

원저

陰谷에 시술한 동규인약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향 보고

허미숙 · 김정호 · 김영일

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Herbal-acupuncture at KI₁₀ on LPS-induced Nephritis in Rats

Her Mi-suk, Kim Jung-ho and Young-il Kim

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

Objectives : This study aimed to evaluate the effects of Malvae Semen herbal-acupuncture (MS-HA) at KI₁₀(*Eumgok*) on nephritis induced by lipopolysaccharide (LPS) in rat.

Methods : Rats with nephritis induced by LPS, were treated with Malvae Semen herbal-acupuncture(MS-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 Malvae Semen Herbal-acupuncture at KI₁₀ on nephritis in rats, WBC, Neutrophils in blood, BUN, Creatinine, TNF- α , CINC-1 in serum, urinal volume, creatinine, total protein in urine and renal TNF- α , renal tissue were analyzed.

Results : MS-HA at KI₁₀ significantly reduced WBC and neutrophil in blood, TNF- α in serum of LPS-stimulated rats. MS-HA at KI₁₀ significantly reduced total protein level in urine. MS-HA at KI₁₀ reduced accumulation of neutrophil in renal tissue of LPS-stimulated rats.

Conclusions : Taken together, MS-HA at KI₁₀ has a therapeutic effect on nephritis in LPS-stimulated rat.

Therefore, it is suggested that MS-HA at KI₁₀ may be an useful therapeutics for nephritis in clinical field.

Key words : nephritis, herbal-acupuncture, KI₁₀, Malvae Semen

· 접수 : 2011. 11. 10. · 수정 : 2011. 12. 6. · 채택 : 2011. 12. 6.
· 교신저자 : 김영일, 대전광역시 서구 둔산동 1136 대전대학교 부속둔산한방병원 침구과
Tel. 042-470-9137 E-mail : omdkim01@dju.ac.kr

I. 서론

신장은 심장에서 방출되는 혈액량의 약 25% 가량이 신장으로 흘러 들어간다. 혈액공급을 받은 신장은 여과 배설하는 역할을 하기에 혈액 속 약물 및 독소에 쉽게 노출되어 손상을 받기도 한다¹⁾.

급성 신장염은 감염이나 자가면역체계의 이상 활성화로 신원에의 급성 염증에 의하여 육안적 혹은 현미경적 혈뇨와 단백뇨, 부종, 고혈압이나 사구체 여과율 감소 등 급격한 신기능 약화를 초래한다¹⁾.

LPS(Lipopolysaccharide)는 그람음성박테리아의 세포막 구성성분으로 대식세포의 활성화 인자이며 자극된 대식세포는 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 등과 같은 cytokine을 생성하여²⁻⁴⁾, 세포매개성 면역반응 및 염증반응을 유발한다. 또 LPS는 매산지움 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며 매산지움 세포와 tubular epithelial cell에 Fas 발현을 증가시킴으로써 직간접적으로 신장 손상을 초래한다⁵⁻⁷⁾.

음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 會水穴이며, 足少陰腎經·衝脈·陰維脈의 交會穴로서, 補腎培元, 調經利水하는 효능이 있어 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難 등을 치료한다⁸⁾.

동규인은 아욱과(錦葵科 : Malvaceae)에 속한 일년생 초본인 아욱(*Malva verticillata* L)의 성숙한 種子이다. 성미로 性은 寒하고, 味는 甘하다. 귀경은 大腸·小腸·膀胱經이며 효능 및 주치는 利水通淋, 潤腸通便, 下乳, 治淋病, 水腫, 大便不通, 乳汁不行이다⁹⁾.

급성 신부전 및 신장독성에 관한 기존의 연구로는 육미지황탕¹⁰⁾, 단삼¹¹⁾, 녹용¹²⁾ 등의 약물을 이용하여 유효한 효과를 보인 연구가 보고된 바 있었으며, 구맥²⁾·차전자¹³⁾·동과인³⁾약침을 음곡에 자침하여 유효한 효과를 보인 예가 있었다. 그리고 동규인에 대한 기존의 연구로는 동규인 추출액을 투여하여 肥滿症과 肥滿誘導細胞 3T3-L1의 分化에 미치는 영향에 유의한 효과를 보인 예¹⁴⁾가 있었으나 동규인의 신장염에 대한 치료효과에 관한 연구는 아직 보고된 바 없었다.

이에 저자는 음곡 동규인 약침이 독소에 의한 신장염에 미치는 영향을 알아보고자, 동규인 약침액을 만들어, 시술 후 LPS로 유도된 신장염 병태모델 흰쥐의 음곡 상응부위에 시술하고, 혈액과 소변, 신장 내 염증 활성평가, 조직학적 분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 동물

동물은 6 주령의 웅성 SD rat을 (주)대한바이오파크(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±2℃)과 습도 20~60%을 유지하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 동규인(Malvae Semen, MS)는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약(Table 1)

Table 1. Reagent

Reagent	Company	Country	
Phosphate buffer saline (PBS)	Sigma	USA	
HBSS			
Collagenase type IV			
MTT			
Lipopolysaccharide (LPS)			
Gum-sucrose			
Formalin			
Absolute EtOH			
Harris Hematoxlin			
Eosin B			
RPMI 1640 media			
Antibiotics			Hyclone
FBS			BD
BCA kit			
TNF-alpha ELISA Kit	Oxford Bio Assay Systems ALPCO Cellscience		
Creatinine assay kit			
CINC-1 ELISA Kit			
MPO ELISA Kit			

(2) 기기(Table 2)

Table 2. Equipment

Equipment	Company	Country
Bio-freezer	Sanyo	Japan
Rotary evaporator	Eyela	
Digital camera Microscope	Nicon	
ELISA reader	TARAN	Canada
Sonicate	Fisher	USA
Ice maker	Vision science	Korea
Metabolic cage	B&P	
Cytological centrifuge	Hanil	
Micro centrifuge		
Cryotome	Shandon	UK

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 동규인 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500 ml를 가하여 3 시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축 하였다. 농축액에 95% ethyl alcohol 30 ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 동규인 55g으로부터 얻은 약침액을 감압 농축하여 수분을 모두 날렸을 때 분말 수율은 1.168 g이었다(수율 2.12%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4℃에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 10%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Fig. 1).

