

Heparin이 사구체 메산지움 세포의 증식 및 Endothelin 생성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 신장질환연구소, 이화여자대학교 의과대학 내과학교실*

한대석 · 최규현 · 강신욱 · 강덕희* · 이호영

〈요 약〉

사구체 질환은 platelet-derived growth factor(PDGF), endothelin(ET)을 비롯한 다양한 매개 물질에 의하여 진행되는 것으로 알려져 있으며, 항응고제인 heparin은 혈관 평활근 세포의 증식 억제 효과가 알려지면서 혈관 평활근 세포와 특성이 유사한 메산지움 세포에서도 증식 억제 효과와 함께 사구체 질환에서의 치료 효과가 거론되어 왔다. 이에 저자들은 heparin의 사구체 메산지움 세포에 미치는 영향의 일부를 규명하기 위하여 백서 사구체 메산지움 세포에서 PDGF 자극에 의한 증식 및 ET 생성에 미치는 heparin의 영향을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) PDGF(10ng/ml)는 메산지움 세포의 증식을 대조군에 비하여 유의있게 증가시켰으며(512.0 ± 38.6 cpm/well vs. 3300.4 ± 432.5), 세포수도 유의있게 증가 시켰다($23.0 \pm 3.5 \times 10^3$ /well vs. 66.5 ± 8.9 , $p < 0.05$).

2) Heparin은 PDGF(10ng/ml) 자극에 의한 메산지움 세포의 증식을 용량 비례적으로 억제하였다($100\mu\text{g/ml}$, 3300.4 ± 432.5 cpm/well vs. 1452.5 ± 264.7 , $66.5 \pm 8.9 \times 10^3$ /well vs. 20.0 ± 6.5 , $p < 0.05$).

3) Heparin의 증식 억제 효과는 $100\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $56.2 \pm 8.0\%$ 로 chondroitin sulfate($48.9 \pm 5.4\%$)와 유사하였고, N-desulfated N-acetylated heparin($25.7 \pm 9.7\%$)보다 강력하였으나, N-desulfated heparin은 억제 정도가 $8.2 \pm 5.4\%$ 로 뚜렷한 증식 억제 효과를 관찰할 수 없었다.

4) PDGF는 25ng/ml 농도에서 메산지움 세포의 ET 생성을 유의있게 증가 시켰다(4.2 ± 0.7 pg/ml/mg of protein vs. 15.7 ± 1.4 , $p < 0.05$).

5) Heparin은 PDGF(25ng/ml) 자극에 의한 ET 생성을 용량 비례적으로 억제하였다($100\mu\text{g/ml}$, 12.6 ± 3.5 pg/ml/mg of protein vs. 2.5 ± 1.1 , $p < 0.05$).

이상의 결과로 보아 heparin은 메산지움 세포의 증식 및 ET의 생성을 억제함으로써 메산지움 세포의 증식을 동반한 사구체 신염의 치료에 도움이 될수 있을 것으로 추정되나, 억제 기전 및 항응고 효과를 고려한 생체내 투여 효과에 대한 향후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

서 론

메산지움 세포는 수축 기능을 통하여 사구체 여과율의 조절에 관여할뿐 아니라 사구체 신염과 당뇨병성 신증을 비롯한 다양한 사구체 질환에서 증식과 아울러

기질의 확장으로 사구체의 병변을 나타내는 주된 세포이며, 신부전증으로 진행되면서 나타나는 사구체 경화에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 이들 세포는 platelet-derived growth factor(PDGF), arginine vasopressin(AVP), endothelin(ET) 등 다양한 성장인자 또는 cytokine 에 대한 수용체를 보유하여^{2,3)}, 자극 물질에 따라 증식 또는 비후를 보이며 자가 분비 (autocrine) 또는 측분비(paracrine)를 통하여 스스로

본 연구는 1995년도 연세대학교 의과대학 일반과제 연구비로 이루어졌음.

분열을 촉진 또는 제한하는 것으로 알려지고 있다⁴⁾.

면역 복합체를 비롯한 여러 원인에 의하여 유발되는 사구체 신염은 다양한 성장인자에 의하여 매개되며, PDGF는 혈소판으로부터 유리되는 강력한 성장인자로서 메산지움 세포의 증식을 촉진하며, 메산지움 세포로부터 PDGF, ET 등을 생성, 분비하게 하는 중요한 매개물질의 하나이다⁵⁾. 또한 ET는 혈관 내피 세포로부터 분비되는 강력한 혈관 수축 물질로 사구체내 미세 순환을 조절하며 angiotensin II(Ang II) 자극에 의한 메산지움 세포의 증식에 관여함이 알려지면서 역시 사구체신염의 매개물질의 하나로 인정되고 있다⁶⁾.

