

鳳仙花 추출물의 膜性腎症에 대한 治療效果

위경¹, 유지현², 도은수¹, 장준복¹, 길기정^{1*}

1 : 중부대학교 한방제약과학과 2 : (재)금산국제인삼약초연구소

Therapeutic Effect of the *Impatiens balsamina* Linne Extract on the Membranous Nephropathy

Wi Gyeong¹, Ji Hyun Yoo², Eun Soo Doh¹, Jun Pok Chang¹, Ki Jung Kil^{1*}

1 : Department of Herbal Pharmaceutical Science, Joongbu University
Geumsan 312-402, Korea

2 : International Ginseng and Herb Research Institute Geumsan 312-804, Korea

ABSTRACT

Objective : Membranous nephropathy(MN) is one of the most common causes of nephrotic syndrome in adults. MN has been defined as granular subepithelial deposition of IgG immune complexes along the glomerular basement membrane(GBM). However, there is not a satisfactory treatment for MN. We aimed to identify the effect of *Impatiens balsamina* Linne(IBM) treatment on cationic bovine serum albumin(cBSA)- induced MN in a mouse model.

Methods : Mice were divided into 4 groups. The normal group was injected with saline. The Control group was treated with cBSA(50 mg/kg i.p) only. The third group IBM-100, was treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBM(100 mg/kg, p.o). The fourth group IBM-400, was treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBM (400 mg/kg, p.o). After cBSA and IBM treatment for 6 weeks, we measured change of body weight, proteinuria, serum albumin, total cholesterol, triglyceride, BUN, creatinine, IgA, IgM, IgG, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels. The morphologic changes of renal glomeruli were also observed with a light microscope.

Results : The level of proteinuria significantly decreased and serum albumin increased in groups treated with cBSA and IBM extract compared with the control. The levels of serum triglyceride, BUN, IgG, TNF- α , IL-1 β significantly decreased in both IBM groups. In histological findings of kidney tissue, thickening of GBM decreased in both IBM groups.

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

Key words : *Impatiens balsamina* Linne(IBM), membranous nephropathy(MN), cationic bovine serum albumin (cBSA)

서론

막성 신증(membranous nephropathy, MN)은 신증후군의 일종으로서 사구체 모세혈관 상피세포아래(subepithelial space)에 면역복합체의 침착으로 사구체 상피세포의 족돌기가 융합되고 기저막이 비후되는 질환으로^{1,2)}, MN은 성인 신증후

군의 30~40%, 소아 신증후군의 약 5%를 차지하며, 주로 40대 성인 남자에게 많이 발생하고, 말기 신부전의 중요한 원인이 된다^{3,4)}

MN의 80%는 원발성 사구체 신염으로 아직 정확한 병인은 명확하지 않지만, 사구체외에서 형성된 항원과 IgG 같은 항체가 결합하여 기저막(glomerular basement membrane : GBM)

*교신저자 : 길기정, 중부대학교 한방제약과학과.

· Tel : 041-750-6225, · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

· 접수 : 2011년 11월 9일 · 수정 : 2011년 11월 28일 · 채택 : 2011년 12월 16일

에 침착하거나 GBM의 외부 저밀도층에 분포하는 내인성 항원에 대한 항체의 반응으로 추정하고 있다^{5,6)}.

신장의 사구체는 혈액의 여과기능을 담당하는데 크게 size selective barrier와 charge selective barrier로써 작용한다. Size selective barrier는 크기가 큰 혈구나 단백질이 빠져나가지 못하게 하는 작용을 하고, charge selective barrier는 사구체 기저막과 모세혈관 상피세포가 음전하를 띠므로써 음전하를 띤 혈장단백이 빠져나가지 못하게 하는 기능을 한다^{6,7)}. 그러나 MN에서와 같이 면역물질의 침착이나 기저막의 비후, 상피세포의 죽돌기의 소실 등으로 인해 사구체 여과장벽의 기능이 손상되었을 경우에는 혈장 내 알부민이 빠져나가지게 되고, 이로 인해 단백뇨와 저알부민혈증이 발생한다^{8,9)}.

또한 저 알부민혈증으로 인한 혈장 내 삼투질 농도의 감소는 부종을 유발하며 간에서 콜레스테롤이 풍부한 지단백(lipoprotein)의 합성을 촉진시켜 고지혈증을 유발하게 된다¹⁰⁾.

일반적인 서양의학적 치료는 단백뇨량에 따라 다르며, 신증후군을 동반한 경우에도 징후가 경미하면 경과 관찰이나 대증요법만으로 치료하고, 심한 경우에는 steroid 단독요법, 세포독성 면역억제제요법 또는 steroid와 세포독성 면역억제제나 cyclosporine A의 병합 요법 등을 활용하고 있으나^{9,10)}, 장기 투여 시 많은 부작용이 나타난다^{10,11)}.

또한 보존적인 치료만으로 좋은 예후를 보이는 연구 결과도 있지만^{12,13)} 보존적 치료만으로는 상당수의 환자들이 결국 신기능의 저하를 일으킨다는 보고^{14,15)}도 있으므로, 기존의 부작용이 적으면서 효과적인 약제개발이 요구되고 있는 실정이다.

최근 실험연구에서 淸熱解毒, 活血利濕의 效能이 있는 複腎湯이 신혈류량을 증가시키고, 면역반응을 개선시켜 신사구체 상피세포에 면역복합물 침착을 억제시킨다고 보고¹⁶⁾되었으며, 膜性腎炎¹⁷⁾에 淸熱解毒의 效能이 있는 柴胡, 半枝蓮, 芙蓉葉을 가하여 MN에 유의한 효과가 있었다는 보고¹⁸⁾ 등이 있다.

鳳仙花(*Impatiens balsamina* Linne)는 鳳仙花科(Balsaminaceae)에 속하며 인도, 말레이시아, 중국 및 우리나라 등지에서 관상용으로 재배되는 일년생 초본이다¹⁹⁻²¹⁾.