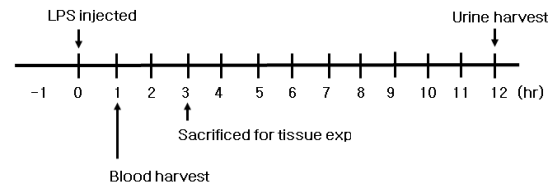


Fig. 1. Manufacturing procedure of malvae semen herbal acupuncture solution

2) 세포독성

(1) 간세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD rat의 간 조직을 사용하였다. Rat을 ethyl ether를 이용하여 마취한 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단하여 동물의 혈액을 모두 배출하였다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10% FBS)와 collagenase typeIV(300u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 한다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어서 줌으로써 간세포가 잘 분리되도록 하였다. 얻은 간세포는 RPMI 1640 media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.

(2) MTT assay

분리한 간 실질세포의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96 well plate에 세포를 1×10⁵ cells/well으로 분주하고, FBS 10%와 antibiotics를 첨가한 RPMI 1640 media에 동규인 전탕액을 농도별로 처리하고, 72시간동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution (5 mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20 μl씩 분주하고 5시간 동안 37℃에서 incubation을 실시한다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 μl씩 버리고, solubilizing solution을 100 μl씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 optical densities로 확인하였다.

3) 신장염 동물 모델

6주령 수컷 SD rat에 LPS(2mg/kg)를 복강에 투여하여 신장염을 유도하였다¹⁾. 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. LPS 투여 1시간 뒤, 각 실험군에서 5마리의 혈액 sample을 채취하였으며, LPS 투여 3시간 후에는 혈액을 채취했던 동물 5 마리를 sacrifice하여 신장을 적출하였다. 각 실험군의 나머지 3마리로부터 LPS 투여 후 12시간 동안 소변 sample을 채취하였다(Fig. 2).

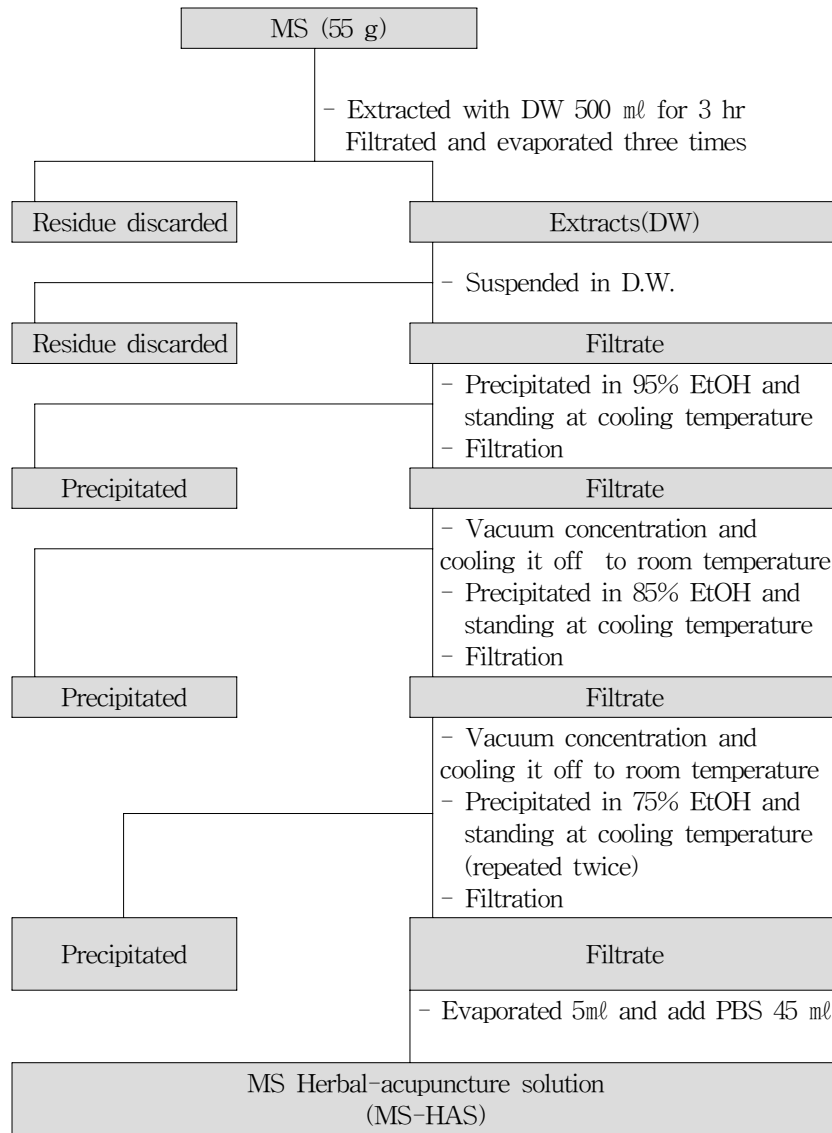


Fig. 2 Experimental Procedure

4) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), NP군(needle prick, NP), saline대조군(Saline), 동규인약침군(MS-HA)의 5군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, NP군, saline대조군, 동규인약침군은 각각 2mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. NP군과 saline대조군, 동규인약침군은 LPS 투여 1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 NP(needle prick)자극, saline주입, 동규인약침처치를 주 3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치하지 않은 정상 SD rat
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2mg/kg으로 복

강 투여한 군

- ③ NP군(NP) : 실험 전 1주일간 48시간 간격으로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 26 gauge 주사기를 0.5 cm 정도 깊이로 자입한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군
- ④ Saline대조군(Saline) : 실험 전 1주일간 saline 0.2 ml를 48시간 간격으로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군
- ⑤ 동규인약침군(MS-HA) : 실험 전 1주일간 5%의 동규인약침액 0.2 ml를 48시간 간격으로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군

5) 신장염 평가

(1) 혈액분석

LPS 처리 1시간 뒤, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 심장채혈법으로 각 동물에서 4 ml의 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) 소변분석

Metabolic cage에서 12시간 동안 소변을 채취하여, 배뇨량과 뇨중 total protein과 creatinine 농도를 kit로 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 대동맥 혈관에 HBSS (Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장 조직은 0.05% sodium azide가 첨가된 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2000×g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80℃에서 보관하였다가 ELISA kit을 이용하여 TNF-alpha와 MPO의 농도를 측정하였다.

