

兒茶가 Cationic Bovine Serum Albumin 투여로 유발된 Membranous Nephropathy Mouse Model에 미치는 영향

정기훈, 조충식, 김철중
대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

Effects of the Acasia Catechu Extract on the Membranous Nephropathy Induced by Cationic Bovine Serum Albumin in Mice

Gi-hun Jeong, Chung-sik Cho, Cheol-jung Kim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

ABSTRACT

Objective : Membranous nephropathy(MN) is an organ-specific autoimmune disease and a relatively common cause of nephrotic syndrome in adults worldwide. But treatment of MN is not defined. This study was to evaluate the effects of Acasia Catechu extract(ACE) on the MN induced by cBSA in mice.

Methods : Mice were divided into 4 groups. The normal group was injected with a saline solution. The control group was treated with cBSA (10 mg/kg i.p.) only. The third group was treated with cBSA (10 mg/kg i.p.) and ACE (250 mg/kg, p.o.). The fourth group was treated with cBSA (10mg/kg i.p.) and ACE (500mg/kg, p.o.). After cBSA and ACE treatment for 6 weeks, we measured change of body weight, 24hrs proteinuria, serum albumin, total cholesterol, triglyceride, BUN, creatinine, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IgA, IgM and IgG levels. The morphologic changes of renal glomeruli were also observed with a light microscope.

Results : The levels of 24 hrs proteinuria, total cholesterol, triglyceride, IgG, IgM, IgA, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ significantly decreased in both ACE groups. The level of albumin significantly increased in both ACE groups. The mRNA expression of IL-1 β in splenocytes considerably decreased in the ACE-500 group. In histological findings of kidney tissue, thickening of GBM decreased in both ACE groups.

Conclusions : This study shows that ACE might be effective for treatment of MN. More clinical data and studies are to be done for efficient application.

Key words : Acasia Catechu Extract(ACE), membranous nephropathy(MN), cationic bovine serum albumin(cBSA)

1. 서론

막성 신증(Membranous Nephropathy : MN)은 사구체 기저막의 비후와 상피하 침전물의 소견을

보이는 신병증으로¹, 80% 이상의 환자에서 다량의 단백뇨가 발견되며, 그 중 대부분이 신증후군의 임상상을 보이고^{1,2}, 성인 신증후군의 30~40%를 차지한다². 그러나 임상 경과가 다양하며, 그 치료 방법이 아직 확립되지 않았고, 스테로이드나 세포독성 약제를 사용할 경우 예상되는 부작용에 비해 효과가 확실하지 않은 실정이다^{1,2}.

한의학에서 MN은 임상증상 상 ‘浮腫’, ‘水腫’,

· 교신저자: 김철중 대전시 중구 대흥동 22-5번지
대전대학교 부속대전한방병원 신계내과
TEL: 042-229-6880
E-mail: kidneykim@paran.com

‘虛勞’, ‘尿濁’ 등의 범주로, 淸熱利濕, 活血去瘀, 健脾活血, 益氣養陰 및 溫腎補陽 등의 치법을 활용되고 있다³⁻⁵. 중국에서는 MN에 益氣活血化濕의 방법을 활용한 치료가 단백뇨 감소와 체내 알부민 수치 회복에 효과가 있음이 보고되었고⁶, 국내에서는 膜性腎炎方⁷ 및 그 가미방⁸⁻¹¹과 黃連¹², 黃芩¹³에 대한 실험적 연구가 진행되어 MN에 유의한 효과가 있음이 보고되었다.

兒茶는 *Acasia catechu*(L. F.) Willd.의 心材 혹은 去皮한 가지부분을 煎制한 후 건조하여 膏의 형태로 만든 것으로, 성미는 涼苦澁하고, 心, 肺, 脾經에 歸經하며 收濕斂瘡, 止血定痛, 淸熱化痰의 효능을 가지고 있어 瘡瘍, 久潰不斂, 牙疳, 口瘡, 咯血, 吐血, 尿血, 便血, 血崩, 外傷出血, 痔瘡癰腫, 痰熱咳嗽의 치료에 활용되고 있다¹⁴.

張¹⁵은 난치성 신장질환의 경우 濕, 痰, 瘀가 병리 과정상 원인과 결과로 작용하여 痰濁과 瘀血이 腎絡을 閉塞하여 나타난다하여, 痰과 瘀가 腎內微型癥積을 이루어 신기능의 저하를 유발한다고 하였고, 何¹⁶는 淸熱解毒, 活血利濕의 治法이 신혈류량 증가와 면역반응 개선을 일으켜 면역 복합물의 침착을 억제시킨다고 하였다. 이러한 보고는 收濕斂瘡과 淸熱化痰의 효능을 가진 兒茶가 신장 기능 개선에 일정한 의의가 있을 가능성을 보여준다.

이에 저자는 兒茶가 MN에 미치는 영향을 실험적으로 확인하고자, cationic bovine serum albumin (cBSA) 투여로 MN이 유발된 mouse에 兒茶의 추출물을 투여한 후 체중, 24시간 단백뇨, 혈액학적 변화와 면역학적 기전 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 동 물

실험에 사용된 mouse는 (주)중앙실험동물에서 7주령의 평균 31±1.4 g의 ICR계 female을 구입하여,

1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 본 실험에 사용하였다. 물과 사료는 충분히 자유롭게 먹도록 하였으며, 사료성분은 조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제가 첨가되지 않은 고형사료(삼양사 Co.)를 사용하였다. 실험동물은 온도가 22 ± 2 °C로 일정하게 유지되고, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명되며, 12시간은 조명이 차단되는 conventional system으로 조절되는 환경에서 사육하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용된 兒茶(*Acasia catechu* : AC)는 대전대학교 중앙공동실험실에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

실험에 사용된 시약은 bovine serum albumin (BSA), anhydrous ethyl enediamine(EDA), 1-ethyl-3-((3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride) (EDC), HCl, Freund's complete adjuvant, chloroform, glutaldehyde, glycine, NP-40, ethanol, hematoxylin, eosin, paraformaldehyde, triton X-100, RPMI-1640 media, phosphate buffered saline(PBS), RBC lysis buffer, 10% buffered formalin이며 모두 Sigma Chemical Co.(U.S.A.) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum (FBS), horse serum은 Hyclone(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

(2) 기 기

본 실험에는 약제추출을 위하여 BÜCHI rotavapor R-200 모델(Flawil, Switzerland)을 사용하였고, 동결건조를 위해 Centrifugal vacuum concentrator (Hanil, Korea)를 사용하였다. 또한 cBSA의 isoelectric point(pI)를 측정하기 위하여 Bio-Rad(U.S.A.)사의 수평 전기영동장치를 사용하였고, cBSA의 크기를 알아보기 위하여 Bio-Rad(U.S.A.)사의 5% SDS-PAGE 수직 전기영동장치를 사용하였으며, 최종단백질 농도는 BCATM protein assay kit (Pierce,