Heparin은 항응고 작용이 있는 분자량 5-50 KD의 glycosaminoglycan으로 임상에서 널리 사용되고 있으며, 혈관 평활근 세포의 증식을 억제할 뿐 아니라 최근에는 항고혈압 효과도 보고된 바 있다⁷⁻⁹⁾. Purkerson 등¹⁰⁾은 신장을 일부 절제한 백서에서 heparin의 투여로 항응고 효과와 무관하게 잔여 신장의 사구체 경화가 지연됨을 보고하여 heparin이 메산지움 세포에 직접 작용할 가능성과 함께 사구체 신염에서의 진행 억제 가능성을 제시하였다. 메산지움 세포는 혈관 평활근 세포와 기원과 특성이 유사하며, 최근 강 등¹¹⁾은 백서 사구체 메산지움 배양 세포에서 PDGF에 의한 세포 증식을 heparin이 유의하게 억제 시킴을 보고하였다.

이에 본 연구자는 heparin에 의한 메산지움 세포의 증식 억제 효과와 함께 측분비를 통한 사구체 손상 및 미세 혈관 수축에 따른 사구체 경화 과정을 매개할 것으로 추정되는 ET의 생성에 대하여 heparin에 의한 억제 가능성을 규명하기 위하여, 대표적인 메산지움 세포의 성장인자인 PDGF 자극에 의한 백서 사구체 메산지움 세포의 증식 및 ET 생성에 heparin 투여가 미치는 영향을 실험하였다.

재료 및 방법

1. 재료

PDGF, heparin(intact, N-desulfated, N-desulfated N-acetylated), chondroitin sulfate, RPMI-1640 배양액, bovine serum albumin, trypsin/EDTA 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO. USA)

로부터 구입하였으며, 우태아 혈청(fetal calf serum)은 Gibco BRL(Gaithersburg, MD. USA) 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 백서 사구체 메산지움 세포의 배양

Choi 등¹²⁾의 방법을 참고하여 시행하였다. 백서를 단두하여 희생시켜 신장을 적출한다음 피질부분만을 잘라내어 penicillin, streptomycin이 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 옮긴후 pore size 200, 150, 75 μ m sieve의 순서대로 통과 시킨다. 75 μ m sieve에 남은 사구체를 PBS에 재부유 시킨후 900 rpm에서 5분간 원침하여 상층액을 버린후 20% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배양액을 넣고 분리된 사구체의 순수도를 확인한후, 배양용기에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ humidified incubator에서 배양하였다. 배양액내 L-valine을 D-valine으로 치환하여 가능한 섬유아세포의 증식을 최소화하고, anti-desmin antibody(DAKO, Inc, Japan)와 anti-cytokeratin antibody(DAKO Inc, Japan)로 염색하여 상피세포의 오염여부를 확인한후 계대 배양하여 횡수 3-10회의 세포를 대상으로 실험하였다.

2) PDGF 및 Heparin의 투여

각 well에서 confluency를 이룬 세포를 PDGF 투여전 24 시간동안 0.5% 우태아 혈청이 함유된 배양액으로 바꾸어 배양한 후 0.1% bovine serum albumin이 함유된 우태아 혈청이 들어있지 않은 배양액으로 다시 바꾸고나서 PDGF를 첨가하고 24시간 동안 자극하였으며 heparin의 효과는 예정된 농도가 되도록 동시에 첨가하여 실험하였다.

3) [³H]thymidine uptake 측정과 세포수 산정

Choi 등¹²⁾의 방법에 따라 96 well plate에 분주하고(1×10^4 cells/well) 배양한 다음 앞서 기술된 방법에 따라 PDGF를 희석하여 10ng/ml로 자극한후 [³H]thymidine(New England Nuclear, Boston, MA. USA)을 1 μ Ci/well 씩 첨가하여 24 시간동안 배양한 세포를 trypsin 처리후 cell harvester로 glass filter에 흡착시켜 실온에서 약 6 시간동안 건조시킨 다음 scintillation tube에 2ml scintillation cocktail을 넣고 filter에 흡착된 양을 β -counter로 측정하였다. 세포수의 산정도 Choi 등¹²⁾의 방법에 따

라 시행하였으며, 24-well culture plate에 5×10^3 cells/well 씩 분주하고 배양한후 [^3H] thymidine uptake에서와 같은 방법으로 자극하고 5일간 배양한 다음 trypsin/EDTA로 이탈시켜 세포부유액을 만든다. 이어서 0.4% trypan blue로 염색하여 손상되지 않은 세포를 구분하고 hemocytometer를 이용하여 2번 측정하였다.

4) ET의 측정

최 등¹³⁾의 방법을 참고하여 효소면역 측정법으로 Endothelin-1 immunoassay kit(R & D systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 측정하였다. 메산지움 세포를 6well plate(Falcon Co. Oxford, UK)에 1×10^6 /well 씩 분주하고 앞서 기술한 방법에 따라 PDGF 및 heparin으로 처리한후 배양 상층액을 수거하여 4°C에서 5분간 1000 rpm으로 원침한후 상층액을 -70°C에 보관하였다. 각 well에 100 μl 의 anti-ET-1 conjugate을 첨가한후 100 μl 씩의 검체를 standard와 같이 첨가하고 10분간 잘 혼합하였다. 실온에서 1 시간 추가 배양한후 Wash buffer로 6회 세척하고나서 100 μl 의 substrate를 첨가하고 30분간 배양한 다음 1 M HCl 을 첨가한후 ELISA reader 로 450nm에서 well당 optical density를 측정하였다. 배양 상층액내 단백질농도는 Abbott Laboratories (AbbottPark, IL, USA)의 protein assay kit를 이용하여 측정하였다.