(4) 조직학적 분석

LPS 처리 3시간 후, 실험동물의 신장을 적취하여, 10%의 formalin에 고정한다. 고정된 조직은 왁스에 format시켜 5 μm의 두께로 박절한 후 조직 절편을 슬라이드에 부착시키고 실내에서 30분 이상 방치하였다. 슬라이드에 부착된 조직은 Harris hematoxylin에서 1분 정도 염색을 실시하고 흐르는 물에 씻어주었다. 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 빼고, 다시 깨끗한 95% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼었다. 남은 alcohol 성분은 흡수지를 이용하여 완전하게 alcohol 성분을 제거하고, 100% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 후, 다시 깨끗한 100% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼었

다. 남은 alcohol 성분을 제거하고, Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼고, 다시 깨끗한 Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 뒤, 봉입한다. 봉입을 끝낸 조직은 광학 현미경(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰한 후, digital camera(DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하였다.

6) 통계분석

실험결과는 각 실험군에서 얻은 결과값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 통계프로그램은 SPSS (14.0 KO)를 이용하여 분석하였다. Fig. 1의 데이터는 ANOVA-test를 이용하여 여러 농도간 결과값의 평균을 비교하였으며, Fig. 2와 3에서는 *t*-test를 이용하여 LPS처리군과 비처리군의 평균을 비교하였다. 이후 Fig. 4부터는 정상군과 LPS군의 평균을 *t*-test로 비교하고, 다시 LPS군, NP군, saline군, MS-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. 세포독성

동규인약침액을 1%, 2.5%, 5%, 10%로 희석하여 정상 rat의 간세포에 대한 세포독성을 확인하였으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

2. LPS투여 따른 TNF-alpha의 농도 변화

1) Serum TNF-alpha

Rat에 LPS 복강투여를 실시하여 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 LPS를 투여하지 않은 군과 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4).

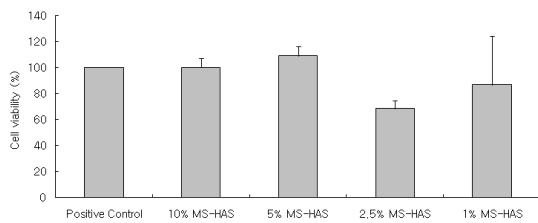


Fig. 3. Cytotoxicity of MS-HAS on rat liver cells
Liver cells from normal SD rat were cultured in RPMI 1640 with 10% FBS medium for 72h with or without various concentrations of MS-HAS (Dianthi Semen herbal acupuncture solution). The cell viability were measured by MTT assay. Values represent the means \pm SEM of 3 independent experiments.
Control : culture medium without MS-HAS.
10%, 5%, 2.5%, 1% MS-HAS : culture medium with 10%, 5%, 2.5%, 1% MS-HAS : respectively

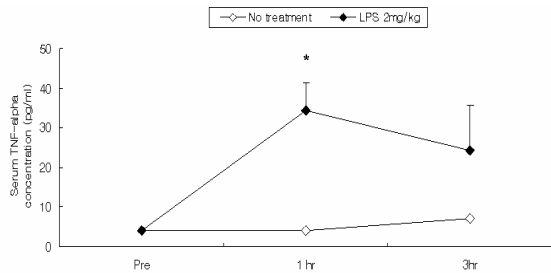


Fig 4. Effect of LPS on serum TNF-alpha level in SD rats

The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS(lipopolysaccharide; 2mg/kg). Blood samples were taken from rat heart at 1 hr or 3 hr after the LPS injection, and serum TNF-alpha level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).
No treatment : normal SD rat.
LPS 2 mg/kg : SD rat with LPS (2mg/kg) challenge.
* : $p < 0.05$, compared to no-treatment group by *t*-test.

Table 3. Blood Cell Counts in LPS-Stimulated Rats

	Normal	LPS	NP	Saline	MS-HA
RBC ($\times 10^6$ cell/ml)	7.016 \pm 0.423	7.014 \pm 0.304	7.016 \pm 0.442	7.378 \pm 0.747	7.878 \pm 0.203
WBC ($\times 10^3$ cell/ml)	3.07 \pm 2.397	11.624 \pm 0.631	2.934 \pm 2.43	6.25 \pm 3.33	3.58 \pm 1.735
Neutrophil (%)	84.6 \pm 2.79	94.2 \pm 2.387	89.6 \pm 4.879	92.6 \pm 1.140	76.6 \pm 6.878

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intraperitoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and the blood cells were counted. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

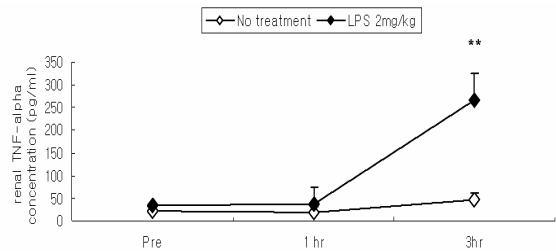


Fig. 5. Effect of LPS on renal TNF-alpha level in SD rats

The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS(2mg/kg). Rat kidney was removed at 1 hr or 3 hr after the LPS injection, and renal TNF-alpha level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean \pm SD(n=3).
No treatment : normal SD rat.
LPS 2 mg/kg : SD rat with LPS(2mg/kg) challenge.
** : $p < 0.001$, compared to no-treatment group by *t*-test.

2) Renal TNF-alpha

Rat에 LPS를 복강 투여하여 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. 5).

3. 동규인약침 시술이 LPS에 의한 rat의 신장염에 미치는 영향

1) 혈액학적 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의

혈액을 채취하여 RBC, WBC의 수와 WBC 중 neutrophil의 비율을 측정하였다(Table 3).

(1) RBC

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈중 RBC 수를 측정하였다. 모든 실험군에서 혈중 RBC는 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 6).

