

Original Articles

陰谷에 시술한 동과인 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

이정환, 김정호, 김영일
대전대학교 한의과대학 침구학교실

Anti-inflammatory Effect of *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture at KI10 on nephritis in rats

Jeong-hwan Lee, Jeong-ho Kim, Young-il Kim

Dept. of Acupuncture & Moxibustion College of Oriental Medicine, Daejeon University.

Received : 10. 03. 19

Revised : 10. 05. 11

Accepted : 10. 05. 24

Key Words:

Nephritis, Herbal-acupuncture, KI10, *Benincasae Semen*, LPS.

ABSTRACT

Objective : This study aimed to evaluate the effects of *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture (BS-HA) at KI10 (Umgok) on nephritis induced by LPS in rat.

Methods : Rats with nephritis induced by LPS, were treated with *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture (BS-HA) injection at KI10. Two control groups, N.P. group and saline group, were treated with 26 gauge needle at KI10, 3 times a week. In Saline group normal saline was injected at KI10.

To evaluate the effects of *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture at KI10 on nephritis in rats, WBC, Neutrophils in blood, BUN, Creatinine, TNF- α , CINC-1 in serum, urinal volume and creatinine and Total protein in urine, renal TNF- α , renal MPO were measured and renal tissue was also analyzed.

Results : BS-HA injected at KI10 significantly inhibited WBC and neutrophil in blood, creatinine in serum, and MPO in kidney of LPS-stimulated rats.

BS-HA injected at KI10 reduced concentration of neutrophil in renal tissue of LPS-stimulated rats.

Conclusion : BS-HA at KI10 has a therapeutic effect for nephritis in LPS-stimulated rat. Therefore, it is suggested that BS-HA at KI10 may be an useful therapeutics in clinical field after further researches.

I. 서론

신장은 횡격막아래 등쪽으로 제 11흉추와 제 12흉추의 높이에 척추 양쪽 총 2개가 위치하는 장기이며, 그 크기는 성인의 주먹보다 약간 작은 정도로서 길이가 약 10cm, 너비가 5cm, 두께가 3cm 정도이다. 신장 하나의 무게는 100~150g 정도로 우리 몸 체중의 0.4~0.5%에 불과 하지만 심장에서 방출되는 혈액량의 약 25% 가량이 신장으로 흘러 들어간다. 혈액공급을 받아 신장에서 여과 배설하는 역

할을 하기에 혈액 속 약물 및 독소에 쉽게 노출되어 손상 받기도 한다¹⁾.

급성 신장염은 감염이나 자가면역체계의 이상 활성화로 신원에서의 급성염증에 의하여 육안적 혹은 현미경적 혈뇨와 단백뇨, 부종, 고혈압이나 사구체여과율 감소 등 급격한 신기능 약화를 초래한다²⁾.

LPS(Lipopolysaccharide)는 그람음성박테리아의 외

* Corresponding author: Young-il Kim, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University, 1136 Dunsan-dong, Seo-Gu, Daejeon, Rep. of Korea
Tel:82-42-470-9137, Fax:82-42-470-9006, E-mail: omdkim01@dju.ac.kr

부 세포막을 구성하는 성분으로 내독소로 잘 알려져 있으며 대식세포의 활성화 인자이며 자극된 대식세포는 Tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), Interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-8, IL-10 등과 같은 cytokine을 생성하여 세포매개성 면역반응 및 염증반응에 관여한다²⁻⁶⁾.

동과인(*Benincasae semen*)은 葫蘆科(*Cucurbitaceae*)에 속한 일년생 초목인 동과의 성숙한 종자를 건조한 것으로, 性은 涼 無毒하고, 味는 甘하며 利濕排膿하는 효능이 있다⁷⁾.

음곡(KI10)은 足少陰腎經의 合水穴로서 滋補肝腎의 效能이 있어 腎虛로 인한 각종 증상을 主治한다⁸⁾.

급성 신장염에 관한 기존의 서양의학적 치료는 감염성인 경우 항생제 투여 및 대증치료만 있는 실정이며⁹⁾, 실험 연구로는 구맥¹⁰⁾, 차전자¹¹⁾ 약침을 음곡에 자침하여 유효한 효과를 보인 예가 있었으며 동과자 추출액을 투여하여 고지혈증 및 염증감소에 유의한 효과를 보인 예¹²⁾와 해열진통 효과에 대한 연구¹³⁾, 신생혈관생성 억제를 통한 항암효과 연구¹⁴⁾가 있었으나 신장염에 대한 효과는 아직 보고된 바 없었다.

이에 저자는 LPS로 유도된 신장염 병태모델 흰쥐로 음곡과 상응하는 부위에 동과인 약침을 시술하여 혈액의 RBC, WBC, neutrophil, BUN, creatinine, TNF- α , CINC-1과 소변의 creatinine, total protein, 신장내 염증활성효소(TNF- α , MPO), 조직학적 분석을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

동물은 6주령의 수컷 SD 흰쥐(체중 180 ± 20 g)을 (주) 대한바이오링크(경기도, 한국)에서 공급받아 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 실험 당일까지 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하고, 실험실은 실온($22 \pm 2^\circ\text{C}$)과 습도 20~60%를 유지하였고 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 규칙을 따랐다.

2) 약재

본 실험에 사용된 동과인(*Benincasae Semen*, 이하

BS로 표기)는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

3) 시약 및 기기(Scheme 1, 2)

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 동과인 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축 하였다. 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축하면 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 동과인 55g으로부터 얻은 약침액을 감압농축하여 건조시켜 남은 분말은 1.07g이었다(수율 1.95%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering 하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 2.5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다.

2) 세포독성

(1) 간세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD 흰쥐의 간조직을 사용하였다. 흰쥐를 Ethyl ether를 이용하여 마취시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca^{2+} , Mg^{2+} free)를 투여하며 복부 쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시킨다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640media(with 10% FBS)와 collagenase type IV (300u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 하였다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 잘 분리되도록 하였다. 얻어진 간세포는

RPMI 1640media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.

(2) MTT assay

분리된 간 실질세포의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96 well plate에 세포를 1×10^5 cells/well으로 분주하고, FBS 10%와 antibiotics를 첨가한 RPMI 1640 media에 동과인 전탕액을 농도별로 처리하고, 72시간동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution (5 mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, U.S.A)을 각 well에 20 μ l씩 분주하고 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 incubation을 실시하였다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 μ l씩 버리고, solubilizing solution을 100 μ l씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 optical densities로 확인하였다.

3) 신장염 동물 모델

6주령 수컷 SD 흰쥐에 LPS(2 mg/kg)를 복강에 투여하여 신장염을 유도하였다. 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. LPS 투여 1시간 뒤, 각 실험군에서 5마리의 혈액 sample을 채취하였으며, LPS 투여 3시간 후에는 혈액을 채취했던 동물 5마리를 sacrifice하여 신장을 적출하였다. 각 실험군의 나머지 3마리로부터 LPS 투여 후 12시간 동안 소변 sample을 채취하였다(Scheme 3).

4) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(Normal), LPS군(LPS), N.P.군(needle prick, N.P.), saline군(Saline), 동과인 약침군(BS-HA)의 5군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, N.P.군, saline군, BS-HA군은 각각 2 mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. N.P.군과 saline군, BS-HA군은 LPS 투여 1주일 전에 뒷다리 반막모양근의 힘줄아래에 좌우 교대로 음곡(KI10) 상응부위에 NP(needle prick)자극, saline 주입, 동과인 약침처치를 주 3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

(1) 정상군(Normal) : 아무 처치하지 않은 정상SD 흰쥐.

(2) LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2mg/kg으로 복강 투여한 군.

(3) N.P.군(N.P.) : 실험 전 1주일간 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 26gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 자입

한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.

(4) Saline군(Saline) : 실험전 1주일간 saline 0.2ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군.

(5) 동과인 약침군(BS-HA) : 실험전 1주일간 2.5%의 동과인 약침액 0.2ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.

5) 신장염 평가

(1) 혈액 분석

LPS 처리 1시간 뒤, ethyl ether를 이용하여 흰쥐를 마취하고 심장 채혈 법으로 각 동물에서 4ml의 혈액을 채취하였다. (주)이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 RBC, WBC, Neutrophils의 비율을 측정하였으며, 혈청 BUN의 농도를 확인하였다. 혈청 TNF-alpha, CINC-1, creatinine의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변 분석

Metabolic cage에서 12시간동안 소변을 채취하여, 배뇨량과 뇨중 total protein과 creatinine 농도를 kit를 이용하여 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 흰쥐를 마취하고 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.05% sodium azide가 첨가된 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, U.S.A)하여 잘게 간 후, 2000 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80 $^{\circ}$ C에서 보관되었다가 ELISA kit을 이용하여 TNF-alpha와 MPO의 농도를 측정하였다.

(4) 조직학적 분석

LPS 처리 3시간 후, 실험동물의 신장을 적취하여, 10%의 formalin에 고정하였다. 고정된 조직은 왁스에 format시켜 5 μ m의 두께로 박절한 후 조직 절편을 슬라이드에 부착시키고 실내에서 30분 이상 방치하였다. 슬라이드에 부착된 조직은 Harris hematoxylin에서 1분 정도 염색을 실시하고 흐르는 물에 씻어준다. 물기를 제거하고 1% acid

alcohol에 2, 3번 정도 넣었다 빼 준 뒤, 흐르는 물에 슬라이드를 씻어준 후, 0.3% ammonia water에 중화시키기 위해 5~10번 정도 넣었다 빼 준다. 다시 흐르는 물에 슬라이드를 씻어주고, Eosin에서 3분 정도 염색처리한 뒤, 95% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 주고, 다시 깨끗한 95% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼 준다. 남은 alcohol 성분은 흡수지를 이용하여 완전하게 alcohol 성분을 제거하고, 100% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 준 후, 다시 깨끗한 100% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼 준다. 남은 alcohol 성분을 제거하고, Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 주고, 다시 깨끗한 Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 준 뒤, 봉입하였다. 봉입을 끝낸 조직은 광학현미경 (ECLIPSE E600, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰한 후, digital camera(DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하였다.

6) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 결과값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 통계프로그램은 SPSS(14.0 Korean ver.)을 이용하여 분석하였다. Fig. 1의 데이터는 ANOVA-test를 이용하여 여러 농도간 결과값의 평균을 비교하였으며, Fig. 2에서는 t-test를 이용하여 LPS 처리군과 비처리군의 평균을 비교하였다. Fig. 3부터는 정상군과 LPS군의 평균을 t-test로 비교하고, 다시 LPS군, N.P.군, saline군, BS-HA군의 평균값을 ANOVA test를 이용하여 비교하였으며, ANOVA test의 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 신뢰도는 95%이상($p < 0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성적

1. 동과인 약침액의 세포독성

동과인 약침액을 1%, 2.5%, 5%, 10%로 희석하여 정상 흰쥐의 간세포에 대한 동과인 약침액의 세포독성을 확인하였다. 동과인 약침액의 농도가 높을수록 세포의 viability가 유의하게 증가됨을 나타내었으나 유의성은 없었다 (Fig 1).

2. LPS투여 따른 TNF-alpha의 농도 변화

1) Serum TNF-alpha

흰쥐에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 serum TNF-alpha의 농도를 관찰하였다. LPS 투여 1시간 후에 serum TNF-alpha의 농도가 크게 증가하여 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 높았으며, LPS 투여 3시간 후에는 1시간 후에 비하여 serum TNF-alpha가 감소하여 no-treatment군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig 2).

2) Renal TNF-alpha

흰쥐에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 각각 신장을 적출하여 renal TNF-alpha의 농도를 관찰하였다. LPS 복강투여 1시간 후에 renal TNF-alpha의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 차이를 보이지 않았으며, LPS 투여 3시간 후 renal TNF-alpha의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig 2).

3. 음곡에 투여한 동과인 약침이 LPS에 의한 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

1) 혈액학적 분석

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈액을 채취하여 RBC, WBC의 수와 WBC 중 neutrophil의 비율을 측정하였다(Table 1).

(1) RBC

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈중 RBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 RBC는 Normal군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다. BS-HA군에서 LPS군, N.P.군, saline군에 비하여 혈중 RBC에 유의한 변화는 없었다(Fig 3).

(2) WBC

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈중 WBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. N.P.군과 BS-HA군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다 (Fig 3).

(3) Neutrophil

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈액을 채취하여 WBC 중 neutrophil 비율을 측정하였다. LPS군의 neutrophil 비율은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. BS-HA군에서는 LPS군, N.P.군, saline군에 비하여 neutrophil 비율이 유의하게 감소하였다(Fig 3).

3) Blood chemistry

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 혈청 BUN, creatinine, TNF-alpha 그리고 CINC-1의 농도를 측정하였다 (Table 2).

(1) Blood urea nitrogen (BUN)

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 BUN 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 증가하였다. N.P.군 및 saline군, BS-HA군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였다. BS-HA군에서는 N.P.군 및 saline군에 비하여 혈청 BUN의 농도에 유의한 차이가 없었다(Fig 4).

(2) Creatinine

신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 creatinine 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 creatinine이 유의하게 증가하였다. BS-HA군에서는 LPS군, N.P.군, saline군에 비하여 혈청 creatinine 농도에 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig 4).

(3) TNF- α

신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 TNF- α 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 TNF- α 가 현저하게 증가하였다. Saline군에서는 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 유의하게 감소하였다. BS-HA군은 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig 4).

