

음곡에 시술한 등심초약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

임지순 · 조태환 · 임윤경*

대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실

Abstract

The Effect of *Junci Medulla* Herbal-acupuncture at KI₁₀ on LPS induced Nephritis in Rats

Jee Soon Ihm, Tae Hwan Cho and Yun Kyoung Yim*

Dept. of Meridian and Acupoint, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives : This study aimed to evaluate the effects of *Junci Medulla* Herbal-acupuncture(JM-HA) at KI₁₀(*Umgok*) on nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rats.

Methods : Rats with nephritis induced by LPS, were treated with JM-HA at KI₁₀ 3 times a week. The rats in the NP group and the saline group were treated with a needle prick and a saline injection respectively. To evaluate the effects of JM-HA at KI₁₀ on nephritis in rats, WBC, neutrophils in blood, BUN, creatinine, TNF- α in serum, creatinine, total protein in urine and renal MPO were measured.

Results : JM-HA at KI₁₀ significantly inhibited the increase of WBC and neutrophils in blood, BUN, creatinine, TNF- α in serum, and MPO in kidney of LPS-stimulated rats.

Conclusion : JM-HA at KI₁₀ has therapeutic effects on nephritis in LPS-stimulated rats. Therefore, it is suggested that JM-HA at KI₁₀ may be a useful therapy in clinical field after further researches.

Key Words : nephritis, herbal-acupuncture, KI₁₀, *Junci Medulla*, LPS

Acceptance : 2012. 11. 12. Adjustment : 2012. 11. 20. Adoption : 2012. 11. 20.

Corresponding author : Yun Kyoung Yim, Department. of Meridian and Acupoint, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon, 300-176, Republic of Korea
Tel : +82-42-280-2610 E-mail : docwindy@dju.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society

I. 서론

등심초(*Junci Medulla*, JM)는 골풀과(*Juncaceae*)에 속한 다년생 초본인 골풀의 莖髓를 8~9월에 채취하여 曬乾한 다음 莖髓를 取出한 것으로, 性은 微寒하고, 味는 甘淡하며, 歸經은 心·肺·小腸經이며, 清心火 利小便하는 효능이 있다¹⁾.

음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴로서 祛濕通漚, 滋腎清熱, 疏泄厥氣, 利導下焦의 효능이 있어 尿道炎, 陰道炎, 小便難 등의 증상을 主治한다²⁾.

신장은 타 장기에 비해 많은 혈류를 받아 이를 여과 배설시키는 역할을 하므로 혈액 속에 포함된 신독성 물질 및 약물에 의해 손상받기 쉬운 여건이고³⁾, 감염으로 인한 혈중의 면역복합체나 항체가 사구체기저막에 침착되면 사구체신염이 발생한다. 사구체기저막에 침착된 면역복합체나 세균에 대한 항체는 면역시스템을 활성화시켜 사구체를 손상시킴으로써 혈뇨, 단백뇨 등을 유발하고, 여과기능의 손상까지 진행되면, 췌뇨와 요독증이 발생한다⁴⁾.

LPS(lipopolysaccharide)는 그람음성박테리아의 외부 세포막을 구성하는 성분으로, 내독소 쇼크(endotoxin shock)라 불리는 병리적 연쇄반응의 주요한 시작인자이다⁵⁾. LPS는 단핵구(monocyte)를 자극하여 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α)와 같은 cytokine을 분비하도록 함으로써 패혈증을 유발한다⁶⁾. 패혈증이 진행되는 동안, 활성화된 호중구(neutrophil)와 같은 체액성 면역물질들이 체순환계로 분비되고⁷⁾, 대량으로 활성화된 호중구는 호중구 엘라스타제(neutrophil elastase) 및 초과산화물로 유도된 활성산소(superoxide derived free radical)와 같은 염증물질을 분비함으로써 조직을 손상시킨다^{8,9)}.

음곡에 시술한 약침이 신장염에 미치는 영향에 관한 기존의 실험 연구로는 금전초약침¹⁰⁾·동과인약침¹¹⁾·차전자약침¹²⁾·구맥약침¹³⁾ 등을 이용하여 유효한 효과를 보인 연구가 보고된 바 있으나, 등심초약침(*Junci Medulla* herbal acupuncture, JM-HA)을 이용한 실험은 아직 보고된 바 없다.

이에 저자는 음곡 등심초약침이 독소에 의한 신장염에 미치는 영향을 알아보고자, 등심초약침액(*Junci Medulla* herbal acupuncture solution, JM-HAS)을 만들어 흰쥐의 음곡 상응부위에 약침시술하고, LPS로 신장염을 유도하여 혈액분석, 소변분석, 신장 내 MPO(myeloperoxidase) 활성평가 등을 통하여 유의한

결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

동물은 6주령의 웅성 SD rat을 (주) 대한바이오링크(경기도, 한국)에서 공급받아 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 실험 당일까지 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하였고, 실험실은 실온(22±2 °C)과 습도 50~60 %를 유지하였으며 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 규정을 따랐다.