(2) WBC

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈중 WBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. NP군과 saline 대조군, 동규인약침군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

(3) Neutrophil

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 WBC 중 neutrophil 비율을 측정하였다. LPS군의 neutrophil 비율은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 동규인약침군에서는 LPS군, NP군 및 saline군에 비하여 neutrophil 비율이 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

2) Blood chemistry

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 혈청 BUN,

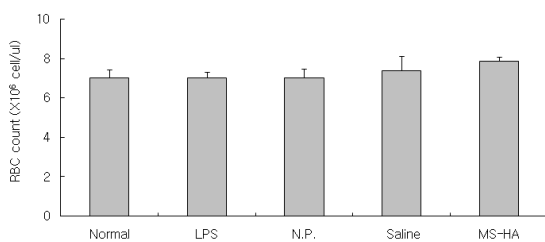


Fig. 6. Effects of MS-HA on RBC count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and RBC count was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

creatinine, TNF-alpha 그리고 CINC-1의 농도를 측정하였다(Table 4).

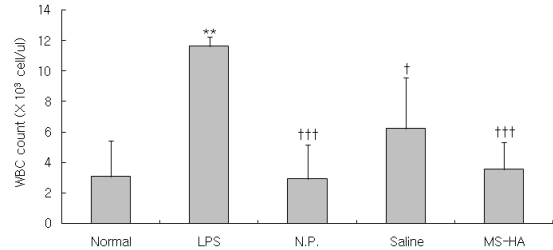


Fig. 7. Effect of MS-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and WBC count was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

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 (200μl/rat) injection at KI₁₀.

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

** : p<0.01, compared to normal group by t-test.

† † † : p<0.001.

† : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test.

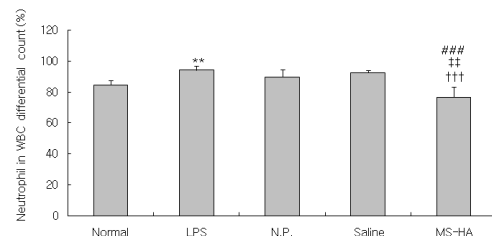


Fig. 8. Effect of MS-HA on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and the percentage of neutrophil out of WBC count was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

** : p<0.01, compared to normal group by t-test.

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

‡ ‡ : p<0.01 compared to NP group by ANOVA test.

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

Table 4. Blood Chemistry Analysis in LPS- Stimulated Rats

	Normal	LPS	NP	Saline	MS-HA
BUN (mg/dl)	25.52 ±4.097	40.16 ±4.763	18.74 ±2.254	18.26 ±3.769	38.24 ±1.834
Creatinine (mg/dl)	0.412 ±0.091	1.408 ±0.190	1.088 ±0.309	1.593 ±0.249	0.996 ±0.36
TNF- α (pg/ml)	25.029 ±14.094	222.143 ±38.074	225.857 ±3.273	127.314 ±48.508	127.571 ±14.915
CINC-1 (pg/ml)	255.429 ±19.029	612.714 ±21.3	378.357 ±104.406	411 ±212.454	462.714 ±14.061

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum was isolated. The levels of IgG, BUN, creatinine, TNF- α and CINC-1 in serum were analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).
 Normal : normal SD rat.
 LPS : LPS(2mg/kg) challenge.
 NP : LPS(2mg/kg) challenge and a needle prick at KI₁₀.
 Saline : LPS(2mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI₁₀.
 MS-HA : LPS(2mg/kg) challenge and MS-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

(1) BUN(Blood urea nitrogen)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 BUN 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 증가하였다. NP군 및 saline대조군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였다. 동규인약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 9).

(2) Creatine

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 creatine 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 creatine이 유의하게 증가하였다. 동규인약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 creatine 농도가 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 10).

(3) TNF- α

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 TNF- α 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 TNF- α 가 현저하게 증가하였다. Saline 대조군 및 동규인약침군은 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

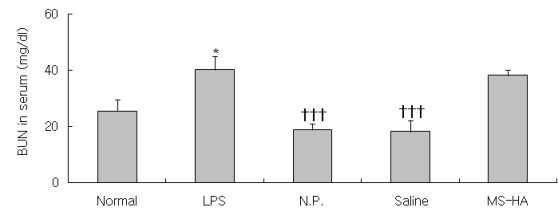


Fig. 9. Effects of MS-HA on serum BUN level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum BUN level was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).
 Normal : normal SD rat.
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge.
 NP : LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at KI₁₀.
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline (200 μ l/rat) injection at KI₁₀.
 MS-HA : LPS(2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.
 * : $p < 0.05$ compared to normal group by t -test.
 † † † : $p < 0.001$ compared to LPS group by ANOVA test.

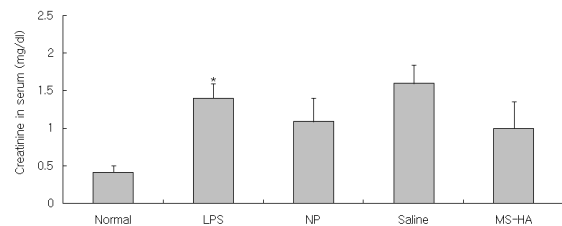


Fig. 10. Effects of MS-HA on serum creatine level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum creatine level was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).
 Normal : normal SD rat.
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge.
 NP : LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at KI₁₀.
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline (200 μ l/rat) injection at KI₁₀.
 MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.
 * : $p < 0.05$ compared to normal group by t -test.

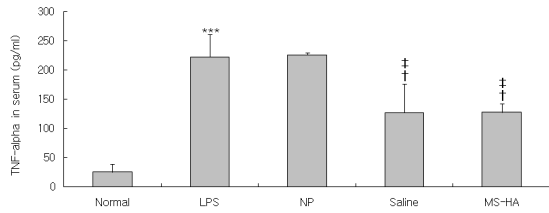


Fig. 11. Effects of MS-HA on serum TNF-alpha level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum TNF-alpha level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5). Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 µl/rat) at KI₁₀.

*** : 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 NP group by ANOVA test.

(4) CINC-1(Cytokine-induced neutrophil chemo-attractant-1)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 CINC-1 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. NP 군 및 saline대조군에서는 LPS군에 비하여 CINC-1이 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 동규인약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 12).

3) 소변 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 소변 양과 요중 creatinine과 total protein의 양을 측정하였다(Table 5).

