

원저

紫河車藥鍼이 糖尿誘發 흰쥐의 腎臟保護機能에 미치는 影響

유진호 · 최도영 · 강성길

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Renoprotective Effect of Hominis Placenta Aqua-acupuncture in Streptozotocin Induced Diabetic Rats

You Jin-ho, Choi Do-young and Kang Sung-gil

Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University.

Objective : This study was undertaken to determine whether Hominis Placenta(HP) aqua-acupuncture exerts renoprotective effect on diabetic nephropathy induced by streptozotocin(STZ) in rats.

Methods : In order to study the renoprotective effect of HP aqua-acupuncture, experimental animals were divided into 5 groups and treated for 2 weeks as follows: control group was injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, 5% HP aqua-acupuncture group was injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, 10% HP aqua-acupuncture group was injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, normal group was injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, and Captopril group was administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats.

Results : While HP aqua-acupuncture did not reduce any body weight, index of kidney hypertrophy, the plasma glucose concentration and BUN respectively, HP aqua-acupuncture showed lowering urinary albumin excretion rate and serum creatinine as compared with the control group. Gene and protein expressions of TGF- β 1 and fibronectin in kidney, one of the extracellular matrix proteins were investigated. There were significant differences in expression levels in HP aqua-acupuncture group as compared with the control group, and 100 μ g/ml and 500 μ g/ml of HP depressed apoptosis, showing in a dose dependent

- 접수 : 2002년 6월 29일 · 수정 : 7월 9일 · 채택 : 2002년 7월 13일
- 교신저자 : 강성길, 서울시 동대문구 회기동1, 경희대학교 한의과대학 침구학교실
(Tel. : 02-958-9193) E-Mail : kskacu@orgio.net

manner. In the HE staining, HP aqua-acupuncture inhibited the injury of glomerulus and proximal convoluted tubule.

Conclusions : HP aqua-acupuncture showed the renoprotective effect possibly through suppressions of TGF- β 1 and fibronectin expressions in kidney.

Key words : Hominis Placenta, diabetic nephropathy, TGF- β 1, fibronectin, apoptosis

I. 緒 論

당뇨병성 신증(Diabetic Nephropathy)은 당뇨병 환자에 있어서 중요한 만성 합병증 중의 하나로 신 이식이나 장기간 투석치료를 받아야 하는 사람들 중 에서 당뇨병환자가 약 35%를 차지하고 있으며, 최근 국내에서도 당뇨병성 신부전 발생으로 입원하게 되는 환자수가 계속 증가하고 있는 실정이다^{1),7)}.

이러한 당뇨병으로 인한 신장병변의 발생기전에 대해서는 아직까지 확실하게 알려져 있지 않지만 장 기간의 고혈당에 의한 대사의 변화와 함께 유전적 소인이 관여하는 것으로 생각되며, 사구체의 경화와 세뇨관의 비후가 나타나 신장의 크기가 커지게 된다. 이때 혈청 크레아티닌치는 신피질 간질의 섬유화에 비례하여 높아지고, laminin B₁ 및 TGF- β 1의 mRNA 표현이 증가된다¹⁾.

당뇨병성 신증을 韓醫學에서는 消渴을 失治, 誤治 또는 적절하지 못한 치료로 인하여 경과가 오래되어 발생하는 것으로 보며, 점차 진행될수록 腎臟의 기능이 衰竭해져 形體消瘦, 身疲乏力, 面色無華, 腰膝痠軟, 納少腹脹, 口渴多飲, 大便乾結, 脈細無力 등의 종합적인 증상이 나타나는 것으로 보고 있다¹⁴⁾.

紫河車(Hominis Placenta)는 건강한 산모의 胎盤으로 肺經, 肝經과 腎經으로 歸經하며 補氣養血, 益精하여 骨蒸, 羸瘦, 盜汗, 腰痛膝軟, 精枯, 倦怠無力 등의 모든 虛損病을 치료한다^{6),9),12),13)}. 紫河車藥鍼에 관한 실험으로 CCl₄ 및 ethionine에 의해 발생된

간지방침착의 억제효과가 있으며, 흰쥐의 위궤양에 예방과 치료효과가 있었다는 보고가 있다³⁾. 최근 腎臟疾患에 대한 藥鍼療法の 연구결과를 살펴보면, 윤¹⁹⁾과 박¹⁷⁾ 등은 紅花子와 瓦松藥鍼이 腎臟細胞의 사망과 DNA손상을 억제하는 효과를 보였다고 하였으며, 유¹⁸⁾와 정²⁴⁾ 등은 魚腥草와 土茯苓藥鍼으로 흰쥐의 세뇨관의 세포핵괴사를 억제하고 재생을 촉진했다고 보고했다.

이에 저자는 紫河車藥鍼이 糖尿誘發 흰쥐의 腎臟保護機能에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐에 streptozotocin을 투여하여 당뇨병성 신증을 유발시키고, 당뇨병 및 신장질환에 많이 활용되고 있는 腎愈(BL23)^{10),11)} 양측에 紫河車藥鍼 후 체중, 신비대 지수, 혈당, 혈중 크레아티닌과 BUN 및 뇨중 알부민의 변화를 관찰하고, RT-PCR을 이용하여 TGF- β 1과 fibronectin protein의 발현양상 및 flowcytometry로 apoptosis현상을 분석하였으며 조직검사를 통해 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 (주)중앙실험동물(서울, 대한민국)에서 200g의 수컷 SD(Sprague Dawley) 흰쥐를 구

입하였으며, 습도 50%, 온도 24~26℃로 유지되는 동물사육장에서 사육하면서 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다.

2) 약 제

자하거약침액은 (주)동덕제약(충청북도, 대한민국)에서 분말로 구입하여 사용하였고, 비교약물로 사용한 captopril은 (주)보령제약(서울, 대한민국)으로부터 공급받아 사용하였다.

