

원저

음곡에 시술한 목통약침이 흰쥐의 급성 신장염에 미치는 영향

조은 · 강재희 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구의학교실

Abstract

Anti-inflammatory Effect of *Akebiae Lignum* Parmacupuncture at KI₁₀ on LPS-induced Acute Nephritis in Rats

Cho Eun, Kang Jae-hui and Lee Hyun

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

Objectives : This study was designed to evaluate the effects of *Akebiae Lignum* herbal acupuncture(AL-HA) at KI₁₀ in acute nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rat.

Methods : Rats were divided into 5 groups and 4 groups were injected LPS to induce acute nephritis. Normal group was normal SD rat, LPS group was injected LPS, AL-HA group was treated with AL-HA at KI₁₀ three times for a week, needle prick(NP) group with 26 gauge needle and saline group with normal saline. To evaluate the effects of AL-HA at KI₁₀ on acute nephritis in rats, WBC, neutrophil in blood, BUN, TNF- α , CINC-1 in serum and urinary volume, total protein in urine, renal MPO were measured and renal tissue was analyzed.

Results : AL-HA group significantly reduced WBC, neutrophil in blood, BUN in serum, total protein in urine and renal MPO. And AL-HA group reduced concentration of neutrophil on glomerulus than LPS group in histological analysis.

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

Key words : acute nephritis, parmacupuncture, KI₁₀, *Akebiae Lignum*, LPS

- 접수 : 2012. 5. 8. · 수정 : 2012. 6. 4. · 채택 : 2012. 6. 5.
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 서북구 두정동 621 대전대학교 부속천안한방병원 침구의학과
Tel. 041-521-7578 E-mail : lh2000@hanmir.com

I. 서론

혈뇨, 단백뇨, 단백뇨 등의 증상을 일으키는 급성 신장염은 neutrophil이 모여들어 염증반응을 일으켜 모세혈관 내강의 폐색을 일으킨다. 이로 인해 신사구체 여과율(glomerular filtration rate, GFR) 저하, 혈청 creatinine이나 BUN의 상승, 소변 감소증, 무뇨가 일어나며 체내 순환혈액량의 증가로 인하여 고혈압, 부종 전신 증상이 동반된다¹⁾.

목통(*Akebiae Lignum*, 이하 AL)은 으름덩굴과에 속한 낙엽성 관목인 으름덩굴 또는 기타 동속식물의 줄기로서 性은 寒하고 味는 苦하다. 歸經은 心·小腸·膀胱經이며, 淸熱利尿, 通利血脈하는 효능이 있어 小便短赤, 淋濁, 水腫을 치료한다^{2,3)}.

음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴로서 足少陰腎經·衝脈·陰維脈의 交會穴로서, 補腎培元, 調經利水의 효능으로 陽痿, 月經不調, 崩漏, 小便難을 치료하는데 상용된다^{4,5)}.

최근 국민건강보험공단 검진 자료에 의하면 신장염의 소견을 보이는 단백뇨, 혈뇨, 혹은 혈청 크레아티닌 1.5mg/dl 이상의 환자가 2000년에 비하여 2004년에 2배 이상 증가하였다고 보고하였으며⁶⁾, 가까운 일본의 경우 만성 신부전 환자의 비중이 1985년에 비해 2007년에 3~4배 증가하였다⁷⁾. 이와 같이 증가하는 신장염에 대한 근본적인 치료법은 없어 염증의 자연 관해가 일어날 때까지 항생제와 대증요법으로 감염을 제거하는 것이 기본 원칙이나⁸⁾ 한방적인 치료가 보다 효과가 있을 것으로 생각된다.

한방에서 신장 독성 및 기능저하에 관한 연구로는 최 등⁹⁻¹¹⁾의 약물을 이용한 연구와 구맥¹²⁻¹⁵⁾ 등 약침을 음곡에 자침하여 신장염에 유의한 효과를 보인 예가 있었다.

목통에 관한 연구로는 전탕액을 투여하여 흰쥐의 급성신부전에 유의한 효과를 보인 오¹⁶⁾의 연구와 목통 추출물의 항산화 효과 및 항균활성효과에 관한 김¹⁷⁾의 연구가 있었으나 목통약침을 이용한 신장염 연구는 아직 접하지 못하였다.

이제 저자는 LPS로 유도된 신장염 병태모델 흰쥐로 음곡에 상응하는 부위에 목통약침을 시술하고 혈액과 소변, 신장 내 염증 활성평가, 조직학적 분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

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℃)과 습도 50~60%를 유지하였고 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 규칙을 따랐다.

2) 약제

본 실험에 사용된 목통(AL)은 한국이 원산지로 강덕제약에서 구입하였다. 대전대학교 부속한방병원에서 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

시약명	제조사	제조국
Phosphate buffer saline(PBS)	Sigma	USA
HALS		
Collagenase type IV		
MTT		
Lipopolysaccharide(LPS)		
Gum-sucrose		
Formalin		
Absolute EtOH		
Harris hematoxin		
Eosin B		
RPMI 1640 media	Hyclone	
Antibiotics		
FAL	BD	
BCA kit		
TNF-alpha ELISA Kit	Oxford Bio Assay Systems	
Creatinine assay Kit		
CINC-1 ELISA Kit	ALPCO Cellscience	
MPO ELISA Kit		
Ethyl ether		