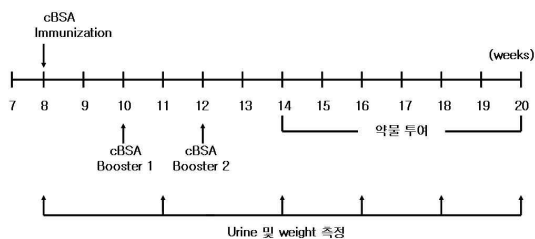
U.S.A.)를 사용하여 측정 계산하였다. 또한 단백뇨 (proteinuria)의 측정은 Bayer (Germany)사의 Albutix[®], cytometer는 FACS Calibur(Becton Dickinson, U.S.A.), ELISA 판독기는 Molecular Devices(Minnesota, U.S.A.)사 제품을 사용하였다. 실험동물의 신장조직 시료 제작에는 Serotec(U.S.A.)사의 cooling microtome (Washington DC, U.S.A.)을 사용하였으며, metabolic cage는 Techniplast (Varese, Italy)사의 제품을 사용하였고, 조직슬라이드 관찰을 위한 광학현미경은 Labophot-2(Nikon, Japan)를 사용하였으며, cell strainer는 Falcon(U.S.A.)사 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

兒茶 400 g을 50 g씩 8회에 나누어 증류수 1,000 ml에 가해 열탕 추출기로 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압증류장치(rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결건조기(freeze dryer)로 완전 건조하여 20 g(수거율 : 5%)의 兒茶추출물(Acacia catechu extract, 이하 ACE)을 얻어 냉동 보관하고 적당 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

[기간별 실험단계도]



2) Antigen, cationic BSA의 준비

Cationic BSA(cBSA, Sigma Chemical Co., U.S.A.)는 Border의 방법¹⁷을 수정하여 BSA를 화학적으로 양이온화 하여 제조하였다. 20 g의 BSA를 증류수 12 ml에 녹이고, 다른 한편으로 20 ml의 증류수에 2.68 ml의 EDA를 섞고 HCl을 가해 pH

4.75의 anhydrous EDA를 만들어 25℃로 식혔다. 이 EDA solution을 앞서 준비한 BSA solution에 넣어 섞고, 곧이어 EDC 150 mg을 넣고 4시간동안 계속 저어주었다. 만들어진 용액은 1 ml EconoPac High S cationic ion-exchange column(Bio-Rad, CA)에 가하고 pH 6.8 phosphate buffer(40 mM)로 washing하여 양이온화 되지 않은 BSA를 제거한 후 pH 10.6의 phosphate buffer(40 mM)로 elution 하였다. 5% thin-layer polyacrylamide gel에 제조된 cBSA와 control BSA를 loading하여 수평전기영동장치(Bio-Rad, U.S.A.)에서 cBSA의 isoelectric point(pI)를 측정하였다. 최종 단백질 농도는 BCATM protein assay kit(Pierce, U.S.A.)로 spectrophotometer 540 nm에서 optical density(O.D.)를 측정하여 계산하였다.

3) MN model 유발 및 검액 투여

8주령의 female ICR계 mouse를 각 군당 10마리씩 하여 정상군(non-treated group, Normal), 대조군(MN-induced by cBSA group, Control), ACE-250군(MN-induced by cBSA and ACE-low dose treated group, ACE-250), ACE-500군(MN-induced by cBSA and ACE-high dose treated group, ACE-500) 등의 4군으로 나누어, 정상군을 제외한 3군에 Freund's complete adjuvant와 섞은 0.2 mg의 cBSA를 6주간 총 3회(1회/2주)에 걸쳐 복강투여(intra-peritoneal injection)하였다. 정상군은 antigen 대신에 saline을 같은 방법으로 주사하여 면역화시키지 않았다. 면역화 6주 후부터 6주간 10 mg/kg의 cBSA를 정상군을 제외한 3군에 매일 복강 투여하여 지속적으로 MN을 유발하는 동시에, ACE-250군에는 兒茶 250 mg/kg를, ACE-500군에는 兒茶 500 mg/kg를 매일 경구 투여하여 MN에 대한 兒茶의 치료 효과를 관찰하였다. 4주간의 투여 후 모든 실험동물들을 metabolic cage에 두어 24시간 동안 물 공급을 자유롭게 하면서 절식하여 소변을 채취하였다. 소변채취 후 희생시켜 blood, kidney, spleen sample 등을 수거하여 분석에 사용하였다.

4) 체중 측정

실험시작 전 평균체중을 구하고 그 후 면역화시키는 6주 동안은 3주마다, 그 후의 6주 동안에는 2주마다 체중을 측정하여 체중변화를 관찰하였다.

5) 24시간 단백뇨(24hrs proteinuria) 측정

Mouse의 뇨는 면역화시키는 6주간은 3주마다, 그 후 6주간은 2주마다 수거하여 단백뇨(proteinuria)의 배출상황을 관찰하였다. 뇨는 24시간 동안 metabolic cage에서 수거하여 -20°C 에서 보관하였으며 후에 Albustix[®](Bayer, Germany)를 이용하여 TBPB의 변색점 변화에 의해 소변 중의 albumin 수치를 측정하였다.

6) 채혈 및 혈청 분석

동물을 희생시키기 전 ethyl ether로 마취시킨 후 심장천자로 채혈하여 1시간 실온에서 방치 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 -80°C 에 보관하였다. 혈청은 creatinine, blood urea nitrogen(BUN), albumin, total cholesterol, triglyceride 등의 serological analysis와 ELISA 분석에 사용되었다.

7) 신장 조직의 적출 및 보관

채혈 후 희생시켜 신장을 적출하여, 일부는 frozen tissue embedding solution에 넣어 freezing시키고, 일부는 10% buffered formalin에, 일부는 glutaldehyde에 fixing시켜 보관하였다.

8) Enzyme-linked immuno-sorbent assay

혈청의 면역글로블린(immunoglobulin, Ig)과 cytokines의 분석을 위해 각기 IgA, IgM, IgG와 IL-6, TNF- α 를 ELISA로 분석하였다. 사용된 antibody는 goat anti-mouse IgA, IgM, rat anti-mouse IL-6, rabbit anti-mouse TNF- α 등 이었다. 이들 antibody를 coating한 96-well plate에 50 μl 의 혈청을 분주하여 2시간 동안 실온에서 방치한 후, washing solution

으로 3회 washing하고 streptavidin -HRP antibody를 반응시키고, TMB substrate로 발색시켜, ELISA reader 450 nm에서 O.D.를 측정하여 혈청 내 단백질을 정량하였다.

