

# 음곡(KI10) 편측 약침의 LPS 유도 급성신장염 억제 효과

임 윤 경

대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실

## Anti-Inflammatory Effect of *Polygoni Avicularis Herba* Herbal-Acupuncture at KI10 on LPS-Induced Nephritis in Rats

Yun-Kyoung Yim

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

### Abstract

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

**Methods** : Rats were allocated into normal, control, and 3 experimental groups. The rats in the control group were intra-peritoneally injected with LPS for nephritis induction. The rats in the groups of experiment 1, experiment 2, and experiment 3 were treated with single needle prick, saline injection, and PaH-HA, respectively at KI10 three times for a week and then injected with LPS. To evaluate the effects of PaH-HA at KI10, WBC count in blood, serum CINC-1, renal TNF- $\alpha$  and renal MPO were measured.

**Results** : Needle prick at KI10 suppressed the increase of WBC in blood and CINC-1 in serum of LPS-stimulated rats. Saline injection at KI10 suppressed the increase of WBC in blood. PaH-HA at KI10 suppressed the increase of WBC in blood, CINC-1 in serum, and MPO in kidney of LPS-stimulated rats.

**Conclusions** : PaH-HA at KI10 has an anti-inflammatory effect on LPS-induced nephritis in rats and there may be a synergism between KI10(Umgok) stimulation and PaH-HA Solution.

**Key words** : herbal-acupuncture, KI10, *Polygoni avicularis Herba*, LPS-induced nephritis

## I. 서 론

신장은 혈액을 공급받아 이를 여과하므로, 혈액 속에 포함된 독성 물질이나 약물에 손상받기 쉽다. 급성신장염은 신원의 급성 염증으로, 비교적 갑자기 발생하는 혈뇨와 함께 흔히 단백뇨, 사구체여과율 감소, 고혈압, 부종 등이 동반되며 폐뇨가 발생

되기도 한다<sup>1)</sup>.

신장염은 한의학적으로 淋症, 尿濁, 尿不利, 尿閉 등, 腎·膀胱의 병증에 속하는 것으로 볼 수 있으며, 대개 清熱利濕, 通利小便의 治法을 사용한다<sup>1)</sup>.

최근 신장염에 대해 항생제 투여 등 서의학적 처치나 침구 및 한약 복용 등의 전통적 치료법 외에, 소량의 정제된 한약제제를 관련된 경혈에 주입함으로써 신장의 여과기능에 대한 부담을 적게 하면서 약물적 치료와 경혈자극의 효과를 결합한 약침요법을 이용한 연구들이 보고되고 있다<sup>2-7)</sup>.

이에 저자는 味苦, 性平, 入膀胱經하며, 清熱利水通淋의 효능이 있는 篇蓄<sup>8)</sup>을 이용한 약침요법을 급성 신장염에 응용할 수 있을 것으로 사료되었다.

· Corresponding author: Yun-Kyoung Yim, Department of Meridian and Acupoint, College of Oriental Medicine, Daejeon University, 96-3, Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon 300-716, Korea  
Tel: +82-42-280-2610, Fax: +82-42-280-2641  
E-mail: docwindy@du.kr

· Received November 20, 2012, Revised December 5, 2012, Accepted December 10, 2012

신장독성으로 인한 사구체신염, 급성신부전, 간질성신염, 신독성신염 등의 병태모델을 위한 실험적인 방법으로 LPS가 다용되는데<sup>2)</sup>, LPS는 그람 음성박테리아 세포막을 구성하는 지질다당체의 일종으로, 급격한 염증반응을 유발하고 조직을 손상한다. 특히 신장에 있어서는 사구체의 mesangium cell을 자극하여 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발하고 mesangium cell과 tubular epithelial cell에 Fas 발현을 증가시킴으로써 신장손상을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

이에, 본 연구에서는 rat를 이용하여 足少陰腎經의 合水穴인 陰谷 상응 부위에 蕪蓄약침을 1주일간 시술하고 LPS로 급성신장염을 유발한 후 음곡 편측약침이 rat의 급성신장염에 미친 영향을 이학적 분석을 통해 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