(2) 기기

기기명	제조사	제조국
Bio-freezer	Sanyo	Japan
Rotary evaporator	Eyela	
Digital camera microscope	Nikon	
ELISA reader	TARAN	Canada
Sonicate	Fisher	USA
Ice maker	Vision science	Korea
Metabolic cage	B&P	
Cytological centrifuge	Hanil	UK
Micro centrifuge		
Cryotome	Shandon	

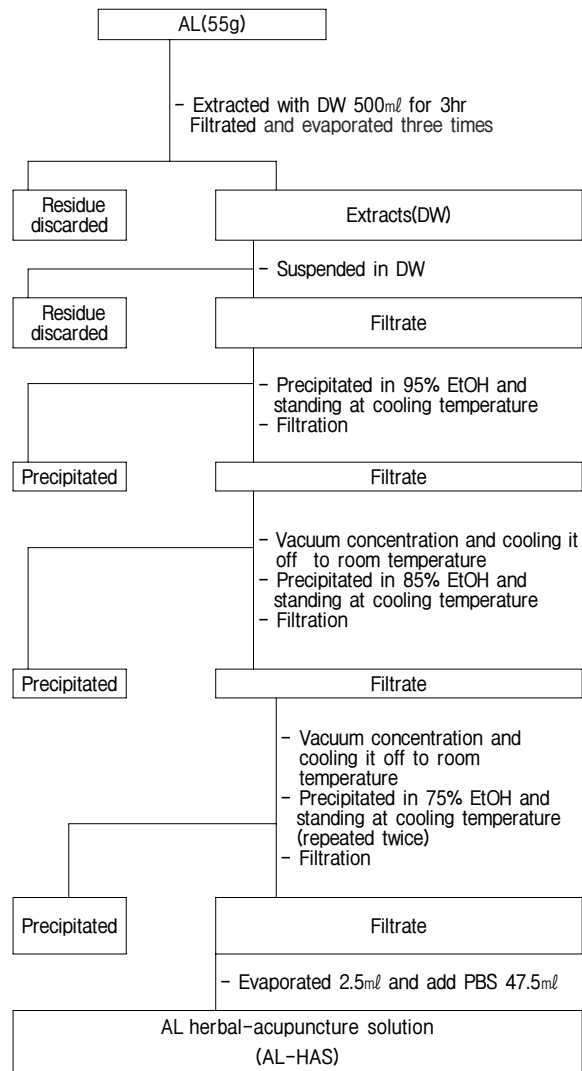
2. 방법

1) 약침액의 조제

분쇄기를 이용해서 목통 55g을 분쇄하여 분말로 만들어 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후 rotary evaporator에 감압농축하였다. 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여 실온에서 교반한 후 방치하여 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 4℃에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다.

여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).

목통 55g으로부터 얻은 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 건조시켰을 때 건조분말은 0.392g이었다(수율 0.71%) (Scheme 1).



Scheme 1. Manufacturing procedure of *Akebiae Lignum* Herbal acupuncture solution

2) 세포독성

(1) 세포 분리

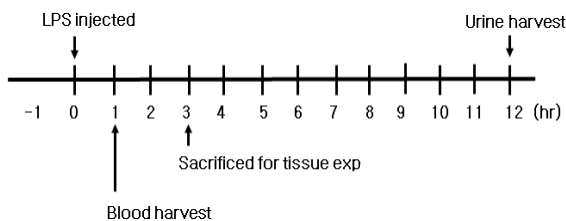
본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD rat의 간 조직을 사용하였다. Rat을 ethyl ether를 이용하여 마취시킨 후, 대동맥 혈관에 HALS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켰다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10% FAL)와 collagenase type IV(300u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation하였다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 잘 분리되도록 하였다. 얻어진 간세포는 RPMI 1640 media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.

(2) MTT assay

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

3) 신장염 동물 모델

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



Scheme 2. Experimental procedure

4) 실험군 분류 및 처치

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

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치를 하지 않은 정상 SD rat
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2mg/kg으로 복강 투여한 군
- ③ NP군(NP) : 실험 전 1주일간 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 26gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 자입한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군
- ④ Saline군(Saline) : 실험 전 1주일간 saline 0.2ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군
- ⑤ 목통약침군(AL-HA) : 실험 전 1주일간 5%의 목통약침액 0.2ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군

5) 신장염 평가

(1) 혈액 분석

LPS 처리 1시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 심장 채혈법으로 각 동물에서 4ml의 혈액을 채취하였다. (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 WBC, neutrophils의 비율을 측정하였으며, 혈청 BUN의 농도를 확인하였다. 혈청 TNF-α (Tumor necrosis factor-α), CINC-1(Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변 분석

Metabolic cage에서 12시간 동안 소변을 채취하여, 배뇨량과 요중 total protein 농도를 kit을 이용하여 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 대동맥 혈관에 HALS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장 조직은 0.05% sodium azide가 첨가된 0.1M phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2000×g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80°C에서 보관되었다가 ELISA kit을 이용하여 MPO(myeloperoxidase)의 농도를 측정하였다.

(4) 조직학적 분석

LPS 처리 3시간 후, 실험동물의 신장을 적취하여, 10%의 formalin에 고정하였다. 고정된 조직은 왁스에 format시켜 5 μ m의 두께로 박절한 후 조직 절편을 슬라이드에 부착시키고 실내에서 30분 이상 방치하였다.

슬라이드에 부착된 조직은 Harris hematoxylin에서 1분 정도 염색을 실시하고 흐르는 물에 씻어 주었다.