6) 통계학적 분석

각 실험에서 얻어진 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하고 통계학적 비교는 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 Scheffe's F-test로 검정을 시행하여 p value 0.05 미만에서 유의성을 두었다.

결 과

1. Heparin이 PDGF 자극에 의한 메산지움 세포의 증식에 미치는 영향

PDGF 는 10ng/ml 의 농도에서 메산지움 세포의 [^3H]thymidine uptake을 대조군 512.0 ± 38.6 cpm/well 에 비하여 3300.4 ± 432.5 cpm/well로 유의있게 증가시켰으며, 세포수 산정에서도 대조군 $23.0 \pm 3.5 \times 10^3$ /well 에 비하여 $66.5 \pm 8.9 \times 10^3$ /well으로 유의있는 증가를 보였다(Table 1, $p < 0.05$). Heparin과 PDGF

의 동시 투여는 PDGF(10ng/ml) 자극에 의한 [^3H]thymidine uptake을 heparin 농도 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의있게 억제 하였으며, 25 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 PDGF 단독 투여군의 3300.4 ± 432.5 cpm/well에 비하여 각각 1848.9 ± 297.8 cpm/well, 1452.5 ± 264.7 cpm/well으로 현저히 감소하였다(Table 1, $p < 0.05$). 또한 세포수 증가의 비교에서도 [^3H]thymidine uptake의 결과와 유사하게 heparin 투여시 PDGF 자극에 의한 세포수의 증가가 용량 비례적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다(Table 1, $p < 0.05$).

2. Heparin 특성에 따른 PDGF 자극에 의한 메산지움 세포의 증식 억제 효과의 비교

Heparin 투여에 의한 [^3H]thymidine uptake 억제 효과의 정도는 다음과 같은 식에 의해 산출한 % inhibition으로 나타내었다.

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{cpm of cells treated with PDGF and heparin}}{\text{cpm of cells treated with PDGF}} \right) \times 100$$

Intact heparin은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $56.2 \pm 8.0\%$ inhibition 의 억제 효과를 나타내었으며, 동일한 농도에서 N-desulfated heparin은 $8.2 \pm 5.4\%$ inhibition으로 뚜렷한 억제 효과를 관찰할수 없는 반면에 N-desulfated N-acetylated heparin 은 $25.7 \pm 9.7\%$ inhibition로 intact heparin 보다는 약한 억제 효과를 보였다(Fig. 1). 또 다른 glycosaminoglycan인 chondroitin sulfate도 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 PDGF 자극에 의한 [^3H]thymidine uptake에 대하여 intact heparin과 유사한 $48.9 \pm 5.4\%$ inhibition 의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1).

3. PDGF 투여가 메산지움 세포의 ET 생성에 미치는 영향

PDGF 는 메산지움 세포의 ET 생성을 대조군 4.2 ± 0.7 pg/ml/mg of protein에 비하여 10ng/ml, 25ng/ml의 농도에서 각각 5.8 ± 0.8 , 15.7 ± 1.4 로 용량 비례적으로 증가시켰으며, 25ng/ml의 농도에선 유의있는 증가를 보였다(Fig. 2, $p < 0.05$).

Table 1. Effects of Heparin on PDGF-induced [³H]thymidine Uptake and Proliferation of Cultured Rat Mesangial Cells

	[³ H]thymidine uptake (cpm/well)	Number of cells (×10 ³ /well)
Control	512.0±38.6	23.0±3.5
PDGF ¹	3300.4±432.5	66.5±8.9
PDGF + Heparin 5 μg/ml	2079.7±198.0*	50.5±5.6*
PDGF + Heparin 25 μg/ml	1848.9±297.8*	31.5±4.6*
PDGF + Heparin 100 μg/ml	1452.5±264.7*	20.0±6.5*

¹: Platelet-derived growth factor, 10ng/ml

*: p<0.05 vs. PDGF, alone

N=6 in [³H]thymidine uptake, 3 in number of cells

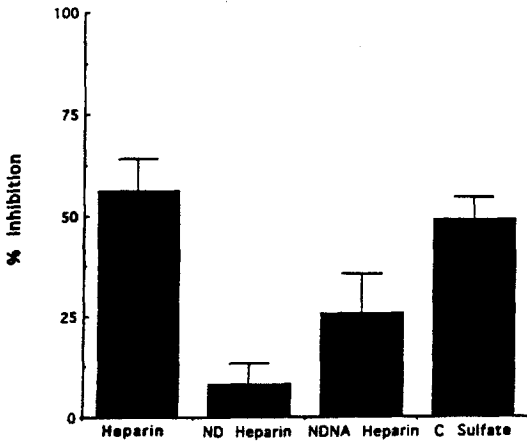


Fig. 1. Comparison of the inhibitory effects of intact heparin, N-desulfated(ND) heparin, N-desulfated N-acetylated(NDNA) heparin and chondroitin(C) sulfate on PDGF-induced proliferation of cultured rat mesangial cells. Data are expressed as percent inhibition of PDGF(10ng/ml)-induced proliferation at a concentration of 100 μg/ml, respectively(N=6, Mean±S.D).