한방서에 莖葉을 指甲草라 하며 祛風, 活血, 水腫 및 軟骨 등의 효능이 있고, 打撲傷, 癰疽, 赤白痢 및 崩症을 치료한다고 기록되어 있으며, 種子는 急性子라 하여 子宮收縮, 破積塊, 疝氣에 경구투여하여 避妊效果和 透骨軟堅 작용이 있다고 보고되어 있다²⁰⁾.

鳳仙花에 대한 기존 연구로는 鳳仙花 추출물의 항균성에 관한 연구²²⁾와 鳳仙花에 대한 pH 수준별 처리가 항산화 물질 및 관련 효소 활성에 미치는 영향²³⁾ 등이 보고되고 있으나, 鳳仙花의 MN에 미치는 효과에 대하여는 아직 접하지 못하였다.

본 연구에서는 막성신증 활성 물질 탐색과정을 통하여 鳳仙花의 MN 치료 효능을 실험적으로 규명하고자, cationic bovine serum albumin(cBSA) 투여로 MN이 유발된 생쥐에 鳳仙花의 추출물을 투여한 후 체중, 24시간 단백뇨, 혈액학적 변화와 면역학적 기전 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 鳳仙花(*Impatiens balsamina* Linne : IBL)는 중국에서 구입하여 중부대학교에서 정선한 후에 사용하였다.

2) 동물

실험에 사용된 생쥐는 (주)중앙실험동물에서 8주령의 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 고형사료를 사용하였다. 실험동물은 온도가 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지되고, 12시간은 200~300 Lux로 조명되며, 12시간은 조명이 차단되는 conventional system으로 조절되는 환경에서 사육하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

鳳仙花 400 g을 증류수 2,000 mL에 가해 열탕 추출기로 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압증류장치(Rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결건조기(Freeze dryer)로 완전 건조하여 24 g(수거율: 6%)의 鳳仙花추출물을 얻어 냉동 보관하고 적당 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) Antigen, cationic BSA의 준비

Cationic BSA는 Border의 방법²⁴⁾을 수정하여 BSA를 화학적으로 양이온화하여 제조하였다. 20 g의 BSA를 증류수 12 mL에 녹이고, 다른 한편으로 20 mL의 증류수에 2.68 mL의 EDA를 희석하고, HCl을 가해 pH 4.75의 anhydrous EDA를 만들어 25°C 로 식혔다. 이 EDA solution을 앞서 준비한 BSA solution에 넣어 희석하고, 곧이어 EDC 150 mg을 넣고 4시간동안 계속 저어주었다. 만들어진 용액은 1 mL EconoPac High S cationic ion-exchange column에 가하고 pH 6.8 phosphate buffer(40 mM)로 washing하여 양이온화되지 않은 BSA를 제거한 후 pH 10.6의 phosphate buffer(40 mM)로 elution하였다. 5% thin-layer polyacrylamide gel에 제조된 cBSA와 control BSA를 loading하여 수평전기영동장치에서 cBSA의 isoelectric point (pI)를 측정하였다. 최종 단백질 농도는 BCATM protein assay kit를 사용하여 spectrophotometer 540 nm에서 optical density(OD)를 측정하여 계산하였다.

3) MN model 유발 및 검액 투여

8주령의 female ICR계 생쥐를 각 군당 10 마리씩 하여 정상군(non-treated group, Normal), 대조군(MN-induced group by cBSA, Control), IBL-L군

(MN-induced by cBSA and IBL-low dose treated group, IBL-L), IBL-H군 (MN-induced by cBSA and IBL-high dose treated group, IBL-H) 등의 4군으로 나누어, 정상군을 제외한 3군에 Freund's complete adjuvant와 섞은 0.2 mg의 cBSA를 6주간 총 3회(1회/2주)에 걸쳐 복강 투여(intra-peritoneal injection ; i.p.)하였다. 정상군은 cBSA대신에 saline을 같은 방법으로 주사하여 유도 시키지 않았다. cBSA 투여 6주 후부터 4주간 50 mg/kg의 cBSA를 정상군을 제외하고 매일 복강 투여하여 지속적으로 MN을 유발하는 동시에, IBL-L군에는 봉선화 100 mg/kg을, IBL-H군에는 봉선화 400 mg/kg을 매일 경구 투여하여 MN에 대한 봉선화의 치료 효과를 관찰하였다. 6주간의 투여 후 모든 실험동물들을 metabolic cage에 두어 24시간 동안 물 공급을 자유롭게 하면서 절식하여 소변을 채취하였다. 소변채취 후 희생시켜 혈액, 신장, 비장 샘플 등을 수거하여 분석에 사용하였다.

4) 체중 측정

실험시작 전 평균체중을 구하고, 2주마다 체중을 측정하여 체중변화를 관찰하였다.

5) 24시간 단백뇨 측정

생쥐의 소변은 12주 동안 2주마다 각 실험군별로 최종의 소변을 수거하여 단백뇨(proteinuria)의 배출상황을 관찰하였다. 소변은 24시간 동안 metabolic cage에서 수거하여 Albustix을 이용하여 TBPB의 변색점 변화에 의해 소변 중의 albumin 수치를 측정하였다.

6) 비장, 신장 중량 측정

동물을 희생시키기 전 ethyl ether로 마취하여 채혈 후 희생시켜 비장과 신장을 적출하여 생리식염수로 씻어내고 수분을 여과지로 제거한 후 무게를 측정하였다.

7) 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℃에 보관하였다. 혈청은 creatinine, blood urea nitrogen(BUN), albumin, total cholesterol, triglyceride 등의 serological analysis와 ELISA 분석에 사용되었다.

8) Enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)

혈청의 면역글로블린(immunoglobulin, Ig)의 IgA, IgM, IgG와 사이토카인의 IL-6, TNF- α , IL-1 β 를 ELISA로 분석하였다.