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 공급하고, 실험실은 실온(22±2°C)과 습도 40~60%를 유지하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 편측(*Polygoni avicularis Herba*: 이하 PaH)은 대전대학교 한방병원 약제실의 검수를 받아 구입하여 실온에 보관되었으며 초음파 세척 후 실험에 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 편측 55 g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500 ml를 가하여 3시간 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 감압농축하면 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. 편측 55 g으로부터 얻은 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 날렸을 때 건조분말은 0.765 g이었다(수율 1.39%). 1 N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 2.5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다.

#### 2) 신장염 동물 모델

6주령 수컷 SD rat에 LPS(2 mg/kg)를 복강에 투여하여 신장염을 유도하였다.

#### 3) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), 대조군(control), 실험군 1(experiment 1), 실험군 2(experiment 2), 실험군 3(experiment 3)의 5군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 모든 군은 각각 2 mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. 실험군 1, 실험군 2, 그리고 실험군 3은 LPS 투여 전 1주일 간 음곡(KI10) 상응 부위에 좌우 교대로 NP(needle prick)자극, saline 주입, 편측 약침(*Polygoni avicularis Herba*-Herbal Acupuncture: PaH-HA)을 3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

##### (1) 정상군(Normal)

아무 처치하지 않은 정상 SD rat.

##### (2) 대조군(Control)

실험당일 LPS를 2 mg/kg으로 복강 투여한 군.

**(3) 실험군 1(Experiment 1)**

실험 전 1 주일간 주 3회 음곡(KI10) 상응 부위에 26 gauge 주사기를 0.5 cm 정도 깊이로 자입한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군.

**(4) 실험군 2(Experiment 2)**

실험 전 1 주일간 saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응 부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군.

**(5) 실험군 3(Experiment 3)**

실험 전 1주일간 2.5%의 편축 약침액(Polygoni avicularis Herba-Herbal Acupuncture Solution: PaH-HAS) 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응 부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군.

**4) 신장염 평가**

**(1) 혈액 분석**

LPS 처리 1시간 후 각 동물에서 4 ml의 혈액을 채취하여 혈중 WBC 수와 혈청 CINC-1 농도를 확인하였다.

**(2) 신장 내 염증활성 평가**

LPS 처리 3시간 후 ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 대동맥 혈관에 HBSS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.05% sodium azide가 첨가된 0.1 M phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2000×g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 ELISA kit을 이용하여 TNF-alpha와 MPO의 농도를 측정하였다.

**5) 통계분석**

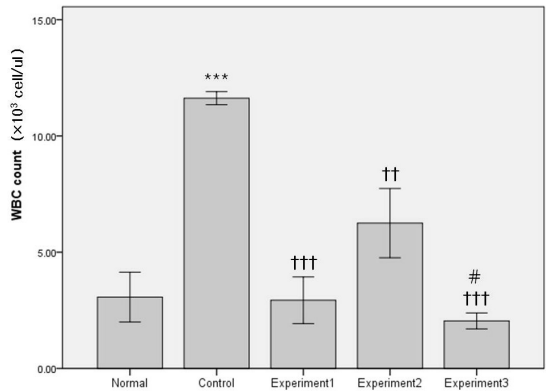
실험 결과는 각 실험군에서 얻은 결과값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS(18.0 KO)을 이용하였다. 정규성 확인 후, one way ANOVA test를 이용하여 각 군의 평균값을 비교하

였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 신뢰도는 95% 이상(p<0.05)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

**III. 결 과**

**1. WBC count in blood**

대조군의 혈중 WBC 수는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 실험군1, 실험군2, 실험군3 모두 혈중 WBC 수가 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 실험군 3의 혈중 WBC 수는 실험군2에 비하여 유의하게 낮았다(Fig. 1).