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 주었다. 다시 흐르는 물에 슬라이드를 씻어주고, Eosin에서 3분 정도 염색처리한 뒤, 95% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 주고, 다시 깨끗한 95% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼 주었다.

남은 alcohol성분은 흡수지를 이용하여 완전하게 alcohol성분을 제거하고, 100% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 준 후, 다시 깨끗한 100% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼 주었다. 남은 alcohol 성분을 제거하고, Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 주고, 다시 깨끗한 Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 준 뒤, 봉입하였다.

봉입을 끝낸 조직은 microscope(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰한 후, digital camera(DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하였다.

6) 통계처리

실험결과는 각 실험군에서 얻은 결과값의 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 통계프로그램은 SPSS (14.0 Korean version)를 사용하였다. n수가 30 미만이기 때문에 각각의 데이터는 모수검정을 통하였으며 정규성 검정과 등분산성 검정을 만족하여 ANOVA-test와 t-test를 사용하였다.

Fig. 1의 데이터는 ANOVA-test를 이용하여 여러 농도간 결과값의 평균을 비교하였으며, Fig. 2와 Fig. 3에서는 t-test를 이용하여 평균을 비교하였다.

나머지는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 사용하여 군간 비교를 하였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다.

유의수준은 신뢰도 95% 이상($p < 0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. 목통약침액의 세포독성

목통약침액을 1%, 2.5%, 5%, 10%로 희석하여 정상 rat의 간세포에 대한 세포독성을 확인하였다. 5% 목통약침액이 1%, 2.5%의 목통약침액에 비하여 viability가 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

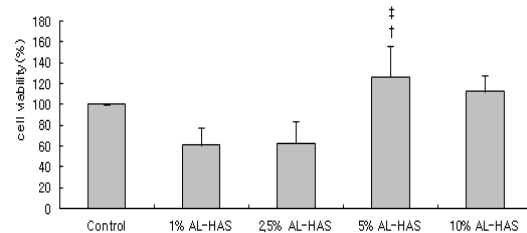


Fig. 1. Cytotoxicity of AL-HAS on rat liver cells
Liver cells from normal SD rat were cultured in RPMI 1640 with 10% FBS medium for 72h with or without various concentrations of AL-HAS(Akebiae Lignum herbal acupuncture solution). The cell viability were measured by MTT assay. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments.
Control : culture medium without AL-HAS
10%, 5%, 2.5%, 1% AL-HAS : culture medium with 10%, 5%, 2.5%, 1% AL-HAS respectively.
† : $p < 0.05$, compared to 1% AL-HAS by ANOVA test.
‡ : $p < 0.05$, compared to 2.5% AL-HAS by ANOVA test.

2. LPS투여 따른 TNF- α 의 농도 변화

1) Serum TNF- α

Rat에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 serum TNF- α 의 농도를 관찰하였다.

LPS 투여 1시간 후에 serum TNF- α 의 농도가 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 높았으며, LPS 투여 3시간 후에는 serum TNF- α 가 감소하여 no-treatment군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

2) Renal TNF- α

Rat에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 각각 신장을 적출하여 renal TNF- α 의 농도를 관찰하였다.

LPS 복강투여 1시간 후에 renal TNF- α 의 농도는

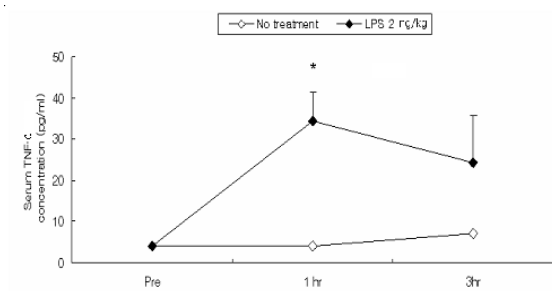


Fig. 2. Effect of LPS on serum TNF-α level in SD rats
 The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS(lipopolysaccharide; 2mg/kg). Blood samples were taken from rat heart at 1hr or 3hr after the LPS injection, and serum TNF-α level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean ± SD(n=3).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

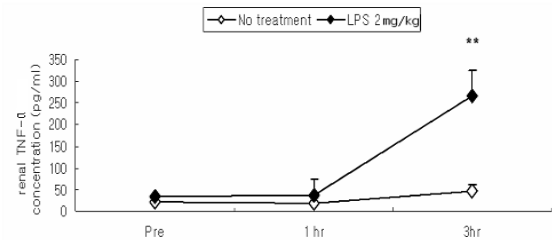


Fig. 3. Effect of LPS on renal TNF-α level in SD rats
 The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Rat kidney was removed at 1hr or 3hr after the LPS injection, and renal TNF-α level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean ± SD(n=3).
 No treatment : normal SD rat without LPS challenge.
 LPS 2 mg/kg : SD rat with LPS(2mg/kg) challenge.
 ** : $p < 0.01$, compared to no-treatment group by *t*-test.

LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의한 차이는 없었으며, LPS 투여 3시간 후 renal TNF-α의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

3. 음극 목통 약침이 LPS에 의한 rat의 신장염에 미치는 영향

1) 혈액학적 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 WBC의 수와 WBC 중 neutrophil의 비율을 측정하였다.

(1) WBC

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의

혈중 WBC 수를 측정하였다.

LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. NP군과 saline군, AL-HA군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였으며, AL-HA군의 혈중 WBC는 LPS군과 saline군에 비하여 유의하게 낮았다(Fig. 4).