2) 약제

본 실험에 사용된 등심초(*Junci Medulla*, JM)는 대전대학교 한방병원에서 구입하여 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

Table 1. Reagents

Reagent	Manufacturer	Country
Phosphate buffer saline (PBS)	Sigma	USA
HBSS		
Collagenase type IV		
MTT		
Lipopolysaccharide(LPS)		
Gum-sucrose		
Absolute EtOH	Hyclone	
RPMI 1640 media		
Antibiotics		
FBS	BD	
BCA kit		
TNF-alpha ELISA kit	Oxford	
Creatinine assay kit	Bio Assay Systems	
MPO ELISA Kit	Cell Science	
Ethyl ether		

(2) 기기

Table 2. Instruments

Instrument	Manufacturer	Country
Bio-freezer	Sanyo	Japan
Rotary evaporator	Eyela	
ELISA reader	TARAN	Canada
Sonicate	Fisher	USA
Ice maker	Vision science	Korea
Metabolic cage	B&P	
Cytological centrifuge	Hanil	
Micro centrifuge		

2. 방 법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 등심초 55 g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500 ml를 가하여 3 시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 유출액을 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. 등심초 55 g에서 얻은 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 제거하였을 때 건조분말은 0.141 g이었다(수율 0.26 %). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4 °C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 10 %로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).

2) 약침액의 세포독성측정

(1) 세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD rat의 간조직을 사용하였다. Rat을 ethyl ether를 이용하여 마취시

킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca^{2+} , Mg^{2+} free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켰다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media (with 10 % FBS)와 collagenase type IV(300 u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation하였다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 잘 분리되도록 하였다. 얻어진 간세포는 RPMI 1640 media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.

(2) MTT assay

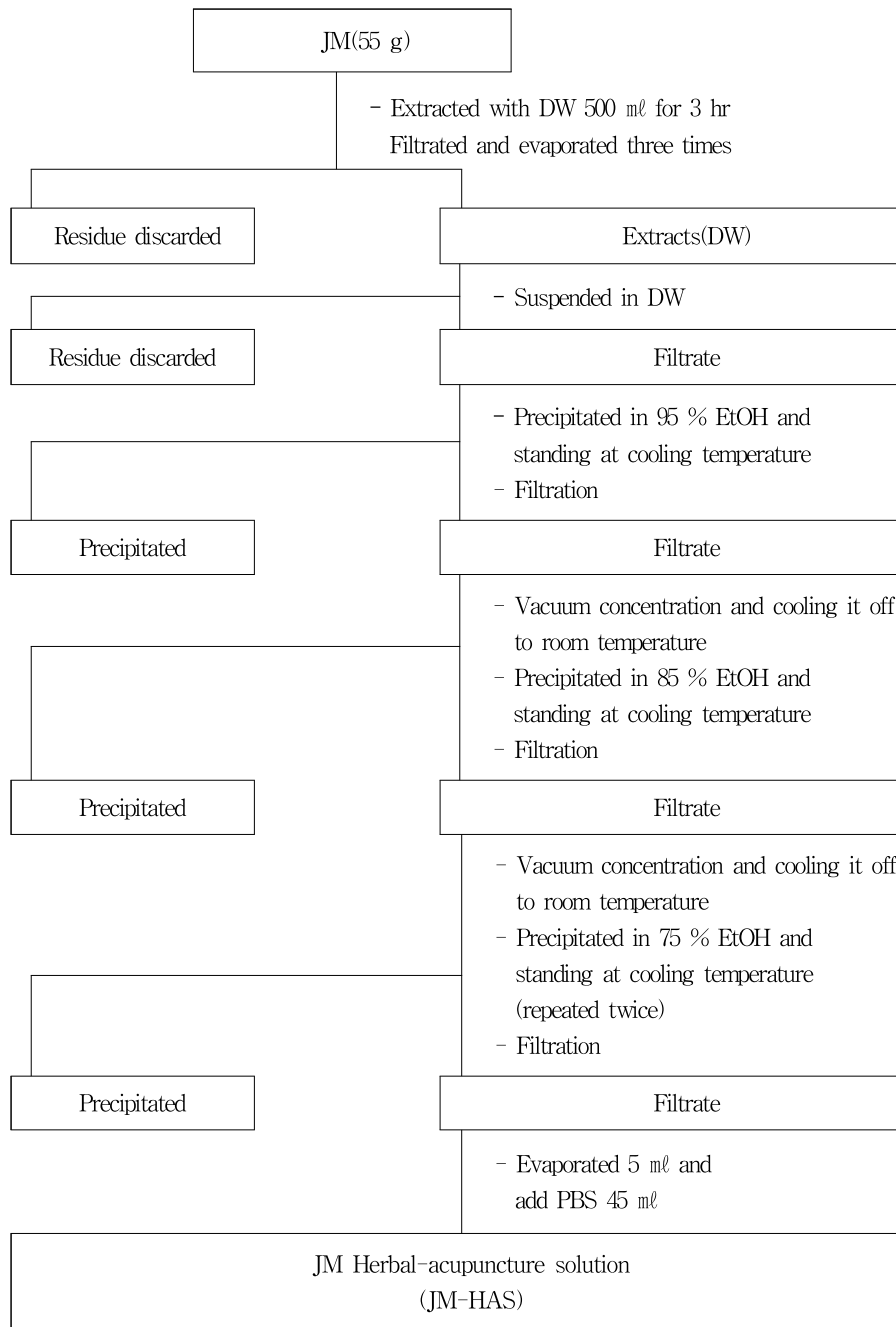
분리된 간 실질세포의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96 well plate에 세포를 1×10^5 cells/well으로 분주하고, FBS 10 %와 antibiotics를 첨가한 RPMI 1640 media에 등심초 전탕액을 농도별로 처리하고, 72시간 동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution(5 mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20 μ l씩 분주하고 5시간 동안 37 °C에서 incubation을 실시한다. 5시간 후, 각 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 570 nm에서 optical densities로 확인하였다.