9) Splenocyte의 RT-PCR

Mouse에서 spleen을 적출한 후 주사기를 사용하여 cell을 분리하고, cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 조직과 불순물을 제거한 후, red blood cell(RBC) lysis buffer(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 0.1 mM EDTA in 1 L of demineralized water)를 넣고 5분간 RBC를 용해시키고 PBS로 세척한 후에 cell을 수거하였다. 준비된 splenocyte는 TRIZOL (Invitrogen)을 사용하여 manufacturer's protocol에 따라 total RNA를 분리하였다. 간단히 요약하면 trizol reagent에 5분간 homogenize시킨 cell을 trizol reagent 1 ml 당 0.2 ml의 chloroform을 넣고 15초간 흔들어 주고 3분간 실온에서 보관한 후, 12,000 rpm에서 15분간 4 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하며 원심분리하였다. 분리된 상층액을 새 EP tube로 옮기고, trizol 1 ml 당 0.5 ml/ml 비율의 isopropanol을 넣고 10분간 실온에서 incubation 시키고, 12,000 rpm에서 15분간 4 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하며 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 버리고 침전된 RNA는 75% ethanol로 씻고 건조시킨 후, DEPC에 녹여 spectrophotometer에서 농도와 purity를 측정하였다. 준비된 RNA와 oligo dT, dNTP, reverse transcriptase로 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 준비하였다. cDNA와 다음의 primer set을 가지고 PCR을 수행하여 splenocyte에서 IL-1 β , IL-10, IFN- γ 등의 cytokines을 RNA level에서 분석하였다. Cytokines의 primer sequence 및 PCR 조건은 β -actin(25 cycles)을 제외하고는 30 cycles로 실시되었고 30초간 실시되었다. 구체적인 실험조건은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Primer Sequence of Each Cytokines in This Studies

Cytokine	Direction	Sequence	Anealing temperature
mouse β -actin	RT-actin-S	5'-ctatgtgggtgacgaggccc-3'	55°C
	RT-actin-AS	5'-gccctcgtagatgggcacag-3'	
mouse IL-10	M IL-10 S	5'-gcatggcccagaaatcaagg-3'	58°C
	M IL-10 AS	5'-tccaaggaagaacccctcc-3'	
mouse IL-1 β	M IL-1 b S	5'-tgaagggtgcttccaacc-3'	58°C
	M IL-1 b AS	5'-gtccgacagcacgaggcttt-3'	
mouse IFN- γ	M IFN-g S	5'-tgcggcctagctctgagaca-3'	58°C
	M IFN-g AS	5'-cgcttgctgttctgaaga-3'	

10) 광학현미경 관찰

Embedding solution에서 freezing시켜 놓은 조직을 rotary microtome을 이용하여 20 μ m 두께로 dissection하여 슬라이드를 만들고 -80°C에 보관하였다. 준비된 슬라이드를 물에 넣어 rehydration 시킨 후, hematoxylin에 1분간 담가 nuclear를 염색시키고, 흐르는 물에 몇 분 동안 washing 한 후, eosin에 1분간 담가 cytoplasm을 염색시킨 다음, 다시 흐르는 물에 몇 분 동안 washing하였다. 이어 70%, 95%, 100%의 ethanol series에 연차적으로 담가 dehydration 시키고, xylene에 1분간 반응시켜 안정화시킨 후, mounting solution을 올리고 cover glass로 슬라이드를 봉입하고 광학현미경(Labophot-2, Nikon, Japan)으로 400배의 배율에서 조직 상태를 관찰하였다.

11) 통계 분석

실험 결과들은 mean \pm standard deviation으로 기록하였고, one way ANOVA에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 여부를 검증하였으며, 유의성이 나타날 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증 하였다.

III. 성적

1. 체중에 미치는 영향

대조군에서는 정상군에 비하여 급격한 체중 증

가를 보였다. 두 실험군 모두 대조군에 비하여 체중이 감소하였으며, ACE-250군은 18주째에서 대조군에 비하여 유의한 체중 감소 소견을 보였고, ACE-500군은 20주째에서 대조군에 비하여 유의한 체중 감소 소견을 보였다(Fig. 1).

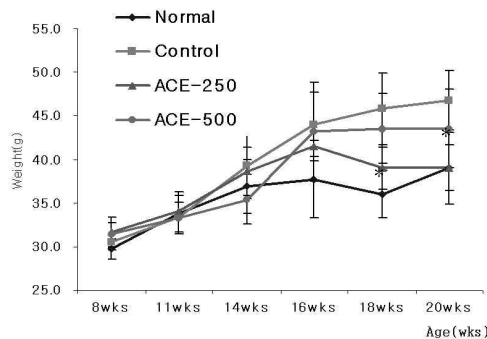


Fig. 1. Effects of ACE on the body weight in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean \pm standard deviation.

Normal : non-treated group.

Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.

ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract (250 mg/kg, p.o) group.

ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract (500 mg/kg, p.o) group.

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(* : $p < 0.05$ vs control).

2. 24시간 단백뇨에 미치는 영향

단백뇨 수준의 변화를 살펴보면, 정상군의 24시간 단백뇨 지수(index of 24hrs proteinuria)는 0.1 ± 0.2 , 대조군은 2.6 ± 1.3 으로 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다($p < 0.001$). ACE-250군은 0.4 ± 0.2 ($p < 0.01$), ACE-500군은 0.2 ± 0.3 ($p < 0.001$)으로 모두 단백뇨 지수가 level 1.0 이하 수준으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

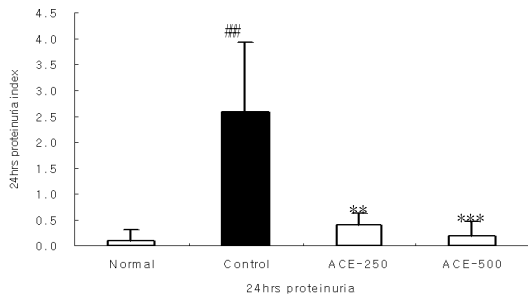


Fig. 2. Effects of ACE on index of 24hrs proteinuria in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

0 : Trace or negative
 1 : 0.30 g/L or 30 mg/dl
 2 : 1.0 g/L or 100 mg/dl
 3 : 3.0 g/L or 300 mg/dl
 4 : ≥ 20.0 g/L or ≥ 200 mg/dl

The results are expressed the mean \pm standard deviation.

Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
 ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
 ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs control, ### : $p < 0.001$ vs normal).