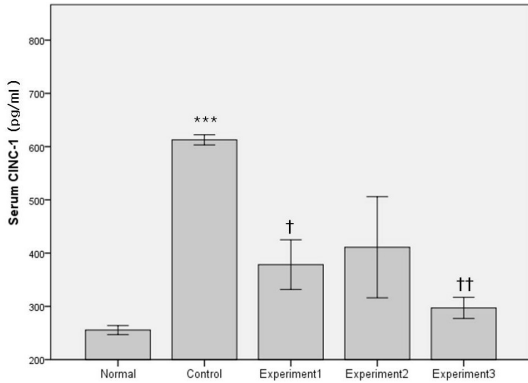
**Fig. 1. Effect of PaH-HA at KI10 on WBC count in blood of LPS-stimulated rats.**

Data were expressed as mean±SD(n=5). Control : LPS (2 mg/kg) challenge, Experiment1 : LPS(2 mg/kg) challenge and Needle Prick at KI10, Experiment2 : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at KI10, Experiment3 : LPS(2 mg/kg) challenge and herbal acupuncture with PaH-HAS(2.5%, 200 μl/rat) at KI10. \*\*\*p<0.001, to normal group by ANOVA test, †††p<0.001, ††p<0.01 to control group by ANOVA test, #p<0.05 to experiment 2 group by ANOVA test.

**2. Serum CINC-1(Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)**

대조군의 serum CINC-1은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였고, 실험군1과 실험군3에서는 대조

군에 비하여 serum CINC-1 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 2).



**Fig. 2. Effect of PaH-HA at KI10 on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats.**

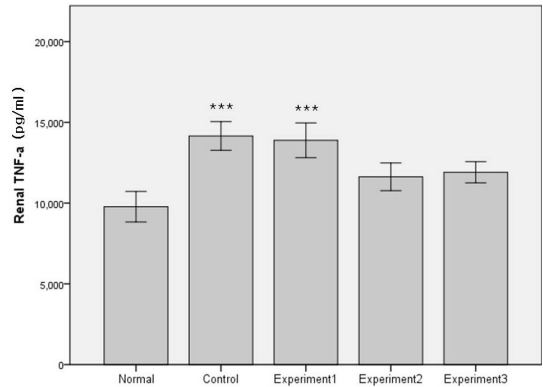
Data were expressed as mean±SD(n=5). Control : LPS (2 mg/kg) challenge, Experiment1 : LPS(2 mg/kg) challenge and Needle Prick at KI10, Experiment2 : LPS (2 mg/kg) challenge and saline(200 µl/rat) injection at KI10, Experiment3 : LPS(2 mg/kg) challenge and herbal acupuncture with PaH-HAS(2.5%, 200 µl/rat) at KI10. \*\*\* $p < 0.001$  to normal group by ANOVA test, †† $p < 0.01$ , † $p < 0.05$  to control group by ANOVA test.

### 3. Renal TNF- $\alpha$

대조군의 renal TNF-alpha가 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 실험군 2와 실험군 3의 renal TNF-alpha는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

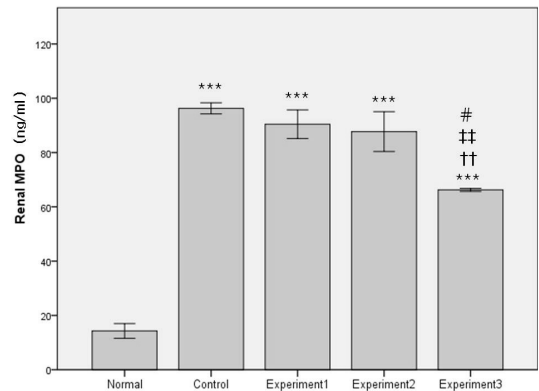
### 4. Renal MPO(myeloperoxidase)

대조군의 renal MPO가 정상군에 비하여 현저하게 증가하였다. 실험군 3의 renal MPO는 대조군, 실험군 1 및 실험군 2에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 4).