(4) CINC-1 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)

신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 CINC-1 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. N.P.군, saline군 및 BS-HA군은 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1이 감소하였

으나 유의성은 없었다(Fig 4).

4) 소변 분석

12시간 동안 소변을 채취하여 소변량과 뇨중 creatinine과 total protein의 양을 측정하였다(Table 3).

(1) 이노 활성

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도한 후 metabolic cage에 한 마리씩 수용하고 12시간동안 소변을 채취하여 배뇨량을 측정하였다. LPS군과 saline군에서는 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다. BS-HA군에서는 LPS대조군 및 N.P.군, saline군에 비하여 배뇨량에 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig 5).

(2) Creatinine

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 뇨중 creatinine 양을 측정하였다. LPS군의 뇨중 creatinine 농도는 정상군에 비하여 약간 증가하였으며, BS-HA군에서는 LPS군에 비하여 뇨중 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Fig 5).

(3) Total protein

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 뇨중 total protein 양을 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 뇨중 total protein이 유의하게 증가하였다. BS-HA군의 뇨중 total protein은 LPS군에 비하여 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig 5).

5) 신장 내 염증활성

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장조직을 분획한 후 TNF-alpha와 MPO의 농도를 측정하였다(Table 4).

(1) TNF- α

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 renal TNF-alpha의 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal TNF-alpha가 유의하게 증가하였다. BS-HA군의 renal TNF-alpha는 LPS군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig 6).

(2) MPO (myeloperoxidase)

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을

적출하여 renal MPO 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal MPO가 현저하게 증가하였다. N.P군 및 saline군에서는 LPS군에 비하여 renal MPO에 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. BS-HA군의 renal MPO는 LPS군 및 N.P군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig 6).

6) 조직학적 분석

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색법으로 조직을 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 정상군에 비하여 LPS군에서 신장의 조직학적 변화는 나타나지 않았다. 사구체의 neutrophil 집중은 LPS군에서 증가하고 BS-HA군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig 7).

IV. 고찰

신장은 길이 10cm, 너비 5cm, 두께 3cm 정도의 강낭콩 모양으로 횡격막 아래 등쪽으로 1쌍이 붙어있는 장기로 피질, 수질, 신우로 구성되어 있으며 피질에 수많은 모세혈관이 모여 암적갈색을 띤다. 신장은 소변을 생성하여 체액량의 조절 및 체내 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 등의 전해질 균형조절, 혈액의 pH 조절, 노폐물 배설 및 체내 과잉물질 배설, 독성물질 및 대사 후 생성된 불필요한 물질의 체외배출, 혈압의 내분비성 조절 등의 역할을 한다. 따라서 피질의 신사구체 및 세뇨관의 내피세포는 혈액 속 각종물질에 노출되어 있으며 이로 인해 신독성 물질 및 약물에 손상받기 쉬운 여건에 있다.¹⁵⁾

급성 신장염은 신원외의 급성염증에 의하여 육안적 혹은 현미경적 혈뇨와 단백뇨, 부종, 고혈압이나 사구체외과울 감소 등 급격한 신기능 약화 증상을 보이며¹⁾, 대부분은 급성 감염후에 발생하는 염증으로 보통 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pneumococcus* 등이 원인이다⁹⁾.

신장염은 한의학적으로 尿不利, 尿濁, 淋病의 범주에 해당하며 소변이 淋瀝하고 澀痛하며, 排尿困難하며, 소변이 頻尿短澀하고, 滴瀝不盡하며, 요도가 刺痛하고, 小腹이 拘急하거나 혹은 腰腹이 痛引한 증상이라 하였으며¹⁾, 《金匱要略·消渴小便不利淋病篇》¹⁶⁾에서는 “淋之爲病, 小便如栗像, 小腹弦急, 痛引臍中”이라하였고, 《諸病源候論》¹⁷⁾에서는 “諸淋者 有腎虛而膀胱熱故也”라 표현하였다.

염증이란 국소적 손상에 대한 혈관이 있는 조직의 반

응으로 손상부위를 정상으로 회복시키기 위한 생체의 방어기전이다. 염증세포는 염증 과정을 매개하는 여러 화학물질을 생성, 분비하는데 대표적인 것으로 cytokine이 있으며, 염증에 관여하는 2가지의 중요한 cytokine에는 IL-1과 TNF- α 가 있다. 염증에 관여하는 세포는 백혈구로 일반적인 염증 초기에는 neutrophil이 주로 활동하고 후기에는 림프구, 형질세포와 대식세포가 주로 활동한다^{15,18)}.

Neutrophil은 골수에서 만들어지고 세포질 내에 호중성의 과립을 가지며 염증이 발생하면 혈관의 내피세포에 부착하였다가 혈관 밖으로 유주하고 화학 주성에 의해 항원과 이물에 이동하고 부착한 후 이것들을 탐식하는 역할을 한다. 주로 그람 음성균의 세포막에서 만들어진 LPS는 대식세포를 자극하여 IL-1과 TNF- α 를 분비하여 혈관의 내피세포와 섬유모세포, 상피세포에 있는 수용체와 결합하여 neutrophil을 화학적으로 유도하여 모이게 하는 IL-8과 단핵구를 화학적으로 유도하여 모이게 하는 MCP를 분비하도록 한다¹⁵⁾.

내독소로 잘 알려진 LPS는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, 체내 세포를 자극하여 pro-inflammatory cytokine이 분비되고 염증반응을 활성화시켜 세포손상을 유발한다. LPS가 신장에 작용하면 신장으로 들어가는 혈액흐름에 장애를 일으키고 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine이 분비되고 면역반응을 유도한다. 또한 LPS는 다량의 nitric oxide를 발생하게 하며, mesangial cell 증식을 일으켜 신장염, 사구체 경화증, 신부전과 같은 신장손상에 관여한다²⁰⁻²⁴⁾.

약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종으로 수침요법, 혈위주사요법으로 불린다. 치료 경혈 및 체표 반응점에 정제 추출한 약물을 주입하여 질병을 치료하는 방법으로 자침과 약물의 효과를 동시에 얻고, 약물의 경구투여가 불가능한 경우에도 시술할 수 있는 장점이 있다¹⁹⁾.

陰谷(KI10)은 足少陰腎經의 經穴로 오금선상의 내측, 넙다리빗근 아래, 반막모양근 위, 정강이뼈 내과 뒤에 위치한다. 足少陰의 合水穴이며 自性穴로서, 祛濕通洩, 滋腎清熱, 疎泄厥氣, 利導下焦 등의 效能이 있어 膝關節炎, 股關節痛, 膝不能屈伸, 尿道炎, 陰道炎, 陰萎, 子宮出血, 帶下, 痔核, 小便難, 腹脹滿, 臍腹痛, 崩漏 등의 치료혈이 된다⁸⁾.