2. 방 법

1) 실험군 설정 및 처치

200g의 SD 흰쥐에 100mM citrate buffer(pH 4.5)에 녹인 streptozotocin(STZ)을 복강으로 70 mg/kg 투여하였다. STZ투여 5일 후 혈당을 측정하여 당뇨 유도를 확인하고 혈당이 300mg/dl 이상인 흰쥐만을 선별하여 각 group당 7마리씩 배정하여 대조군, 5% 자하거약침군, 10% 자하거약침군 및 captopril군으로 나눈 후 대조군은 생리식염수를, 자하거약침군은 5% 및 10% 농도의 자하거약침액을 각각 양측 신수(BL23)에 0.1ml씩 2주간 약침하였다. Captopril군은 체중 1kg당 50mg 용량으로 경구 투여하였으며, 정상군은 STZ를 투여하지 않은 흰쥐 7마리에 생리식염수를 양측 신수(BL23)에 0.1ml씩 2주간 약침하였다.

2) 체중과 신장무게 측정

약침 후 3, 7 및 14일에 체중을 측정하였고, 신비대지수를 측정하기 위한 체중과 좌측 신장의 무게는 약침 후 4주에 측정하였다.

3) 혈당측정

혈당측정을 위한 혈액 채취는 오후 3시에 실시하였다. 마취 후 안와정맥을 통해 채혈하여 5,000rpm에서 10분간 원심분리 후에 얻어진 혈장을 사용하였다. 포도당 농도는 glucose oxidase method¹⁵⁾를

이용한 trinder 용액을 사용하여 실시하였다. 5μl의 혈장을 취해 trinder 시약 1ml를 첨가하고 상온에서 18분간 방치한 후 505nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose 표준곡선을 이용해 산출하였다.

4) 혈중 크레아티닌과 BUN 측정

혈중 크레아티닌과 BUN은 약침 후 14일에 각각 변형된 Jaffe법⁴⁰⁾과 Urea N-E kit를 사용하여 측정하였다.

5) 요중 알부민배설량 측정

약침 후 14일에 실험동물들을 대사케이지로 옮겨 24시간 동안 요를 수집하였으며, 알부스트레이트 용액을 사용하여 측정하였다.

6) RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) 및 조직검사

신장으로부터 easy-BLUE를 사용하여 total RNA를 추출하였다. RNA 1μg을 MMLV-reverse transcriptase를 사용하여 cDNA로 역전사하였다. 만들어진 cDNA를 template로 하여 TGF-β1 primer를 사용하여 PCR하였다. 사용된 primer의 서열은 다음과 같다.

TGF-β1: sense primer 5'-TCA CTG GAG TTG TAC GGC AG-3', antisense primer 5'-TCT CTG TGG AGC TGA AGC AA-3'.

PCR product는 scanning densitometry로 읽어 정량하였고 GAPDH를 함께 PCR하여 이를 보정하였다.

GAPDH: sense primer 5'-GGA AAG ACA ACG GAC AAA TC-3', antisense primer 5'-GTC ATC TTC TGG AGC ACC TT-3'³⁶⁾.

HE(hematoxylin-eosin) 염색을 위해서 흰쥐를 마취하여 관류고정 후 신장을 취하였다. 또한 신장 조직에서 TGF-β1, fibronectin 유전자의 발현을

군간 비교하기 위하여 각 동물에서 신장조직을 절취하여 사용 전까지 deep freezer(-70~-90℃)에 보관하였다.

7) Western blot

신장조직과 시료처리된 세포를 ice-cold lysis buffer(containing 0.125M Tris-HCl (pH 8.0), 3% SDS, 200 μM PMSF, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin A)로 균질화한 후 20,000rpm에서 20분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 Lowry method³⁹⁾에 의해 protein 정량을 한 후 western-blot에 사용하였다. Protein sample (10 μg)을 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하고 nitrocellulose membrane(Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, England)에 transfer하였다. Blot을 5% nonfat dry milk로 blocking한 후 monoclonal mouse anti-Bcl 2와 anti-fibronectin antibody(Santacruz, California, USA)에 3시간 동안 incubation하였고 다시 1시간 동안 anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase(Bio-rad, Hercules, USA)에 incubation하였다. Enhanced chemiluminescence system(Pierce, Rockford, USA)으로 peroxidase의 luminescence detection을 실시하여 얻어진 immunoreactive protein의 상대량을 GS-700 imaging densitometer를 이용하여 분석하였다³⁵⁾.

8) 사구체 분리와 RMC culture³⁴⁾

적출한 신장의 캡슐을 제거한 후 피질 부위를 잘라내고, 얻어진 피질 조직을 작게 조각내어 sieving method에 따라서 사구체를 분리하였다. 잘게 부순 피질 조각을 200 μm-mesh sieve와 150 μm-mesh sieve를 통과시키고 75 μm-mesh sieve에 걸러진 사구체를 모았다. PBS로 세척하고 원심분리하여 얻어진 사구체를 20% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다. 여러 번의 계대를 통하여 mesangial

cell 만을 클로닝하였다.

9) 세포배양과 시료처리³⁸⁾

분리되어진 mesangial cell을 20% FBS, anti-biotics(penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μg/ml), 5.5mM glucose가 함유된 DMEM 배지에서 3~4일 간격으로 계대배양하였다. 본 실험을 위해 배양된 세포를 1×10⁶cell/dish 농도가 되도록 seeding한 후 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 다시 serum free media로 배지를 교환해주고 24시간 동안 배양한 후 고농도의 포도당과 시료를 함유한 배지로 교환하여 24시간 동안 처리하였다.

10) PI staining

시료처리 되어진 세포를 cold PBS로 세척한 후 tube에 옮겼다. 70% EtOH 로 pipetting 한 후 4℃에서 60분간 방치하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 PBS로 세척 후 다시 원심분리한 후 상등액은 버리고 RNase를 가하였다. PI(propidium iodide)를 1ml 첨가한 후 차광하여 상온에서 15분간 방치한 후 flowcytometry로 분석하였다.

11) HE staining

고정액에 고정된 신장을 dehydration 시킨 후 파라핀을 침투시켜 굳힌 후 5 micron으로 박절하여 silicone으로 coating된 슬라이드에 붙였다. 염색을 하기 위해 슬라이드를 수화시킨 후 hematoxyline과 eosin 염색을 순서대로 시행하였다. 염색된 슬라이드를 dehydration 시킨 후 mounting하여 morphology를 관찰하였고 tuft area를 측정하였다³⁷⁾.

12) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계처리는 student t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

Ⅲ. 成績

1. 체중에 미치는 영향

대조군은 시료투여 후 3, 7 및 14일 모두 정상군에 비해 체중이 유의성(p<0.01)있게 감소하였다. 5% 및 10% 자하거약침군과 Captopril군 모두에서 대조군에 비해 체중의 유의한 변화가 없었다(Table 1).