3. 혈청학적 기본변화에 미치는 영향

1) Albumin에 미치는 영향

혈청 중 albumin 농도는 정상군에서는 $2.12 \pm$

0.04 g/dl 였고, 대조군에서는 1.47 ± 0.16 g/dl 로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였고($p < 0.001$), ACE-250군에서는 1.97 ± 0.12 g/dl ($p < 0.001$), ACE-500군이 2.01 ± 0.13 g/dl ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3).

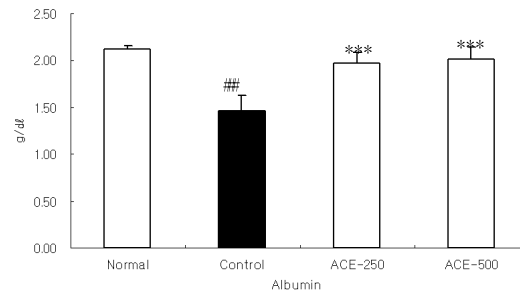


Fig. 3. Effects of ACE on serum albumin level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean \pm standard deviation.

Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
 ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
 ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*** : $p < 0.001$ vs control, ### : $p < 0.001$ vs normal).

2) Total cholesterol에 미치는 영향

혈청 중 total cholesterol 농도는 정상군에서는 71.0 ± 3.4 mg/dl 였고, 대조군에서는 107.8 ± 6.4 mg/dl 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.001$), ACE-250군에서는 80.0 ± 11.1 mg/dl ($p < 0.001$), ACE-500군에서는 91.8 ± 7.4 mg/dl ($p < 0.05$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

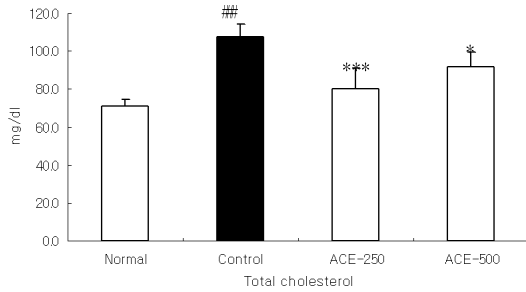


Fig. 4. Effects of ACE on serum cholesterol level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
 ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
 ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(* : p<0.05, *** : p<0.001 vs control, ### : p<0.001 vs normal).

3) Triglyceride에 미치는 영향

혈청 중 triglyceride 농도는 정상군에서는 63.4 ± 11.7 mg/dl 였고, 대조군에서는 76.4 ± 17.2 mg/dl 로 정상군에 비하여 증가하였고, ACE-250군에서는 50.2 ± 10.0 mg/dl (p<0.05), ACE-500군이 48.8 ± 6.1 mg/dl (p<0.05)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

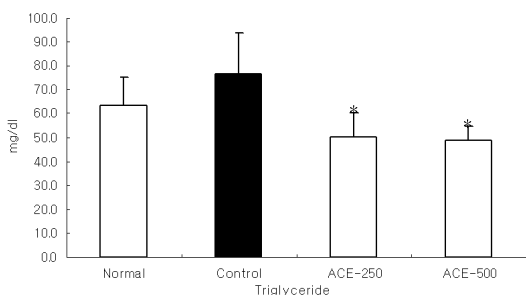


Fig. 5. Effects of ACE on serum TG level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
 ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
 ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(* : p<0.05 vs control).

4) Creatinine에 미치는 영향

혈청 중 creatinine 농도는 정상군에서는 0.52 ± 0.03 mg/dl 였고, 대조군에서는 0.54 ± 0.02 mg/dl 로 정상군에 비하여 증가하였으며, ACE-250군에서는 0.55 ± 0.04 mg/dl 로 증가하였고, ACE-500군에서는 0.51 ± 0.02 mg/dl 로 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

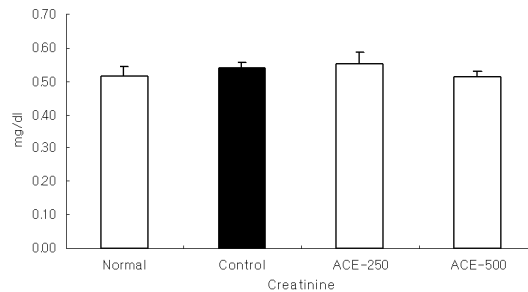


Fig. 6. Effects of ACE on serum creatinine level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
 ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
 ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

5) BUN에 미치는 영향

혈청 중 BUN 농도는 정상군에서는 30.1 ± 3.00 mg/dl 였고, 대조군에서는 30.2 ± 2.15 mg/dl 로 정

상군과 큰 차이를 보이지 않았으며, ACE-250군에서는 27.5 ± 0.85 mg/dl, ACE-500군에서는 28.1 ± 0.92 mg/dl 로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

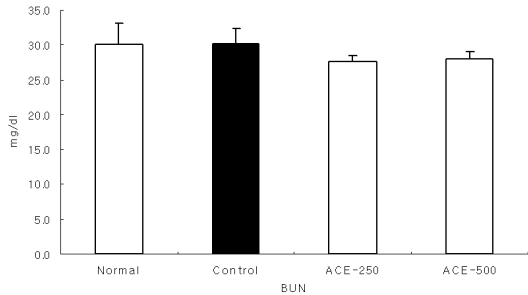


Fig. 7. Effects of ACE on serum BUN level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

4. 혈청 IgG, IgM, IgA에 미치는 영향

1) IgG에 미치는 영향

혈청 중 IgG 농도는 정상군에서는 5.0 ± 0.2 mg/ml 였고, 대조군에서는 6.7 ± 0.1 mg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.001$), ACE-250 군에서는 6.0 ± 0.1 mg/ml ($p < 0.01$), ACE-500군에서는 4.8 ± 0.4 mg/ml ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

2) IgM에 미치는 영향

혈청 중 IgM 농도는 정상군에서는 2.8 ± 0.3 mg/ml 였고, 대조군에서는 8.2 ± 1.1 mg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고($p < 0.001$), ACE-250 군에서는 3.3 ± 0.3 mg/ml ($p < 0.001$), ACE-500군에서는 4.1 ± 0.1 mg/ml ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9).

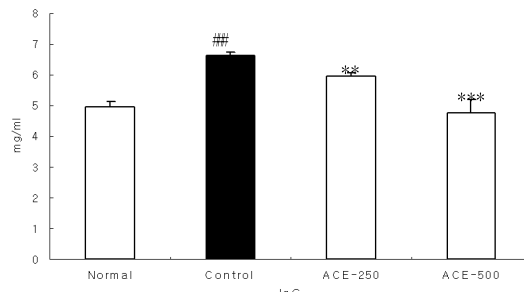


Fig. 8. Effects of ACE on serum IgG level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.
Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs control, ### : $p < 0.001$ vs normal).