(1) 이뇨 활성

Rat에 LPS로 신장염을 유도한 후 metabolic cage에 한 마리씩 수용하고 12시간동안 소변을 채취하여 배뇨량을 측정하였다. LPS군과 Saline대조군에서는 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다. 동규인치료군에서는 LPS대조군 및 saline대조군에 비하여 배뇨량이 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 13).

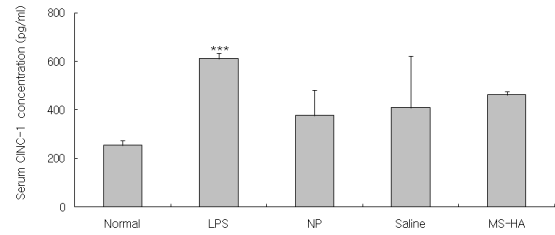


Fig. 12. Effects of MS-HA on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum CINC-1 level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 µl/rat) at KI₁₀.

*** : p<0.001 compared to normal group by t-test.

Table 5. Urine analysis in LPS-stimulated rats

	Normal	LPS	NP	Saline	MS-HA
Urine (ml/rat)	11.33 ±1.155	6.5 ±1.732	7.167 ±2.082	4.833 ±1.041	7.333 ±4.933
Creatine (mg/dl)	1.373 ±0.044	2.307 ±0.637	1.439 ±0.379	1.884 ±0.314	2.054 ±0.730
Total protein (ng/dl)	1095.21 ±90.437	1583.11 ±39.558	1191.53 ±81.235	1138.76 ±315.123	921.395 ±209.656

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). The rats were kept in the metabolic cages and the urine was collected for 12 hours. And the levels of urinary creatinine and total protein were analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 µl/rat) at KI₁₀.

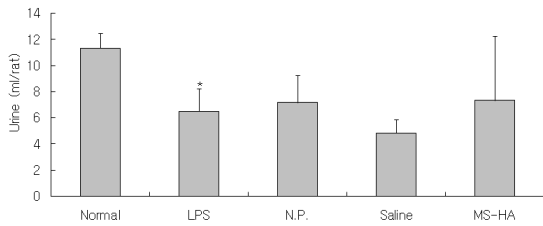


Fig. 13. Effect of PS on urinary volume in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). The rats were kept in metabolic cages and the urine was collected for 12 hours. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

* : $p < 0.05$ compared to normal group by *t*-test.

(2) Creatinine

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요중 creatinine 양을 측정하였다. LPS군의 creatinine 농도는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 동규인약침군과 NP군에서는 LPS군에 비하여 요중 creatinine 농도가 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 14).

(3) Total protein

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요중 total protein 양을 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 요중 total protein이 유의하게 증가하였다. 동규인약침군의 요중 total protein은 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 15).

4) 신장 내 염증활성

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장조직을 분획한 후 TNF-alpha와 MPO의 농도를 측정하였다(Table 6).

(1) TNF- α

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 renal TNF-alpha의 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal TNF-alpha가

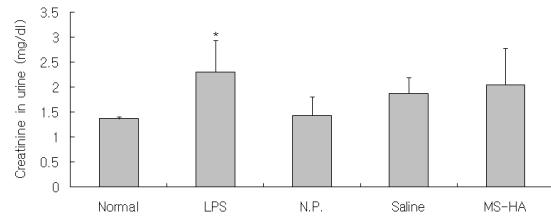


Fig. 14. Effects of MS-HA on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). The rats were kept in the metabolic cages and the urine was collected for 12 hours. And the urinary creatinine level was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

* : $p < 0.05$ compared to normal group by *t*-test.

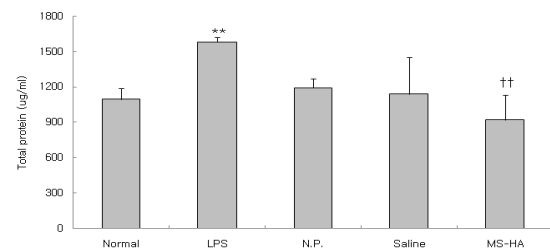


Fig. 15. Effects of MS-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). The rats were kept in the metabolic cages and the urine was collected for 12 hours. And, total protein level in urine was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

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

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

Table 6. Inflammatory Activity in Kidney of LPS- Stimulated Rats

	Normal	LPS	NP	Saline	MS-HA
TNF-alpha (mg/dl)	9775.33±2111.531	14156.7±1989.263	13886±2407.278	11627.3±1921.047	1488.6±641.671
MPO (mg/dl)	14.275±6.094	96.283±4.585	90.422±11.783	87.717±16.422	83.348±5.483

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed and the levels of renal TNF-alpha and MPO were analysed by ELISA. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200μl/rat) at KI₁₀.

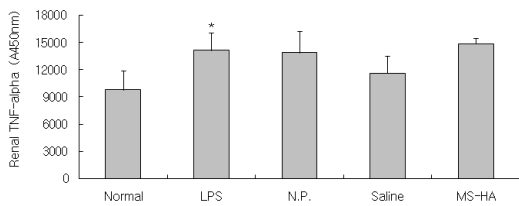


Fig. 16. Effects of MS-HA on renal TNF-alpha level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed and renal TNF-alpha level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

* : p<0.05 compared to normal group by t-test.

유의하게 증가하였다. 동규인약침군의 renal TNF-alpha는 대조군에 비하여 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 16).

(2) MPO(myeloperoxidase)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 renal MPO 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal MPO가 현저하게 증가하였다. 동규인약침군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 17).

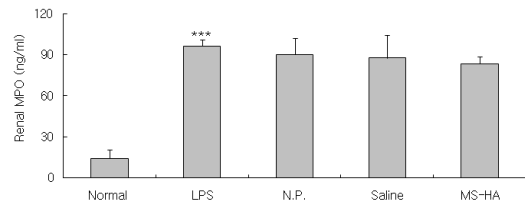


Fig. 17. Effects of MS-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed and renal MPO level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

*** : p<0.001 compared to normal group by t-test.

5) 조직학적 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 hematoxin and eosin(H&E) 염색법으로 조직을 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. LPS군의 신장조직은 정상군에 비하여 사구체에 neutrophil의 집중과 조직의 조밀도 저하가 나타났다. 동규인약침군의 신장 조직은 정상군 만큼 neutrophil의 집중이 줄어들지는 않았으나, LPS군에 비하여는 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 나타났다(Fig. 18).