**Fig. 3. Effect of PaH-HA at KI10 on renal TNF-alpha level in LPS-stimulated rats.**

Data were expressed as mean±SD(n=5). Control : LPS(2 mg/kg) challenge, Experiment1 : LPS(2 mg/kg) challenge and Needle Prick at KI10, Experiment2 : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 µl/rat) injection at KI10, Experiment3 : LPS(2 mg/kg) challenge and herbal acupuncture with PaH-HAS(2.5%, 200 µl/rat) at KI10. \*\*\* $p < 0.05$  to normal group by ANOVA test.



**Fig. 4. Effect of PaH-HA at KI10 on renal MPO level in LPS-stimulated rats.**

Data were expressed as mean±SD(n=5). Control : LPS(2 mg/kg) challenge. Experiment1 : LPS(2 mg/kg) challenge and Needle Prick at KI10, Experiment2 : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 µl/rat) injection at KI10. Experiment3 : LPS(2 mg/kg) challenge and herbal acupuncture with PaH-HAS(2.5%, 200 µl/rat) at KI10. \*\*\* $p < 0.001$  to normal group by ANOVA test, †† $p < 0.01$  to control group by ANOVA test, † $p < 0.05$  to experiment1 group by ANOVA test, # $p < 0.05$  to experiment2 group by ANOVA test.

## IV. 고 찰

篇蓄은 마디풀과에 속한 1년생 草本인 마디풀의 全草이다. 平無毒, 味苦, 入脾胃肺膀胱經하며 洩熱下行하여 清利濕熱의 要藥이 된다<sup>8)</sup>.

陰谷은 무릎 뒤안쪽면, 반힘줄근 힘줄(semi-tendinosus tendon)의 바로 가쪽, 오금주름(popliteal crease) 위에 위치하며, 足少陰腎經의 合水穴로 補腎培元利水의 효능이 있어 溺難, 小便急引, 陰痛, 小便黃 등의 치료에 사용한다<sup>10)</sup>.

본 연구에서는 篇蓄 약침액을 제조하여 정상 rat의 陰谷 상응 부위에 1주일간 3회 약침시술하고 LPS를 복강 투여한 후 rat의 혈액과 신장에서 염증활성을 관찰하였다.

LPS 투여 1시간 후 rat의 혈중 WBC와 serum CINC-1(cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)이 현저하게 증가하였다(Fig. 1, 2). 백혈구는 염증이 발생하면 혈관의 내피 사이를 빠져나가 화학주성에 의해 항원으로 이동하여 염증반응을 유발하므로, 염증을 감별하는 주요한 혈액검사 지표의 하나이다<sup>11)</sup>. 염증초기의 반응은 주로 neutrophil이 담당하는데<sup>12)</sup>, CINC-1은 IL-8계통으로 내피세포에서 분비되어 neutrophil을 유도하고 활성화한다<sup>13,14)</sup>. 본 실험에서 신장염 병태모델 흰쥐의 음곡에 single needle prick 자극이나 편축약침을 시술한 경우 대조군에 비하여 혈중 WBC와 serum CINC-1가 유의하게 감소하였다. 특히 편축약침은 식염수주입에 비하여 혈중 WBC수를 유의하게 감소시켰다(Fig. 1, 2). 이는 LPS투여에 의해 급격하게 일어나는 염증반응을 음곡 침자극 또는 음곡 편축약침시술이 유의하게 억제하였음을 보여주며, 여기에는 음곡의 경혈 효능이 작용하였을 것으로 추정된다. 또한, 편축약침액은 식염수에 비하여 염증 억제 효과가 유의하게 높았음을 확인할 수 있다.

LPS 투여 3시간 후 실험동물의 신장조직에서 TNF- $\alpha$ 와 MPO(myeloperoxidase)가 정상군에 비하여 유의하게 증가하여, 독성물질에 의한 급성신장염의 유발을 확인하였다(Fig. 3, 4). TNF- $\alpha$ 는 강력한 proinflammatory cytokine으로 염증반응에 의해 활성화된 림프구에 의해 생산된다<sup>15-17)</sup>. MPO

는 neutrophil에서 주로 방출되는 효소로, 사구체신염 등에서 고빈도로 나타나, 조직내의 neutrophil 수를 측정하기 위한 지표로 널리 사용된다<sup>18)</sup>. 본 실험에서 실험동물의 음곡에 saline이나 편축약침액을 주입한 경우 renal TNF- $\alpha$ 는 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 유의성은 없었고(Fig. 3), renal MPO는 음곡편축약침군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 4). 따라서 음곡편축약침은 LPS로 유도된 rat의 신장염을 유효하게 억제하는 것으로 보이며, 여기에는 편축의 약리적 효능이 작용하였을 것으로 추정된다.