冬瓜仁(*Benincasae semen*)은 葫蘆科(*Cucurbitaceae*)에 속한 일년생 초목인 동과의 성숙한 종자를 건조한

것으로, 性은 涼 無毒하고, 味는 甘하며 利濕排膿하는 효능이 있어 腸癰, 腎癰 등의 염증성 질환, 淋病, 水腫 등의 신장 및 비뇨계 질환으로 인한 증상들을 치료 할 수 있다고 하였다⁷⁾.

급성 신장염에 관한 기존의 서양의학적 치료는 항생제 투여후 경과관찰 하면서 증상에 따른 처치만 있어⁹⁾, 한의학적 처치가 효과적일 수 있는 가능성이 있다. 과거 한의학적 실험 연구로는 구맥¹⁰⁾, 차전자¹¹⁾ 약침을 음곡에 자침하여 유효한 효과를 보인 예가 있었고, 동과자 추출액을 투여하여 고지혈증 및 염증감소에 유의한 효과를 보인 예¹²⁾와 해열진통 효과에 대한 연구¹³⁾, 신생혈관생성 억제제를 통한 항암효과 연구¹⁴⁾가 있었으나 동과인 약침을 시술하여 신장염에 효과를 나타낸 예는 아직 보고된 바 없었다.

이에 저자는 음곡에 시술한 동과인 약침의 신장염에 대한 치료효과를 알아보고자 동과인 약침액을 시료로 정상 흰쥐의 간세포에 대한 세포독성을 확인하고 LPS 투여 후 혈청과 신장내 TNF- α 의 농도를 측정하였고, 음곡에 동과인 약침 투여 후 혈액 및 혈청 분석, 소변분석, 신장내 염증활성, 조직학적 분석을 시행하였다.

정상 흰쥐의 간세포에 BS-HA를 여러 가지 농도로 투여한 후 세포생존율을 확인한 결과 BS-HA의 농도가 높을수록 세포의 viability가 증가됨을 확인할 수 있었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig 1). 유의성은 없었지만 1% 이하의 동과인 약침은 유효한 효과 보다는 세포독성이 더 높다고 사료되어 약침의 효과를 정확하게 확인하기 위하여 유효한 효과를 가질 수 있는 가장 낮은 농도인 2.5%의 동과인 약침을 사용하였다.

LPS 투여에 따른 TNF- α 의 농도 변화를 알아보고자 각각 혈청과 신장 조직에서 정상군과 LPS투여군의 TNF- α 농도를 측정하였다. 혈청 검사에서는 LPS 투여 후 1시간과 3시간 후 모두 TNF- α 가 증가하였고 1시간 후에는 유의한 증가를 보였으며 3시간 후에는 유의한 차이를 보이지 않으며 신장 조직검사에서는 투여하고 3시간 이후에 유의한 증가를 보였다(Fig 2). 따라서 LPS 투여에 따른 효과를 측정하기 위해서 혈청 검사는 투여하고 1시간 후에 측정하고 소변검사는 12시간 동안 소변을 채취하여 실험을 진행하였다.

Neutrophil은 골수에서 만들어지는 백혈구의 일종으로 내부에 중성 염색성 과립을 가지고 있다. 염증이 발생하면 항원과 이물질에 부착하여 탐식작용한다²⁰⁾. 본 실험에서 LPS 투여군에 비해 BS-HA군에서 백혈구, 백혈구 중 neutrophil의 비율이 BS-HA군에서 유의하게 감소

하였고 N.P.군에서 혈중 백혈구가 감소하여 음곡에 시술한 동과인 약침과 음곡혈 자침이 신장염 모델에서 염증반응을 억제한 것으로 사료된다(Fig 3).

TNF- α 는 여러 세포에 자극하여 다양한 효과를 나타내는 강력한 pro-inflammatory cytokine으로 염증반응의 급성기에 작용하며 세균감염이나 내독소의 자극을 받아 대식세포에서 분비된다. TNF- α 는 혈관투과도를 증가시키며 혈관을 확장시키고, 호중구를 활성화시키며 특정 종양세포에 종양 파괴 효과를 나타낸다. 또한 유착분자의 발현을 유도하며 IL-1, IL-6, IL-8 등과 같은 다른 cytokine의 방출을 증진시킨다. IL-8은 내피세포에서 분비되어 neutrophil을 유도하며 활성화시킨다. CINC-1은 IL-8 계열의 하나로 neutrophil에 특화된 화학주성인자로 CINC-1을 측정하여 neutrophil의 활성화 정도를 평가할 수 있다²⁵⁻²⁷⁾.

Blood urea nitrogen(BUN)은 혈중에 존재하는 요소내 질소를 표현하는 것으로 신장질환과 관계가 깊은 질소대사 산물이다. 암모니아, 요산과 더불어 요소는 질소대사의 3가지 주요 최종 대사산물로 간의 요소회로에서 생성된다. 간에서 생성된 요소는 신사구체에서 여과된 다음 세뇨관에서 일부는 재흡수 되고 나머지는 소변으로 배설된다. 신기능이 저하되어 사구체여과율이 감소하면 혈중 농도가 상승하므로 신기능을 평가할 수 있다²⁸⁾.

Creatinine은 근수축 energy로서 creatinine phosphate로부터 생성되는 creatine이 탈수되어 생긴 최종 대사산물로 BUN과는 달리 세뇨관에서 재흡수 되지 않고 체외로 배설되며 신장 이외에 영향을 받지 않으며 근육량에 비례하고 식이 영향이 거의 없이 일정하므로 creatinine의 요중 배설량은 체내의 creatinine 생성량과 동일하며 사구체의 여과율에 따라 변하므로 신장기능을 평가하는 지표가 된다²⁹⁾.

본 실험에서 흰쥐의 혈청에서 BUN, creatinine, TNF- α , CINC-1의 농도를 측정한 결과 BUN은 음곡에 시술한 모든 군이 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고, creatinine은 LPS군에 비해 유의한 변화가 없었고, TNF- α 는 saline군에서 LPS군에 비하여 유의한 감소가 있었고, CINC-1은 LPS군에 비해 음곡에 시술한 모든 군이 감소하였으나 유의성은 없었다. 혈청 BUN의 감소는 음곡의 효과로 보인다(Fig 4).

정상 신장에서는 사구체에서 여과과정을 거쳐 소변에는 적혈구, 알부민, 백혈구 등의 단백질이 일반적으로 발견되지 않거나 미량이 발견된다. 사구체 질환이 있는

상태에서는 사구체 손상으로 투과성이 증가되면 소변에서 단백물질이 발견된다¹⁵⁾. 그러므로 본 실험에서는 흰쥐에서 소변을 채취하여 소변량과 뇨중 creatinine, total protein을 측정하였다. 소변량은 LPS군에 비해 유의한 변화는 없었으나, 뇨중 creatinine은 BS-HA군에서 LPS군, N.P., saline군에 비해 유의하게 감소하였고, total protein은 LPS군에 비하여 감소하기는 하였으나 유의성은 없었다. 뇨중 creatinine의 감소는 동과인의 약리학적 효과로 보인다(Fig 5).