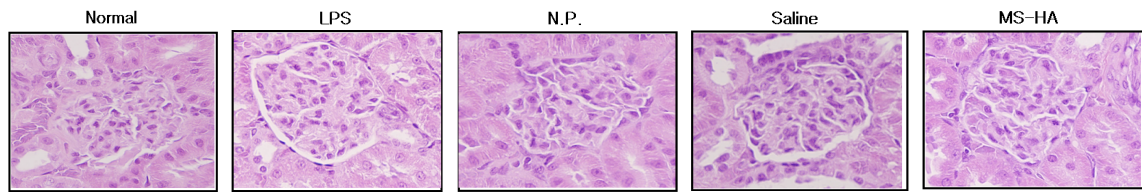


Fig. 18. Histological analysis of renal tissue in LPS-stimulated rats (H&E stain)

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed. The renal tissue was sliced and embedded in OCT compound, and 8 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (\uparrow : glomerulus, $\times 400$).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2mg/kg) challenge.

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

MS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and MS-HA (10%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

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

IV. 고찰

신장은 길이 10cm, 너비 5cm, 두께 3cm 정도의 강낭콩 모양으로 횡격막 아래 등쪽으로 1쌍이 붙어 있는 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 PH조절, 노폐물 배설 및 체내 과잉물질의 체외 배출, 혈압의 내분비성 조절 등의 역할을 한다. 따라서 피질의 신사구체 및 세뇨관의 내피세포는 혈액 속 각종물질에 노출되어 있으며 이로 인해 신 독성 물질 및 약물에 손상받기 쉬운 여건에 있다^{1,15)}.

신장은 사구체에서 혈액을 여과한 후 세뇨관에서 능동수송과 확산 과정을 통하여 물질을 교환하기 위하여 미세한 막 구조를 이루고 있으며, 능동수송에 의한 왕성한 대사작용으로 인해 독성물질에 대한 감수성이 높다.

급성 신장염은 신원의 급성 염증에 의하여 육안적 혹은 현미경적 혈뇨와 단백뇨, 부종, 고혈압이나 사구체 여과율 감소 등 급격한 신기능 약화 증상을 보인다¹⁾.

신장의 사구체에 발생하는 사구체 신염은 감염에 의한 면역복합체나, 항체가 사구체 기저막에 침착되어 발생한다. 전신적인 혈관의 염증성 질환 등도 사구체 신염의 원인이 된다. 사구체 기저막에 침착된 면역복합체나 세균에 대한 항체는 자가조직을 손상시키는 면역시스템을 활성화시켜 사구체 신염이 촉발된다. 사구체 신염은 사구체의 막 구조를 손상시켜, 혈뇨, 단

백뇨 등을 유발하고, 여과기능의 손상까지 진행된다면, 단백뇨와 요독증이 발생한다¹⁶⁾.

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, 尿道가 刺痛하고, 小腹이 拘急하거나 혹은 腰腹이 通引한 증상이라고 하였으며¹⁾, 《金匱要略·消渴小便不利淋病篇》¹⁷⁾에서는 “淋之爲病, 小便如粟像, 小腹弦急, 通引臍中”이라 하였고, 《諸病源候論》¹⁸⁾에서는 “諸淋者 有腎虛以膀胱熱故也”라 표현하였다.

염증이란 혈관이 있는 조직 내에서 여러 가지 염증 유발성 자극에 의하여 발생한 손상에 대한 생체의 반응이며 염증의 화학 매개체란 자신이 염증의 원인이 되는 것이 아니고, 혈장, 세포 및 손상받은 조직으로부터 유래하여 여러 가지의 반응을 증대하는 물질로 이중의 하나가 cytokine이다. 그중 염증에 관여하는 2가지의 중요한 cytokine에는 IL-1, TNF- α 가 있다. 염증에 관여하는 세포는 백혈구로 염증의 경과와 종류에 의해 염증 반응에서 백혈구의 종류가 변한다.

일반적인 염증은 초기에 Neutrophil이 주로 활동하고 후기에는 림프구, 형질세포와 대식구가 이에 대신한다. 염증의 초기에 주요 역할을 담당하는 Neutrophil은 골수에서 유래하고 세포질 내에 호중성의 과립이 있으며 염증이 발생하면 혈관의 내피 사이를 빠져나가 혈관 밖으로 유출하고 화학 주성에 의해 항원과 이물에 이동하고 부착한 후 이것들을 탐식하는 역할을 한다¹⁹⁾.

LPS는 그람음성박테리아 세포막의 구성 성분으로 면역세포를 자극하여 cytokine을 분비시키며 증가된

혈청 내 proinflammatory cytokine은 LPS에 의한 신장 손상을 매개한다. 신장의 경우 LPS는 신장의 혈행 역학 장애를 유발하며 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine을 분비시키고 IL-8, MCP-1 등의 chemokine을 분비하여 면역세포의 화학주성을 유발한다. 또 LPS는 매산지움 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며 매산지움 세포와 tubular epithelial cell에 Fas 발현을 증가시킴으로써 직간접적으로 신장 손상을 초래하며¹⁶⁻¹⁸⁾, 최근의 실험에서 신장 독성으로 인한 사구체 신염, 급성 신부전, 간질성 신염, 신 독성 신염 등의 병태모델에 많이 사용되고 있다.

동규인은 아욱과(錦葵科 : Malvaceae)에 속한 일년생 초본인 아욱(*Malva verticillata* L)의 성숙한 種子이다. 성미로 性은 寒하고, 味는 甘하다. 귀경은 大腸·小腸·膀胱經이며, 효능 및 주치는 利水通淋, 潤腸通便, 下乳, 治淋病, 水腫, 大便不通, 乳汁不行이다. 利水通淋시키는 효능으로 小便不利와 水腫 淋病澀痛 등의 證을 치료한다. 또한 潤腸通便하므로 大便燥結을 치료하며, 下乳消腫시키는 효능이 있어 乳汁不行으로 인한 乳房脹痛을 치료한다⁹⁾.