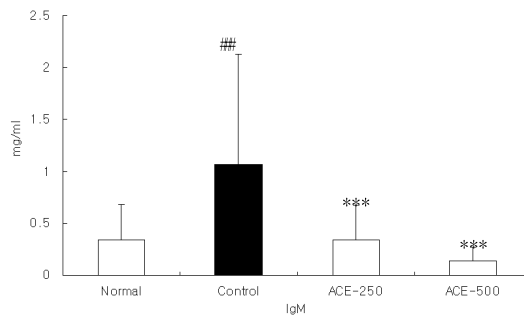


Fig. 9. Effects of ACE on serum IgM level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.
Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*** : $p < 0.001$ vs control, ### : $p < 0.001$ vs normal).

3) IgA에 미치는 영향

혈청 중 IgA 농도는 정상군에서는 2.3 ± 0.4 mg/ml 였고, 대조군에서는 6.6 ± 1.8 mg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.001$), ACE-250 군에서는 2.2 ± 0.4 mg/ml ($p < 0.001$), ACE-500군에서는 2.2 ± 0.5 mg/ml ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10).

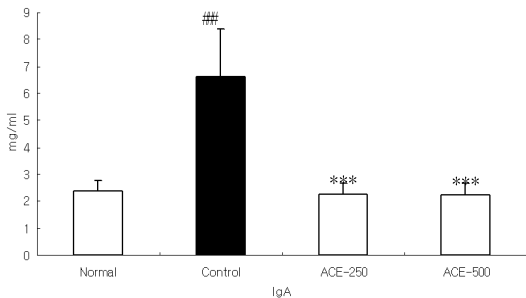


Fig. 10. Effects of ACE on serum IgA level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.

Control : treated with cBSA(10 mg/kg i.p) group.

ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.

ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*** : $p < 0.001$ vs control, ### : $p < 0.001$ vs normal).

5. 혈청 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ 에 미치는 영향

1) TNF- α 에 미치는 영향

혈청 중 TNF- α 의 농도는 정상군에서는 145.3 ± 10.7 pg/ml 였고, 대조군에서는 320.4 ± 16.1 pg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.001$), ACE-250군에서는 181.3 ± 26.0 pg/ml ($p < 0.001$), ACE-500군에서는 135.8 ± 15.5 pg/ml ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11).

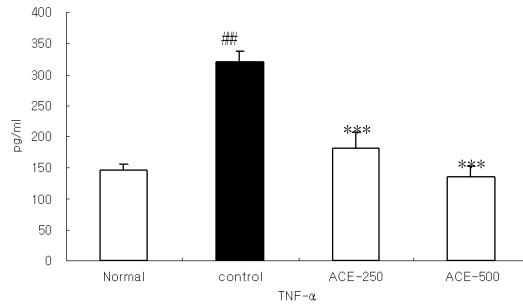


Fig. 11. Effects of ACE on serum TNF- α level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.

Control : treated with cBSA(10 mg/kg i.p) group.

ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.

ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*** : $p < 0.001$ vs control, ## : $p < 0.001$ vs normal).

2) IL-6에 미치는 영향

혈청 중 IL-6 농도는 정상군에서는 19.1 ± 1.5 pg/ml 였고, 대조군에서는 62.0 ± 9.6 pg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.001$), ACE-250군에서는 16.6 ± 1.9 pg/ml ($p < 0.001$), ACE-500군에서는 24.7 ± 2.9 pg/ml ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

3) IL-1 β 에 미치는 영향

혈청 중 IL-1 β 농도는 정상군에서는 80.8 ± 8.4 pg/ml 였고, 대조군에서는 196.3 ± 62.3 pg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.01$), ACE-250군에서는 102.8 ± 43.6 pg/ml ($p < 0.05$), ACE-500군에서는 89.3 ± 31.9 pg/ml ($p < 0.01$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13).

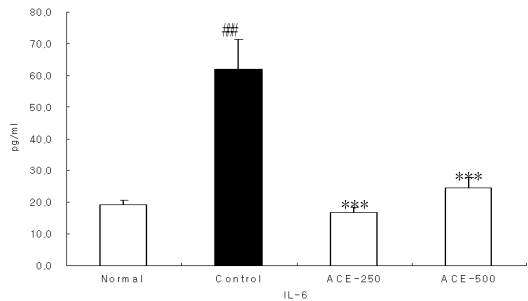


Fig. 12. Effects of ACE on serum IL-6 level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.

Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.

ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.

ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*** : p<0.001 vs control, ### : p<0.001 vs normal).

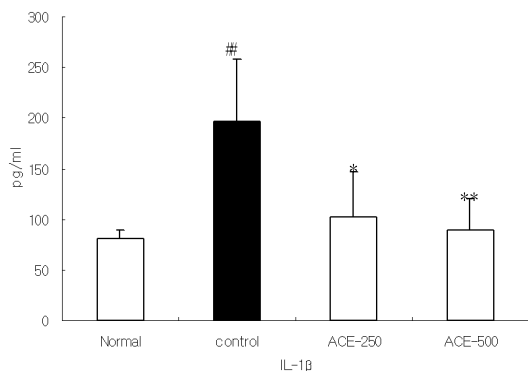


Fig. 13. Effects of ACE on serum IL-1β level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.

Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.

ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.

ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(* : p<0.05, ** : p<0.01 vs control, ## : p<0.01 vs normal).

4) IFN-γ에 미치는 영향

혈청 중 IFN-γ 농도는 정상군에서는 166.0 ± 13.5 pg/ml 였고, 대조군에서는 265.2 ± 29.1 pg/ml 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며 (p<0.01), ACE-250군에서는 99.9 ± 17.2 pg/ml (p<0.001), ACE-500군에서는 83.7 ± 19.1 pg/ml (p<0.001)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 14).

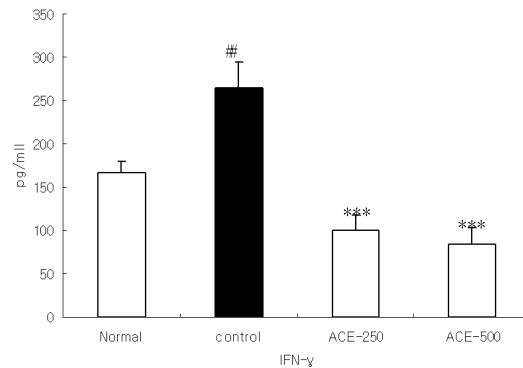


Fig. 14. Effects of ACE on serum IFN-γ level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

The results are expressed the mean±standard deviation.

Normal : non-treated group.

Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.

ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.

ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*** : p<0.001 vs control, # : p<0.01 vs normal).