3) 신장염 동물 모델

6주령 수컷 SD rat에 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 5 마리를 sacrifice하여 신장을 적출하였다. 각 실험군의 나머지 3마리로부터 LPS 투여 후 12시간 동안 소변 sample을 채취하였다(Scheme 2).

4) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), NP군(needle prick, NP), saline군(Saline), 등심초약침군(JM-HA)의 5군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, NP군, saline군, 등심초약침군은 각각 2 mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. NP군과 saline군, 등심초약침군은 LPS 투여 1 주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 NP(needle prick)자극, saline 주입, 등심



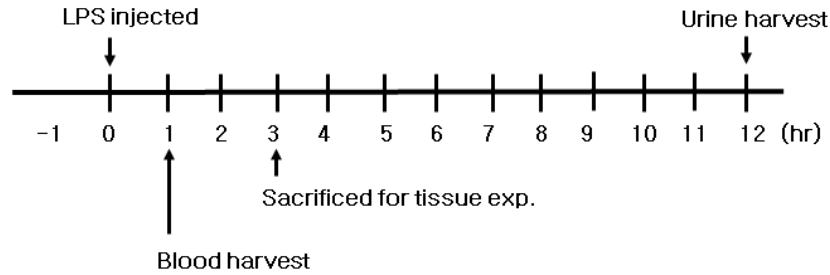
Scheme 1. Manufacturing procedure of *Junci Medulla* herbal acupuncture solution

초 약침시술을 주3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치하지 않은 정상 SD rat
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2 mg/kg으로 복강 투여한 군
- ③ NP군(NP) : 실험 전 1주일간 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 26 gauge 주사기를 0.5 cm 정도 깊

이로 자입한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군

- ④ Saline군(Saline) : 실험 전 1주일간 saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군
- ⑤ 등심초약침군(JM-HA) : 실험 전 1주일간 10%의 등심초약침액 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상



Scheme 2. Experimental procedure

응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군

5) 신장염 평가

(1) 혈액 분석

기존의 연구보고¹⁰⁻¹³⁾에 따르면 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 serum TNF- α 의 농도가 유의하게 증가한다고 하였다. 이에 본 실험에서도 LPS 처리 1시간 뒤, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 심장 채혈법으로 각 동물에서 4 ml의 혈액을 채취하였다. (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 WBC의 수와 WBC 중 Neutrophil의 비율을 측정하였으며, 혈청 BUN의 농도를 확인하였다. 혈청 TNF- α , creatinine의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변 분석

Metabolic cage에서 12시간동안 소변을 채취하여 요중 total protein과 creatinine 농도를 kit를 이용하여 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

기존의 연구보고¹⁰⁻¹³⁾에 따르면 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 renal TNF- α 의 농도가 유의하게 증가한다고 하였다. 이에 본 실험에서도 LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.05 % sodium azide가 첨가된 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣고 sonicate (Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80 °C에서 보관하였다가 ELISA kit을 이용하여 MPO의 농도를 측정하였다.

6) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 결과값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 통계프로그램은 SPSS(14.0 KO)를 이용하여 분석하였다. 등심초약침액의 세포독성 데이터는 ANOVA test를 이용하여 여러 농도간 결과값의 평균을 비교하였다(Fig. 1), 이후의 분석에서는 정상군과 LPS군의 평균을 *t*-test로 비교하고, 다시 LPS군, NP군, saline군, 등심초약침군의 평균값을 ANOVA test를 이용하여 비교하였으며, ANOVA test의 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다(Fig. 2~9). 신뢰도는 95 % 이상($p < 0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. 등심초약침액의 세포독성

등심초약침액을 1 %, 2.5 %, 5 %, 10 %로 희석하여 정상 흰쥐의 간세포에 대한 세포독성을 확인하였다. 등심초약침액의 농도가 높을수록 세포의 viability가 증가되는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 1).

2. 음곡에 시술한 등심초약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

1) 혈액학적 분석

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈액을 채취하여 WBC의 수와 WBC 중 호중구의 비율을 측정하였다.

(1) WBC

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰

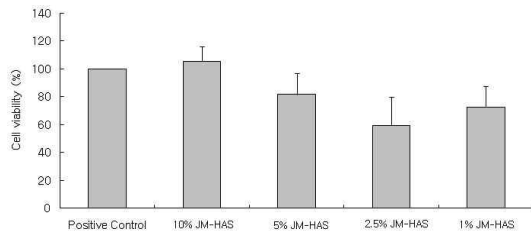


Fig. 1. Cytotoxicity of JM-HAS on rat liver cells

Liver cells from normal SD rat were cultured in RPMI 1640 with 10 % FBS medium for 72 h with or without various concentrations of JM-HAS(Junci Medulla 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 JM-HAS.

10 %, 5 %, 2.5 %, 1 % JM-HAS : culture medium with 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 % JM-HAS respectively.

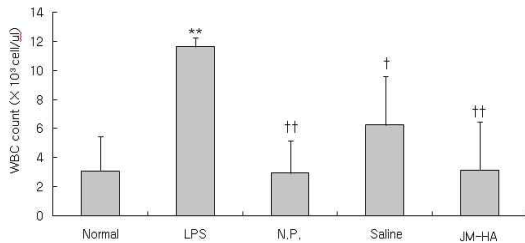


Fig. 2. Effect of JM-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats

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

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.

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

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

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

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

†† : $p < 0.01$.

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

쥐의 혈중 WBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. NP군과 saline군, 등심초약침군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

(2) 호중구(neutrophil)

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈액을 채취하여 WBC 중 neutrophil 비율을 측정하였다. LPS군과 saline군의 호중구 비율은 정상군

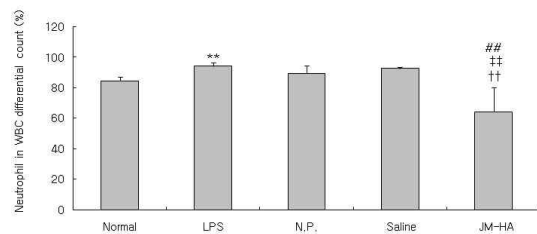


Fig. 3. Effect of JM-HA on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2 mg/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 \pm SD(n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.

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

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

JM-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and JM-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.

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

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

에 비하여 유의하게 증가하였다. 등심초약침군에서는 LPS군, NP군 및 saline군에 비하여 호중구 비율이 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

2) Blood chemistry

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 흰쥐의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 혈청 TNF- α , creatinine, BUN의 농도를 측정하였다.

(1) TNF- α

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 TNF- α 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 TNF- α 가 현저하게 증가하였다. Saline군 및 등심초약침군은 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

(2) Creatinine

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 creatinine 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 creatinine이 유의하게 증가하였다. 등심초약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

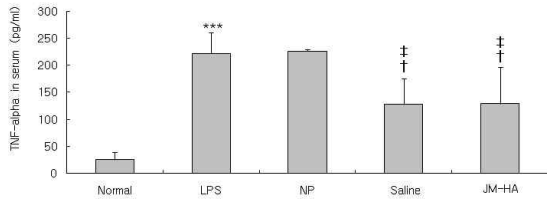


Fig. 4. Effects of JM-HA on serum TNF- α level in LPS-stimulated rats

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

Normal : normal SD rat

LPS : LPS(2 mg/kg) challenge

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

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

JM-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and JM-HA(10%, 200 μ l/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 N.P. group by ANOVA test

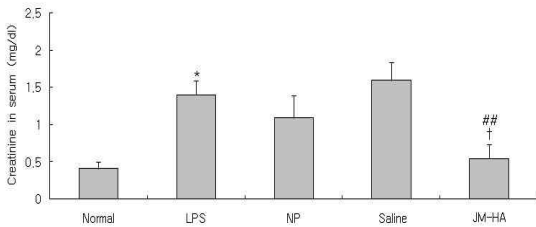


Fig. 5. Effects of JM-HA on serum creatinine level in LPS-stimulated rats

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

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.