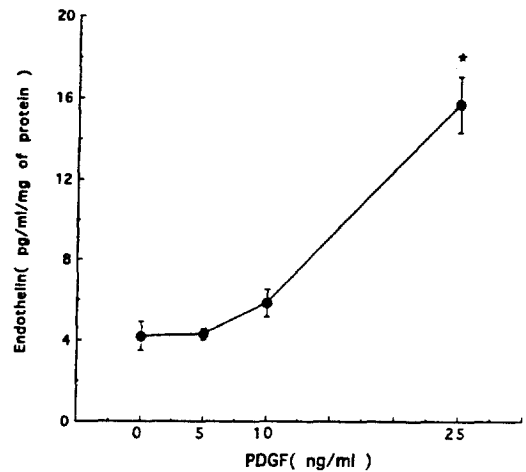


Fig. 2. Effects of PDGF on endothelin production in cultured rat mesangial cells.

*: p<0.05, compared to the value without addition of PDGF(N=3).

고 안

4. Heparin 이 매산지움 세포의 PDGF 자극에 의한 ET 생성에 미치는 영향

Heparin 의 매산지움 세포의 PDGF 자극에 의한 ET 생성에 대한 억제 효과 실험에서 heparin은 PDGF(25ng/ml) 자극에 의한 ET 생성을 12.6±3.5 pg/ml/mg of protein로 부터 50 μg/ml 농도와 100 μg/ml의 농도에서 각각 5.8±2.4, 2.5±1.1pg/ml/mg of protein로 현저히 억제 하였으며, 매산지움 세포의 증식에 대한 억제 효과에서와 같이 용량 비례적인 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, p<0.05).

Heparin은 임상에서 항응고제로 널리 사용되는 mucopolysaccharide로 hexosamine과 uronic acid residue의 위치에 따라 다양한 구조를 가지며 항응고 효과의 유무가 결정된다^{7, 10}. 또한 간, 심장등의 장기에서도 발견되며, 사구체 상피세포에서도 heparin과 유사한 물질이 분비됨이 알려지면서 heparin의 항응고 효과 이외의 특성에 관한 많은 연구가 있었다^{14, 15}. Mandal 등⁹은 자연발생적인 고혈압 백서(spontaneously hypertensive rat)에서 heparin의 투여로 항고혈압 효과를 보고하였으며, Castellot 등¹⁶은 혈관 평활근 세포의 증식에 대한 억제 효과를 보고하였다.

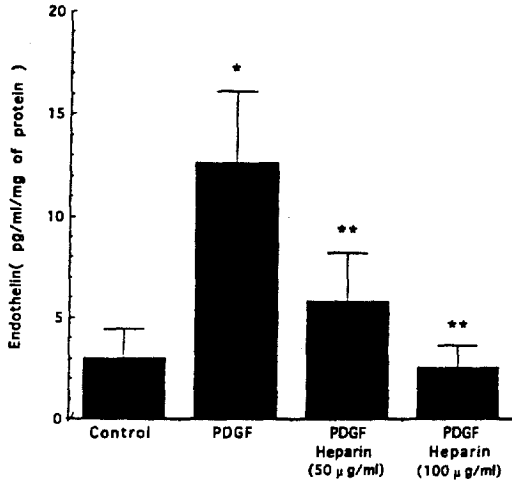


Fig. 3. Effects of heparin on PDGF-induced endothelin production in mesangial cells. The concentration of PDGF was 25ng/ml(N=4).
* : $p < 0.05$, compared to control
** : $p < 0.05$, compared to PDGF

신장에 대한 효과로 Kincaid-Smith 등¹⁷⁾은 반월형 사구체 신염에서 치료 효과를 보고하였으며, Purkerson 등¹⁰⁾은 신장이 부분절제된 백서의 잔여 신장에서 신기능의 저하가 heparin의 투여로 지연됨을 관찰한 바 있으나 heparin의 메산지움 세포에 미치는 직접적인 영향에 대해서 여전히 연구 대상이 되어 왔다.