Antibody는 goat anti-mouse IgA, IgM, IgG, anti-mouse IL-6, TNF- α , IL-1 β 을 사용하였다. 이들 antibody를 coating한 96-well plate에 50 μ L의 혈청을 분주하여 2시간동안 실온에서 방치한 후, 3회 수세하고 streptavidin-HRP antibody를 반응시키고, TMB substrate로 발색시켜, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 광학현미경 관찰

실험 종료 후에, 신장을 적출하여 10% formaldehyde에서 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직을 파라핀으로 포매하였고, rotary microtome을 이용하여 5 μ m 두께로 dissection하여 슬라이드를 만들고 -80℃에 보관하였다. Haematoxylin and Eosin(H&E) 염색은 준비된 슬라이드를 물에 넣어 rehydration 시킨 후, hematoxylin에 1분간 담가 nuclear를 염색시키고, 흐르는 물에 몇 분 동안 수세한 후, eosin에 1분간 담가 cytoplasm을 염색시킨 다음, 다시 흐르는 물에 몇 분 동안 수세하였다. 이어 70%, 95%, 100%의 ethanol series에 연차적으로 담가 dehydration 시키고, xylene에 1분간 반응시켜 안정화시킨 후, mounting solution을 올리고 cover glass로 슬라이드를 봉입하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 조직 상태를 관찰하였다.

10) 통계 분석

실험 결과들은 mean \pm standard deviation(S.D.)으로 표시하였고, 통계처리는 Student's T-test를 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의성 있는 것으로 인정하였다. 정상군에 대한 대조군의 유의성은 '#' 대조군에 대한 각 투여군의 유의성은 '*' 으로 표시하였다.

결 과

1. 체중, 비장 및 신장에 대한 영향

대조군은 정상군에 비하여 급격한 체중 증가를 보였다. 두 실험군 모두 대조군에 비하여 체중이 감소하였으며, IBM-H군은 대조군에 비하여 유의한 체중 감소를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Effects of IBL on the body, kidney and spleen weight in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Group	Body weight	Kidney weight	Spleen weight
Normal	34.5 \pm 3.7	18.1 \pm 1.1	11.8 \pm 0.4
Control	38.3 \pm 3.5 [#]	23.2 \pm 2.5 [#]	34.6 \pm 10.1 [#]
IBL-L	36.0 \pm 3.7	21.1 \pm 1.7 [*]	20.2 \pm 5.2 [*]
IBL-H	35.2 \pm 2.7 [*]	19.4 \pm 1.4 [*]	19.0 \pm 2.0 [*]

Normal : non-treated group.
 Control : cBSA(50 mg/kg, i.p.) group.
 IBL-L : cBSA(50 mg/kg, i.p.) + IBL extract(100 mg/kg, p.o.) group.
 IBL-H : cBSA(50 mg/kg, i.p.) + IBL extract(400 mg/kg, p.o.) group.
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test (# $p < 0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test (* $p < 0.05$).

2. 24시간 단백뇨에 대한 영향

12주 동안 단백뇨 수준의 변화를 살펴보면, 대조군은 4.00 \pm 0.3이였으며, IBL-L군과 IBL-H군은 각각 0.6 \pm 0.2, 0.5 \pm 0.0으로 나타나 IBL 투여군의 단백뇨 지수가 level 1.0 이하 수준으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

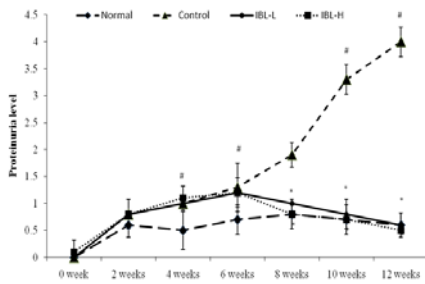


Fig. 1. Effects of IBL on proteinuria level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Scores were converted to numbers as follows ; 0 (Trace or negative), 0.5 (Trace or 0.30 g/L), 1 (0.30 g/L), 2 (1.0 g/L), 3 (3.0 g/L), 4 (≥ 20.0 g/L).

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(# $p < 0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(* $p < 0.05$).

3. 혈청학적 변화에 미치는 영향

1) Albumin에 미치는 영향

혈청 중 albumin 농도의 정상군은 1.90 ± 0.07 g/dL 였고, 대조군은 1.32 ± 0.13 g/dL로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IBL-L군과 IBL-H군은 각각 1.78 ± 0.15 g/dL와 1.84 ± 0.09 g/dL로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2).

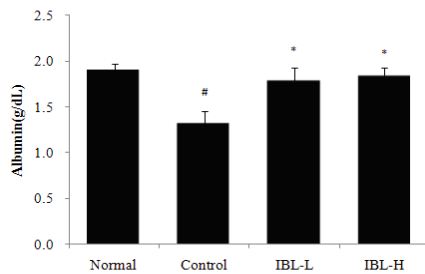


Fig. 2. Effects of IBL on serum albumin level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(# $p < 0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(* $p < 0.05$).

2) Total cholesterol에 대한 영향

혈청 중 total cholesterol 농도의 정상군은 69.4 ± 7.0 mg/dL 였고, 대조군은 93.0 ± 7.1 mg/dL로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. IBL-L 투여군은 87.0 ± 6.0 mg/dL로 대조군에 비하여 감소하였으며, IBL-H 투여군은 75.8 ± 4.0 mg/dL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

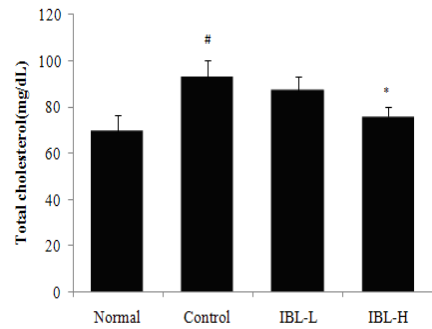


Fig. 3. Effects of IBL on serum total cholesterol level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(# $p < 0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(* $p < 0.05$).

3) Triglyceride에 대한 영향

혈청 중 triglyceride 농도의 정상군은 88.8 ± 6.9 mg/dL 였고, 대조군은 157.8 ± 16.4 mg/dL로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, IBL-L 투여군과 IBL-H 투여군은 각각 94.0 ± 6.8 mg/dL와 73.0 ± 15.8 mg/dL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

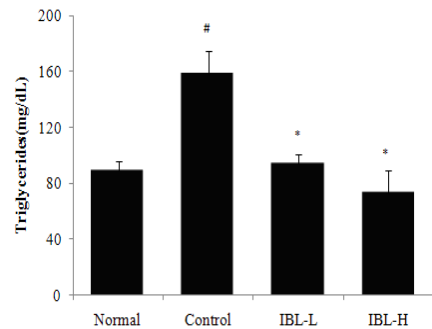


Fig. 4. Effects of IBL on serum triglyceride level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(# $p < 0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(* $p < 0.05$).

