

## 참가시나무 추출물이 신장결석유도 랫드에 미치는 저해효과

허진선, 김종복, 유한춘<sup>1</sup>, 이민수<sup>2</sup>, 최종원<sup>2\*</sup>

아이케이사이언스(주), <sup>1</sup>전라남도산림자원연구소, <sup>2</sup>경성대학교 약학대학

### Protective Effect of *Quercus salicina* Blume Extract in Calcium Oxalate Urolithiasis Model

Jin-Sun Heo, Jong-Bok Kim, Han-Choon You<sup>1</sup>, Min-Su Lee<sup>2</sup> and Jong-won Choi<sup>2\*</sup>

IK Science Co., Ltd. Busan 608-810, Korea

<sup>1</sup>Forest Resources Research Institute of Jeollanam-Do, Naju 520-830, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

**Abstract** - Kidney stones occur in approximately 1% of the population during their lifetime. Although the development of extracorporeal shock wave lithotripsy (SWL) has revolutionized the therapy of urolithiasis, the rate of recurrence of urolithiasis, the rate of recurrence of stones after SWL is about 50% within 10 years, which still represents serious problems for patients. So to clarify the mechanism of Urocalum, and QS (*Quercus salicina* Blume) extract in the treatment of urolithiasis. Rat calcium oxalate urolithiasis was induced by oral administration of ethylene glycol and the vitamin D3 analog alfacalcidol for 14 days and QS extract was given to rats. After the last administration, we measured in urine, serum and renal oxidative stress marker. Ethylene glycol and alfacalcidol treatment increased BUN, creatinine, uric acid and XO. This increase was significantly suppressed by the administration of QS extract. These findings suggest that the QS extract plays a role in the prevention of stone formation and recurrence in urolithiasis.

**Key words** - Alfacalcidol, BUN, Urolithiasis, Kidney stones, *Quercus salicina* Blume

## 서 언

참가시나무(*Quercus salicina* Blume)는 참나무과에 속하는 상록활엽교목으로 일본과 우리나라 남부 섬 지방에 분포한다. 잎은 피침형이며, 위쪽에 예리한 톱니가 있고 뒤쪽은 흰색이다. 참가시나무의 잎과 잔가지는 설사, 이질, 피부염과 출혈증 등의 치료에 사용하며, 항염, 항부종 및 이노작용에 효과가 있다고 알려져 있으며, 특히 결석의 용해와 배출에 효능이 있어 우리나라와 일본 등에서 민간요법적 방법으로 결석 치료에 사용되고 있다(Kim *et al.*, 2008).

*Quercus*속 식물에 대한 성분에 관한 연구는 *Quercus pedunculata*, *Q. Sessiliflora*, *Q. Valonea* 등으로부터 pedunculagin, castalin, valolaginic acid, isocalolaginic acid와 castalagin등을 분리하였으며(Mayer *et al.*, 1969),

생리활성 연구를 보면 *Quercus stenophylla*의 엑스로 만든 Urocalun이 urolithiasis에 임상적 효과가 있다고 발표하였고(Goto *et al.*, 1967, Inoue and Shiozaki, 1967), *Quercus*속 식물의 엑스에서 antidermatophyte activity를 확인하였다(Ikekami, 1998). 그리고 *Quercus dentana*로부터 분리한 플라보노이드인 Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside, quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside, Kaempferol 3-O-(6"-trans-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside, Kaempferol 3-O-(2"-6"-di-trans-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside 그리고 Kaempferol 3-O-(2",4"-di-acetyl-3"-cis-p-coumaroyl-6"-trans-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside를 분리하였으며, 이에 대한 superoxide 생성 억제 활성을 시험관내에서 확인하였다(Meng *et al.*, 2001).

최근, 우리 식단이 전통적 채식 위주의 식생활에서 패스트푸드와 다양한 음식문화의 변화로 고혈압, 당뇨 등의 생

\*교신저자(E-mail) : jwchoi@ks.ac.kr

활습관성 발병과 이에 동반한 호르몬의 변화 등으로 인하여 결석 환자가 증가하고 있다. 결석 치료법으로는 수술로 꺼내거나 체외충격파시술로 깨뜨려 없애기도 하지만, 대부분 재발병하고 있으며, 이에 따른 정신적, 경제적 고통을 많은 환자가 받고 있다. 적절한 치료방법으로는 신장결석의 생성기전이 명확히 밝혀져 있지 않고 있는점을 고려하여 임상에서는 주로 약물로서 이노제 및 외과적으로 방사선을 이용한 파쇄법과 수술을 병행하여 치료하고 있다(Halliwel, B. 1994).