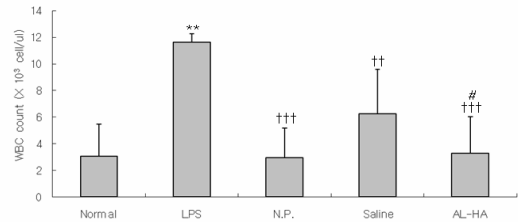


Fig. 4. Effect of AL-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method 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.
 NP : LPS(2mg/kg) challenge and a needle prick at KI₁₀.
 Saline : LPS(2mg/kg) challenge and saline(200μl/rat) injection at KI₁₀.
 AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200μl/rat) at KI₁₀.
 ** : $p < 0.01$, compared to normal group by ANOVA test.
 ††† : $p < 0.001$, †† : $p < 0.01$ compared to LPS group by ANOVA test.
 # : $p < 0.01$ compared to saline group by ANOVA test.

(2) Neutrophil

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 WBC 중 neutrophil 비율을 측정하였다.

AL-HA군에서는 정상군, LPS군, NP군 및 saline군에 비하여 neutrophil 비율이 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

2) Blood chemistry

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 혈청 BUN, TNF-α 그리고 CINC-1의 농도를 측정하였다.

(1) BUN(Blood urea nitrogen)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의

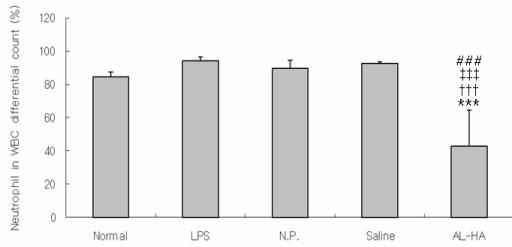


Fig. 5. Effect of AL-HA on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method and injected intra-peritoneally with LPS(2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1hr 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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200μl/rat) at KI₁₀.

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

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

‡‡‡ : p<0.001 compared to NP group by ANOVA test.

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

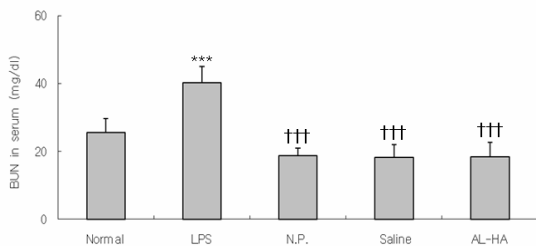


Fig. 6. Effects of AL-HA on serum BUN level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method and injected intra-peritoneally with LPS(2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1hr after the LPS injection and serum BUN 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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200μl/rat) at KI₁₀.

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

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

혈청 BUN 농도를 확인하였다.

LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 증가하였다. NP군 및 saline군, AL-HA군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

(2) TNF-α

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 TNF-α 농도를 확인하였다.

LPS군, NP군 saline군, AL-HA군에서는 정상군에 비하여 혈청 TNF-α가 현저하게 증가하였다. Saline군에서는 LPS군과 NP군에 비하여 혈청 TNF-α 농도가 유의하게 감소하였다. AL-HA군은 LPS군에 비하여 혈청 TNF-α 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

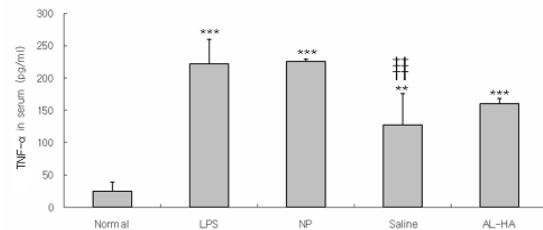


Fig. 7. Effects of AL-HA on serum TNF-α level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method and injected intra-peritoneally with LPS(2mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1hr after the LPS injection and serum TNF-α 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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200μl/rat) at KI₁₀.

*** : p<0.001, ** : p<0.01 compared to normal group by ANOVA test.

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

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

(3) 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.

LPS군에 비하여 NP군의 혈청 CINC-1의 농도가 유의하게 감소하였다. AL-HA군에서는 LPS군에 비

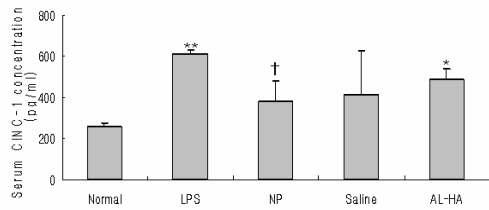


Fig. 8. Effects of AL-HA on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method 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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200µl/rat) at KI₁₀.

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA test.

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

하여 혈청 CINC-1 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

3) 소변 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 소변량과 요중 total protein의 양을 측정하였다.

(1) 배뇨량 측정

Rat에 LPS로 신장염을 유도한 후 metabolic cage에 한 마리씩 수용하고 12시간 동안 소변을 채취하여 배뇨량을 측정하였다.

LPS군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 유의하게 감소하였다. AL-HA군에서는 LPS대조군에 비하여 배뇨량이 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

(2) Total protein

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요중 total protein량을 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 요중 total protein이 유의하게 증가하였다.

AL-HA군의 요중 total protein은 LPS군에 비하여 요중 total protein농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

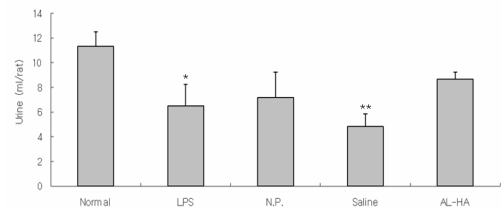


Fig. 9. Effect of AL-HA on urinary volume in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). The rats were kept in metabolic cages and the urine was collected for 12 hours. 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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200µl/rat) at KI₁₀.