PDGF는 혈소판의 α -granule에 존재하며 단핵구, 내피세포 및 대식 세포에서도 분비되는 메산지움 세포의 강력한 분열 유발물질로 protein kinase C(PKC)의 활성화와 세포내 칼슘의 상승을 초래하여 다양한 세포 반응을 일으킨다^{3, 5)}. 본 연구에서 PDGF는 10 ng/ml의 농도에서 현저한 [³H]thymidine uptake의 증가와 세포 증식을 유발하여 강 등¹¹⁾, Kohno 등¹⁸⁾의 연구와 유사한 결과를 얻었다. 또한 Heparin의 투여는 PDGF 자극으로 유발된 [³H]thymidine uptake의 증가와 세포 증식을 의의있게 억제하였다. Heparin은 5 µg/ml의 농도에서도 의의있는 억제 효과를 보였으며 용량 비례적으로 억제되어 메산지움 세포의 증식에 대한 강력한 억제제로 생각된다. Rosenberg⁷⁾는 분획하지 않은 heparin의 항증식 효과의 활동도를 155U/mg로 보고한 바 있어, 본 연구에서 최저 heparin 농도가 5 µg/ml이었음을 고려할때 heparin의 투여시 사구체내 농도는 확인 할 수 없으나 매우 소량으로도 증식 억제 효과를 얻을수 있을 것으로 기대된다.

Heparin의 메산지움 세포의 증식 억제 효과의 기전은 확실히 알려져 있지 않으나 Reiley 등⁸⁾이 혈관 평활근 세포에서 heparin이 mid G1 phase의 protooncogene인 c-myc의 발현을 감소 시키는 반면 c-myc, c-fos의 발현에는 영향을 미치지 않음을 보고하여 혈관 평활근 세포와 특성이 유사한 메산지움 세포에서도 mid G1 phase와 같은 특정 세포주기에 선택적으로 작용할 것으로 생각된다. 또한 PDGF 자극후 세포 증식에 이르는 신호 전달계의 각 부위에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 우선 PDGF와 PDGF 수용체와의 결합 및 수용체 발현을 제한할수 있으며, 세포내 주된 분열 자극 경로인 PKC 활성화 경로에 영향을 미칠수 있다. 본 연구에서 PDGF 수용체에 대한 실험은 없었으나 PDGF 자극에 의한 ET 생성도 억제함으로 보아 heparin이 PDGF와 수용체의 결합이나 수용체의 발현에도 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. Heparin의 PKC 활성화에 대한 직접적인 억제는 확실치 않은 반면 Castellot 등¹⁹⁾과 Wright 등²⁰⁾은 각각 PKC 활성화 물질인 mezerein과 phorbol ester에 의한 혈관 평활근 세포의 증식 및 3T3 섬유아 세포의 c-fos, c-myc 발현의 억제를 보고한 바 있어 PKC 활성화 이하의 단계에 영향을 미쳤을 것으로 추정되나 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Heparin의 구조적인 특성에 따른 증식 억제 효과를 비교하기 위한 실험에서 항응고 작용이 없는 N-desulfated heparin은 증식 억제 효과를 나타내지 않았으며 N-desulfated N-acetylated(NDNA) heparin은 항응고 작용은 없으나 증식 억제 효과가 intact heparin의 50% 정도로 회복되어 구조상 N-sulfation이 증식 억제 효과에 중요함을 제시하는 결과로 생각된다. Castellot 등¹⁶⁾도 혈관 평활근 세포에서의 증식 억제 효과가 N-sulfation과 관련이 있음을 보고한 바 있다. NDNA heparin도 백서에서 부분 절제된 잔여 신장의 사구체 경화의 진행을 intact heparin과 동일한 정도로 지연시킴이 보고된 바 있어¹⁰⁾, 메산지움 세포의 항증식 효과에서도 NDNA heparin과 intact heparin 사이에는 차이가 없을 것으로 예상되었으나, 본 연구에서 NDNA heparin의 경우 intact heparin보다 동일 농도에서 증식 억제 효

과가 낮았으므로 N-sulfation으로 인한 heparin의 구조적 특성이 증식 억제 효과에 중요할 것으로 사료된다. 또한 사구체내 존재하는 mucopolysacchaide로 알려진 dermatan sulfate, chondroitin sulfate 등도 내인성 증식 억제 물질로 보고된 바 있어²¹⁾, chondroitin sulfate와 heparin의 증식 억제 효과를 비교한 결과 동일한 농도에서 항증식 효과에는 유의한 차이를 관찰할 수 없어, 항증식 효과가 heparin 특유의 작용보다는 다른 glycosaminoglycan에서도 관찰할 수 있는 특성으로 판단된다. 향후 heparin과 다른 glycosaminoglycan과의 병용 투여를 통한 상승 작용의 유무 등에 대한 추가 실험과 아울러 PDGF 이외의 다른 성장인자들에 의한 증식에 미치는 영향에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

PDGF는 직접적으로 메산지움 세포의 증식을 유발할 뿐 아니라 메산지움 세포로부터 PDGF의 생성, 분비를 유발하고 세포 표면에 PDGF 수용체의 발현을 촉진한다^{2, 3)}. 또한 메산지움 세포로부터 다른 성장인자의 분비를 유발함으로써 촉진비 기전을 통하여 증식 촉진 효과를 최대화하게 된다²²⁾. Bakris 등⁶⁾은 Ang II 자극에 의한 메산지움 세포의 증식이 ET에 대한 단일클론 항체에 의하여 억제됨을 보고하여 Ang II에 의한 세포 증식에 Ang II 자체 뿐 아니라 ET에 의하여 일부 조절됨을 시사하였다. 본 실험에서 PDGF 자극시 용량 비례적으로 ET의 증가를 관찰하여 PDGF 자극에 의한 메산지움 세포의 증식도 ET에 의하여 부분적으로 매개될 수 있음을 추정할 수 있었으나 ET 단일클론 항체의 투여에 의한 억제 여부 등의 추가 실험이 필요하다고 사료된다.