2. 신비대지수[Kidney weight(mg)/Body weight (g)]에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 체중의 감소와 신장의 비대가 발생하여, 신비대지수(Kidney weight/Body weight)가 정상군에 비해 유의성(p<0.01)있게 증가하였다. 5% 및 10% 자하거약침군과 Captopril군 모두에서 대조군에 비해 신비대지수 감소의 경향성은 보였으나 유의성이 없었다(Table 2).

3. 혈당에 미치는 영향

대조군은 시료투여 후 3, 7 및 14일 모두 혈당이 정상군에 비해 유의성(p<0.01)있게 증가하였다. 5% 및 10% 자하거약침군과 Captopril군 모두에서 대조군에 비해 혈당 감소의 경향성은 보였으나 유의성이 없었다(Table 3).

4. 혈중 크레아티닌과 BUN에 미치는 영향

대조군은 혈중 크레아티닌과 BUN이 정상군에 비해 각각 유의성(p<0.01)있게 증가하였다. 5% 및 10% 자하거약침군 모두에서 혈중 크레아티닌이 대조군에 비해 유의성(p<0.05)있게 감소하였으나, 혈중 BUN은 5% 및 10% 자하거약침군 모두에서 대조군에 비해 유의성이 없었다. Captopril군은 혈중 크레아티닌과 BUN이 각각 대조군에 비해 유의성(p<0.01, p<0.05)있게 감소하였다(Table 4).

5. 요중 알부민 배설량에 미치는 영향

대조군은 요중 알부민 배설량이 정상군에 비해 유의성(p<0.01)있게 증가하였다. 10% 자하거약침군

Table 1. Effect of HP Aqua-acupuncture on Body Weight in STZ Induced Diabetic Rats

Group	Dose	Body weight (g)			
		0	3 days	7 days	14 days
Normal	-	201±4	219±6	277±14	269±34
Control	-	204±11	185±21 ^{**}	203±40 ^{**}	198±62 ^{**}
HP5	5%	210±13	191±16	185±33	188±39
HP10	10%	198±2	185±21	187±36	187±41
CAP	50mg/kg	200±6	185±10	180±41	187±50

Each value shows the mean ± SE of seven animals examined.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

Normal; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, Control; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

P 0.01 vs normal

Table 2. Effects of HP Aqua-acupuncture on Ratio of Left Kidney to Body Weight in STZ Induced iabetic Rats 2 Wee safter Treat ent

Group	Dose	Body weight (g)	Kidney weight (mg)	Index of kidney hypertrophy(mg/g)
Normal	-	264±36	923±145	3.50±0.17
Control	-	170±11	988±30	5.80±0.39 ⁺⁺
HP5	5%	175±6	925±90	5.29±0.52
HP10	10%	193±7	1150±64	5.41±0.13
CAP	50mg/kg	201±32	885±92	4.41±0.24

Each value shows the mean ± SE of seven animals examined.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

Normal; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, Control; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

P 0.01 vs normal

Table 3. Effects of HP Aqua-acupuncture on Plasma Glucose in STZ Induced iabetic Rats

Group	Dose	Plasma glucose(mg/dl)			
		0	3	7	14
Normal	-	107±17	128±9	115±7	100±9
Control	-	121±11	516±92 ⁺⁺	529±126 ⁺⁺	415±42 ⁺⁺
HP5	5%	128±10	529±54	487±10	406±29
HP10	10%	111±19	519±121	477±46	366±32
CAP	50mg/kg	128±7	518±142	433±81	333±86

Each value shows the mean ± SE of seven animals examined.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

Normal; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, Control; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

P 0.01 vs normal

은 요중 알부민 배설량이 대조군에 비해 유의성(p <0.05) 있게 감소하였으나, 5% 자하거약침군은 유의한 변화가 없었다. Captopril군은 요중 알부민 배

설량이 대조군에 비해 유의성(p <0.05) 있게 감소하였다(Table 5).

Table 4. Effect of HP Aqua-acupuncture on Serum Creatinine and BUN in STZ Induced Diabetic Rats

Group	Dose	serum creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)
Normal	-	0.64±0.07	21.1±2.4
Control	-	1.00±0.18 ⁺⁺	47.2±7.1 ⁺⁺
HP5	5%	0.79±0.12 [*]	44.0±4.9
HP10	10%	0.69±0.11 [*]	43.7±6.8
CAP	50mg/kg	0.61±0.03 ^{**}	37.1±4.4 [*]

Each value shows the mean ± SE of seven animals examined.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

Normal; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, Control; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

P 0.01 vs normal, P 0.05, P 0.01 vs control

Table 5. Effect of HP Aqua-acupuncture on Urinary Albumin Excretion in STZ Induced Diabetic Rats

Group	Dose	urinary albumin (mg/day)
Normal	-	13.5±4.7
Control	-	444.9±132.5 ⁺⁺
HP5	5%	485.8±173.7
HP10	10%	217.0±56.6 [*]
CAP	50mg/kg	71.8±47.4 ^{**}

Each value shows the mean ± SE of seven animals examined.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

Normal; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, Control; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

P 0.01 vs normal, P 0.05, P 0.01 vs control

6. TGF-β1과 fibronectin protein에 미치는 영향

대조군은 TGF-β1 mRNA의 발현이 정상군에 비해 유의성(p<0.05)있게 증가하였다. 5% 및 10% 자하거약침군과 Captopril군 모두에서 TGF-β1

mRNA의 발현이 대조군에 비해 유의성(p<0.05)있게 감소하였다(Fig. 1).

Fibronectin protein의 발현은 대조군이 정상군에 비해 유의성(p<0.01)있게 증가하였다. 10% 자하거약침군은 fibronectin protein의 발현이 대조군에

비해 유의성($p < 0.01$)있게 감소하였으며, 5% 자하거약침군도 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 2).