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA test

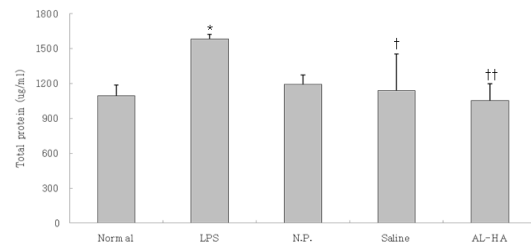


Fig. 10. Effects of AL-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method 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 ± 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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200µl/rat) at KI₁₀.

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

†† : $p < 0.01$, † : $p < 0.05$ compared to LPS group by ANOVA test.

4) 신장 내 MPO(myeloperoxidase) 활성

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장조직을 분획한 후 MPO의 농도를

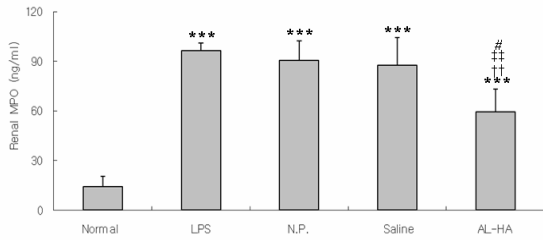


Fig. 11. Effects of AL-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and method 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 \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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

*** : $p < 0.001$ compared to normal group by ANOVA test.

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

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

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

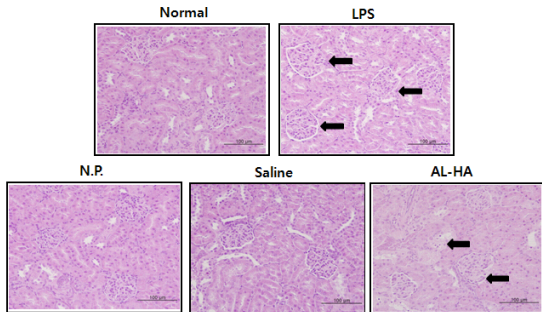


Fig. 12. Histological analysis of renal tissue in LPS-stimulated rats(H&E stain)

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

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.

AL-HA : LPS(2mg/kg) challenge and AL-HA(5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

측정하였다.

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을

적출하여 renal MPO 농도를 측정하였다. LPS군, NP군, saline군, AL-HA군에서는 정상군에 비하여 renal MPO가 현저하게 증가하였다. AL-HA군은 LPS군, NP군 및 saline군에 비하여 renal MPO가 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

5) 조직학적 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 hematoxylin and eosin(H&E) 염색법으로 조직을 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

LPS군의 신장조직은 정상군에 비하여 사구체에 neutrophil의 집중을 나타내었다. AL-HA군의 신장조직에서는 LPS군에 비하여 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 12).

IV. 고찰

신장은 복강 후벽의 윗부분에 척추 양쪽의 약간 패인 자리에 위치하며 완두콩 모양의 장기로서^{18,19)} 성인 신장의 무게는 양측을 합쳐서 체중의 1%인 것에 비해 휴식 시 심박출량의 20%인 분당 약 1000ml 정도의 혈액을 공급 받는다⁸⁾. 신장은 크게 조절기능, 배설기능, 내분비기능, 대사기능이 있어 생존에 필수적으로 체액의 항상성에 관여하며 인체의 대사산물이 체외로 배설되는 주된 경로일 뿐만 아니라 독소나 약물과 같이 체내에서 생성되거나 외부에서 유입된 유해물질의 배설에도 중요한 역할을 하여 독성물질에 대한 감수성이 높다²⁰⁾.

급성 신장염은 다양한 원인에 의해 급성으로 발생하는 혈뇨, 단백뇨 및 고질소혈증, 신장에서의 수분 및 염분 저류를 특징으로 하며 신기능 감소가 심하면 핏뇨가 나타나기도 한다²⁰⁾. 수분 및 염분 저류는 고혈압, 폐부종, 안면 및 사지 부종을 초래한다. 만성으로 이행될 경우 신부전으로 발전할 수 있으며 국내에서도 만성 신질환자의 빈도가 증가하고 이에 대한 의료비 지출이 증가하고 있다²¹⁾.

한의학적으로 신장염은 尿不利, 尿濁, 淋病, 浮腫 등에 속하며, 대개 風寒濕의 外邪 침습 후 속발하는 병증으로 치법은 대개 淸熱利濕, 通利小便 등의 방법을 사용하므로¹⁹⁾ 淸熱利濕의 대표적 효능이 있는 목통을 실험 연구에 사용하였다.

음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 澁水穴로서 무릎 뒷부

위 다리 오금선상의 반힘줄모양근힘줄의 가쪽 모서리에 위치하며 祛濕通漚, 滋腎清熱, 疏泄厥氣, 利導下焦하는 효능으로 崩漏, 小便難, 腹脹滿, 尿道炎, 陰痿, 陰道炎 등 신장의 기능과 관련된 질환의 치료혈로 사용된다⁵⁾.

목통(*Akebiae Lignum*)은 으름덩굴과에 속한 낙엽성 관목인 으름덩굴 또는 기타 동속식물의 줄기로서 性味는 苦寒하며 通利清降하므로 下로 利水泄熱하게 하여 濕熱의 邪氣가 하행하며 소변으로 배출을 용이하게 한다²⁾. 목통에 대한 연구로 항염증 및 진통작용은 oleanolic acid 및 hederagenin에 의한 것으로 알려져 있으며²²⁾, 목통 saponin이 울혈성 부종억제 및 이뇨효과가 있다고 보고하였다²³⁾.