6. Splenocyte에서 IL-1β의 mRNA발현에 미치는 영향

Splenocyte에서 IL-1β RNA level에서 분석한 결

과, ACE 투여군 모두에서 대조군에 비하여 mRNA 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었고, 특히 ACE-500 군에서 현저하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 15).

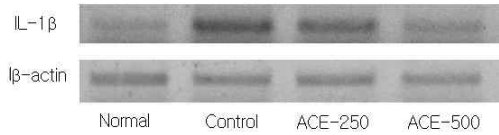


Fig. 15. Effects of ACE on mRNA expression of cytokines in splenocytes.

Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group.
 ACE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(250 mg/kg, p.o) group.
 ACE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and AC extract(500 mg/kg, p.o) group.

7. 광학현미경적 소견에 미치는 영향

정상군은 사구체 기저막의 비후가 나타나지 않았고, 대조군은 cBSA와 면역복합체의 침착으로 추정되는 사구체 기저막의 비후가 관찰되었다. ACE-250 군과 ACE-500군에서는 대조군에 비하여 사구체 기저막의 비후가 감소되어 있는 것이 관찰되었으며, ACE-250군보다는 ACE-500군에서 보다 뚜렷하게 감소되어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 16).

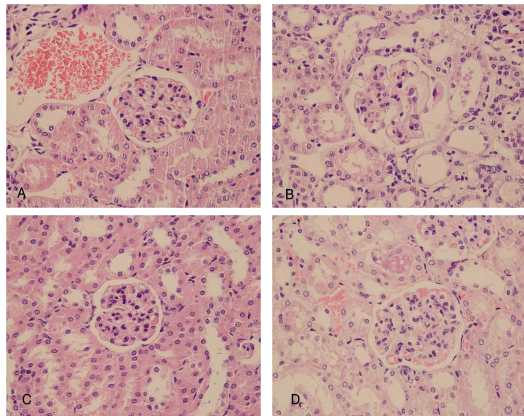


Fig. 16. H&E staining of renal glomeruli in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.

A. Normal : non-treated group.

B. Control : treated with cBSA(10mg/kg, i.p) group.
 C. ACE-250 : treated with cBSA(10mg/kg, i.p) and AC extract(250mg/kg, p.o) group.
 D. ACE-500 : treated with cBSA(10mg/kg, i.p) and AC extract(500mg/kg, p.o) group.
 Control shows diffuse thickening of glomerular basement membrane. H&E staining : original magnification ×400.

IV. 고찰

MN은 신생검에서 특징적 광학현미경 소견인 사구체 기저막의 미만성 비후에서 명명된 질환으로, 외피하 부위에 면역복합체가 침착하여 발생하여 병리학적 진단명이다^{1,2,18}.

MN은 다른 전신질환이 동반되지 않는 원발성과 전신질환 혹은 약제에 동반된 이차성으로 분류되며, 41세 이후 성인 신증후군 환자의 가장 많은 원인을 차지한다¹. 환자의 80% 이상에서 보통 비선택성 단백뇨를 나타내는 신증후군으로 발현되며, 현미경적 혈뇨가 50%의 환자에서 나타나고, 고혈압은 초기에는 10~30%에서 나타나나, 나중의 진행성 신부전에서는 흔하게 나타난다^{1,2,18}.

임상경과는 다양하여 25% 정도는 자연관해를 이루며, 20~50%의 환자에서는 신부전으로 진행되는 것으로 알려져 있다¹⁹. 임상경과가 다양한 만큼 치료방법에 대하여도 아직까지 확립된 바가 적어, 일부에서는 보존적 치료법만으로도 73% 내외에서 정상 신기능을 유지한다고 보고하였고²⁰, 고용량의 스테로이드를 이용한 치료군이 신부전으로의 진행이 적다는 연구도 있었다²¹. 하지만 대단위의 후향적 연구결과는 스테로이드 단독치료가 신기능과 단백뇨에 큰 효과를 미치지 못한 것으로 나타났고^{22,23}, 최근에는 스테로이드 단독치료와 cyclophosphamide 병용치료가 유의한 효과가 있음이 보고되었으나²⁴ 아직 MN에 대한 치료는 이론의 여지가 많다.

한의학에서 MN은 임상증상 상 ‘浮腫’, ‘水腫’, ‘虛勞’, ‘尿濁’ 등의 범주에 해당하며, 脾, 肺, 腎 三臟의 기능실조와 관련이 있다²⁵. 脾氣虛弱, 水濕貯

留, 氣陰兩虛, 濕瘀阻絡, 肝腎陰虛, 濕熱蘊結 등의 辨證에 따라 清熱利濕, 活血去瘀, 健脾活血, 益氣養陰 및 溫腎補陽의 치법이 활용되고 있으며³⁻⁵, 중국에서는 MN에 益氣活血化濕의 방법을 활용한 치료 가 단백뇨 감소와 체내 알부민 수치회복에 효과가 있음이 보고되었다⁶. 국내에서는 膜性腎炎方⁷ 및 그 가미방⁸⁻¹¹과 黃連¹², 黃芩¹³에 대한 실험적 연구가 진행되어 MN에 유의한 효과가 있음이 보고되었다.

兒茶는 豆科에 속한 *Acacia catechu*(L. F.) Willd.의 心材 혹은 去皮한 가지부분을 煎制한 후 건조하여 膏의 형태로 만든 것으로, 성미는 涼苦澁하며, 心, 肺, 脾經에 歸經하고 收濕斂瘡, 止血定痛, 清熱化痰의 효능을 가지고 있다¹⁴. 임상에서는 瘡瘍, 久潰不斂, 牙疳, 口瘡, 咯血, 吐血, 尿血, 便血, 血崩, 外傷出血, 痔瘡癰腫, 痰熱咳嗽에 활용하며, 保肝, 利膽의 작용과 면역활성 작용, 항균작용, 장관운동 촉진 작용, 혈당강화 작용, 혈액순환 개선 작용 등의 약리 작용이 있음이 보고되었다¹⁴.

張¹⁵은 난치성 신장질환의 경우 濕, 痰, 瘀가 병리 과정상 원인과 결과로 작용하여 痰濁과 瘀血이 腎絡을 閉塞하여 신기능의 저하를 유발한다고 하였고, 淡²⁶은 腎病은 水腫의 범주에 속하며 痰飲과 瘀血이 관계가 있으며, “瘀血化水, 亦發水腫”, “怪病多痰”이라 하여 脾肺腎 三臟의 치료와 더불어 痰濁과 瘀血의 치료를 중시하였다. 또한 清熱작용을 가진 처방⁸ 및 약물^{12,13}들이 실험적으로 MN에 유의한 효과가 있음이 보고되어, 收濕斂瘡과 清熱化痰의 효능을 가진 兒茶가 신장 질환의 개선에 일정한 효과가 있을 가능성을 시사한다.