MPO는 neutrophil, monocyte로부터 방출되는 효소로 cytotoxic한 산과 이온을 만들게하여 면역반응에 작용한다. MPO 분석은 염증의 지표로서 조직속의 neutrophil의 수를 측정하는데 사용된다²⁹⁾.

본 실험에서는 신장 실질내 염증활성도를 측정하기 위해 TNF- α 와 MPO의 농도를 측정하였는데 TNF- α 의 농도는 음곡에 시술한 동과인 약침에 의해 유의한 변화를 보이지 않았다. MPO의 농도는 음곡에 시술한 동과인 약침에 의해 LPS군, N.P.군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig 6). 이는 앞서 neutrophil의 비율이 감소된 것과 비교하여 동과인 약침의 消腫하는 효과로 WBC중에서 neutrophil이 집중적으로 감소되어서 나타난 효과로 보인다.

신장을 적출하여 손상을 관찰한 결과 LPS대조군은 유의한 조직의 변화는 없었으나 사구체내 neutrophil이 집중되었다. BS-HA군에서는 비교적 neutrophil의 집중이 감소되는 것으로 나타났다(Fig 7). 따라서 BS-HA군에서는 LPS와 같은 독성물질이 유발한 신장염의 조직 손상을 막는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과, 음곡에 시술한 동과인 약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 대하여 혈액내 백혈구와 neutrophil의 증가를 억제하며, 혈청 내에서 BUN 등의 노폐물 축적을 감소시키고, inflammatory cytokine을 억제하였으며, 신장 실질내의 염증반응 또한 억제하는 효과를 나타내었다. 또한 음곡에 saline을 투여한 군에서 혈중 WBC, 혈청 BUN, TNF- α 가 유의하게 감소하였고, N.P.군에서 혈중 WBC, 혈청 BUN, CINC-1이 유의하게 감소한 것은 음곡의 경혈 특성에 따른 효과로 보인다. 음곡에 대한 동과인 약침은 신장의 염증반응에 효과가 있는 것으로 생각되며 향후 이에 대한 지속적 연구 및 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

음곡(KI10)에 시술한 동과인 약침이 LPS로 유도된 신장염 모델 흰쥐에 미치는 영향을 알아보고자 동과인 약침액을 시료로 정상 흰쥐에 LPS 투여 후 혈청과 신장내 TNF- α 의 농도를 측정하였고, 음곡에 동과인 약침 투여 후 혈액 및 혈청 분석, 소변분석, 신장내 염증활성, 조직학적 분석을 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BS-HA군에서 혈중 WBC와 neutrophil의 비율, 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였다.
2. BS-HA군에서 뇨중 creatinine과 신장실질내의 MPO가 유의하게 감소하였다.
3. BS-HA군에서 조직학적 분석에서 사구체의 neutrophil 집중이 LPS군에 비해 감소하는 경향을 보였다.
4. NP군과 Saline군은 LPS군에 비해 TNF- α 와 Total protein level in urine를 제외한 다른 항목에서는 유의한 차이를 보이지 않았다.

VI. 참고문헌

1. 杜鎬京. 동의신계학. 서울: 성보사. 2003:141-459.
2. Axtelle T, Pribble J. IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. J Endotoxin Res. 2001;7(4):310-4.
3. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)-kappa B activation in cultured murine macrophages. Biol Pharm Bull. 2004;27(5):617-20.
4. Mukaida N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K, Matsushima K. Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-

- kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J Leukoc Biol.* 1996;59(2):145-51.
5. Lazarov S, Balutsov M, Ianev E. The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutr Boles.* 2000;32(4):33-40.
 6. Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol.* 2000;20(5):407-31.
 7. 康秉秀, 高雲彩, 金圭烈, 金先熙, 盧昇鉉, 朴涌基 외. 본초학. 서울: 영림사. 2000:477.
 8. 대한침구학회 교재편찬위원회. 침구학(상). 파주: 집문당. 2008:175-6.
 9. Korean association of Internal medicine. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 16th ed. Seoul: MIP. 2006:1827-48.
 10. Kim KM, Lee H, Kang HJ, Lee YH, Yim YK. Anti-inflammatory Effect of *Dianthi Semen* Herbal-acupuncture at KI10 on nephritis in rats. *Korean J Meridian & Acupoint.* 2009;26(1):61-77.
 11. Park BM, Hur B, Yim YK. Anti-inflammatory Effect of *Plantaginis Semen* Herbal-acupuncture at KI10 on LPS-induced nephritis in rats. *Korean J Meridian & Acupoint.* 2009;26(2):127-43.
 12. Kim SK, Song HJ, Park KH, Shin MK. Studies on the Expectorant Activities of Water Extract of *Semen Benincasae* and its Fractions in the Rat Trachea. *Korean J Herbology.* 2003;18(1):115-26.
 13. Qadrie ZL, Hawisa NT, Khan MW, Samuel M, Anandan R. Antinociceptive and anti-pyretic activity of *Benincasa hispida* (thunb.) cogn. in Wistar albino rats. *Pak J Pharm Sci.* 2009;22(3):287-90.
 14. Lee KH, Choi HR, Kim CH. Anti-angiogenic effect of the seed extract of *Benincasa hispida Cogniaux.* *J Ethnopharmacol.* 2005;97(3):509-13.
 15. Arthur C. Guyton, John E. Hall. *Textbook of Medical Physiology.* 10th ed. Seoul: Jungdam. 2002:318-20, 452-4.
 16. 張仲景. 欽定四庫全書 子部五醫家類-卷2 金匱要略. 서울: 대성문화사. 1995:734-1113.
 17. 南京中醫學院. 諸病源候論校釋. 北京: 人民衛生出版社. 1983:464.
 18. Ivan M. Roitt, Peter J. Delves. *Roitt's Essential immunology.* 10th ed. U.S.A: Blackwell science. 2001:250-1.
 19. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울: 엘스비어 코리아. 2008:3-8.
 20. Masayo Naito, Karol Bomszyk, and Richard A. Zager. Endotoxin Mediates Recruitment of RNA Polymerase II to Target Genes in Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(7):1321-30.
 21. Suzanne Heemskerk, Arianne van Koppen, Luc van den Broek, Geert J. M. Poelen, Alfons C. Wouterse, Henry B. P. M. Dijkman, Frans G. M. Russel, and Rosalinde Masereeuw. Nitric oxide differentially regulates renal ATP-binding cassette transporters during endotoxemia. *Pflugers Arch.* 2007;454(2):321-34.
 22. Won-Il Choi, Kun Young Kwon, Jeong Wook Seo, John Beagle, Deborah A Quinn, and Charles A Hales. The role of phosphodiesterase 3 in endotoxin-induced acute kidney injury. *BMC Infect Dis.* 2009;9:80.
 23. T R WELCH, M FRENZKE, D WITTE, and A E DAVIS III. C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol.* 2002;130(1):43-8.
 24. E. Noiri, S. Kuwata, K. Nosaka, K. Tokunaga, T. Juji, Y. Shibata, and K. Kurokawa. Tumor necrosis factor-alpha mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated rat kidney. Chronological analysis of localization. *Am J Pathol.* 1994;144(6):1159-66.
 25. Watanabe K, Koizumi F, Kurashige Y, Tsurufuji S, Nakagawa H. Rat CINC, a mem-