염증반응은 조직의 손상에 대한 면역세포의 국소적인 방어보호 및 회복반응이다. 세균, 바이러스 등 이물질을 인식한 면역세포가 활성화 되어 cytokine을 분비하여 염증반응을 유발시킨다. Cytokine은 염증 및 면역 반응을 조절하고 세포증식과 분화에 관여하는 단백질 인자로서²⁴⁾ 사구체신염의 발병과 진행에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 그람 음성 세균 세포외막의 성분인 LPS는 mesangium세포에서 면역기능을 조절하는 TNF- α , IL-1, IL-6 등의 cytokine을 분비시키고 IL-8, MCP-1 등의 chemokine을 분비하여 면역세포의 화학주성을 유발하여 과다한 염증반응을 일으키고 또한 mesangium세포를 자극하여 nitric oxide 분비를 유발하여 정상적인 세포의 기능을 파괴하고, mesangium세포의 증식을 일으켜 신장손상에 관여한다^{25,26)}.

급성 신장염은 근본치료 방법이 없어 대증요법 및 항생제 투여로 염증의 자연 완화가 일어날 때까지 기다리는 처치 외에는 마땅한 치유법이 없어 후에 만성 신부전으로 이행되는 경우가 있다. 일본의 경우 만성 신부전 환자가 증가하고 있으며⁷⁾ 우리나라도 신장질환에 대한 진료비가 늘어나는 실정이다²¹⁾. 한의학에서 신장염 관련 기존 연구로는 구맥¹²⁻¹⁵⁾ 등 약침을 음곡에 시술하여 신장염에 유의한 효과를 보인 예가 있었다. 목통에 관한 연구로는 흰쥐의 급성 신부전에 유의한 효과를 보인 오 등^{16,27)}의 연구, 목통 추출물의 항균효과에 관한 김 등^{17,28)}의 연구와 목통약침자극의 통증 유발 흰쥐에 미치는 영향에 관한 연구²⁹⁾가 있었으나 신장염에 清熱利濕하여 이뇨, 항염증 효능으로 목통약침액을 이용한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 목통약침이 급성 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 목통약침액을 시료로 정상 흰쥐의

간세포에 대한 세포독성을 확인하고 LPS 투여 후 혈청과 신장 내 TNF- α 의 농도를 측정하였고, 음곡에 목통약침 투여 후 혈액 및 혈청 분석, 소변 분석, 신장 내 염증활성, 조직학적 분석을 시행하였다.

정상 흰쥐의 간세포에 AL-HA를 여러 가지 농도로 투여한 후 간세포에 대한 세포 독성을 확인한 결과 5% 농도 AL-HA가 1%, 2.5%의 목통 약침액에 비하여 viability가 유의하게 증가되어 5%의 농도 목통 약침액을 사용하였다(Fig. 1).

TNF- α 는 proinflammatory cytokine으로서 다양한 면역 반응에 중심적 역할을 하며, 강력한 염증 조절 기능이 있는 물질이다^{25,26)}. 또한 TNF- α 가 직접 사구체 손상을 일으켜 podocyte의 nephrin 발현을 증가시켜 podocyte 기능에 영향을 준다³⁰⁾. LPS 투여에 따른 시간당 TNF- α 의 농도 변화를 분석하기 위하여 각각 혈청과 신장 조직에서 정상군과 LPS투여군의 TNF- α 농도를 측정하였다. 혈청 검사에서는 LPS 투여 후 1시간과 3시간 후 모두 TNF- α 가 증가하였으나 1시간 후에는 유의한 증가를 보이지 않았다. 신장 조직 검사에서는 LPS 투여 1시간 후 TNF- α 가 정상군에 비해 거의 차이가 없었으나 3시간 후에는 유의한 증가를 보였다. 따라서 LPS 투여에 따른 효과를 정확하게 측정하기 위해서 혈청검사는 투여 1시간 후, 신장 조직 검사는 3시간 후에 시행하였다(Fig. 2, 3).

WBC는 염증 반응에서 주역인 세포로 염증의 경과에 따라 종류가 변한다. 일반적인 염증 초기에는 neutrophil이 주로 반응하며, 후기에는 림프구, 형질세포와 대식구가 이에 대신한다. neutrophil은 골수에서 유래하고 세포질 내에 neutrophil의 과립이 있는데 이는 염증이 발생하면 혈관의 내피 사이를 빠져나가 혈관 밖으로 유출하고, 화학주성에 의해 항원과 이물 이동, 부착하여 탐식하게 된다. 또한 염증반응에서 단백 분해 효소를 방출하여 주변에 침착된 섬유소와 호중구 또는 조직을 액화하여 pus를 형성한다³¹⁾. 본 실험에서 LPS 투여군에 비해 AL-HA군에서 WBC, WBC 중 neutrophil의 비율이 유의하게 감소하여 AL-HA군에서 염증반응을 억제하였으며, NP군에서 WBC가 감소하여 음곡혈 자침 또한 염증반응을 억제한 것으로 사료된다(Fig. 4, 5).

