었던 IGF-I 분비 촉진 작용은 GTS, PD 및 PT 처리 시 차단되었으며, 세포 성장 작용 (세포 비대)에서도 같은 효과를 볼 수 있었다. 아울러 고포도당에 의한 cAMP 및 PKC 활성은 GTS 처리시 현저하게 차단되었으며 PD 및 PT 처리 시 역시 부분적으로 억제 되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 볼 때 신장 근위세뇨관 세포에서 ginsenoside는 cAMP 및 PKC 활성 경로를 억제하여 고포도당에 의한 IGFs 분비 작용을 차단하는 것으로 나타났다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 전남대학교 학술연구비 지원 및 BK21 바이오치료 산업인력 양성사업팀의 지원을 받아 수행되었으며 아울러 농림수산 식품부 농림 기술개발사업의 친환경 농업연구사업단 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 깊이 감사드립니다.

인용문헌

- Locatelli, F., Pozzoni, P. and Del Vecchio, L. : Renal replacement therapy in patients with diabetes and end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, S25-29 (2004).
- Thomson, S. C., Vallon, V. and Blantz, R. C. : Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F8-15 (2004).
- Yung, S., Lee, C. Y., Zhang, Q., Lau, S. K., Tsang, R. C. and Chan, T. M. : Elevated glucose induction of thrombospondin-1 up-regulates fibronectin synthesis in proximal renal tubular epithelial cells through TGF-beta1 dependent and TGF-beta1 independent pathways. *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 1504-1513 (2006).
- Akturk, M., Arslan, M., Altinova, A., Ozdemir, A., Ersoy, R., Yetkin, I., Ayvali, E., Gonen, S. and Toruner, F. : Association of serum levels of IGF-I and IGF-BP-1 with renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Growth Horm. IGF Res.* **17**, 186-193 (2007).
- Tack, I., Elliot, S. J., Potier, M., Rivera, A., Striker, G. E. and Striker, L. J. : Autocrine activation of the IGF-I signaling pathway in mesangial cells isolated from diabetic NOD mice. *Diabetes* **51**, 182-188 (2002).
- Kiefer, D. and Pantuso, T. : Panax ginseng. *Am. Fam. Physician* **68**, 1539-1542 (2003).
- Yip, T. T., Lau, C. N., Kong, Y. C., Yung, K. H., Kim, J. H. and Woo, W. S. : Ginsenoside compositions of Panax ginseng C.A. Meyer tissue culture and juice. *Am. J. Chin. Med.* **13**, 89-92 (1985).
- Waki, I., Kyo, H., Yasuda, M. and Kimura, M. : Effects of a hypoglycemic component of ginseng radix on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals. *J. Pharmacobiodyn.* **5(8)**, 547-554 (1982).
- Xie, J. T., Mehendale, S. R., Wang, A., Han, A. H., Wu, J. A., Osinski, J. and Yuan, C. S. : American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. *Pharmacol. Res.* **49(2)**, 113-117 (2004).
- Cho, W. C., Chung, W. S., Lee, S. K., Leung, A. W., Cheng, C. H. and Yue, K. K. : Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **550(1-3)**, 173-179 (2006).
- Park, S. H., Shin, S. S. and Han, H. J. : High glucose levels alter angiotensin II-induced Ca²⁺ uptake via PKC and cAMP pathways in renal proximal tubular cells. *Kidney Blood Press. Res.* **24(2)**, 84-91 (2001).
- Klar, J., Sandner, P., Muller, M. W. and Kurtz, A. : Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.* **444(3)**, 335-344 (2002).
- Jackson, E. K. and Dubey, R. K. : Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281(4)**, F597-612 (2001).
- Kimura, M., Ishizawa, M., Miura, A., Itaya, S., Kanoh, Y., Yasuda, K., Uno, Y., Morita, H. and Ishizuka, T. : Platelet protein kinase C isoform content in type 2 diabetes complicated with retinopathy and nephropathy. *Platelets* **12(3)**, 138-143 (2001).
- Iori, E., Marescotti, M. C., Vedovato, M., Ceolotto, G., Avogaro, A., Tiengo, A., Del Prato, S. and Trevisan, R. : In situ protein Kinase C activity is increased in cultured fibroblasts