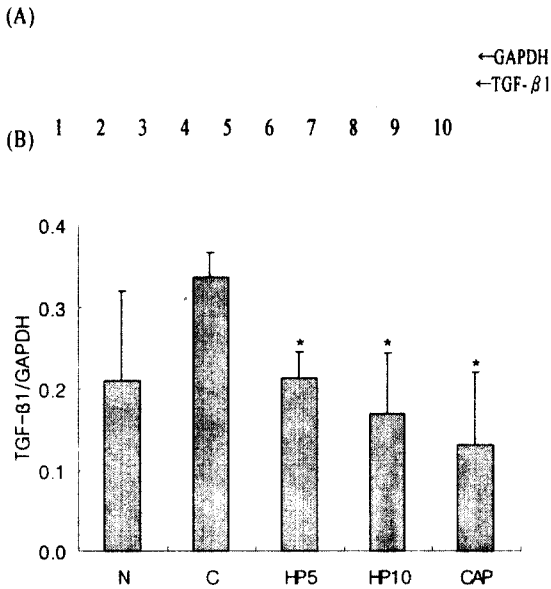


Fig. 1. Expression of TGF-β1 mRNA in kidney of STZ induced diabetic rats treated with HP aqua-acupuncture

(A) Lanes 1~2; N, lanes 3~4; C, lanes 5~6; HP5, lanes 7~8; HP10, lanes 9~10; CAP. Bands representing the 289bp TGF-β1 PCR product and the 471bp GAPDH product are indicated.

(B) Quantification of mRNA was normalized with GAPDH.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

N; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, C; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

+ P < 0.05 vs normal, * P < 0.05 vs control

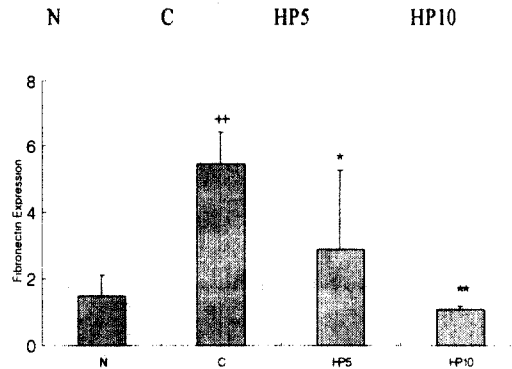


Fig. 2. Expression of fibronectin protein in kidney of STZ induced diabetic rats treated with HP aqua-acupuncture

Bands representing the 220 Da fibronectin product is indicated.

Data are the means ± SE of three animals examined.

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

N; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, C; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

++ P < 0.01 vs normal, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control

7. Apoptosis에 미치는 영향

고혈당(30mM glucose)에 노출된 신장조직은 apoptosis가 증가하였으며, 자하거약침액은 30mM glucose에 노출된 신장조직의 apoptosis를 억제하였다. 신장조직의 apoptosis는 500μg/ml의 자하거약침액에서 100μg/ml 자하거약침액보다 억제효과가 크게 나타났다(Fig. 3).

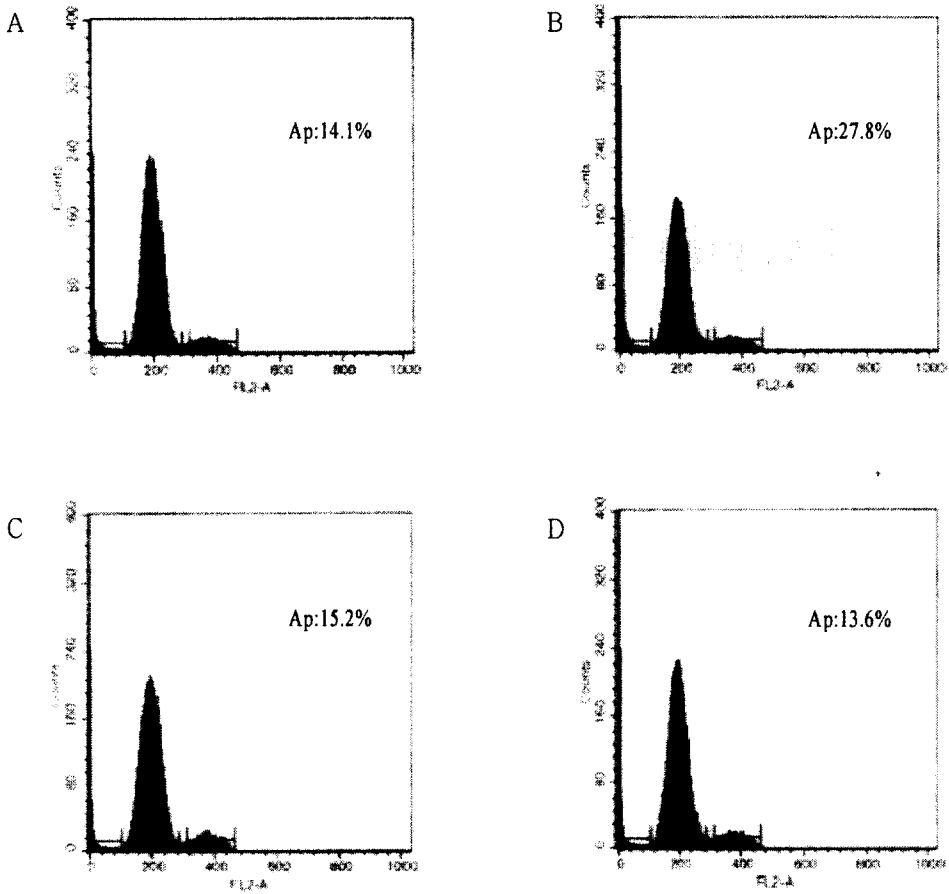


Fig. 3. DNA fluorescence histograms of PI stained RMC

Ap; apoptosis

Cells were treated with 100 μ g/ml and 500 μ g/ml of Hominis Placenta, and apoptosis was induced by high glucose (30mM).

A: 5.5mM glucose, B: 30mM glucose, C: 30mM glucose+100 μ g/ml Hominis Placenta, D: 30mM glucose+500 μ g/ml Hominis Placenta

The values indicated in figure represent the percentage of apoptosis.

8. 조직검사

HE 염색을 한 후 현미경으로 관찰한 결과, 5% 및 10% 자하거약침군과 Captopril군 모두에서 대조군에 비해 사구체와 근위 세뇨관(proximal convoluted tubule)의 손상이 억제되었으며, 10% 자하거약침군에서 5% 자하거약침군보다 조직손상의 억제효과가 크게 나타났다(Fig. 4).