Blood urea nitrogen(BUN)은 혈중에 존재하는 요소 내 질소를 나타내는 것으로 요소는 간의 요소회로에서 단백질대사의 최종산물로서 생성되어 혈류를 거쳐 신장에서 여과 및 재흡수되고 나머지는 요중으로 배설되는데, 신기능이 저하하여 사구체여과율(GFR)

이 감소하면 혈중 농도가 상승하므로 신기능의 지표가 된다³¹⁾.

강력한 proinflammatory cytokine인 TNF- α 는 염증반응 급성기에 작용하여 세균감염이나 내독소의 자극을 받아 대식세포에서 분비되며, 혈관투과도를 증가시켜 혈관을 확장시키고 대식세포를 자극하여 백혈구의 주화성과 보충을 유도하는 IL-1, IL-6, IL-8과 같은 cytokine을 분비하도록 한다³²⁾. CINC-1은 IL-8계통으로 내피세포에서 분비되어 neutrophil을 유도하며 활성화시켜 흰쥐의 염증반응 모델 연구에서 수치가 사용되어왔다³³⁾.

본 실험에서 흰쥐의 혈청에서 BUN, TNF- α , CINC-1의 농도를 측정된 결과 BUN은 음곡에 시술한 모든 군에서 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고, TNF- α 는 saline군에서 LPS군에 비하여 유의한 감소가 있었으며, CINC-1은 NP군에서 유의한 감소가 있었다. 이에 목통약침이 TNF- α 와 CINC-1의 기전에 관계한 신장염의 억제 효과는 없을 것으로 사료되며, 혈청 BUN의 농도 감소는 음곡의 祛濕通洩, 滋腎清熱의 효과로 보인다(Fig. 6~8).

신장의 중요한 기능은 노폐물 배설과 체액량 및 조성의 조절기능을 통하여 인체의 항상성을 유지하는 것이다. 사구체가 손상받으면 호중구가 모여들면서 염증반응이 일어나게 되어 사구체 속에 있는 mesangial 세포나 내피세포 등이 증식되어 사구체 내부의 모세혈관내강이 폐색된다. 내강이 폐색되면 혈액을 여과할 수 없게 되고 GFR이 저하되어 소변 감소증이나 무뇨가 일어나게 되며, 염증에 의해 손상을 입은 바닥막은 큰 구멍이 뚫려 정상적인 사구체에서 통과할 수 없는 적혈구와 단백질 등이 대량으로 소변으로 배출되게 된다¹⁾. 본 실험에서는 흰쥐에서 12시간 동안의 소변을 채취하여 소변량과 요중 total protein을 측정하였다. 소변량은 LPS대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았으나, 요중 total protein은 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 이는 경구로 투여한 목통전탕액이 급성 신부전으로 야기된 단백뇨에 유의한 효과를 보여준 김¹⁷⁾의 연구 결과와 일치하는 것으로 사료되며 목통약침의 清熱利尿, 通利血脈하는 효능이 염증으로 손상된 신장의 기능을 개선시킨다는 것으로 생각된다(Fig. 9, 10).

MPO는 neutrophil이 탐식한 세균에 대하여 free radical을 생산하여 면역작용을 보이며, MPO-ANCA (anti neutrophil cytoplasmic antibody)는 현미경적 다발성 동맥염이나 괴사성 사구체신염에서 고빈도로

나타나 염증의 지표로서 조직 속의 neutrophil의 수를 측정하는 데 사용된다^{31,34)}. 이에 본 실험에서 신장 내 염증 활성도를 측정하기 위해 신장 조직 내 MPO의 농도를 측정하였는데 AL-HA군이 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 11). MPO 농도의 감소는 앞서 WBC, neutrophil의 유의한 감소와 비교하여 음곡 목통약침의 清熱利濕하는 효과로 염증작용의 주핵심인 WBC 감소뿐만 아니라 neutrophil의 감소에 더욱 집중적으로 나타난 것으로 보인다.

LPS로 신장염을 유도하여 3시간 후 신장을 적출하여 손상을 관찰한 결과 LPS군의 신장조직은 정상군에 비하여 사구체에 neutrophil의 집중을 나타내었고 AL-HA군에서는 LPS군에 비하여 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 12). 따라서 앞의 MPO 및 neutrophil의 유의한 감소 및 신장조직에서 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 미루어 AL-HA군에서는 LPS와 같은 독성물질이 유발한 급성 신장염의 조직손상을 막는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과 음곡에 시술한 목통약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 급성 신장염에 대하여 혈중 WBC와 neutrophil의 증가를 억제하며, 혈청 BUN의 노폐물 축적을 감소시키고, 신장의 손상으로 인한 실질 내 MPO와 소변 내 total protein이 유의하게 감소하였다. 한편 음곡에 saline을 투여한 군에서 혈중 WBC, 혈청 BUN, TNF- α ,가 유의하게 감소하였고, NP군에서는 혈중 WBC, 혈청 BUN, CINC-1이 유의하게 감소하였는데 이는 음곡 경혈의 祛濕通洩, 滋腎清熱, 疏泄厥氣, 利導下焦의 특이적 효능에 따른 치료 효과도 작용했을 것으로 보인다. 따라서 음곡에 시술한 목통약침은 신장의 염증반응을 억제시키는 데 효과가 있는 것으로 생각되어 향후 이에 대한 지속적이며 체계적인 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

음곡(KI₁₀)에 시술한 목통약침이 LPS로 유도된 신장염 모델 흰쥐에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈액 및 혈청분석, 소변분석, 신장 내 염증활성, 조직학적 분석을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. AL-HA군에서 혈중 WBC, neutrophil의 비율, 혈청 BUN의 농도가 LPS군에 비해 유의하게

- 감소하였다.
2. AL-HA군에서 요중 total protein과 신장 실질 내의 MPO가 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다.
 3. 조직학적 분석에서 AL-HA군에서 사구체의 neutrophil 집증이 LPS군에 비해 감소하는 경향을 보였다.