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

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

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

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

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

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

(3) BUN(blood urea nitrogen)

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 흰쥐의 혈청 BUN 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 증가하였다. NP군, saline군, 등심초약침군 모두 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

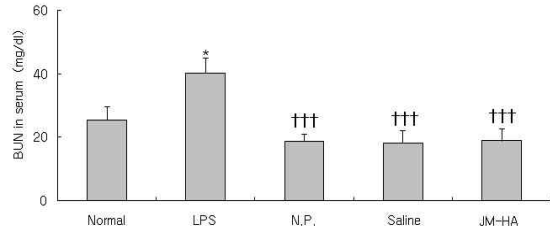


Fig. 6. Effects of JM-HA on serum BUN level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2 mg/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(2 mg/kg) challenge.

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

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

JM-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and JM-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.

3) 소변 분석

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요중 creatinine과 total protein의 양을 측정하였다.

(1) Creatinine

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요중 creatinine 양을 측정하였다. LPS

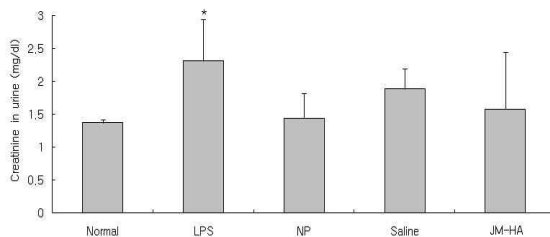


Fig. 7. Effects of JM-HA on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2 mg/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(2 mg/kg) challenge.

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

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

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

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

군의 creatinine 농도는 정상군에 비하여 요중 creatinine은 유의하게 증가하였다. 등심초약침군, NP군, saline 군에서 모두 LPS군에 비하여 요중 creatinine 농도가 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 7).

(2) Total protein

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소

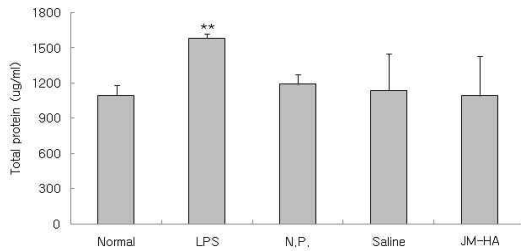


Fig. 8. Effects of JM-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2 mg/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 ± SD(n=3). Normal : normal SD rat.

LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.

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

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

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

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

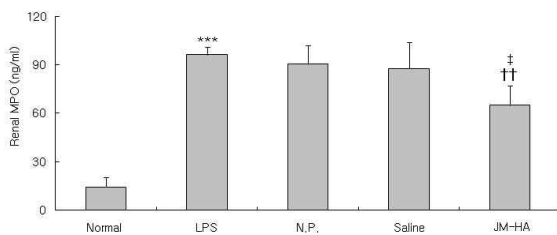


Fig. 9. Effects of JM-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS(2 mg/kg). 3 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(2 mg/kg) challenge.

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

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

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

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

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

‡ : p<0.05 compared to NP group by ANOVA test.

변을 채취하여 요중 total protein량을 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 요중 total protein이 유의하게 증가하였다. 등심초약침군의 요중 total protein은 LPS군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

4) 신장 내 MPO 활성

흰쥐에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 renal MPO 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal MPO가 현저하게 증가하였다. 등심초약침군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

IV. 고 찰

약침요법은 신침요법의 일종으로 혈위주사요법이라고도 하며, 경락학설과 약물이론에 근거하여 환자의 질병에 상응하는 경혈과 약물을 선택하고 약침액을 경혈 내에 자입하여 경혈과 약물이 질병에 대해 종합적인 작용을 발휘하여 질병을 치료하는 방법으로 약물의 흡수가 빠르고¹⁴⁾, 경구투여가 불가능한 경우에 처치할 수 있으며 환처에 처치할 수 있는 등의 장점이 있다¹⁵⁾.

燈心草(*Junci Medulla*, JM)는 골풀과(*Juncaceae*)에 속한 다년생 초본인 골풀의 莖髓를 8~9월에 채취하여 曬乾한 다음 莖髓를 取出한 것으로, 性은 微寒하고, 味는 甘淡하며, 歸經은 心·肺·小腸經이며, 清心火 利小便하는 효능이 있으며¹⁾, 음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴로서 祛濕通洩, 滋腎清熱, 疏泄厥氣, 利導下焦의 효능이 있어 尿道炎, 陰道炎, 小便難 등의 증상을 主治한다²⁾.