4) Creatinine에 대한 영향

혈청 중 creatinine 농도의 정상군은 0.38 ± 0.04 mEq/dL 였고, 대조군은 0.46 ± 0.05 mEq/dL로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, IBL-L 투여군과 IBL-H 투여군은 각각 0.40 ± 0.00 mEq/dL와 0.38 ± 0.04 mEq/dL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

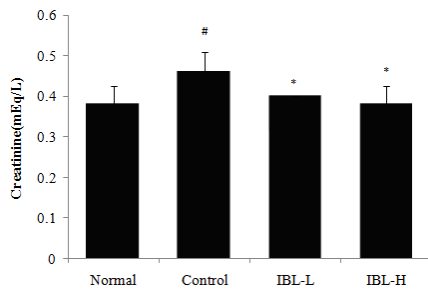


Fig. 5. Effects of IBL on serum creatinine level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test($\#p<0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test($*p<0.05$).

5) BUN에 대한 영향

혈청 중 BUN 농도의 정상군은 16.3 ± 2.4 mEq/dL 였고, 대조군은 25.2 ± 4.2 mEq/dL로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군은 19.6 ± 4.4 mEq/dL로 대조군에 비하여 감소하였고, IBL-H 투여군은 15.6 ± 1.6 mEq/dL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

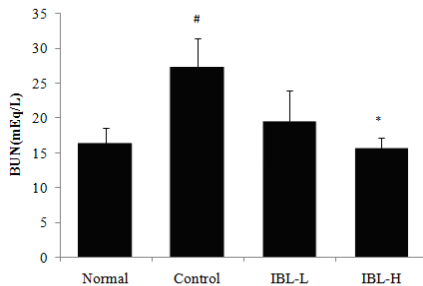


Fig. 6. Effects of IBL on serum BUN level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test($\#p<0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test($*p<0.05$).

4. 혈청 내 면역글로불린 생성에 대한 영향

1) IgG에 대한 영향

혈청 중 IgG 농도의 정상군은 2.7 ± 0.9 ng/mL 였고, 대조군은 33.6 ± 4.6 ng/mL 로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군과 IBL-H 투여군은 각각 12.7 ± 2.6 ng/mL와 11.8 ± 3.8 ng/mL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

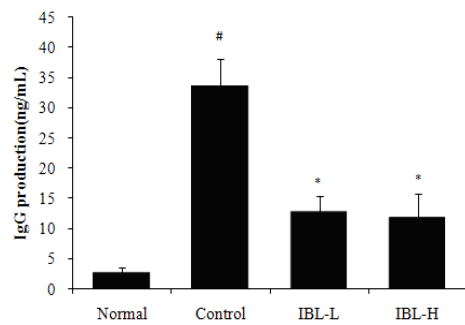


Fig. 7. Effects of IBL on serum IgG level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test($\#p<0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test($*p<0.05$).

2) IgM에 대한 영향

혈청 IgM 농도의 정상군은 22.7 ± 6.5 ng/mL 였고, 대조군은 92.3 ± 11.8 ng/mL로 상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군과 IBL-H 투여군은 각각 32.5 ± 0.3 ng/mL, 24.5 ± 8.0 ng/mL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

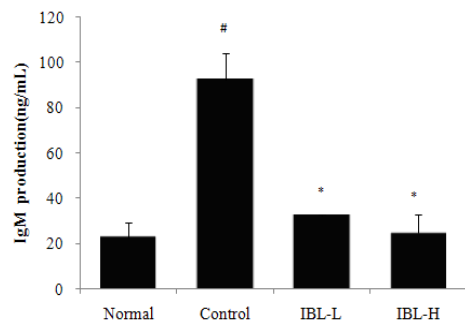


Fig. 8. Effects of IBL on serum IgM level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test($\#p<0.05$). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test($*p<0.05$).

3) IgA에 대한 영향

혈청 IgA 농도의 정상군은 17.2 ± 0.9 ng/mL 였고, 대조군은 37.9 ± 4.9 ng/mL로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군과 IBL-H 투여군은 각각 28.4 ± 5.2 ng/mL, 21.7 ± 4.4 ng/mL로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9).

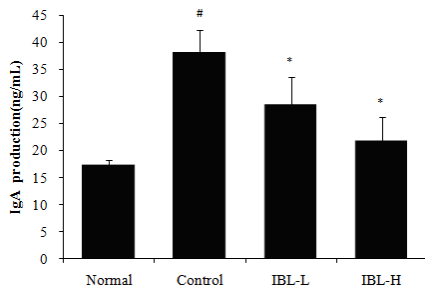


Fig. 9. Effects of IBL on serum IgA level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(#*p*<0.05). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(**p*<0.05).

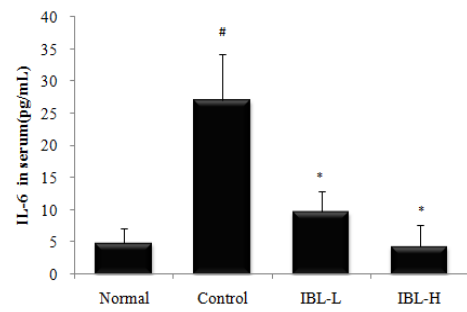


Fig. 11. Effects of IBL on serum IL-6 level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(#*p*<0.05). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(**p*<0.05).

5. 혈청 내 사이토카인 생성에 대한 영향

1) TNF-α 에 대한 영향

혈청 중 TNF-α 의 농도의 정상군은 2.19±1.5 pg/mL 였고, 대조군은 22.0±4.2 pg/mL로 나 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군과 IBL-H 투여군은 각각 14.9±2.9 pg/mL, 14.2±4.3 pg/mL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10).