IV. 考察

당뇨병성 신증은 당뇨병환자에게 있어 중요한 사망원인이 되며 신장에서 발생하는 모든 병변을 포함하는데, 주로 사구체 병변으로서 결절성 또는 미만성 사구체 경화가 가장 잘 알려져 있지만 병변의 진

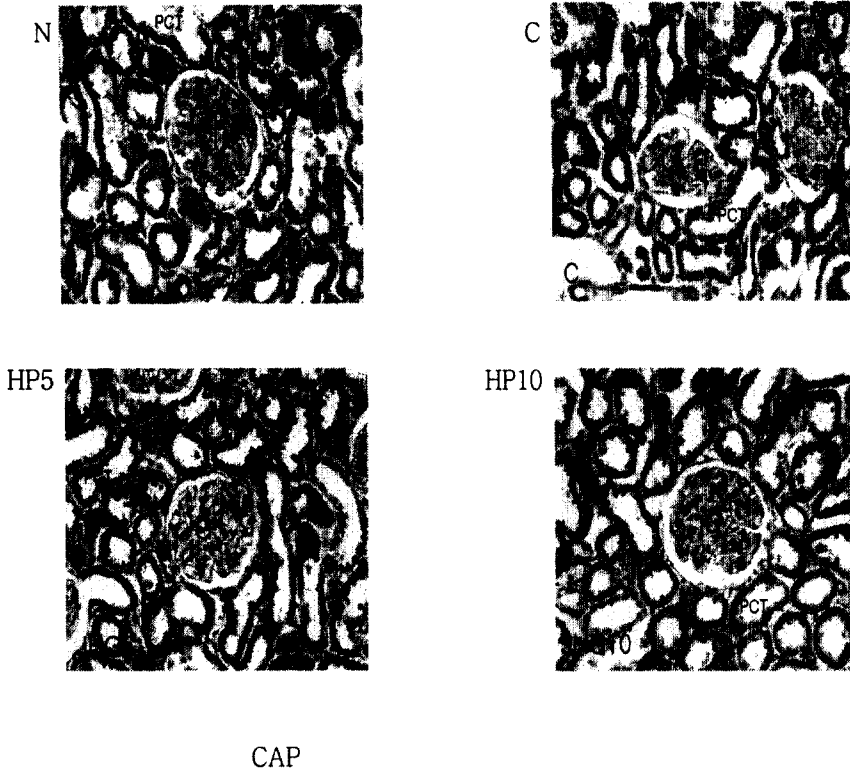


Fig. 4. HE staining of glomeruli(G) and proximal convoluted tubule(PCT) in kidney

HP; Hominis Placenta, STZ; streptozotocin

N; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in normal rats, C; group injected subcutaneously by saline aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP5; group injected subcutaneously by 5% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, HP10; group injected subcutaneously by 10% HP aqua-acupuncture into Sinsu(BL23) in STZ induced diabetic rats, CAP; group administrated with captopril at a dose of 50mg/kg in STZ induced diabetic rats

행 또는 당뇨병의 부작용으로 생긴 세뇨관 및 간질의 변화를 관찰할 수 있다. 당뇨병성 신증은 경증의 무증상 단백뇨, 신증후군, 진행성 신부전증, 그리고

고혈압 등 다양한 임상징후를 보인다⁵⁾.

철저한 혈당조절이 인슐린 의존형 당뇨병 환자에게서 신증의 발생과 초기 당뇨병성 신증의 진행을 뚜

릿하게 감소시킬 수 있다고 보고되어 고혈당이 이 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 당뇨병성 신증이 모든 당뇨병환자에게 발생하지 않고, 혈당을 철저히 조절하여도 신증의 발생을 완전하게 예방하지 못하는 것으로 보아 고혈당 이외의 다른 내인성 또는 환경적인 위험인자가 관여함을 추측할 수 있다. 한편, 아직까지 밝혀지지 않은 어떤 유전적 요인이 신증 발생의 감수성을 결정할 것으로 여겨져 이에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있는데, 현재까지 알려진 위험인자들로는 당뇨병의 유병기간, 불량한 혈당조절, 고혈압, 신동맥내 혈류역동학적 변화, 비효소적인 당화, Polyol 대사, 산화성 스트레스, TGF-β1, 유전적 감수성 등을 들 수 있으나 아직까지는 확실하게 밝혀진 바는 없다⁷⁾.

조직학적 특징은 사구체경화증으로 기본병변은 사구체간질세포의 증식과 세포외 기질의 축적이다. 그리고, 세뇨관도 함께 비후되어 신장의 크기가 커지게 된다^{5),7)}. 사구체간질(mesangium)은 사구체간질세포(mesangial cell)와 이를 둘러싸고 있는 세포외 기질로 구성되는데, 그 역할은 족세포와 더불어 모세혈관의 지주역할을 할 뿐만 아니라 면역복합체나 여러 거대분자의 포식작용을 하는 것으로 알려져 있다. 사구체 내에 존재하는 세포외 기질은 주로 제4형 교원질로 구성되며, 그밖에 laminin, fibronectin, heparan sulfate proteoglycan 5형 및 6형 교원질이 나타난다¹⁾.

당뇨병성 신증은 당뇨병에서 나타나는 당뇨병 전신성 미세혈관 합병증의 하나로 흔하게 발생하며, 환자를 사망에까지 이르게 한다. 당뇨병환자에게 단백뇨가 출현하면 이미 당뇨병성 신증의 중기에 돌입한 것으로 그 진행은 비가역적이다. 그렇기 때문에 당뇨병성 신증은 조기의 예방과 치료가 아주 중요하다.

당뇨병은 韓醫學에서 消渴에 해당된다고 할 수 있는데, 外臺秘要에서 “其久病變惑發癰疽或爲水病”, 儒門事親에서 “其狀多飲而數溲, 或不數溲變爲水腫”, 三

消論에서 “夫消渴者……或熱甚而膀胱佛鬱, 不能滲泄水液妄行而面上腫也”라고 하여 당뇨병으로 인한 신증을 消渴의 병발증으로 인식하고 있음을 알 수 있다⁴⁾.