이상에서 LPS로 유도된 급성 신장염 병태모델을 이용하여 음곡 편축 약침의 신장염 억제 효과를 실험적으로 확인하였다. 향후 임상적 활용을 위한 좀 더 심도깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

흰쥐의 음곡 상응부위에 편축 약침을 시술하고 LPS로 급성신장염을 유발한 후 혈액과 신장에서 염증활성을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음곡 needle prick 자극은 급성 신장염 병태모델 흰쥐의 혈중 WBC 수와 serum CINC-1 증가를 유의하게 억제하였다.
2. 음곡 saline 주입은 급성 신장염 병태모델 흰쥐의 혈중 WBC 수 증가를 유의하게 억제하였다.
3. 음곡 편축 약침은 급성 신장염 병태모델 흰쥐의 혈중 WBC 수, serum CINC-1, 그리고 renal MPO 증가를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과, 음곡 편축 약침은 실험적으로 유도된 흰쥐의 신장염 억제에 유효한 것으로 사료되며, 여기에는 음곡 경혈 자극과 편축약침액의 상승작용이 있었을 것으로 추정된다.

## 참고문헌

1. Du HK. Oriental kidney system internal medicine. Seoul : Sung Bo Sa. 2003 : 141-5.

- 226, 256-7, 360-7, 454-9.
2. Park BM, Hur B, Yim YK. 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.
  3. Kim KM, Lee H, Kang HJ, Lee YH, Yim YK. Anti-inflammatory effect of *dianthi semen* herbal-acupuncture at KI10 on nephritis in rats. *Journal of Meridian & Acupoint*. 2009 ; 26(1) : 61-77.
  4. Lee JH, Kim JH, Kim YI. Anti-inflammatory effect of *Benincasae Semen* herbal-acupuncture at KI10 on nephritis in rats. *Journal of Pharmacopuncture*. 2010 ; 13(2) : 51-65.
  5. Yoon KS, Kang JH, Lee H. 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.
  6. Her MS, Kim JH, Kim YI. Herbal-acupuncture at KI10 on LPS-induced nephritis in rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2011 ; 28(6) : 69-83.
  7. Cho E, Kang JH, Lee H. Anti-inflammatory effect of *Akebiae Lignum* pharmacopuncture at KI10 on LPS-induced acute nephritis in rats. *Journal of Pharmacopuncture*. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2012 ; 29(3) : 41-53.
  8. Lee SI. *Herbology*. Seoul : Eui yak sa. 1975 : 262.
  9. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet*. 1991 ; 338(8769) : 732-6.
  10. *Meridians & Acupoints Compilation Committee of Korean Oriental Medical Colleges*. *Details of Meridians & Acupoints : A Guidebook for College Students*. Daejeon : Jongryeonamu Publishing Co. 2012 : 634.
  11. Guyton C, John E Hall. *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed. Seoul : Jungdam. 2002 : 446-9.
  12. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 1994 ; 56(5) : 559-64.
  13. Jung JH, Ha JY, Min KR, Shibata F, Nakagawa H, Kang SS, et al. Reynosin from *Sassurea lappa* as inhibitor on CINC-1 induction in LPS-stimulated NRK-52E cells. *Planta Med*. 1998 ; 64(5) : 454-5.
  14. Shibata F. The role of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) in inflammation. *Yakugaku Zasshi*. 2002 ; 122(4) : 263-8.
  15. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*. 1991 ; 285(2) : 199-212.
  16. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1991 : 411-52.
  17. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 1991 ; 266(12) : 7313-6.
  18. 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.