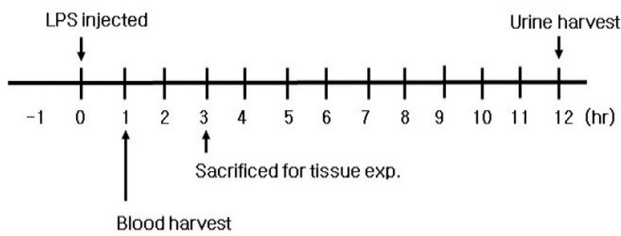
- ber of the interleukin-8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant in vivo. *Exp Mol Pathol.* 1991;55(1):30-7.
26. Nakagawa H, Komorita N, Shibata F, Ikesue A, Konishi K, Fujioka M, Kato H. Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2 alpha and CINC-2 beta, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. *Biochem J.* 1994;301(2):545-50.
27. Iida M, Watanabe K, Tsurufuji M, Takaishi K, Iizuka Y, Tsurufuji S. Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Infect Immun.* 1992;60(4):1268-72.
28. Yi KN, Kwon OH. *Clinical pathology file.* 3rd ed. Seoul: Eui-Hak Publishing. 2003:95-6, 102-3.
29. Hong Xiao, Peter Heeringa, Peiqi Hu, Zhi Liu, Minglang Zhao, Yasuaki Aratani, Nobuyo Maeda, Ronald J. Falk, and J. Charles Jennette. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest.* 2002;110(7):955-963.

Reagent	Company	Country
Phosphate buffer saline(PBS)	Sigma	U.S.A
HBSS		
Collagenase type IV		
MTT		
Lipopolysaccharide(LPS)		
gum-sucrose		
formalin		
absolute EtOH		
Harris Hematoxlin		
Eosin B		
RPMI 1640 media	Hyclone	U.S.A
Antibiotics		
FBS		
BCA Kit	BD	
TNF-alpha ELISA Kit	Oxford	
Creatinine assay Kit	Bio Assay Systems	
CINC-1 ELISA Kit	ALPCO	
MPO ELISA Kit	Cellscience	

Scheme 1. Reagent

Instrument	Company	Country
Bio-freezer	Sanyo	Japan
Rotary evaporator	Eyela	
Digital camera Microscope	Nikon	
ELISA reader	TARAN	Canada
Sonicate	Fisher	U.S.A
Ice maker	Vision science	Korea
Metabolic cage	B&P	
Cytological centrifuge Micro centrifuge	Hanil	
Cryotome	Shandon	U.K

Scheme 2. Instrument



Scheme 3. Experimental Procedure

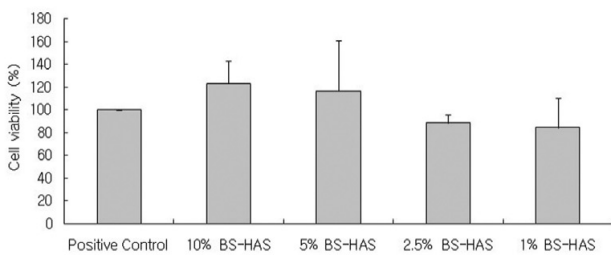
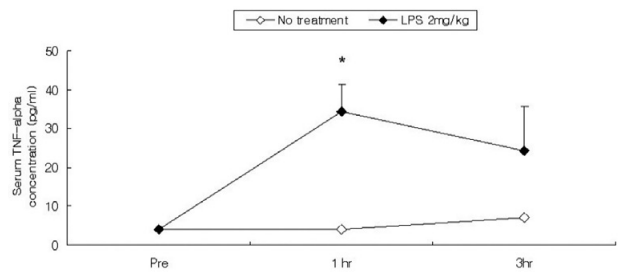
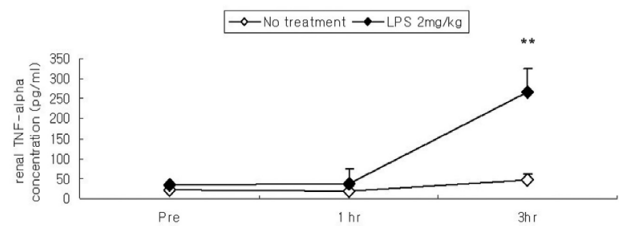


Fig 1. Cytotoxicity of BS-HAS on rat liver cells.
 Positive Control : culture medium without BS-HAS
 10%, 5%, 2.5%, 1% BS-HAS : culture medium with 10%, 5%, 2.5%, 1% BS-HAS respectively



A) Serum TNF-alpha level in SD rats.



B) Renal TNF-alpha level in SD rats.

Fig 2. Effect of LPS in SD rats.

* : $p < 0.05$, compared to no-treatment group by t-test

** : $p < 0.01$, compared to no-treatment group by t-test

Table 1. Blood cell counts in LPS-stimulated rats.

	Normal	LPS	N.P.	Saline	BS-HA
RBC($\times 10^6$ Cell/ μ l)	7.01 \pm 0.423	7.01 \pm 0.304	7.01 \pm 0.442	7.37 \pm 0.747	7.41 \pm 0.242
WBC($\times 10^3$ Cell/ μ l)	3.07 \pm 2.397	11.62 \pm 0.631	2.93 \pm 2.430	6.25 \pm 3.330	4.38 \pm 3.701
Neutrophil(%)	84.60 \pm 2.790	94.20 \pm 2.387	89.60 \pm 4.879	92.60 \pm 1.140	43.80 \pm 11.122

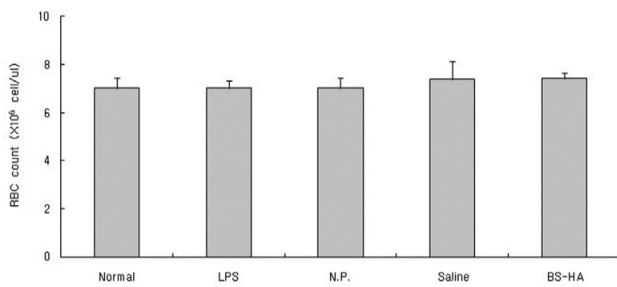
Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