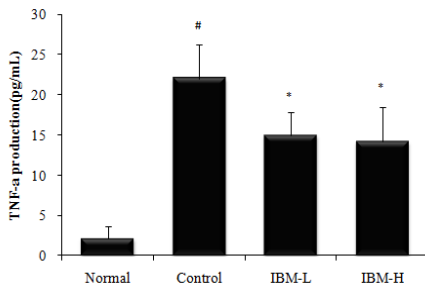


Fig. 10. Effects of IBL on serum TNF-α level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(#*p*<0.05). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(**p*<0.05).

2) IL-6에 대한 영향

혈청 중 IL-6의 농도의 정상군은 4.9±2.2 pg/mL 였고, 대조군은 27.1 ±7.2 pg/mL로 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군 9.7±3.2 pg/mL 과 IBL-H 투여군 4.3±3.2 pg/mL로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11).

3) IL-1β 에 대한 영향

혈청 중 IL-1β 의 농도의 정상군은 237.5±33.3 pg/mL 였고, 대조군은 1244.3±128.9 pg/mL로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, IBL-L 투여군은 417.2±111.1 pg/mL, IBL-H 투여군은 354.6±126.4 pg/mL로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

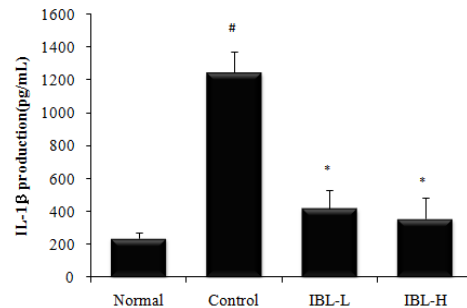


Fig. 12. Effects of IBL on serum IL-1β level in cBSA-induced membranous nephropathy mice.

Normal : Non-treated group.

Control : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).

IBL-L : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).

IBL-H : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(400 mg/kg, p.o.).

The results represent the mean±S.D. Statistically significant value was compared with normal group by student's *t*-test(#*p*<0.05). Statistically significant value was compared with control group by student's *t*-test(**p*<0.05).

6. 광학현미경적 소견에 미치는 영향

정상군(A)은 사구체 기저막의 비후가 나타나지 않았고, 대조군(B)은 cBSA와 면역 복합체의 침착으로 추정되는 사구체 기저막의 비후가 관찰할 수 있었으며, IBL-L 투여군(C)과 IBL-H 투여군(D)은 대조군에 비하여 사구체 기저막의 비후가 감소되어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 13).

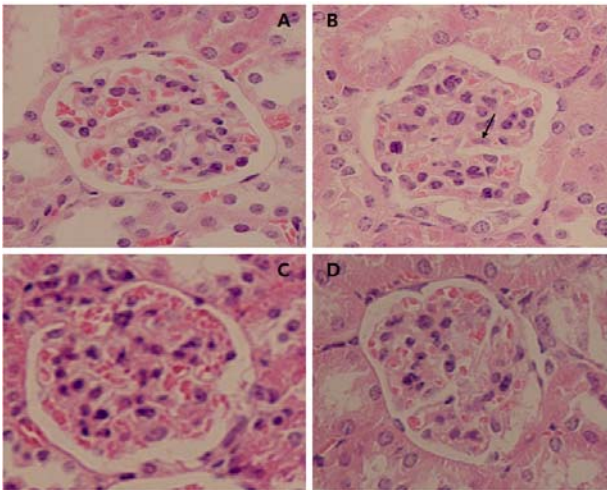


Fig. 13. H&E staining of renal glomeruli in cBSA-induced membranous nephropathy mice.
 Normal(A) : Non-treated group.
 Control(B) : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p).
 IBL-L(C) : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o.).
 IBL-H(D) : Group treated with cBSA(50 mg/kg, i.p) and IBL extract(100 mg/kg, p.o).
 Control shows diffuse glomerular basement membrane(GBM) thickening (arrow). All images are at $\times 400$ magnification.

고찰

MN은 외피하 부위에 면역복합체가 침착하여 발생하는 면역매개성 질환으로 사구체 기저막의 비후와 상피하 침전물의 소견을 보이는 특징으로^{6,9,25)}.

이러한 침전은 IgG, IgA, IgM과 C3, C5b-9 등의 면역글로불린과 보체로 구성된 침착물이 관찰되기 때문에 만성 항원-항체 매개성 질환으로 알려져 있다^{3,26)}.

사구체 손상은 많은 경우 면역학적 기전에 의해 발생하며, 면역학적 기전은 대부분의 원발성 사구체 질환의 사구체 손상 주 기전으로 작용한다. 면역학적 기전은 크게 항체 매개성 손상과 세포 매개성 손상으로 나타나며, 이 중 항체 매개성 손상은 자가 항원 또는 이식항원들에 대한 항체의 반응에 의해 나타나며^{6,9,27)}, 이러한 과정에서 염증 반응 및 염증 매개 물질은 그 손상을 가중 시킨다^{6,27)}.

MN의 증상으로는 경미한 소변이상부터 신증후군까지 다양하게 발현하고, 임상경과도 신증후군의 자연관해와 재발 및 만성신부전으로 진행되는 등 매우 다양한 경과를 보이며²⁸⁾, 치료는 대증 요법과 스테로이드 단독 또는 세포독성 면역억제제의 병합요법을 사용하나 효과에 대한 일치된 보고는 없으며, 부작용에 비해 효과가 확실하지 않다^{6,9,28,29)}. 그러므로 기존의 부작용이 적으면서 효과적인 약제 개발이 요구되고 있는 실정이다.

이에 저자는 봉선화가 MN에 미치는 영향을 확인하고자 봉선화 추출물을 MN mouse에 투여한 후 체중 및 단백뇨의 변화를 관찰하였고, 혈액학적 개선여부를 확인하기 위하여 혈청 albumin, total cholesterol, triglyceride, BUN, creatinine을 측정하였고, 면역학적 원인으로 유발되는 사구체 질환에서 봉선화 추출물을 투여하여 개선 효과를 확인하기

위해 IgA, IgG, IgM의 면역글로불린과 대표적인 사이토카인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 변화를 관찰하였다.