당뇨병성 신증을 韓醫學에서는 消渴을 失治, 誤治 또는 적절하지 못한 치료로 인하여 발생하는 것으로 보며, 尿濁, 水腫, 眩暈 등의 증상을 보이는데, 결국은 腎元衰敗하여 水濕毒濁泛濫하여 瘀血凝滯가 되어 氣機가 逆亂해지는 것으로 보았다. 초기에는 특징적인 증상이 나타나지 않으나 점차 진행될수록 腎臟의 기능이 衰竭해져 종합적인 증상이 나타나게 된다. 말기에는 氣陰兩虛해져 形體消瘦, 身疲乏力, 面色無華, 腰膝痠軟, 納少腹脹, 口渴多飲, 大便乾結, 脈細無力 등의 증상이 나타난다. 그런 만큼, 당뇨병성 신증은 韓醫學의 不治已病治未病的 豫防醫學學의 思想과 깊게 관련되어 조기예방과 치료가 아주 중요하다⁴⁾.

당뇨병의 침구치료에 관한 근래의 연구를 살펴보면, 당뇨병 환자에게 침과 뜸을 같이 사용하여 높은 치료율을 보였다는 보고³²⁾가 있으며, 저주파 전침을 이용하여 유의한 결과를 거두었다는 보고²⁸⁾가 있다. 신증후군 환자 및 당뇨병환자에게 腎俞에 뜸치료를 하여 호전을 보였고¹¹⁾, 당뇨흰쥐에게 침구치료로 지질대사를 조절하여 혈관벽의 변화를 개선시켰고³¹⁾, 五加皮²⁹⁾, 黃芪³⁰⁾, 香丹注射液³³⁾ 등을 靜脈滴注하여 각각 蛋白尿의 배설율을 감소시키고, 血漿과 尿에서의 內皮細胞를 감소시켜 內皮細胞를 보호하는 작용으로 腎臟의 기능을 유지시켰다는 보고도 있다. 또한, 藥鍼療法에 의한 실험으로 紅花子¹⁹⁾, 瓦松¹⁷⁾ 및 黃芩藥鍼²⁶⁾이 각각 신장세포의 사망과 DNA손상을 억제하는 효과를 보였다고 하였으며, 魚腥草¹⁸⁾ 및 土茯苓藥鍼²⁴⁾은 각각 흰쥐의 세뇨관의 세포핵괴사를 억제하고 재생을 촉진한다고 하였다. 杜沖藥鍼은 흰쥐의 전해질 대사와 혈장 aldosteron양에 중요한 변화를 일으킨다고 하였으며²⁷⁾, 紅花子²⁰⁾와 冬蟲夏草藥鍼²⁵⁾은 지질의 과산화를 억제했다고 보고하였다.

紫河車(Hominis Placenta)는 건강한 산모의 胎盤

으로 性味는 甘鹹하고 溫 無毒하고 肺經, 肝經과 腎經으로 歸經한다. 그 효능으로는 補氣養血, 益精하여 虛損羸瘦, 勞熱骨蒸, 咳喘, 咯血, 盜汗, 遺精, 陽痿, 腰痛膝軟, 精枯, 倦怠無力, 婦女的 血氣不足 및 不妊 등을 치료하며 “乃補陰陽兩虛之藥, 有反本還元之功”이라 하여 모든 虛損病에 사용한다^{6),9),12),13)}. 紫河車는 estradiol, progesterone, acetyl glucosamine, D-galactose, amino acid 등의 성분을 함유하고 있는데, 최근의 연구에 의하면 인체의 저항력을 증강시키고 감염을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

紫河車藥鍼에 관해서는 CCl_4 및 ethionine에 의해 발생된 肝脂肪 침착의 억제효과가 있으며, 흰쥐의 실험적 위레양에 예방과 치료효과가 있으며, 흰쥐의 성장과 발육에 효과가 있었다는 보고가 있다³⁾.

따라서, 위와 같은 결과를 토대로 補氣養血, 益精하여 모든 虛損病을 치료하는 紫河車を 주입하여 慢性 虛證에 해당하는 당뇨병으로 인한 신증의 腎臟保護機能에 효과가 있을 것으로 기대되어 본 실험을 실시하였다.

藥鍼療法은 그 효과가 빠르고 용량이 정확하며, 약물이 위장관에서 파괴되는 것을 방지할 수 있고 내복하기 힘든 환자에게 사용할 수 있는 장점이 있다¹⁰⁾.

腎俞(BL23)는 腎의 背俞穴로 그 氣가 背俞로 轉輸되어 臟腑의 機能 및 臟腑와 관련이 있는 全身疾患을 진단하고 치료할 수 있어 腎臟機能과 밀접한 관련성을 지니며, 滋補腎陰, 振氣化, 益水壯火, 培元固本, 利水祛濕의 穴性으로 腎臟炎, 虛勞, 眩暈, 水腫, 腰痛, 消渴, 尿頻, 尿貯留, 羸瘦 등에 상용되어 腎臟疾患의 치료에 중요한 혈이다^{10),11)}.

그리고, 비교약물로 사용한 captopril은 전환효소 억제제로 angiotensin II 생성을 억제하고, 사구체내 혈압을 저하시키며, 사구체 비대를 지연시키고, 사구체 여과율의 감소속도를 지연시키는 효과가 있다⁷⁾.

이에 본 실험에서는 紫河車藥鍼이 糖尿誘發 흰쥐의 腎臟保護機能에 미치는 영향을 관찰하기 위하여

흰쥐에 streptozotocin을 투여하여 당뇨병성 신증을 유발시킨 후 당뇨병 및 신장질환에 많이 활용되고 있는 腎俞(BL23)^{14),17)}에 紫河車藥鍼 후 체중, 신비대지수, 혈당, 혈중 크레아티닌과 BUN 및 뇨중 알부민의 변화를 관찰하고, RT-PCR을 이용하여 TGF- β 1과 fibronectin protein의 발현양상 및 flowcytometry로 apoptosis현상을 분석하였으며 조직검사를 통해 관찰하였다.

흰쥐에 streptozotocin을 투여하여 당뇨병성 신증을 유발시키게 되면, 체중의 감소와 함께 신장의 비대가 나타나서 신비대지수(Kidney weight/Body weight)가 증가하게 된다^{1,5,7)}. 본 실험에서 대조군은 체중의 감소와 신장의 비대가 발생하여 신비대지수가 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 5% 및 10% 자하거약침군 모두 대조군에 비해 신비대지수 감소의 경향성은 보였으나 유의성은 없었다. 지속적인 고혈당은 당뇨병성 신증의 중요한 요인중의 하나인데, 본 실험에서 대조군은 지속적으로 고혈당상태가 유지되었으며, 5% 및 10% 자하거약침군 모두 대조군에 비해 혈당 감소의 경향성은 보였지만 유의성은 없었다.