ET는 21개의 아미노산으로 구성된 강력한 혈관 수축 작용을 갖는 물질이다¹³⁾. 현재까지 3종의 ET 유전자 밝혀졌으며, ET-1, 2, 3 가운데 ET-1이 혈액에서 분리되는 주된 형태이다^{13, 23)}. Sakamoto 등²⁴⁾은 백서 메산지움 세포로부터 ET-1을 분리하였으며, ET는 신장에서 메산지움 세포내 phospholipase C, A₂의 활성화를 통하여 증식, 수축 및 eicosanoid 생성 등에 관여할 뿐 아니라²⁵⁾, c-fos 발현 등 혈관 수축 작용이외에 메산지움 세포의 다양한 기능을 조절한다²³⁾. 또한 transforming growth factor- β , thrombin 등의 자극으로도 분비됨이 보고되어²²⁾, ET에 의한 수축, 수축 세포의 수축을 통한 사구체 혈액학적 조절

이 신기능 유지에 중요할 것으로 생각된다. 특히 심한 고혈압과 신실질의 손상이 있는 경우에 혈장 ET치의 상승이 보고된 바 있어¹³⁾, 사구체신염 및 신부전의 진행과 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 PDGF 투여는 메산지움 세포로부터 ET의 용량 비례적인 생성의 증가를 보여, 사구체 신염을 비롯한 다양한 사구체 질환에서 메산지움 세포가 PDGF의 자극을 받을 경우 ET 분비를 통한 촉진비 기전에 의하여 증식의 촉진뿐 아니라 미세 순환에도 영향을 미침으로서 사구체 경화로의 진행에 관여할 가능성을 제시하였다. Kohno 등²²⁾도 PDGF 자극시 ET 생성의 증가를 보고하였으며 BB type에서 가장 현저하다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다. Floege 등²⁶⁾은 anti-Thy 1.1 mesangioproliferative glomerulonephritis를 유발한 실험 동물에서 PDGF-B chain의 발현의 증가를 보고하면서 메산지움 세포의 증식과 사구체 경화의 진행에 PDGF 및 PDGF 자극에 의한 다른 매개 물질의 관여 가능성을 주장한 바 있다. 본 연구의 실험과 Zoja 등²⁵⁾의 ET의 자극에 의한 혈관 수축성 thromboxane A₂ 증가에 관한 보고를 고려할 때 PDGF에 의하여 매개되는 사구체 손상은 부분적으로 ET에 의하여 매개될 것으로 사료된다.

메산지움 세포로부터 ET의 생성은 PDGF, Ang II를 비롯한 phospholipase C와 관련된 신호전달계를 갖는 성장 인자나 혈관수축 물질에 의하여 촉진되며 PKC 활성화 물질인 Phorbol ester에 의하여 역시 생성이 증가된다^{6, 22)}. Sakamoto 등²⁴⁾은 H-7 또는 phorbol ester의 전처치를 통하여 PKC 활성화를 제한하였을 경우 ET의 생성이 저하되었으며, forskolin이나 isoproterenol로 세포내 cyclic AMP 농도를 증가시킬 경우에도 ET의 생성이 증가하였다고 보고하였다. 또한 forskolin 등의 효과는 protein kinase A(PKA) 억제제에 의하여 소실됨을 관찰하여 메산지움 세포내 ET 생성의 조절에 PKC 활성화를 통한 촉진 경로와 PKA가 관여되는 억제 경로의 2 과정을 제시하였다²⁴⁾. Kohno 등¹⁸⁾은 PDGF에 의한 ET 생성의 증가에서 ET 수용체에 의한 negative feedback 가능성을 추정하였으며, Zoja 등²⁵⁾은 ET 자극에 의한 prostaglandin 생성의 증가를 보고하면서 이들에 의한 조절 가능성을 추정하기도 하였다.