이에 본 실험에서는 alfacalcidol과 ethylene glycol을 투여한 신장결석 유도 흰쥐를 사용하여 천연물에서 신장결석의 치료제를 개발할 목적으로 민간요법으로 많이 이용하고 있는 참가시나무를 대상으로 혈중의 뇨산 농도 및 신장의 효소활성을 측정하고 조직검사를 병행하여 참가시나무 열수 추출물이 신장기능에 미치는 영향 및 신장결석의 저해효과를 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험재료인 참가시나무(*Quercus salicina* Blume)는 전라남도 산림자원연구소로부터 제공받았으며, 참가시나무 잎, 가지, 열매를 각각 500 g을 3 회 열수추출하여 여과하고 rotary evaporator로 감압농축한 결과 약 7.7%, 8.2%, 6.7%의 수율을 얻었다. 또한 alfacalcidol, ethylene glycol 그리고 furosemide(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)은 HPLC grade를 구입하여 사용하였다.

### 실험동물

실험동물(효창사이언스(주), 대구, 한국)은 고형사료와 물을 자유공급하면서 경성대학교 동물사에서 일정한 조건(온도: 22 ± 1°C, 습도: 55 ± 3%, 명암: 12 시간 light/dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후, 체중 200 ± 10 g의 Sprague-Dawley계 웅성흰쥐를 사용하였다. 실험시간 전 24 시간 동안 물만 주고 절식 하였다. 이때 효소 활성의 일중변동을 고려 하여 실험동물을 일정시간(오전10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

### 신장결석 유발

신장결석의 유발은 Manabu등의 방법(Manabu *et al.*,

2007)을 참조하여 5 ml의 0.5%(w/v)을 kg/body weight로 ethylene glycol을 28일동안 매일 경구투여하였으며, 고칼슘을 유도하기 위하여 alfacalcidol(125 ng/kg) 또한, 매일 경구 투여 하였다. 28일이 경과한 뒤, 실험 동물을 metabolic cage에 나눈 뒤 24시간 뇨를 획득하였다.

뇨에서 pH, volume을 측정하였으며, uric acid, creatinine를 혈청 생화학기(Rochu Ltd, Basel, Switzerland)로 분석하였다. 해부일까지 매일 1회씩 일반 증상의 변화, 독성 증상 및 사망 동물의 유무를 관찰하였으며, 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 체중을 2~3일 간격으로 측정하였다.

### 검액의 제조

참가시나무 잎, 가지, 열매 열수추출물을 생리식염수에 용해한 후 실험동물에 투여하였다. 투여용량은 투여 직전 체중의 변화에 따라 산출하였다. 대조군은 동일 량의 상기의 용매를 사용하였다. 투여용량과 기간은 예비실험을 행한 후, 본 실험에 효과가 있는 것으로 사료되는 각 시료 100, 200 mg/kg 및 positive control로 사용된 furosemide를 하루에 한번, 28일간 각각의 실험군에 경구용 needle zonde를 사용하여 투여하였다.

### 혈청 및 조직 분리

실험 식이 투여 4주 후 최종일에 실험동물을 12 시간 이상 절식시킨 후, CO<sub>2</sub>로 마취시켜 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 얻어진 혈액은 약 30 분간 실온에서 방치시킨 후 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 혈청을 얻어 혈청 생화학분석에 사용하였다. 분리된 혈액 상층액은 혈청생화학기(Rochu Ltd., Basel, Switzerland)로 BUN, creatinine, uric acid 을 분석하였다. 신장은 관류하여 적출 한 후, 냉각된 0.9% 생리식염수로 충분히 세척 하고 물기를 제거한 다음 지방 등을 깨끗하게 정리 하여 무게를 측정하고, 조직 검사에 사용하였다.

### 단회투여독성시험

Sprague-Dawley계 흰쥐 암수 각각 84마리를 6마리씩 무작위로 군 분리하고 체중을 측정하였다. 투여 용량은 OECD의 급성독성 시험 허용 한계용량인 2,000 mg/kg을 고용량군으로 1,000 mg/kg을 저용량군으로 설정하였다.

투여 당일에는 투여 후 6 시간까지 매 시간, 투여 후 1일부터 14일까지는 1일 1회 이상씩 일반상태의 변화, 중독증

상의 발현, 사망 동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 관찰하였다. 14일의 시험기간이 끝난 후 생존 한 모든 실험동물을 CO<sub>2</sub>로 마취시킨 후 치사 시켜 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

### 신장 조직 중 효소활성의 측정

신장조직 중 xanthine oxidase(XO)활성의 측정은 Stripe와 Della의 방법(Stripe and Della., 1969)에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 3.0 μl를 가하여 37°C에서 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid를 가하여 제단백시키고 상정액을 취한 후 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 근거하여 1 분당 1 mg protein이 생성하는 uric acid의 양을 nmol로 나타내었다.