혈중 크레아티닌과 BUN은 신장질환과 관계가 대단히 커서 신장기능의 지표로 중요시되고 있는데⁸⁾, 본 실험에서 대조군은 혈중 크레아티닌과 BUN 모두 정상군에 비해 모두 유의성있게 증가하였으며, 신피질 간질의 섬유화에 비례하는 혈중 크레아티닌은 5% 및 10% 자하거약침군에서 모두 대조군에 비해 유의하게 감소되었으나, 신장기능의 이상을 나타내는 또 다른 지표인 BUN은 유의한 변화가 없었다.

단백뇨는 당뇨병성 신증의 지표로^{1),5),7)} 본 실험에서 대조군은 요중 알부민 배설량이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 10% 자하거약침군은 요중 알부민 배설량이 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 5% 자하거약침군은 유의한 변화가 없었다.

당뇨병성 신증을 발생시키는 인자 중의 하나인 TGF- β 는 원래 혈소판, 태반, 신장에서 분리되었

고, 포유동물에서는 생물학적 작용이 유사한 TGF- β 1, 2, 3 세가지의 isoform이 존재한다. TGF- β 는 세포증식과 분화, 세포의 기질의 생산과 integrin 수용체를 조절하는 등 다양한 기능을 지닌 단백질이다. TGF- β 는 세포의 기질 단백질의 유전자를 직접 상향 조절하여 단백질의 합성을 증가시키고 plasmin이나 collagen과 같은 단백질 분해효소의 생산을 억제하는 동시에 단백질분해효소 억제인자의 합성을 증가시킴으로써 세포의 기질 단백질분해를 억제하고 세포 표면의 integrin 수용체 표현을 조절하여 새로 생산된 세포 외 기질에 부착하는 것을 촉진하고 TGF- β 의 생산을 스스로 증가시켜 활동을 증폭한다. 당뇨병환자는 신장내 TGF- β 가 증가하고, 고포도당에 의해서 혈관간 세포의 mRNA표현과 fibronectin protein의 합성이 증가하여 신비대가 발생한다⁷⁾. 본 실험에서 신비대에 관여하는 TGF- β 1 mRNA와 fibronectin protein의 발현은 5% 및 10% 자하거약침군에서 모두 대조군에 비해 유의하게 억제되어, 자하거약침이 당뇨병성 신증에 있어서 세포외 기질의 축적을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

Apoptosis는 특정세포 자체 내에 내재된 프로그램에 의해 주도되는 세포자연사 또는 세포사멸이라고 정의할 수 있으나, 그 자세한 기전은 확실하지 않다. Apoptosis는 정상조직에서의 세포의 탈락 및 여러 질환의 발병에 있어서 중요한 역할을 하는 고도로 조절되는 일련의 세포사망의 과정으로 특이 암유전자의 발현과 같은 내부적인 요인이나 성장인자와 cytokine 등의 외부인자에 의해 영향을 받으며 DNA손상, 열충격, 환경 독소, 바이러스 감염 등의 여러 자극에 의해 세포자연사가 유발될 수 있는 것으로 알려져 있다^{16),23)}. 신장장애의 경우 apoptosis가 일어나는 것으로 알려져 있으며, 신부전에 있어서 신원 손상의 한 원인으로 여겨진다²²⁾. 본 실험에서 신장조직의 apoptosis는 500 μ g/ml의 자하거약침액에서 100 μ g/ml 자하거약침액보다 억제효과가 크게 나타나 자하거약침액의 농도와 apoptosis의 억제

효과가 관련있는 것으로 여겨지며, 자하거약침이 신장세포의 apoptosis를 억제하는 기전을 통해 신장기능을 유지하고, 당뇨병성 신증의 진행을 억제시킬 수 있다고 사려된다.

또한, HE 염색을 한 후 현미경으로 조직을 관찰한 결과 5% 및 10% 자하거약침군 모두 사구체와 근위 세뇨관(proximal convoluted tubule)의 손상이 현저하게 억제되었으며, 10% 자하거약침군에서 5% 자하거약침군보다 억제효과가 크게 나타났다. 따라서, 자하거약침으로 당뇨병성 신증으로 인한 신장의 조직학적 손상을 회복시킬 수 있다고 여겨진다.

이상의 결과를 종합하면, 자하거약침은 당뇨유발 흰쥐의 체중, 신비대지수, 혈당 및 혈중 BUN을 낮추는 효과는 없었으나, 혈중 크레아티닌과 요중 알부민 배설량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, 신장조직에서 TGF- β 1과 fibronectin의 발현을 억제하고 신장세포의 apoptosis를 억제하는 기전으로 신장세포의 보호기능이 있음을 확인하였다. 따라서, 당뇨병환자에게 있어 혈당 조절과 함께 자하거약침을 응용할 경우 만성적인 경과로 발생할 수 있는 당뇨병성 신증의 예방과 치료에 도움이 될 것으로 기대되며, 자하거약침의 임상활용을 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사려된다.

V. 結 論

紫河車藥鍼이 糖尿誘發 흰쥐의 腎臟保護機能에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 streptozotocin을 투여하여 당뇨병성 신증을 유발시킨 흰쥐의 양측 腎俞(BL23)에 5% 및 10% 紫河車藥鍼 후 체중, 신비대지수, 혈당, 혈중 크레아티닌과 BUN 및 뇨중 알부민의 변화를 관찰하고, RT-PCR을 이용하여 TGF- β 1과 fibronectin protein의 발현양상과 flowcytometry로 apoptosis현상을 분석하고 조직

검사를 통해 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

1. 체중, 신비대지수, 혈당 및 혈중 BUN은 5% 및 10% 자하거약침군에서 각각 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다.
2. 혈중 크레아티닌은 5% 및 10% 자하거약침군에서 각각 대조군에 비해 유의하게 감소되었다.
3. 요중 알부민 배설량은 10% 자하거약침군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였으나, 5% 자하거약침군에서는 유의한 변화가 없었다.
4. TGF- β 1 mRNA의 발현은 5% 및 10% 자하거약침군에서 각각 대조군에 비해 유의하게 억제되었다.
5. Fibronectin protein의 발현은 5% 및 10% 자하거약침군에서 각각 대조군에 비해 유의하게 억제되었다.
6. 신장조직의 apoptosis는 500 μ g/ml의 자하거약침액에서 100 μ g/ml 자하거약침액보다 억제효과가 크게 나타났다.
7. 사구체와 근위 세뇨관의 조직손상은 10% 자하거약침군에서 5% 자하거약침군보다 억제효과가 크게 나타났다.