본 실험에서 Heparin은 PDGF 자극에 의한 ET

의 생성을 용량 비례적으로 억제하였다. 혈관 내피 세포에서의 ET 분비는 유전자 전사(transcription) 단계에서 조절되며¹³⁾, ET mRNA의 발현은 thrombin, phorbol ester 등에 의하여 증가되는 것으로 알려진 바 있어²³⁾, 이들과 유사한 신호 전달계를 가진 PDGF 자극시 ET mRNA 발현의 증가가 예상된다. 따라서 heparin의 억제 효과는 PKC를 비롯한 PDGF의 신호전달계, ET mRNA 발현 및 ET 생성 단계의 3 과정 가운데 부분 또는 전체적으로 작용할 것으로 추정된다. Heparin에 따른 PKC 활동도의 변화에 대한 보고는 확인할 수 없었으나, Kohno 등²²⁾은 phorbol ester 전처치후 ET 생성 억제 효과가 완화됨을 보고하여 heparin에 의한 ET생성 억제 효과의 PKC 의존성을 제시하였다. 반면에 heparin의 증식 억제 효과에서 PKC 의존성의 여부가 뚜렷치 않음을 고려할 때 증식 억제 기전과 동일한 경로로 ET의 생성을 억제할 경우 ET의 mRNA 발현 또는 그 이후 ET 합성에 대한 억제도 heparin 작용 기전의 하나가 될 수 있을 것으로 추정되나 본 연구에서는 ET의 mRNA 발현 또는 그 이후 단백 합성에 대한 실험이 없었으므로 확인할 수는 없었다. 또한 heparin의 증식 억제 효과로 인하여 세포수의 감소에 따른 ET의 생성이 저하되었을 가능성도 배제할 수 없으나 배양 상청액내 동일 단백질 농도당 측정된 ET 농도의 차이이므로 세포수의 차이에 의한 결과는 아닐 것으로 사료된다. 따라서 heparin이 ET의 생성에 미치는 영향을 좀더 규명하기 위하여 이상의 억제 기전에 대한 추가 연구와 아울러 항응고 작용이 없는 heparin에서도 동일한 ET 생성 억제 효과가 있는지에 대한 실험이 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 heparin의 투여는 사구체내 메산지움 세포의 증식과 ET 생성의 억제를 초래하는 것으로 사료되며 메산지움 세포의 증식을 동반하는 사구체 질환의 진행을 일부 완화 시키고, 사구체 미세 순환의 개선으로 사구체 경화로 인한 신기능 저하를 방지하는데도 도움이 될 것으로 기대되나, 억제 기전 및 항응고 효과를 고려한 생체내 투여 효과에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구에 많은 도움을 주신 면역학 검사실의 김은희 기사와 연세대의 임상의학 연구센터 류왕식 부교수님께 깊은 감사를 드립니다.

= Abstract =

The Effects of Heparin on Proliferation and Endothelin Production in Glomerular Mesangial Cells

Dae Suk Han, M.D., Kyu Hun Choi, M.D.
Shin Wook Kang, M.D., Duk Hee Kang, M.D.*
and Ho Yung Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, the Institute of Kidney Disease, Yonsei University, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Women's University, Seoul, Korea*

Glomerular mesangial cells have receptors to various growth factors and vasoactive peptides such as platelet-derived growth factor(PDGF), and endothelin(ET), which are important mediators for the progression of glomerular diseases. Heparin has been reported to have anti-proliferative effects in vascular smooth muscle cells and mesangial cells. Furthermore, the treatment with heparin suppresses the progression of experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. The present study was carried out to further ascertain inhibitory effects of heparin and possible mechanisms of its action, particularly in relation to the effect on ET production of mesangial cells. The effect of heparin on PDGF-stimulated proliferation was assessed by [³H]thymidine uptake as well as the increase of number of cells, and ET production was evaluated in cultured rat mesangial cells.

The results were as follows:

1) PDGF at a concentration of 10 ng/ml stimulated [³H]thymidine uptake significantly(mean±S.D., 512.0±38.6 cpm/well vs. 3300.4±432.5, p<0.05), and also increased the number of cells significantly, compared to control(23.0±3.5×10³/well vs. 66.5±8.9, p<0.05).

2) Heparin inhibited the PDGF(10ng/ml)-stimulated proliferation of mesangial cells in a dose-dependent manner(100 μg/ml, 3300.4±432.5cpm/well vs. 1452.5±264.7, 66.5±8.9 cpm/well vs. 20.0±6.5, p<0.05).

3) While N-desulfated heparin did not show the inhibitory effect on [³H]thymidine uptake, the potency of intact heparin(100 μg/ml) was 56.2±8.0% inhibition, which was similar to chondroitin sulfate(48.9±5.4%). N-desulfated N-acetylated heparin showed 25.7±9.7% inhibition.

4) PDGF stimulated the production of ET in a dose-dependent manner(25ng/ml, 4.2±0.7pg/ml/mg of protein vs 15.7±1.4, p<0.05).

5) Heparin inhibited the PDGF(25ng/ml)-stimulated ET production in a dose-dependent pattern(100 μg/ml, 12.6±3.5 vs. 2.5±1.1, p<0.05).

From the above results, it is concluded that heparin has a significant inhibitory effect on proliferation and ET production in mesangial cells, and this anti-proliferative effect of heparin appears to be related to the structure of heparin, especially N-sulfation. In conclusion, heparin may reduce glomerular injury through these inhibitory effects on mesangial cells, but the further studies such as in vivo experiments considering the anticoagulation effect are needed.