이에 저자는 음곡에 시술한 등심초약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 음곡에 등심초약침을 1주간 시술한 흰쥐에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유발시키고, 혈액 및 혈청 분석, 소변분석, 신장 내 MPO활성 관찰을 시행하였다.

먼저 시술에 사용할 등심초약침액의 농도를 결정하기 위해 등심초약침액의 간세포 독성을 파악하고자 정상 흰쥐의 간세포에 등심초약침액을 여러 가지 농도로 처리하여 간세포의 viability를 관찰하였다. 농도 2.5 %에서 가장 낮은 세포생존율을 보였으며 10 %에서 가장 높은 세포생존율을 보였다(Fig. 1). 이에 10 %

등심초약침액을 이용하여 약침시술을 시행하였다.

서론에서 기술한 바와 같이, LPS를 복강투여하면 체순환계의 WBC, 호중구, TNF- α 등이 증가하고, 이들에 의해 분비되는 면역물질들은 신장으로 흘러 들어가 사구체기저막에 침착되어 사구체신염을 유발하게 된다. LPS 투여 후 혈액 내에 염증물질의 활성이 극대화 되는 시간과 신장염이 극대화 되는 시간은 시간차가 존재하는데, 기존의 연구에¹⁰⁻¹³⁾ 의하면 LPS의 복강투여 1시간 후에 혈청에서의 TNF- α 가 유의하게 증가하고, 3시간 후에는 신장에서의 TNF- α 가 유의하게 증가하였다. 이는 LPS 투여 직후 1시간 동안 체순환계로 염증반응이 활발히 일어나고, 이때 발생한 독성물질들이 이후 3시간 동안 신장에서 걸리지며 신장염을 유발하는 과정을 잘 보여준다. 이상을 근거로, 가장 활발한 염증반응이 일어나는 시간을 고려하여, 혈액의 채취는 LPS 투여 1시간 후에 하였고, 신장의 적출은 LPS 투여 3시간 이후에 시행하였다.

LPS 복강투여 1시간 후 채취한 혈액에서 NP군, saline군, 등심초약침군 모두 LPS군에 비해 WBC의 유의미하게 억제되었고(Fig. 2), WBC 중의 호중구 비율은 등심초약침군에서만 LPS군에 비해 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3).

이는 LPS투여 전 1주간 3회의 음곡에 자침하는 것만으로도 LPS 투여 직후의 혈액 내 WBC의 급격한 증가를 억제하는 데 효과가 있었음을 시사하며, 특히 음곡 등심초약침을 시행한 경우엔 급성 염증의 주요한 물질인 호중구의 증가를 더욱 억제할 수 있었음을 뜻한다.

체순환계의 염증이 어느 정도 진행되는지는 TNF- α 로써 추정할 수 있다. 염증이 진행되는 동안에는 cytokine을 포함한 다양한 체액성 면역물질들이 체순환계로 분비된다⁷⁾. LPS를 복강투여한 직후에 분비되는 여러 가지 cytokine 중에서 TNF- α 는 패혈증의 초기 단계에 중요한 매개역할을 한다는 것이 밝혀졌다^{16,17)}. 또 다른 연구에서는 LPS가 호중구로 하여금 신장을 포함한 다양한 조직을 손상시킨다고 하였다¹⁸⁾. TNF- α 는 혈중 단핵구 등의 세포에서 IL-8 유전자를 발현시키고¹⁹⁾, IL-8의 분비를 촉진하며²⁰⁾, 호중구의 활성화를 통해 세포조직을 손상시킨다²¹⁾.

본 실험에서 LPS 복강투여 1시간 후에 채취한 혈청에서의 TNF- α 는 saline군과 등심초약침군에서 LPS군에 비하여 유의미하게 감소하였다(Fig. 4). Saline군에서도 혈청 TNF- α 의 증가억제가 나타난 것은 음곡에 needle prick보다 강한 자극으로 시술하는 것이 초

기염증반응의 억제에 도움을 주었다고 추정할 수 있으며, 이는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

이상에서 살펴본 혈청 WBC, 호중구비율, 혈청 TNF- α 의 결과로 볼 때, 음곡에 시술한 등심초약침은 LPS로 유도되는 체순환계의 염증단계에서부터 염증 활성을 억제하는 기능이 있다고 할 수 있다.

혈중요소(blood urea nitrogen, BUN)는 혈중에 존재하는 요소 내 질소를 표현하는 것으로, 신장질환과 관계가 깊은 질소대사 산물이다. 암모니아, 요산과 더불어 요소는 질소대사의 세 가지 주요 최종 대사산물로 간의 요소회로에서 생성된다. 간에서 생성된 요소는 신사구체에서 여과된 후 세뇨관에서 일부는 재흡수 되고 나머지는 소변으로 배설된다. 신기능이 저하되어 사구체여과율이 감소하면 혈중 BUN 농도가 상승하므로 신기능을 평가할 수 있다²²⁾.