MN 유발은 양전하를 띤 BSA를 외부항원으로 이용하여 사구체 기저막의 음전하를 띠는 부분과 결합시켜 면역복합체를 발생시키는 방법을 사용하였고, 유발 및 약물치료 실험에 적당하다고 알려져 있다³⁰⁾.

cBSA로 MN 질환을 유도하면서 6주간의 대조군과 IBL의 투여가 체중과 신장 그리고 비장의 무게에 미치는 영향을 관찰한 결과 우선 체중의 변화를 살펴보면 대조군에서 정상군보다 현저히 체중이 증가하였으며, 실험군에서 정상군보다 체중은 증가하였으나, 대조군에 비하여 체중 증가 범위는 낮았다. 대조군의 체중 증가는 MN으로 야기된 수분 저류 및 고지혈증으로 인한 지질대사의 장애로 나타난 것으로 추측되며, IBL 투여군에서 체중증가의 정도가 적게 나타난 것은 IBL 추출물이 사구체여과에 영향을 주어 MN으로 나타난 부종의 개선 및 지질 대사의 개선으로 나타난 것으로 생각된다. 또한 대체적으로 비장은 정상군의 비장보다는 대조군에 비장의 무게가 증가하였다. 즉, 총 비장세포수가 정상군에 비해 대조군에서 증가되어 있었다. 이는 비장 면역세포를 이루는 T 세포와 B 세포 등이 cBSA에 의하여 자가항체가 만들어지면서 흉선의 T세포와 림프의 B 세포의 분화를 유도하여 증가하는 것으로 생각되므로 IBL은 비정상적인 면역세포 증식에 대한 억제 작용이 있는 것으로 생각된다.

단백뇨는 혈장 단백질에 대한 사구체의 charge 및 size selective barrier의 장애로 인해 투과성이 항진되어 나타나는 것으로^{1,31)} 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가한 것은 MN의 유발이 대조군의 사구체 여과장벽의 기능에 이상을 초래하였다고 볼 수 있으며, 대조군에 비하여 유의성 있게 봉선화의 투여가 감소한 것은 사구체 여과장벽과 면역복합체의 침착으로 인한 소변으로의 단백질 배설을 감소시킨 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 cBSA 유도 과정 0~6 주차에서 단백질뇨가 각각 증가하는 것으로 보아 효과적으로 MN 모델이 만들어짐을 확인하였다.

본 실험에서 혈청 albumin 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 두 실험군 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 혈청 total cholesterol 및 triglyceride 농도는 정상군에 비하여 대조군은 상승하였고, 실험군은 대조군에 비하여 감소하였고, 특히 IBM-H군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 유의성 있는 결과는 봉선화의 투여가 단백질뇨의 개선을 통한 MN mouse에서 알부민 수치 상승, 이에 따른 혈장 삼투압의 안정, 그리고 total cholesterol 및 triglyceride의 보상적 합성의 억제 등을 통해 나타난 것으로 사료되며, 또한 봉선화 자체가 고지혈증 개선에서 일정한 효과가 있음^{32,33)}도 확인 시켜 준다.

사구체 질환에서 사구체 모세혈관의 여과 면적 감소와 유효 여과압의 감소는 사구체 여과율의 감소를 야기하며, 임상적으로는 혈청 BUN, creatinine 수치를 측정함으로써 확인할 수 있다⁶⁾.

혈청 BUN 및 creatinine 농도는 대조군에서 정상군에 비하여 증가하였고, 실험군에서는 모두 대조군에 비하여 감소를 하였다. 이러한 결과를 통하여 봉선화 투여가 MN mouse의 사구체 여과율의 개선에 일정부분 효과가 있는 것으로 확인할 수 있었다.

MN은 일반적으로 면역복합체에 의해 발생하며, 면역시스템 중 Th2 type와 연관된 체액성 면역 반응과 관련 되고³³⁾, 체액성 면역반응에 관계되는 항체 중 IgG의 침착이 주된 소견이며 또한 IgM, IgA도 다양한 빈도로 동반된다^{34,35)}.

IgG는 혈중 모든 Ig의 약 75%정도를 차지하고, 면역반응의 초기보다는 1차적인 면역반응이 일어난 후 2차적인 면역반응 때 대량으로 생산되어 활성화 된다^{36,37)}. 결과적으로 MN을 유발시킨 동물모델에서 대조군의 혈청 IgG 농도가 정상군에 비하여 유의성 있게 증가한 것으로 보아, MN의 유도는 성공적인 것으로 생각된다. 또한 cBSA에 의해 MN이 유발됨으로써 면역 복합체 침착에 IgG가 주로 관여함을 확인할 수 있었고, IBL 투여군에서는 대조군에 비하여 IgG에서 유의성 있게 감소하는 것으로 보아 IBL 투여가 항원물질로 작용한 cBSA에 의한 B 세포의 활성화에 직접적으로 관여하여 항체의 생산을 감소시킨 것으로 판단된다.

IgM은 분자량이 큰 거대글로불린으로 총 혈청 Ig의 5~10%를 차지하고 혈중에서의 농도는 낮으나 B 세포의 표면에 있어서는 주된 Ig로서 면역반응의 초기에 빠르게 증가하며 보체활성화능력이 강하며, 자가면역질환에서 면역복합체를 형성하는 중요한 구성성분이다^{36,37)}.

생쥐에 cBSA를 복강투여하여 유도하는 과정에서 증가한 IgM이 IBL 투여가 항원물질로 작용한 cBSA에 의한 B 세포의 활성화에 직접적으로 관여하여 항체의 생산을 감소시킨 것으로 사료된다.

IgA는 혈청 내 총 Ig의 10~15% 정도만을 차지하며 혈청 외의 눈, 코, 구강, 기도, 소화관 등의 분비물에 높은 농도로 포함되어 있는 대표적인 Ig로 모두 B세포의 산물이며, 체액성 면역반응을 매개하는 것으로 알려져 있다^{36,37)}. IBL의 투여가 IgA 감소로 인하여 MN에서 지속적으로 나타나는 면역학적 과정 및 새롭게 나타날 수 있는 cBSA 유도하는 과정에서 억제하여 나타난 것으로 생각되며, 2차적 면역반응의 감소 뿐만 아니라 면역학적 개선을 통한 MN의 회복에도 영향을 주는 것으로 유추할 수 있다.