참 고 문 헌

- 1) Abboud HE: *Growth factors in glomerulonephritis. Kidney Int* 43:252-267, 1993
- 2) Floege J, Topley N, Resch K: *Regulation of mesangial proliferation. Am J Kidney Dis* 17: 673-676, 1991
- 3) Abboud HE, Poptic E, DiCorieto P: *Production of platelet growth factor like protein by rat mesangial cell. J Clin Invest* 80:675-683, 1987
- 4) Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, and Marx M: *Cytokines and mesangial cells. Kidney Int* 43(suppl):26-33, 1993
- 5) Floege J, Topley N, Hoppe J, Barrett TB, Resch K: *Mitogenic effect of platelet-derived growth factor in human glomerular mesangial cells: modulation and/or suppression by inflammatory cytokines. Clin Exp Immunol* 86:334-341, 1991
- 6) Bakris GL, Re RN: *Endothelin modulates angiotensin II-induced mitogenesis of human mesangial cells. Am J Physiol* 264:F937-F942, 1993
- 7) Rosenberg RD: *Biologic action of heparin. Seminars in Hematology* 14:427-440, 1977
- 8) Reilly CF, Kindy MS, Brown KE, Rosenberg RD, Sonensheinn GE: *Heparin prevents vascular smooth muscle cell proliferation through the G1 phase of the cell cycle. J Biol Chem* 264:6990-6995, 1989
- 9) Mandal AK, Lyden TW, Saklayen MG: *Heparin lowers blood pressure: Biological and clinical perspectives. Kidney Int* 47:1017-1022, 1995
- 10) Purkerson ML, Tollefsen DM, Klahr S: *N-desulfated acetylated heparin ameliorates the progression of renal disease in rat with subtotal ablation. J Clin Invest* 81:69-74, 1988
- 11) 강덕희, 윤건일, 강신욱, 최규현, 이호영, 한대석: Heparin이 백서 사구체 메산지움 배양 세포의 증식에 미치는 영향. *대한내과학회지* 51:303-316, 1996
- 12) K.H. Choi, S.W. Kang, S.W. Lee, H.Y. Lee, D.S. Han: *The effect of lovastatin on proliferation of cultured rat mesangial and aortic smooth muscle cells. Yonsei Med J* 36:251-261, 1995
- 13) 최규복, 김성남, 윤건일: 고혈압 환자의 혈장 endothelin 농도. *대한내과학회지* 48:302-310, 1995
- 14) Castellot JJ, Hoover RL, Harper PA, Karnovsky MJ: *Heparin and glomerular epithelial cell-secreted heparinlike species inhibit mesangial cell proliferation. Am J Pathol* 120:427-435, 1985
- 15) Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Doi T, Striker GE: *Biology of disease: mesangial cell turnover: effect of heparin and peptide growth factors. Lab Invest* 64:446-456, 1991
- 16) Castellot JJ, Beeler DL, Rosenberg RD, Karnovsky MJ: *Heparin to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells. J Cell Physiol* 120:315-320, 1984
- 17) Kincaid-Smith P, Saker BM, Fairley KF: *Anticoagulant in "irreversible" acute renal failure. Lancet* 2:1360-1368, 1968
- 18) Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T: *Endothelin modulates the mitogenic effect of PDGF on glomerular mesangial cells. Am J Physiol* 266:F894-F900, 1994
- 19) Castellot JJ, Pukac LA, Caleb BL, Wright TC Jr., Karnovsky MJ: *Heparin selectively inhibits a protein kinase C-dependent mechanism of cell cycle progression in calf aortic smooth muscle cells. J Cell Biol* 109:3147-3155, 1989
- 20) Wright TC, Pukac LA, Castellot JJ, Karnovsky MJ, Levine RA, Kim HY, Campis J: *Heparin suppresses the induction of c-fos and c-myc mRNA in murine fibroblasts by selective inhibition of a protein kinase C-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci(USA)* 86:3199-3203, 1989
- 21) Wang A, Templeton DM: *Inhibition of mitogenesis and c-fos induction in mesangial cells by heparin and heparan sulfates. Kidney Int* 49:437-448, 1996
- 22) Kohno M, Ikeda M, Johchi M, Horio T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T: *Interaction of PDGF*

- and natriuretic peptides on mesangial cell proliferation and endothelin secretion. Am J Physiol* 265:E673-E679, 1993
- 23) Zoja C, Orsio S, Perico N, Benigni A, Morigi M, Benatti L, Rambaldi A, Remuzzi G: *Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor- β , thrombin, and a thromboxane A₂ analogue. Lab Invest* 64:16-20, 1991
- 24) Sakamoto H, Sasaki S, Nakamura Y, Fushimi K, Marumo F: *Regulation of endothelin-1 production in cultured rat mesangial cells. Kidney Int* 41:350-355, 1992
- 25) Zoja C, Benigni A, Renzi D, Piccinelli A, Perico N, Remuzzi G: *Endothelin and eicosanoid synthesis in cultured mesangial cells. Kidney Int* 37:927-933, 1990
- 26) Floege J, Eng E, Young BA, Couser WG, Johnson RJ: *Heparin suppresses mesangial cell proliferation and matrix expansion in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. Kidney Int* 43:369-380, 1993
-