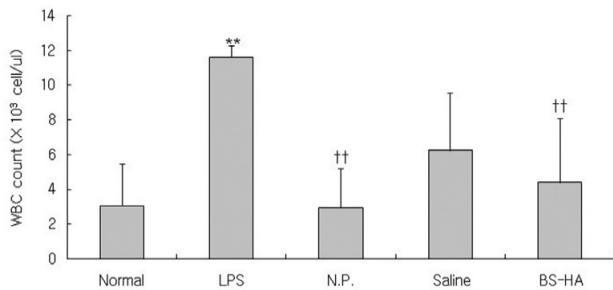
N.P. : LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at KI10

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI10

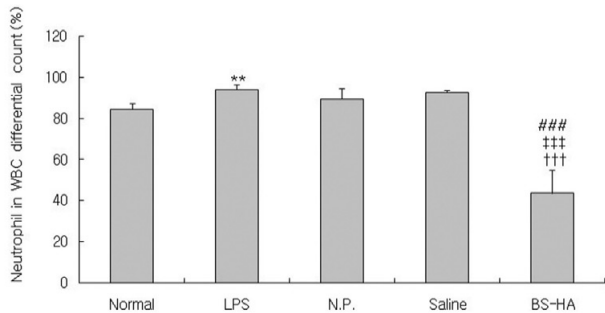
BS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and BS-HA(2.5%, 200 μ l/rat) at KI10



A) RBC count



B) WBC count



C) Neutrophil count

Fig 3. Effect of BS-HA in blood of LPS-stimulated rats.

** : $p < 0.01$ compared to Normal group by t-test

† † : $p < 0.01$ compared to LPS group by ANOVA test

† † † : $p < 0.001$ compared to LPS group by ANOVA test

‡ ‡ ‡ : $p < 0.001$ compared to N.P. group by ANOVA test

: $p < 0.001$ compared to saline group by ANOVA test

Table 2. Blood chemistry analysis in LPS-stimulated rats.

	Normal	LPS	N.P.	Saline	BS-HA
BUN(mg/dl)	25.52±4.097	40.16±4.763	18.74±2.254	18.26±3.769	24.42±3.772
Creatinine(mg/dl)	0.41±0.091	1.40±0.190	1.08±0.309	1.59±0.249	1.72±0.656
TNF-alpha(pg/ml)	25.02±14.094	222.14±38.074	225.85±3.273	127.31±48.508	186.71±12.150
CINC-1(pg/ml)	255.42±19.029	612.71±21.300	378.35±104.406	411.00±212.454	427.00±17.496

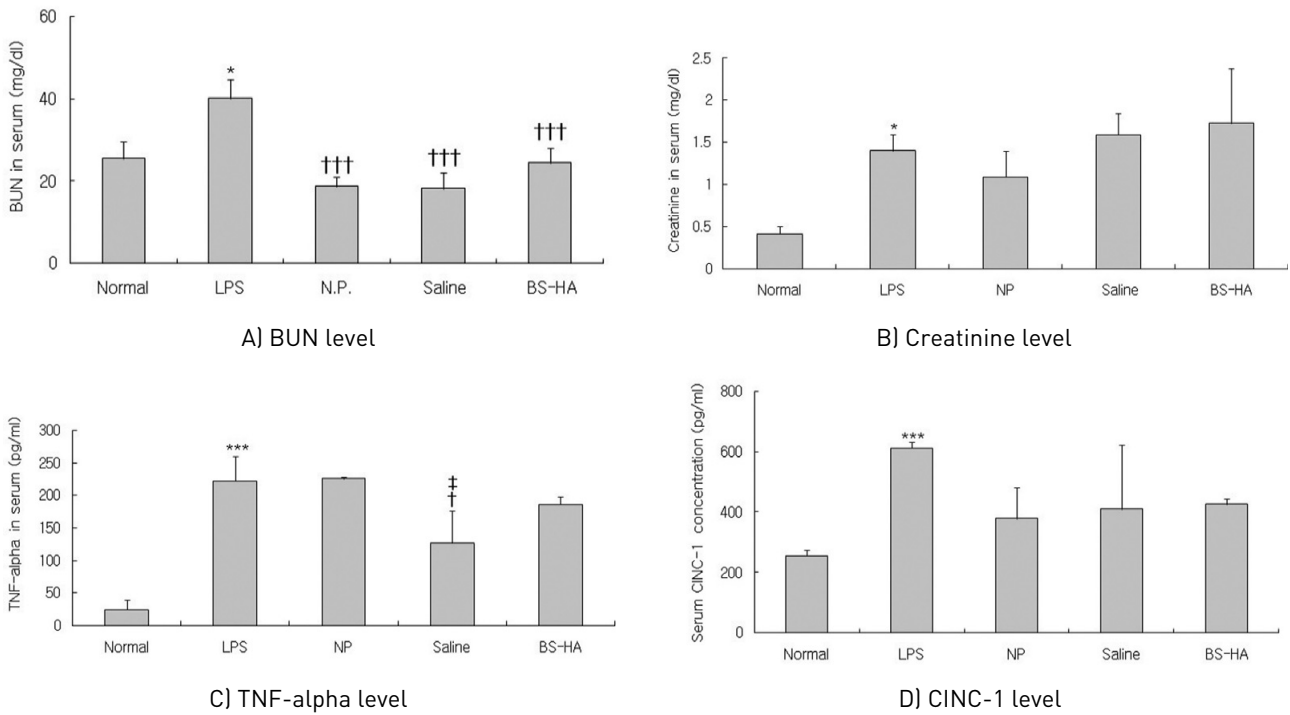


Fig 4. Effects of BS-HA on serum

- * : p<0.05 compared to Normal group by t-test
- *** : p<0.001 compared to Normal group by t-test
- † : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test
- ‡ : p<0.05 compared to N.P. group by ANOVA test
- † † † : p<0.001 compared to LPS group by ANOVA test

Table 3. Urine analysis in LPS-stimulated rats.