약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종이다. 치료 경혈 및 체표 반응점에 정제 추출한 약물을 주입하여 질병을 치료하는 방법으로 자침과 약물의 효과를 동시에 얻고²⁰⁾ 경구투여가 불가능한 경우에 처치할 수 있으며 환처에 처치할 수 있는 등의 장점이 있다^{21,22)}.

陰谷(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴, 自性穴이며 足少陰腎·衝脈·陰維脈의 交會穴로, 무릎안쪽 경골 뒤 큰 근육 아래 작은 근육 위에 손으로 눌러보면 맥이 뛰는 곳으로 무릎을 꿇고 취혈한다. 祛濕通, 滋腎清熱, 疎泄厥氣, 利導下焦, 補腎培元, 調經利水하는 효능이 있어 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難 등의 治療穴이 된다²³⁾.

이에 저자는 음극 동규인약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 동규인약침액을 시료로 정상 백서의 간세포에 대한 세포 독성을 확인하고, LPS로 유도된 신장염 병태모델 흰쥐의 음극 상응부위에 동규인약침을 시술한 후, 혈액분석, 소변분석, 신장 내 염증 활성분석, 조직학적 분석을 시행하였다.

동규인약침액을 1%, 2.5%, 5%, 10%로 희석하여 정상 rat의 간세포에 대한 세포 독성을 확인하였다. 동규인약침액의 농도가 높을수록 세포의 viability가 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1).

LPS 투여에 따른 TNF- α 의 농도 변화는, 혈청에서

는 LPS 투여 1시간 후에, 신장 조직에서는 LPS 투여 3시간 후에 정상군과 LPS 투여군 간에 차이가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 2, 3). 따라서 본 실험에서 혈청 검사는 LPS 투여 1시간 후에, 신장 조직 내 검사는 LPS 투여 3시간 후에 시행하였다.

Neutrophil은 골수에서 만들어지는 백혈구의 일종으로 내부에 중성 염색성 과립이 있어서 염증이 발생하면 항원과 이물질에 부착하여 탐식 작용을 한다²⁴⁾. 본 실험에서 LPS 투여군에 비해 MS-HA군에서 백혈구, 백혈구 중 neutrophil의 비율이 MS-HA군에서 유의하게 감소하였고, NP군에서 혈중 백혈구가 감소하여 음극에 시술한 동규인약침과 음극혈 자침이 신장염 모델에서 염증반응을 억제한 것으로 사료된다(Fig. 6, 7).

BUN은 혈중에 존재하는 요소 내 질소를 표현하는 것으로 신장질환과 관계가 깊은 질소대사 산물이다. 암모니아, 요산과 더불어 요소는 질소대사의 주요 최종 산물로 간의 요소 회로에서 생성된다. 간에서 생성된 요소는 신사구체에서 여과된 다음 세뇨관에서 일부는 재흡수되고 나머지는 소변으로 배설된다. 신 기능이 저하되어 사구체 여과율이 감소하면 혈중 농도가 상승하므로 신기능을 평가할 수 있다²⁵⁾.

Creatinine은 근 수축 energy로서 creatin phosphate로부터 생성되는 creatinine은 탈수되어 생긴 최종 대사산물로 BUN과는 달리 세뇨관에서 재흡수되지 않고 체외로 배설되며 신장 이외에 영향을 받지 않으며 근육량에 비례하고 식이 영향이 거의 없이 일정하므로 creatinine이 요중 배설량은 체내 creatinine의 생성량과 동일하며 사구체 여과율에 따라 변하므로 신장 기능을 평가하는 지표가 된다²⁵⁾.

TNF- α 는 그람-음성 박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 활성화된 대식세포에 의해서 생산되며, 내피세포와 대식세포를 자극하여 백혈구의 주화성 과보충을 유도하는 케모카인을 분비토록 하며, 혈액 단핵구와 T 림프구, 호중구, 혈관 내피세포, 피부섬유아세포 등의 세포에서 IL-8 유전자 발현을 유도한다. TNF- α 로 유도된 chemokine인 IL-8은 염증세포들을 활성화하고 그들을 염증부위로 유인하는 화학 유인인자(chemotactic factor, chemokines)의 작용을 하는데, CINC-1은 IL-8 family의 일원이다. 최근 쥐의 염증반응 모델에서 CINC-1 수치를 측정하여 IL-8 발생을 조사 한 보고가 있다^{26,27)}. 본 실험에서는 염증반응에서 호중구의 활성화 정도를 알아보기 위하여 CINC-1 수치를 측정하였다.

본 실험에서 혈청 BUN, creatinine, TNF- α , CINC-1

의 농도를 측정된 결과, 혈청 BUN에서는 동규인약침 군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. Creatinine 또한 LPS군에 비하여 혈청 creatine 농도가 감소하였으나, 유의성은 없었다. TNF- α 에서는 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 유의하게 감소하였다.

CINC-1에서는 동규인약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 8~11).

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 단백질이 발견된다⁴⁵⁾.

본 실험에서는 백서의 소변을 채취하여 요중 소변량과 creatinine 및 total protein을 측정하였다. 요중 소변량은 LPS군에 비해 유의한 변화는 없었다. 요중 creatinine 과 total protein은 LPS 투여에 의해 증가하였다. 음곡 동규인약침에서 creatinine은 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성이 부족하였고, total protein이 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다.

MPO는 neutrophil, monocyte로부터 방출되는 효소로 cytotoxic한 산과 이온을 만들게 하여 면역반응에 작용한다. MPO분석은 염증의 지표로서 조직 속의 neutrophil의 수를 측정하는 데 사용 된다²⁸⁾. 본 실험에서는 신장 실질 내 염증활성도를 측정하기 위해 TNF- α 와 MPO의 농도를 측정된 결과 음곡 동규인약침에 의해 신장 실질 내 TNF- α 의 농도에는 유의한 변화를 일으키지 못하였고, 동규인약침군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 14, 15).

신장을 적출하여 신장조직을 관찰한 결과, 동규인약침군의 신장 조직은 정상군 만큼의 neutrophil의 집중이 줄어들지는 않았으나, LPS군에 비하여는 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 나타났다(Fig. 16).