TNF- α 는 급성 염증반응의 주된 매개자이며 많은 중증 감염의 전신적 합병증의 원인이 되고, 메산지움, 내피세포, 외피세포를 자극함으로써 사구체 손상을 일으킨다^{38,39)}. 일반적인 사구체 손상의 원인 중의 하나인 염증성 매개 TNF- α 는 많은 면역 질환과 염증질환에서 중요한 매개자로서, 또는 특이한 길항제에 대한 표적물질로 작용을 한다고 보고되었다(Kang, 2004). TNF- α 농도의 감소는 봉선화가 활성화된 림프구와 대식세포 등에 영향을 주어 염증반응 과정에서 만들어지는 염증성 사이토카인의 생성을 억제하는 작용을 한 것으로 추측된다.

IL-6는 B세포 분화증식, 급성기 단백 합성자극, 혈소판 생산자극의 작용뿐만 아니라 신장의 메산지움세포, 세노관세포에서 생산되며 메산지움세포의 증식 및 세노관간질조직의 손상과 관련이 있는 등에도 관여하는 사이토카인으로서³⁸⁻⁴³⁾ 면역세포를 활성화시키고 항체생산을 촉진하는 작용을 하며 염증 정도를 나타내는 marker로 이용되고 있으며^{36,37)}, 불규칙적인 과잉의 IL-6 생성이 증식성 사구체 신염에서 발견되었다고 보고된바 있다⁴⁴⁾. IBL에 의한 IL-6 생성의 감소에 의하여 면역세포의 활성화가 억제되므로써 면역세포의 조직내로의 침윤 등을 포함한 전체적인 염증반응이 감소하며, 특히

IL-6와 같은 항체생성에 중요한 사이토카인의 생성 억제는 cBSA에 대한 항체생성을 저하시키고 그에 따른 면역복합체의 침착 감소로 인하여 사구체막의 파괴가 봉선화의 투여로 인해 MN과 관련된 면역반응에 영향을 끼치는 것으로 생각된다. IL-1 β 는 면역계뿐만 아니라 내분비계, 신경계 등에 다양하게 작용하며 대부분 염증에 관여하는 것이 특징이다^{36,37)}.

소량 분비될 때는 국소염증반응을 매개하고 다량 분비될 때는 전신적인 발열, 대사적 소모를 일으키며 혈관 내피세포의 염증과 연관이 있고^{36,37)}, 막성 사구체 신염과 밀접한 연관성을 가진다는 보고³⁹⁾되어 있으며, 숙주의 염증반응 및 염증성 자극의 매개자로서의 역할을 하여 메산지움의 세포증식과 세포외 기질 축적을 자극한다. 이상의 실험결과는 봉선화 투여는 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 염증관련 사이토카인 발현을 억제하는 봉선화가 활성화된 림프구와 대식세포 등에 영향을 주어 염증반응 과정에서 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 작용과 혈청 IgG, IgM 및 IgA를 감소시킴으로써 면역과 염증반응의 항진과 유관한 사이토카인에 영향을 주어 사구체내에서 cBSA로 인하여 유발된 염증세포의 유입, 혈관 내피세포의 투과성 항진, 탐식작용에 의한 조직손상을 억제하고 세포성 면역과 체액성 면역의 항진을 제어해 주는 것으로 생각된다.

한편, 광학현미경적 소견에서 정상군은 사구체 기저막의 비후가 나타나지 않았으며, 대조군은 면역 복합체의 침착으로 사구체 비후가 관찰된 반면 봉선화 투여에서는 대조군에 비하여 사구체 기저막 비후가 감소되어 있는 것으로 관찰할 수 있었다.

결과적으로 봉선화는 cBSA로 유발된 MN mouse의 사이토카인과 면역글로블린에 유의한 영향으로 나타나 면역학적 개선과 지질대사 개선 등의 효과를 작용하여 향후 구체적인 기전과 임상적 경과에 대하여는 지속적인 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결론

봉선화 추출물을 cBSA로 유발된 MN mouse에 투여하여 체중, 단백뇨와 혈액학적 및 조직 병리학적형태에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉선화 추출물은 체중, 비장, 신장 중량에 대해서 대조군에 비하여 감소되었다.
2. 봉선화 추출물은 단백뇨에 대해서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.
3. 봉선화 추출물은 혈청 albumin 농도에 대해서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었고, 혈청 triglyceride, BUN, creatinine 농도에 대해서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.
4. 봉선화 추출물은 혈청 IgG, IgM, IgA 농도에 대해서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.
5. 봉선화 추출물은 혈청 TNF- α , IL-1 β , IL-6 농도에

대해서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.

6. 봉선화 추출물은 광학현미경 소견에서 대조군에 비하여 사구체 기저막의 비후가 감소되었다.