- from Type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia*. **46**(4), 524-530 (2003).
16. Chung, S. D., Alavi, N., Livingston, D., Hiller, S. and Taub, M. : Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J. Cell Biol.* **95**(1), 118-126 (1982).
 17. Daughaday, W. H. and Rotwein, P. : Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structure serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* **10**, 68-91 (1989).
 18. Bowsher, R. R., Lee, W. H., Apathy, J., O'Brien, P. J., Ferguson, A. L. and Henry, D. P. : 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 (1991).
 19. Sandra, A., Boes, M., Dake, B. L., Stokes, J. B. and Bar, R. S. : Infused IGF-I/IGFBP-3 complex causes glomerular localization of IGF-I in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **275**, E32-E37 (1998).
 20. Wang, S. N., Lapage, J. and Hirschberg, R. : Glomerular ultrafiltration and apical tubular action of IGF-I, TGF-beta, and HGF in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **56**(4), 1247-1251 (1999).
 21. Cummings, E. A., Sochett, E. B., Dekker, M. G., Lawson, M. L. and Daneman, D. : Contribution of growth hormone and IGF-I to early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* **47**(8), 1341-1346 (1998).
 22. Samikkannu, T., Thomas, J. J., Bhat, G. J., Wittman, V. and Thekkumkara, T. J. : Acute effect of high glucose on long-term cell growth: a role for transient glucose increase in proximal tubule cell injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**(1), F162-F175 (2006).
 23. Park, S. H., Choi, H. J., Lee, J. H., Woo, C. H., Kim, J. H. and Han, H. J. : High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF-beta. *Kidney Int.* **59**(5), 1695-1705 (2001).
 24. Cho, W. C., Chung, W. S., Lee, S. K., Leung, A. W., Cheng, C. H. and Yue, K. K. : Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **550**(1-3), 173-179 (2006).
 25. Kang, K. S., Yamabe, N., Kim, H. Y., Park, J. H. and Yokozawa, T. : Therapeutic potential of 20(S)-ginsenoside Rg(3) against streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **591**(1-3), 266-272 (2008).
 26. Kim, H. Y., Kang, K. S., Yamabe, N., Nagai, R. and Yokozawa, T. : Protective effect of heat-processed American ginseng against diabetic renal damage in rats. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8491-8497 (2007).
 27. Park, K. S., Lee, D. E., Sung, J. H. and Chung, S. H. : Comparisons of antidiabetic effect of panax ginseng on MLD STZ-induced diabetic rats in terms of time of administration. *J. Ginseng Res.* **26**(4), 191-195 (2002).
 28. Inada, A., Kanamori, H., Arai, H., Akashi, T., Araki, M., Weir, G. C. and Fukatsu, A. : A model for diabetic nephropathy: advantages of the inducible cAMP early repressor transgenic mouse over the streptozotocin-induced diabetic mouse. *J. Cell Physiol.* **215**(2), 383-391 (2008).
 29. Wang, J., Huang, H., Liu, P., Tang, F., Qin, J., Huang, W., Chen, F., Guo, F., Liu, W. and Yang, B. : Inhibition of phosphorylation of p38 MAPK involved in the protection of nephropathy by emodin in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **553**(1-3), 297-303 (2006).
 30. Park, S. H., Choi, H. J., Lee, J. H., Yang, I. S. and Han, H. J. : High glucose stimulates Ca²⁺ uptake via cAMP and PLC/PKC pathways in primary cultured renal proximal tubule cells. *Kidney Blood Press. Res.* **24**(1), 10-17 (2001).
 31. Koya, D. and King, G. L. : Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47**(6), 859-866 (1998).
 32. Whiteside, C. I. and Dlugosz, J. A. : Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in the diabetic milieu. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **282**(6), F975-980 (2002).
 33. Francki, A., Motamed, K., McClure, T. D., Kaya, M., Murri, C., Blake, D. J., Carbon, J. G. and Sage, E. H. : SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *J. Cell Biochem.* **88**(4), 802-811 (2003).