VI. 參考文獻

1. 김웅진 외. 당뇨병학. 서울:고려의학. 1998: 259-265.
2. 김창민 외. 完譯中藥大辭典. 서울:정담출판사. 1997:3627-3631.
3. 동양의학대사전편찬위원회. 동양의학대사전 6. 서울:경희대학교출판국. 1999:474-476.
4. 두호경. 동신신계학 연구. 서울:경희대학교 출판국. 1994:408-412.
5. 민현기. 임상내분비학. 서울:고려의학. 1999: 409-410.
6. 안덕균 외. 중의약대사전. 서울:정담출판사. 1998:4676-4680.
7. 연세대학교 신장질환연구소. 신장학. 서울:의학문화사. 1999:591-612.
8. 이귀녕 외. 임상병리파일. 서울:의학문화사. 1990:73-75,77-78.
9. 전국한의학대학교 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1991:567-568.
10. 전국한의학대학교 침구경혈학교실. 침구학. 서울:집문당. 1991:489-490,1457.
11. 馬少群 외. 馬氏溫灸法. 북경:북경과학기술출판사. 1994:218-220, 235-238.
12. 虞搏. 醫學正傳. 서울:성보사. 1986:166.
13. 李時珍. 本草綱目. 서울:의성당. 1993:2963-2966.
14. 陳貴廷. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울:일증사. 1992:527-530.
15. Bergmeyer HU, Bernt E. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd rev. ed. 1974: 1205-1212.
16. 김용현 외. 저용량 스트렙토조토신 유발 당뇨병 생쥐에서 인슐린 및 비타민 E 투여가 췌장 소도세포의 세포자연사에 미치는 영향. 당뇨병학회지. 1999;23(6):757-767.
17. 박상원 외. 瓦松藥鍼液이 腎臟細胞에서 H2O2에 의한 세포사망 및 DNA손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(1):88-99.
18. 유충열 외. 魚腥草 藥鍼刺戟이 HgCl2로 손상된 흰쥐의 신장 및 간에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(4):223-244.
19. 윤현민. 紅花子 藥鍼液이 Oxidant에 의해 유발된 신장세뇨관의 세포사망과 DNA손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(4): 293-306.
20. 이경미 외. 신장에서 수은에 의한 유기양이온 이동계의 장애에 대한 紅花子 藥鍼液의 효과.

- 대한침구학회지. 1999;16(3):203-322.
21. 이상길 외. 紫河車藥鍼 제제에 대한 고찰. 대한침구학회지. 2000;17(1):67-74.
 22. 임천규. 급성세뇨관괴사에서 접착분자와 apoptosis의 역할. 대한신장학회지. 1997; 16(2):S216-219.
 23. 정용훈. 면역계에서의 programmed cell death 연구의 현황과 전망. 알레르기학회지. 1995; 15(4):569-585.
 24. 정혜윤 외. 土茯苓藥鍼刺戟이 HgCl₂ 중독 흰 쥐의 損傷腎에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998;15(2):331-348.
 25. 천갑술 외. 冬蟲夏草藥鍼液이 家兔 신피질절편에서 세포막물질 이동계의 기능장애에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(3):123-133.
 26. 허경미 외. 黃芩藥鍼液이 신장조직에서 Oxidant에 의한 세포손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(2):101-110.
 27. 황유진 외. 杜沖藥鍼이 백서의 신장기능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999; 16(4): 377-386.
 28. 金宏柱 외. 近年來國內中醫藥治療 糖尿病 臨床及機理研究進展. 南京中醫藥大學學報. 2001;17(1):63-66.
 29. 羅蘇生 외. 刺五加注射液對早期糖尿病腎臟病變及血漿. 尿內皮素的影響. 中國中西醫 結合雜誌. 2001;21(2):105-107.
 30. 劉志強 외. 黃芪注射液對早期糖尿病腎病患者血小板功能和血漿內皮素的影響. 中國中西醫結合雜誌. 2001;21(4):274-276.
 31. 李石良 외. 鍼刺. 艾灸改善 NIDDM 大鼠 脂代謝紊亂的作用機理. 鍼灸臨床雜誌. 1995;11(2):19.
 32. 曹少鳴. 鍼刺. 艾灸. 鍼灸治療糖尿病的比較研究. 中國鍼灸. 1997;17(10):586.
 33. 中國中醫藥學會內科腎病專業委員會. 糖尿病腎病的中醫治療及用藥經驗談. 上海中醫藥雜誌. 2001;5:15-18.
 34. Burlingtron H, Cronkite EP. Characteristics of cell cultures derived from renal glomeruli. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.. 1973;142:143-149.
 35. Hill C, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Logan A. The renal expression of transforming growth factor- β isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. Endocrinology. 3:141.
 36. Kaneto H, Ohtani H, Fukuzaki A, Ishidoya S, Orikasa S. Increased expression of TGF- β 1 but not of its receptors contributes to human obstructive nephropathy. Kidney international. 1999;56:2137-2146.
 37. Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Allen HJ, Cooper ME, Skinner SL. A new model of diabetic nephropathy with progressive renal impairment in the transgenic (mRen-2)27 rat (TGR). Kidney international. 1998;54:343-352.
 38. Kim SI, Han DC, Lee HB. Lovastatin inhibits transforming growth factor- β expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells. J. Am. Soc. Nephrol. 2000;11:80-87.
 39. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.. 1951;193:265-275.
 40. Mohssen M. Biochemical and Histopathological Changes in Serum Creatinine and Kidney Induced by Inhalation of Thimet (Phorate) in Male Swiss Albino Mouse. Mus musculus.. Environ. Res.. 2001;87:31-36.