이에 저자는 兒茶가 MN에 미치는 영향을 확인하고자 저농도와 고농도의 兒茶 추출물을 MN mouse에 투여한 후 체중 및 24시간 단백뇨의 변화를 관찰하였고, 혈액학적 개선여부를 확인하기 위해 혈청 cholesterol, triglyceride, albumin, BUN, creatinine을 측정하였다. 또한 면역학적 원인으로 유발되는 사구체 질환의 개선 여부와 兒茶의 면역

학적 개선 효과를 확인하기 위해 IgG, IgA, IgM 등의 immunoglobulin과 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ 등 대표적인 cytokine의 혈청 농도를 측정하였다.

MN 유발은 cBSA를 활용하였다. 이 방법은 본래 pH 값이 4.5~5.1 정도인 BSA를 양이온화 하여 pH가 9.5 이상으로 변화시켜 cBSA를 만들고²⁷, 이 cBSA가 음이온화 되어있는 GBM에 침착하게 한 뒤 cBSA를 항원으로 작용시켜 MN을 유발하는 것으로, 유발 및 약물치료 실험에 적당한 생쥐모델을 사용하였다²⁸.

본 실험에서 대조군의 체중증가는 MN으로 야기된 수분 저류 및 고지혈증으로 인한 지질대사의 장애로 나타난 것으로 추측되며, 실험군에서 체중증가의 정도가 적게 나타난 것은 兒茶가 사구체 여과에 영향을 주어 MN으로 나타난 부종의 개선 및 지질 대사의 개선으로 나타난 것으로 생각된다.

단백뇨는 혈장 단백질에 대한 사구체의 charge 및 size selective barrier의 장애로 인해 투과성이 항진되어 나타나는 것으로¹², 실험군에서 단백질뇨가 유의성 있게 감소한 것은 兒茶가 사구체 여과장벽의 회복에 영향을 미치고, 면역복합체의 침착반응을 억제하여 나타난 것으로 유추할 수 있다.

신증후군에서 단백질의 지속, 신장에서의 단백질 이화작용의 증가, 간에서의 합성장애 등은 저알부민혈증을 유발시킨다¹². 저알부민혈증으로 인한 혈장 삼투압 감소는 간에서 콜레스테롤이 풍부한 지단백 합성을 촉진시켜 이로 인해 cholesterol 및 triglyceride가 풍부한 LDL, VLDL의 생성이 증가되고, HDL은 정상 혹은 저하된다¹². 본 실험에서 측정된 혈청 albumin 농도는 대조군에 비해 실험군에서 유의성 있게 상승하였으며, total cholesterol 및 triglyceride는 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과는 兒茶의 사구체 여과장벽 회복에 의한 단백질뇨 감소효과에 더불어 나타난 것으로 판단되며, 또한 신증후군에서 고지혈증이 지방 합성의 증가와 지방대사의 감소의 결과라는 사실¹로 보아 兒茶가 실험군의 지방대사의 회

복에도 직접적인 영향을 주었을 가능성도 생각할 수 있다.

혈청 creatinine과 BUN은 정상군, 대조군, 실험군에서 약간의 증감이 관찰되었으나, 실험적 유의성은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 정상군, 대조군, 실험군 모두 일정 수준 이상의 사구체 여과율이 유지되어, 혈청 creatinine과 BUN의 변화에 큰 영향을 주지 않은 것으로 판단할 수 있다.

Ig(immunoglobulin)는 항체를 뜻하는 다른 명칭으로, 분화된 B세포의 산물이며, 체액성 면역반응을 매개한다²⁹. IgG는 혈중 Ig의 약 75~85%를 차지하고, 항원이 숙주에 재폭될 경우 가장 빈번하게 나타나며, 이차 항체반응의 주된 항체이다^{18,29,30}. IgM은 면역반응에서 가장 먼저 출현하는 Ig이며, 자가면역질환에서 면역복합체를 형성하는 중요한 구성 성분이고, IgA는 분비물 내에 존재하는 주된 항체로, 국소면역을 담당하는 대표적인 Ig이다^{18,29,30}. 본 실험에서 IgG, IgM, IgA 모두 대조군에서 정상군에 비하여 증가하고, 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 관찰되었다. IgG와 IgM은 농도 의존적인 결과를 보였으며, IgA는 농도에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. MN이 면역학적 기전에 의해 사구체에 손상이 발생하며, IgG의 침착이 주된 소견이라는 사실^{1,2}로 보아, IgM과 IgA의 감소는 兒茶의 투여가 MN으로 나타나는 면역학적 과정 및 MN을 유발시키는 면역학적 과민상태의 회복에 영향을 미치는 것을 알 수 있으며, IgG의 감소는 兒茶의 투여가 면역 과민의 호전과 MN의 악화 예방 및 관해에 영향을 미칠 수 있음을 유추할 수 있게 한다.

Cytokine은 많은 면역 질환과 염증질환에서 중요한 치료제로서, 또는 특이한 길항제에 대한 표적 물질로 작용한다²⁹. TNF- α 는 급성 염증반응의 주된 매개자이며 많은 중증감염의 전신적 합병증의 원인이 되고, 메산지움, 내피세포, 외피세포를 자극함으로써 사구체 손상을 일으킨다^{31,32}. IL-1 β 도 역시 TNF와 비슷하게 감염에 대한 숙주의 염증반응

및 다른 염증성 자극의 매개자로서의 역할을 하며, 메산지움 세포 증식과 세포의 기질 축적을 자극한다^{18,29-32}. IFN- γ 는 대식세포를 활성화시키는 세포성 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokines이며, IL-6는 선천면역에서 염증의 전신성 효과를 야기하고, 적응면역에서 B 림프구의 성장을 자극하는 작용을 한다^{18,29-32}. 대조군에서 cytokine이 증가된 소견은 IL-1과 TNF- α 가 원발성 사구체 신염과 밀접한 연관성을 가진다는 보고^{31,32}와 IL-1 β 가 메산지움 세포 증식과 세포의 기질 축적을 자극하는 물질이라는 사실³³과 맥락을 같이 하며, 실험군에서 측정된 cytokine들이 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것은 兒茶의 투여가 사구체의 염증반응을 억제하여 사구체 여과장벽 회복에 영향을 미친 것으로 사료된다.

아울러 splenocyte에서 분석된 IL-1 β 의 mRNA 발현은 실험군에서 모두 대조군에 비하여 감소되었고, 특히 ACE-500군에서 현저하게 감소하였다. 이를 통해 兒茶의 투여로 인한 염증반응 억제와 사구체 여과장벽 회복에 미치는 영향이 RNA수준에서 이루어짐을 알 수가 있다.