Creatinine은 creatinine phosphate에서 생성된 creatinine이 탈수되어 생긴 대사의 최종산물로, creatinine량은 인체 근육량에 비례하여 일정량이 생성되어 오로지 신장을 통해서만 체외로 배설되고, 체내에서 재순환을 하지 않아 혈중 creatinine 농도는 사구체의 여과에 따라 변하게 된다. 따라서 혈청 creatinine 수치 역시 신기능의 지표가 되며, 특히 creatinine은 BUN이 증가하는 탈수, 장폐쇄, 임신중독, 통풍, 요로폐쇄 등의 경우에도 좀처럼 상승치 않으며, 이것의 상승은 심각한 신장기능의 장애를 뜻한다²²⁾.

본 실험에서 LPS 복강투여 1시간 후 혈청 내 BUN과 creatinine은 LPS군에서 유의미하게 상승하였고, 신장염이 유발되어 사구체 여과기능이 저하되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5, 6). BUN의 경우에는 NP군, saline군, 등심초약침군 모두 LPS군에 비하여 유의미한 BUN 증가의 억제가 관찰되었고(Fig. 6), 이는 음곡 자침만으로도 신장기능의 저하를 억제하는 데 의미가 있었다고 사료된다. 혈청 creatinine의 경우 등심초약침군만이 LPS에 비하여 유의미한 증가의 억제가 관찰되었고(Fig. 5), 혈청 creatinine의 상승이 BUN의 상승보다 더욱 심각한 신장기능의 장애를 뜻한다는 점에서 음곡 자침이 신장염을 억제하지만, 음곡 등심초약침이 더욱 강력하게 신장염을 억제한다고 결론내릴 수 있다.

소변 분석에서 요중 creatinine은 NP군, saline군, 등심초약침군에서 모두 LPS군에 비하여 유의미한 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 7). 하지만 요중 creatinine은 혈청 creatinine과 연관지어 생각할 때 의미가 크다. Creatinine 청소율(creatinine clearance, Ccr)은 혈

중 내 creatinine 농도에 대한 소변 내 creatinine 농도의 비율로서, creatinine은 근육에서 생성되는 내인성 물질로 일정한 속도로 체액으로 유출되기 때문에 이 물질의 청소율은 glomerular filtration rate(GFR)을 대변할 수 있다²²⁾. 따라서 신장기능의 손상은 GFR의 감소, 곧 Ccr의 감소를 가져오게 된다. 본 실험에서 측정된 혈청과 소변 중의 creatinine 값으로 비율을 산출해 본 결과, Normal군의 혈청 creatinine 농도가 0.412±0.091, 요중 creatinine 농도가 1.373±0.044로 Ccr=3.3 k(k는 상수)이며, LPS군의 혈청 creatinine 농도가 1.408±0.190, 요중 creatinine 농도가 2.307±0.637로 Ccr=1.6 k로 나타나 normal군에 비하여 LPS군에서 Ccr이 크게 감소하여 신장기능의 큰 손상을 나타냈으며, 등심초약침군에서는 혈청 creatinine 농도가 0.543±0.196, 요중 creatinine 농도가 1.580±0.864로 Ccr=2.9k로 나타나 LPS군에 비하여 Ccr이 증가하였다. 이는 등심초약침이 LPS로 유도되는 급성 신장염에 있어서 신장기능의 저하를 상당히 억제함을 보여 준다.

한편 소변 분석에서 요중 total protein이 LPS군에서 유의한 증가를 보여 신장기능의 손상을 나타내었으나, NP군, saline군, 등심초약침군 모두 유의한 증가 억제를 나타내진 못하였는데(Fig. 8), 이는 음곡약침에도 불구하고 LPS로 인한 신장기능 손상의 진행이 불가피하였음을 의미한다.

MPO assay는 조직 내의 neutrophil의 수를 세는데 널리 쓰이는 방법으로, MPO는 주로 neutrophil에서 분비되는 효소이므로, MPO의 수준은 염증의 지표로 사용할 수 있다²³⁾. 본 실험에서는 신장 실질 내 염증 활성도를 측정하기 위해 MPO의 농도를 측정된 결과 LPS군에 비해 유의하게 감소한 결과를 얻었다(Fig. 9). MPO 활성으로 볼 때 음곡 등심초약침이 신장 실질 내 염증을 억제하는데 유효한 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과를 요약하면, 음곡 등심초약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 대하여 혈액 내 WBC의 증가를 억제하며, WBC 중 호중구의 비율도 억제하였고, 혈청 내 TNF- α 의 증가도 유의하게 억제하였다. 이는 LPS의 복강투여로 유발된 초기의 패혈증 단계에서 음곡등심초약침이 초기염증을 억제하는 효과가 있었음을 의미한다.