	Normal	LPS	N.P.	Saline	BS-HA
Urine(ml/rat)	11.33±1.155	6.50±1.732	7.16±2.082	4.83±1.041	5.66±2.082
Creatinine(mg/dl)	1.37±0.044	2.30±0.637	1.43±0.379	1.88±0.314	1.15±0.491
Total protein (ng/dl)	1095.21±90.437	1583.11±39.558	1191.53±81.235	1138.76±315.123	1542.97±181.487

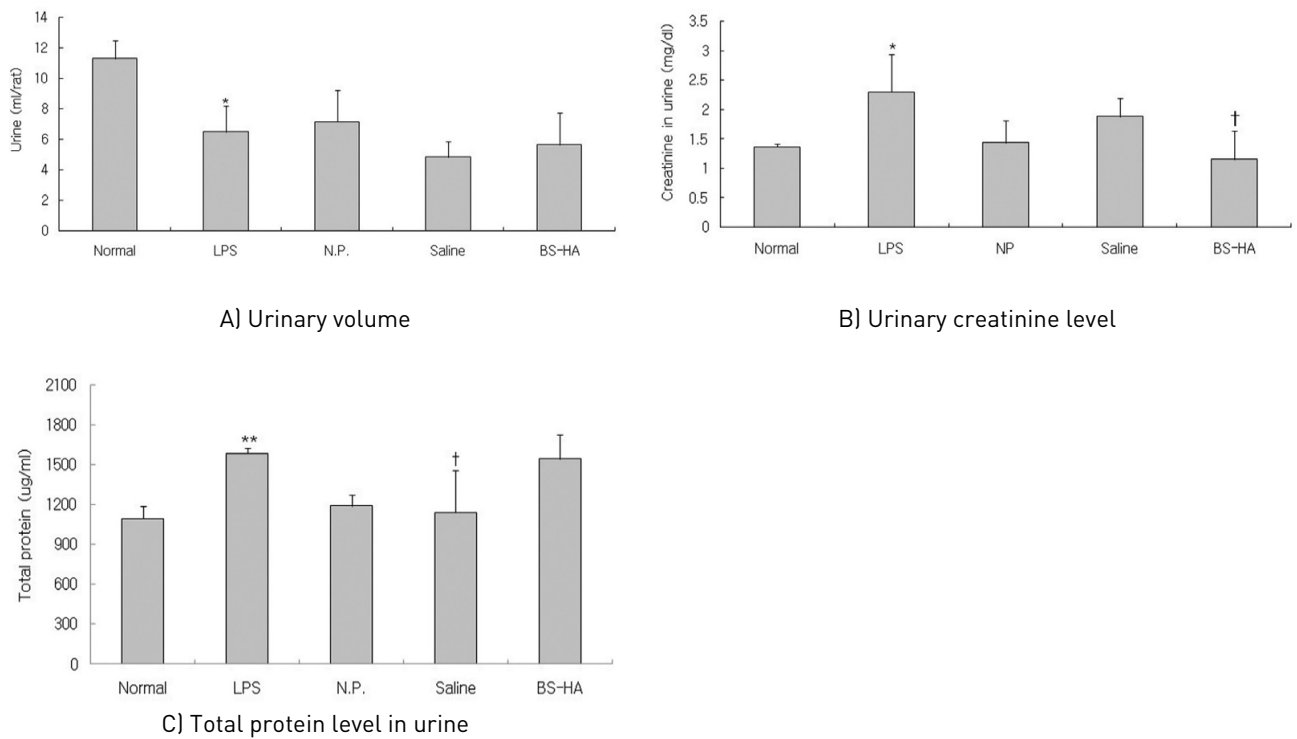


Fig 5. Effects of BS-HA in urine of LPS-stimulated rats.
 * : p<0.05 compared to Normal group by t-test
 ** : p<0.01 compared to Normal group by t-test
 † : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test

Table 4. Inflammatory activity in kidney of LPS-stimulated rats.

	Normal	LPS	N.P.	Saline	BS-HA
TNF-alpha(mg/dl)	9775.33±2111.531	14156.70±1989.263	13886.00±2407.278	11627.30±1921.047	15027.30±1367.796
MPO (mg/dl)	14.27±6.094	96.28±4.585	90.42±11.783	87.71±16.422	58.36±15.571

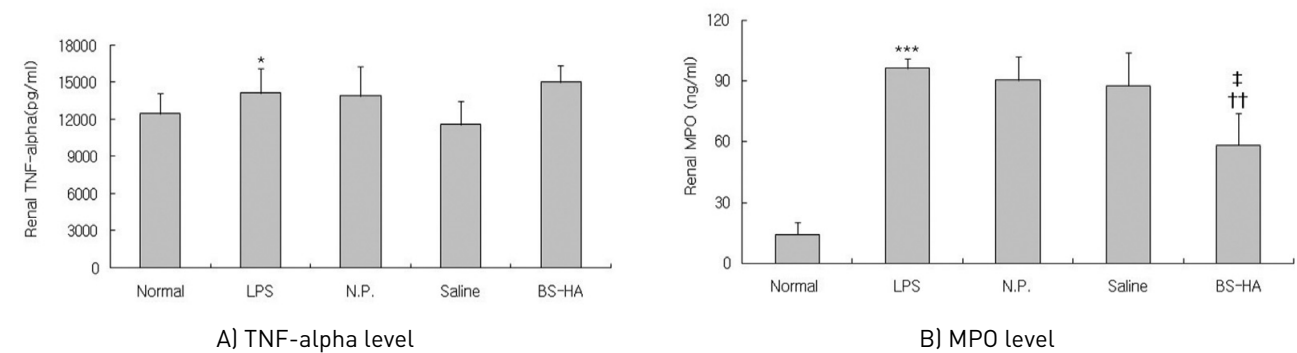


Fig 6. Effects of BS-HA on renal in LPS-stimulated rats.
 * : p<0.05 compared to Normal group by t-test
 *** : p<0.001 compared to Normal group by ANOVA test
 †† : p<0.001 compared to LPS group by ANOVA test
 ‡ : p<0.05 compared to N.P. group by ANOVA test

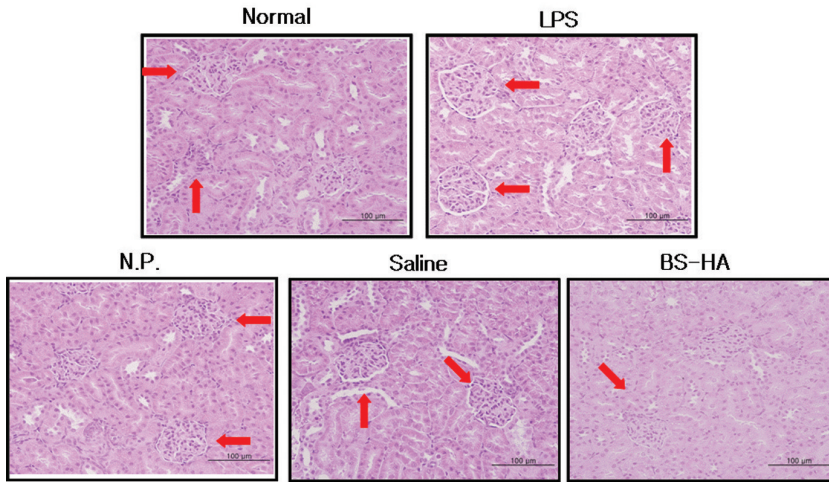


Fig 7. Histological analysis of renal tissue in LPS-stimulated rats. (H&E stain, 400x)