한편, 광학현미경적 소견에서 정상군은 사구체 기저막의 비후가 나타나지 않았고, 대조군은 cBSA와 면역 복합체의 침착으로 추정되는 사구체 기저막의 비후가 관찰되었다. 그에 반해 ACE-250군과 ACE-500군에서는 대조군에 비하여 사구체 기저막의 비후가 감소되어 있는 것이 관찰되었으며, ACE-250군보다는 ACE-500군에서 보다 뚜렷하게 감소되어 있는 것으로 관찰되었다.

결론적으로 兒茶의 收濕斂瘡과 淸熱化痰 작용은 인체 내에서 면역학적 개선과 지질대사 개선 등의 효과로 작용하여, 여과장벽에 일정한 영향을 미침으로써, cBSA로 유발된 MN mouse에 유의한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 결과는 兒茶의 기타 면역학적 질환의 치료 가능성 및 MN의 관해 가능성을 보여주며, 향후 구체적인 기전과 임상적 경과에 대하여는 지속적이고 추가적인 연구가 필

요할 것으로 판단된다.

V. 결 론

cBSA로 유발된 MN mouse에 兒茶추출물을 투여하여 체중, 24시간 단백질 및 혈액학적 변화와 면역 및 조직 병리학적 형태에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 兒茶추출물은 모두 대조군에 비하여 24시간 단백질, 혈청 중 total cholesterol, triglyceride 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
2. 兒茶추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 중 albumin의 농도를 유의성 있게 증가시켰다.
3. 兒茶추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 중 IgG, IgM, IgA, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
4. 兒茶추출물은 대조군에 비하여 혈청 IL-1 β 의 mRNA 발현을 감소시켰다.
5. 兒茶추출물은 대조군에 비하여 광학현미경 소견에서 사구체 기저막의 비후를 감소시켰다.

참고문헌

1. 대한신장학회. 임상신장학. 서울: 광문출판사; 2001, p. 77, 221-32, 244-8.
2. 김현철, 박성배, 박원균, 안기성, 임학. 통합강의를 위한 신장학. 서울: E-PUBLIC; 2006, p. 263-72, 291-300.
3. 두호경. 동의신계학. 서울: 동양의학연구원출판부; 1993, p. 89, 238-42, 301, 305, 369-78, 393-6, 842, 852, 855, 915.
4. 張大寧. 實用中醫腎病學. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1990, p. 90-6, 344-6.
5. 白雲貞, 陳志康. 膜性腎病的中醫臨床與實驗研究進展. 天津中醫雜誌. 2001;18(2):53.

6. 黃少珍, 唐德燊, 劉華鋒. 膜性腎病的治療研究進展. 2008;3:316-8.
7. 김재형, 조충식, 김철중. 膜性腎炎가 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2007;24(4):163-80.
8. 최인구, 조충식, 김철중. 淸熱膜性가 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):104-16.
9. 김두희, 조충식, 김철중. 活血膜性가 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2008;29(4):68-82.
10. 이정원, 조충식, 김철중. 補氣膜性가 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(4):1083-99.
11. 임범수, 조충식, 김철중. 補陽膜性가 Cationic Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2009;30(2):63-78.
12. 채은영, 조충식, 김철중. 黃連이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2009;24(1):99-110.
13. 김만호. 黃芩이 Cationized Bovine Serum Albumin 투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대전대학교 박사학위 논문. 2007.
14. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社; 1999, vol.4 p. 309-12.
15. 張焱, 常克. 安腎膠囊對膜性腎病大鼠治療作用的實驗研究. 山西中醫學院學報. 2007;3(9):19-21.
16. 何衛民 張文藏. 復腎湯對家兔膜性腎病的實驗觀察. 天津醫科大學學報. 1999;5(4):70-2.
17. Border WA, Ward HJ, Kamil ES, Cohen AH. Induction of membranous nephropathy in rabbits

- by administration of an exogenous cationic antigen. *J Clin Invest.* 1982;69(2):451-61.
18. 대한내과학회 편. HARRISON 내과학 16th. 서울: MIP; 2006, p. 1827-48.
 19. Zucchelli P, Ponticelli C, Cagnoli L, Passerini P. Long-Term Outcome of Idiopathic Membranous Nephropathy With Nephrotic Syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1987;2:73-8.
 20. Schieppati A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, Remuzzi G. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *Engl J Med.* 1993;329:85-9.
 21. A controlled study of short-term prednisone treatment in adults with membranous nephropathy. Collaborative Study of the Adult Idiopathic Nephrotic Syndrome. *N Engl J Med.* 1979;301:1301-6.
 22. Cameron JS, Healy MJR, Adu D. The Medical Research Council trial of short-term high-dose alternate day prednisolone in idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in adults. *Q J Med.* 1990;74:1313-56.
 23. Cattran DC, Delmore T, Roscoe J, Cole E, Cardella C, Charron R, Ritchie S. A randomized controlled trial of prednisone in patients with idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 1989;320:210-5.
 24. 윤설영, 이은주, 허정훈, 손영기, 한경근, 안원석, 김성은, 김기현. 특발성 막성 신병증의 임상 경과. *대한내과학회지.* 2004;66(2):175-85.
 25. 沈慶法, 執行. 中醫臨床腎臟病學. 上海: 上海科學技術文獻出版社; 1997, p. 186-90.
 26. 淡華, 于小勇, 史健. 益氣活血中藥結合鷄尾酒療法治療難治性腎病綜合征. 2005;26(8):848-9.
 27. Rafati AA, Gharibi H, Iloukhani H. Conformational stability of bovine serum albumin by cationic surfactant treatments. *Physics and Chemistry of Liquids.* 2003;41:509-17.
 28. Chen JS, Chen A, Chang LC, Chang WS, Lee HS, Lin SH et al. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine albumin: antigen dose-response relations and strain differences. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2004;19(11):2721-8.
 29. 강재성 역. 세포분자면역학. 서울: 범문사; 2004, p. 53, 247-74.
 30. 이귀녕, 권오현. 임상병리과외. 서울: 의학문화사; 2003, p. 265-81, 716-27.
 31. Papayianni A. Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren Fail.* 1996 Sep;18(5):725-40.
 32. Wardle EN. Cytokine growth factors and glomerulonephritis. *Nephron.* 1991;57(3):257-61.
 33. 박미나, 가양일, 이상열, 정래익, 나승연, 정경환 등. 한국인 원발성 사구체신염에서 IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α 유전자 다형성에 관한 연구. *대한신장학회지.* 2006;25(2):221-8.