VI. 참고문헌

1. 최규현 역. SIM 내과학. 서울 : 정담. 2008 : 117-8.
2. 한의과대학 본초학 편집위원회. 본초학. 서울 : 永林社. 2005 : 359-60.
3. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학 제3판. 서울 : 신일북스. 2010 : 509-10.
4. 임윤경, 김준표, 김태한. 대한경락경혈학 각론. 대전 : 오비기획. 2006 : 676-8.
5. 대한침구학회 교재편찬위원회. 침구학(상). 파주 : 집문당 2008 : 175-6.
6. 대한신장학회 등록위원회. 우리나라 신대체 요법의 현황 - 인산 민병석교수 기념 말기신부전 환자 등록사업 2005 -. 대한신장학회지. 2006 ; 425-257.
7. 윤덕현. 한눈에 보는 OECD 보건지표 2009. 서울 : OECD대한민국 정책센터 사회정책본부. 2010 : 102.
8. 대한내과학회 편저. Harrison's 내과학(16th). 서울 : MIP. 2006 : 1583, 1827-48.
9. 최정배, 이경환, 김용성. 육미지황탕가황기인삼 추출물의 Cisplatin 유도 신장독성 보호효과. 대한한방내과학회지. 2003 ; 24(3) : 579-87.
10. 황영근, 정지천. 수은으로 유발된 토끼의 신장 기능 손상에 대한 단삼의 효과. 대한한방내과학회지. 2000 ; 21(2) : 227-34.
11. 윤철호, 정지천, 신의섭. Bromobenzene으로 유도된 신장 기능저하에 미치는 녹용 약침의 항산화 효과. 대한한방내과학회지. 1999 ; 20(2) : 287-302.
12. 김정민, 이현, 강희정, 이용흠, 임윤경. 음곡에 시술한 구맥 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2009 ; 26(1) : 61-77.
13. 박병문, 허부, 임윤경. 음곡 차전자 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2009 ; 26(2) : 127-43.
14. 이정환, 김정호, 김영일. 음곡에 시술한 동과인약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2010 ; 13(2) : 51-65.
15. 윤광식, 강재희, 이현. 음곡 금전초약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2011 ; 28(3) : 43-54.
16. 오상덕. 목통 및 방기전탕약이 Gentamicin sulfate로 유발된 흰쥐의 급성신부전에 미치는 영향. 경희의학. 1994 ; 10(1) : 13-25.
17. 김정균, 강영미, 엄광식, 고영민, 김태영. 천연한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균활성효과. 농업생명과학연구. 2003 ; 37(4) : 69-75.
18. 이원택, 이종은, 박승화, 이경림, 박경아, 홍승길. 인체해부생리학. 서울 : 정담. 2004 : 821-3.
19. 두호경. 동의신계학. 서울 : 정보사. 2003 : 249, 393.
20. 김현철, 박성배, 박원균, 안기성, 임학. 통합강의를 위한 신장학. 서울 : 이퍼블릭 코리아. 2006 : 3, 16.
21. 국민건강보험공단. 2008, 2004년 질병소분류별 다빈도 상병 급여현황.
22. Yamahara J, Takagi Y, Sawada T, Fujimura H, Shirakawa K, Yosjikawa M, Kitagawa I. Effects of crude drugs on congestive edema. Tokyo : Chem Pharm Bull. 1979 ; 27 : 1464-8.
23. Choi J, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of Akebia quinata. J Med Food. 2005 ; 8 : 78-85.
24. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울 : 고려의학. 1998 : 69-75.
25. Papayianni A. Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. Ren Fail. 1996 ; 18 : 725-40.
26. Wardle EN. Cytokine growth factors and glomerulonephritis. Nephron. 1991 ; 57 : 257-61.
27. 금수미, 최용태. 穴位別 목통약침자극이 Gentamicin sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1993 ; 16 : 373-97.
28. 정원재, 최도영, 안병철. 목통약침자극의 항염증작용 및 진통에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집. 1998 ; 21(1) : 361-74.
29. 권도희, 최도영. 목통약침자극이 통풍 유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997 ; 14(2) : 173-89.

30. Huwiler A, Ren S, Holthofer H, Pavenstadt H, Pfeilschifter J. Inflammatory cytokines upregulate nephrin expression in human embryonic kidney epithelial cells and podocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 305 : 136-42.
31. 이귀녕, 이종순. 임상병리파일(제3판). 서울 : 의학문화사. 2000 : 334-5.
32. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* 1991 ; 285 : 199-212.
33. Ha JY, Kim YK, Lee KS, Min KR, Kim YS. Inhibitory effects of herbal extracts on CINC-1 induction in LPS-stimulated rat kidney epithelioid NRK-52E cells. *Natural Product Sciences.* 1997 : 59-70.
34. S Nishimura, T Shinoda, Y Suzuki, H Yoshimoto, H Yamada, H Miura, S Kitamura and Y Arimura. Drug-induced MPO-ANCA-positive necrotizing crescentic glomerulonephritis preceded by granulomatous hepatitis. *Clin Exp Nephrol.* 2002 ; 6 : 118-20.