참고문헌

1. Do HK(두호경). Dongeulshingyehak(동의신계학). Seoul: The orient medicine researcher publishing department(동양의학연구원출판부). 1993 : 89, 238-42, 301, 305, 369-78, 393-6, 842, 852, 855, 915.
2. Jefferson JA and Couser WG. Therapy of membranous nephropathy associated with malignancy and secondary causes. Semin Nephrol, 2003 : 23 : 400-405.
3. The Korean Society of Pathologists. Pathology. Seoul : Komoonsa. 2004 : 676-78.
4. Lee EJ, Lee SH, Won JJ, Yu JN, An SJ, Jeing JH, Rha, SH, An WS, Kim SE and Kim KH. Etiology and clinical course of secondary membranous nephropathy. The Korean Journal of Medicine. 2005 ; 68 : 407-417.
5. Do HK. Clinical Medicine of Kindney System. Seoul 1 : Seoungbosa, 1995 : 12, 244-248, 252, 280-281.
6. The Korean Society of nephrology. Clinical nephrology. Seoul : Kwangmun publishing co. 200 1 : 246.
7. Seoul national university College of medicine. Nerphrology. Seoul : Seoul national university press. 1998 : 158-91.
8. Do HK. Dongui Medicine of Kindney System. Seoul 1 : Seoungbosa, 2006 : 382-383, 393-399.
9. Kim HC, Park SB, Park WK, Ahn GS and Ihm H. 2006. Nephrology for block lecture. ePublic. 2006 : 263-72, 291-300.
10. The Korean Society of Nephrology. Clinical nerphrology. Seoul : Kwangmun publishing co. 2001 : 77, 221-32, 244-8.
11. Kang SK. Nephrology. Publishihg Korea medical book publishing. 1994 : 169-78.
12. Schieppatti A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S and Temmuzi G. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. N Engl J Med, 1993 ; 329 : 85-89.
13. Honkanen E, Tomroth T, Gronhagen-Riska C. Natural history, clinical course and morphological evolution of membranous nephropathy. Nephrol dial Transplant. 1992 ; 7 : 35-41.
14. Lee KY, Bin KT, Kim SS and Shin YT. Immunosuppressive treatment of adult membranous nephropathy. Korean J of Nephrology. 1995 ; 14 : 293-302.
15. Glasscock RJ. The therapy of idiopathic membranous glomerulo-nephritis. Semin Nephrol, 1991 ; 11 : 138-147.
16. Ha WM(何爲民), Chang MH(張文靄). Boksintang dagamean Membranous Nephropathy Experiment and Observation(複腎湯對家免膜性腎病 實驗觀察). Tianjin Medical University publish(天津醫科大學學報). 1999 ; 5(4) : 70-2.
17. Kim JH, Cho CS and Kim CJ. A study for effects of magsungsinyeom-bang on membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin in mouse model. Journal of Meridian & Acupoint. 2007 ; 24 : 163-180.
18. Choi IG, Cho CS, Kim CJ. A study on the effects of Chungyeolmaksungbang on Mouse model of Membranous Nephropathy indyced by Cationized Bovine Serum Albumin. Journal of korean oriental internal medicine. 2008 ; 29(1) : 104-16.
19. Lee CB. Korea illustrated plant book. Hangmusa. 1982 : 528.
20. Yuk CS. Korean medicinal herb. Acedemisa. 198 9 : 334.
21. Song KT, Jung HB, Kim BW and Tae HS. Korea an illustrated plant book. Jail publishing co. 198 9 : 604.
22. Choi SC and Jung JS. Study on the antimicrobial activity of Impatiens balsamina(III). Textile Science and Engineering. 1999 ; 36 : 338-343.
23. Kim HY. Effect of Simulated acid rain on antioxidants and related enzymes in garden balsam (*Impatiens balsamina* L.). Journal of Life Science. 2005 ; 15 : 382-386.
24. 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.
25. Sung JH, Hwang EA, Jin KB, Kwak JH, Han SY, Park SB, Kim HC. Clinicopathologic Study on Adults Idiopathic Nephrotic Syndrome in Korea. The Korean Journal of Nephrology. 2007 ; 26 : 61-69.
26. Kurt J, Isselbacher. Harrison`s Principles of Interl Medicine. Seoul, Jungdam book publisher. 1997 : 1404.
27. The Korean Assosiation of Internal Medicine. Harrison`s Principles of Interl Medicine 16th. Seoul : The publish MIP. 2006 : 1827-1848.
28. Yoon SY, Lee EJ, Huh JH, Son YK, Han KK, An WS, Kim SE, Kim KH. Clinical courses of the adult patients with idiopathic membranous nephropathy. Korean Journal of Medicine. 2004 ; 66(2) : 175-85.
29. Sin HP, Lee SH, Lee TW, Kim MJ, Im CG.

- Treatment outcomes and predictors in patients with idiopathic membranous nephropathy. *Korean Journal of Medicine*. 2004 ; 66 (3) : 267–273.
30. Chung CK, Ham SS, Lee SY, Oh DH, Choi SY, Kang IJ, et al. Effects of *Houttuynia cordata* Ethanol Extracts on Serum Lipids and Antioxidant Enzymes in Rats Fed High Fat Diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1999 ; 28(1) : 205–11.
 31. The Institute of Kidney Disease Yonsei University. *Disease of the Kidney*. Seoul : Medicinemunhwasa, 1999 : 488, 491–3.
 32. Sung NJ, Lee SJ, Shin JH, Chung MJ, Lim SS. Effects of *Houttuynia cordata* Thunb Powder and Juice on Lipid Composition of Liver, Brain and Kidney in Dietary Hypercholesterolemic Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1999 ; 27(6) : 1230–5.
 33. 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.
 34. La ST. *Disease of the kidney*. Seoul : Medicinemunhwasa, 1999 : 488–94.
 35. The Korean Society of Nephrology. *Clinical Nephrology*. Seoul : Kwangmun publishing co., 2001 : 246.
 36. Lee KR, Kwon OH. *Clinical pathology file*. Seoul : Medicinemunhwasa, 2003 : 305–6, 716–20.
 37. Abul K, Abbas, Andrew H, Lichtman. *Cellular and molecular immunology*. Seoul : e–Public, 2004 : 480, 487, 497.
 38. Papayianni A. Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren Fail*. 1996 ; 18 : 725–740.
 39. Wardle EN. Cytokine growth factors and glomerulonephritis. *Nephron*. 1991 ; 57 : 257–261.
 40. Lim CS, Kim YS, Ahn C and Han JS. Internal expression of interleukin–6 and the 174 G/C polymorphism in IgA nephropathy. *The Korean Journal of Nephrology*. 2002 ; 21 : 595–601.
 41. Schena FP, Gesualdo L and Grandaliano G. Progression of renal damage in human glomerulonephritides : Is there sleight of hand in winning the game?. *Kidney Int*. 1997 ; 52 : 1439–1487.
 42. Galla JH. Molecular genetics in IgA nephropathy. *Nephron*. 2000 ; 88 : 107–112.
 43. Rantala I, Mustonen J and Hurme M. Pathogenic aspects of IgA nephropathy. *Nephron*. 2001 ; 88 : 193–198.
 44. Buraczynska M, Jozwiak L, Ksiazek P, Borowicz E and Mierzicki P. Interleukin–6 gene polymorphism and faster progression to end–stage renal failure in chronic glomerulo– nephritis. *Transl Res*. 2007 ; 150 : 101–105.