따라서 이상의 결과를 요약하면, 음곡 동규인약침은 LPS로 유도된 백서의 신장염에 대하여 혈액 내 백혈구와 neutrophil의 증가를 억제하며, inflammatory 요중 total protein을 유의하게 감소하였다. 또한 신장 조직을 적출하여 손상 관찰 시 MS-HA에서 비교적 neutrophil의 집중이 감소되어, 음곡 동규인약침군이 신장염의 조직손상을 막는 데 효과가 있을 것이라 사료된다.

따라서 음곡에 대한 동규인약침은 신장염의 치료

에 효과가 있을 것으로 생각되는바 향후 이에 대한 지속적 연구와 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

음곡(KI₁₀)에 시술한 동규인약침이 LPS로 유도된 신장염 모델 rat에 미치는 영향을 알아보고자 동규인약침액을 시료로 정상 rat의 간세포에 대한 세포독성을 확인하고 LPS 투여 후 혈청과 신장 내 TNF- α 의 농도를 측정하였고, 음곡에 시술한 동규인약침 투여 후 혈액 및 혈청 분석, 소변분석, 신장 내 염증활성, 조직학적 분석을 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MS-HA군에서 혈중 백혈구와 neutrophil의 농도와 혈청 TNF- α 를 억제하였다.
2. MS-HA군에서 요중 total protein이 유의하게 감소하였다.
3. 조직학적 분석에서 사구체의 neutrophil의 집중이 LPS에 비해 감소되었다.

이상의 결과, 음곡 동규인약침은 신장의 염증반응에 대한 위의 결과에서는 통계적 유의성이 있는 것으로 사료되나 BUN, Creatinine, CNIC-1 등에서 유효한 효과를 보지 못해 향후 지속적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. 杜鎬京. 동의신계학. 서울 : 성보사. 2003 : 141-5, 226, 256-7, 360-7, 454-9.
2. 김경민, 이 현, 강희정, 이용흠, 임윤경. 음곡에 시술한 구맥 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2009 ; 26(1) : 61.
3. Aneway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signalactivation of adaptive immunity. Nature. 1997 ; 388(6640) : 394-7.

4. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor 4(TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J immunol.* 1999 ; 162(7) : 3749-52.
5. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock Pathogenesis. *Lancet.* 1991 : 732-6.
6. Ohmori Y, Hamilton TA. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 ; 168 : 1261-7.
7. Tannenbaum CS, Koerner TJ, Jansen MM, Hamilton TA. Characteriation of Lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression. *J immunol.* 1988 ; 140 : 3640-5.
8. 임윤경, 김준표, 김태한. 대학경락경혈학 각론. 대전 : 오비기획. 2006 : 676-8.
9. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회 편저 . 본초학. 서울 : 영림사. 366.
10. 최정배, 이경환, 김용성. 육미지황탕가황기인삼 추출물의 Cisplatin 유도 신장독성 보호효과. *대한한방내과학회지.* 2003 ; 24(3) : 579-87.
11. 황영근, 정지천. 수은으로 유발된 토끼의 신장 기능 손상에 대한 단삼(丹參)의 효과. *대한한방내과학회지.* 2000 ; 21(2) : 227-34.
12. 윤철호, 정지천, 신의섭. Bromobenzene으로 유도된 신장기능저하에 미치는 녹용 약침의 항산화 효과. *대한한방내과학회지.* 1999 ; 20(2) : 287-302.
13. 박병문, 허 부, 임윤경. 음곡 차전자 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. *대한경락경혈학회지.* 2009 ; 26(2) : 61-77.
14. 송윤경 . 冬葵子 추출액이 白鼠의 肥滿症과 肥滿誘導細胞 3T3-L1의 分化에 미치는 영향. *원광대학교 대학원. 학위논문.* 1996
15. Arthur C guyton, John E Hall. *의학생리학* 10th ed. 서울 : 정담. 2002 : 318-20, 452-4.
16. J Claude Bennett, Fred Plum. *Cecil textbook of medicine.* 20th. philadelphia. saunders. 1996 : 552, 575-7.
17. 張仲景. 欽定四庫全書 子部五醫家類 卷2. 金匱要略. 서울 : 대성문화사. 1995 : 734-38.
18. 南京中醫學院. 諸病源候論校澤. 北京 : 人民衛生出版社. 1983 : 464.
19. Alkihisa Harada, Nobuaki Sekido, Tohru Akahoshi, Takashi Wada, Naofumi Mukaida, Kouji Matsushima. Essential involvement of interleukin-8 in acuet inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 1994 ; 56 : 559-64.
20. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울 : 엘스비어 코리아. 2008 : 3-8.
21. 전국한의과대학 침구경혈학교실. 鍼灸學(上). 서울 : 집문당. 2001 : 531-63, 1467-6.
22. 최문변. 수침요법에 대한 고찰. *대한한의학회지.* 1990 ; 11(1) : 315-6, 324-6.
23. 대한침구학회 교재편찬위원회. 침구학(상). 서울 : 집문당. 2008 : 175-6.
24. 김석근, 송호준, 박기현, 신민교. 白冬瓜 種子의 抽出物 分劃物들의 祛痰效果. *대한본초학회지.* 2003 ; 18(1) : 115-26.
25. 이귀녕, 권오현. 임상병리 파일(제3판). 서울 : 의학문화사. 2003 : 95-6, 102-3.
26. Nakagawa H, Komori N, Shibata F, Ikesue A, Konishi K, Fujioka M and Kato H. Identification of cytokineinduced 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 : 545-50.
27. Taie S, Chujo K, Asaga T, Iwanaga Y, Ono J, Maekawa N. Urinary trypsin inhibitor reduces inflammatory response in kidney induced by lipopolysacch, aride. *Ueki J Biosci Bioeng.* 2007 ; 104(4) : 315-20.
28. Xiao, Hong, Heeringa, Peter, Hu, Peiqi, Liu, Zhi, Zhao, Minglang, Aratani, Yasuaki, Maeda, Nobuyo, Falk, Ronald J, Jennette, J Charles. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *American Society for Clinical Investigation.* 2002 ; 110(7): 955-963.