혈청 BUN 및 creatinine, 소변의 creatinine, total protein을 통해 신장기능을 분석하여보니 음곡등심초약침은 신장기능의 손상을 유의미하게 억제하였다.

또 신장실질의 MPO 분석을 통해 음곡등심초약침이 신장에서의 염증을 유의하게 억제함을 알 수 있었다.

이상을 토대로 음곡에 대한 등심초약침은 신장염의 억제 및 치료에 효과가 있을 것으로 생각되는데 향후 이에 대한 지속적 연구와 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

음곡(KI₁₀)에 시술한 등심초 약침이 LPS로 유도된 신장염 모델 흰쥐에 미치는 영향을 알아보고자 등심초약침을 음곡에 시술한 후 LPS를 투여하여 신장염을 유발시키고 혈액분석, 소변분석, 신장 내 MPO(myeloperoxidase) 활성평가를 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈중 WBC, 호중구 비율은 등심초약침군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다.
2. 혈청 BUN, creatinine, TNF- α 는 등심초약침군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다.
3. 신장 내 MPO는 등심초약침군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다.

VI. 참고문헌

1. Committee of Korean Textbook Publisher. Herbology. Seoul : Yeong Lim Sa. 2005 : 370.
2. Committee of Korean Acupuncture & Moxibustion Textbook Publisher. Acupuncture & Moxibustion (Sang). Paju : Jipmundang. 2008 : 176.
3. Du Ho Kyoung. Oriental Kidney System Internal Medicine. Seoul : Sung Bo Sa. 2006 : 456.
4. Russel L. Cecil, J. Claude Bennett, Fred Plum. Cecil textbook of medicine. 20th. Philadelphia : Saunders. 1996 : 552, 575-7.
5. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. N Engl J Med. 1988 ; 318(23) : 1481-6.

6. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* 1993 ; 328(20) : 1471-7.
7. De Vriese AS. Prevention and treatment of acute renal failure in sepsis. *J Am Soc Nephrol.* 2003 ; 14(3) : 792-805.
8. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002 ; 420(6917) : 885-91.
9. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 2006 ; 368(9530) : 157-69.
10. Yoon Kwang-shik, Kang Jae-hui and Lee Hyun. Anti-inflammatory Effect on *Desmodii* Herba Pharmacopuncture at KI₁₀ on Nephritis in Rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 2011 ; 28(3) : 43-54.
11. Lee Jeonghwan, Kim Jeongho, Kim Youngil. Anti-inflammatory Effect of *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture at KI₁₀ on nephritis in rats. *Journal of Pharmacopuncture.* 2010 ; 13(2) : 51-65.
12. Byong-mun Park, Hur Boo, Yun-Kyoung Yim. Anti-inflammatory Effect of *Plantaginis Semen* Herbal-acupuncture at KI₁₀ on LPS-induced nephritis in rats. *Journal of Meridian & Acupoint.* 2009 ; 26(2) : 127-43.
13. Kyung-Min Kim, Hyun Lee, Hee-Jung Kang, Yong-Heum Lee, Yun-Kyoung Yim. Anti-inflammatory Effect of *Dianthi Semen* Herbal-acupuncture at KI₁₀ on nephritis in rats. *Journal of Meridian & Acupoint.* 2009 ; 26(1) : 61-77.
14. Korean Pharmacopuncture Institute. *Pharmacopuncture Medicine and Clinical Use.* Seoul : Korean Pharmacopuncture Institute. 1997 : 1-5.
15. Choi Min-seop, Ko Hyung-kyun, Kim Chang-hwan. A Study on Water Acupuncture. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 1990 ; 7(1) : 315-29.
16. Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol.* 1985 ; 135(6) : 3972-7.
17. van Deventer SJ, Büller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood.* 1990 ; 76(12) : 2520-6.
18. Linas SL, Whittenburg D, Repine JE. Role of neutrophil derived oxidants and elastase in lipopolysaccharide-mediated renal injury. *Kidney Int.* 1991 ; 39(4) : 618-23.
19. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1988 ; 167(6) : 1883-93.
20. Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science.* 1989 ; 243(4897) : 1467-9.
21. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature.* 1993 ; 365(6447) : 654-7.
22. Lee Sam Youl, Jeoung Yun Seop, Kwon O Hun, Song Kyoung Soon. *Clinical Laboratory Medicine* 7th ed. Seoul : Yonsei University Press. 2000 : 238, 240.
23. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984 ; 87(6) : 1344-50.