### 신장 조직의 Ca, Mg 분석

신장의 Ca, Mg 함량시험은 AOAC법(Bernard *et al.*, 1994)에 준하여 측정하였다. 이 실험에서 사용한 표준용액은 accutrace referenece standard, plasma emission standard 1,000 mg/L 표준용액을 묽힌 후 사용하였다.

시료를 전처리 하기 위해 분석용 반도체급의 질산을 사용하였다. 시료의 전처리는 60 ml 용량의 teflon재질로 된 vessel에 신장조직 0.7 g, 질산 7 ml을 넣은 뒤, vessel을 넣은 후 microwave unit를 이용하여 시료를 분해 시켰다. 표준 분석 시료는 각각의 일정량에 표준 Ca, Mg을 0.1 g, 0.2 g, 0.3 g을 첨가한 후 ICP(PerkinElmer Inc., Massachusetts, USA)측정하여 검정 곡선을 작성한 후 분석하였다.

### 신장 조직 검사

신장을 관류하여 적출한 다음 10% formalin에 넣어 조직을 고정한 후 수세하고 60%에서 100% alcohol로 순차적으로 탈수하여 파라핀에 포매 하고 block을 만들었다. 이것을 rotary microtome을 사용 하여 5 μm의 두께로 조직 절편을 만들어 hematoxylin-eosin으로 염색 한 후 광학 현미경(Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### 단백질 정량

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(Lowry *et al.*, 1951)에 준하여 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.,

St. Louis, Mo. USA)를 표준품으로 하여 측정하였다.

### 통계학적 처리

통계적 검정은 SPSS통계 프로그램을 이용 하여 수행하였으며,  $p < 0.05$  이하일 경우 통계 적으로 유의한 것으로 검정하였다. 각 항목에 대한 유의 한 차이를 나타내는지의 비교분석은 student's t-test one-way ANOVA(Turkey's multiple comparison test)를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 단회투여독성시험

참가시나무 잎, 열매, 가지의 분획의 독성을 검사할 목적으로 단회경구투여를 하여 본 결과 시험 전기간을 통하여 최고 용량 군을 비롯 하여 암·수의 모든 마우스 동물군에서 사망 동물은 발생 하지 않았으며, Sprague-Dawley계 흰 쥐 암·수에서 본 시험물질의 최소치사량(minimal lethal dose)는 암수 모두 2,000 mg/kg 이상이였다(Table 1).

### 뇨, 혈청 생화학적 분석

신장결석을 유도한 흰쥐에 참가시나무 잎, 가지, 열매 열수추출물을 투여하고 혈중 BUN, creatinine 및 uric acid에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다.

Normal군에 비하여 Control군의 경우 전체적으로 수치가 상승한 것을 볼 수 있었고, 이에 반하여 양성 대조군으로 사용된 Furosemide군과 QS leaf 군의 경우 14일 투여했을 때, 정상군과 비슷한 수준으로 감소하였다. 특히 QS leaf 200 mg/kg군은 creatinine, BUN 에서 각각  $0.27 \pm 0.23$  mg/dL,  $12.45 \pm 1.02$  mg/dL의 수치를 나타내었으며, 이는 정상군과 유의한 수준을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이를 살펴 볼 때 serum에서 creatinine, BUN 그리고 uric acid에서는 상당히 유의성이 있다고 사료된다.

혈청 생화학적 분석 결과를 바탕으로 뇨에서 참가시나무 잎, 가지, 열매가 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다(Table 3). 뇨의 pH에서는 군간의 유의성은 명확하지 않았으나, volume, creatinine 그리고 uric acid농도의 경우 혈청 생화학적 분석과 비슷한 경향을 보였다.

특히 QS leaf 200 mg/kg군에서 creatinine의 경우  $44.87 \pm 5.50$  mg/dL, Uric acid의 경우  $5.05 \pm 0.52$  mg/dL으

Table 1. Mortality, clinical signs in rats treated orally once with *Quercus salicina* Blume extract

Group	Dose (mg/kg)	Final mortality		Clinical signs		No. of animals with abdominal gross findings	
		Male	Femlae	Male	Femlae	Male	Femlae
QS nut	1,000	0/10	0/10	-	-	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	-	-	0/10	0/10
QS leaf	1,000	0/10	0/10	-	-	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	-	-	0/10	0/10
QS branch	1,000	0/10	0/10	-	-	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	-	-	0/10	0/10

- 1) QS nut : *Quercus salicina* Blume nut water extract, QS leaf : *Quercus salicina* Blume leaf water extract, QS branch : *Quercus salicina* Blume branch water extract.
- 2) Values are mean ± S.D. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal ( $p < 0.05$ ).
- 3) - : no clinical signs.

Table 2. Effect of serum creatinine, uric acid and BUN concentration in rat calcium oxalate urolithiasis model

Group	Dose (mg/kg)	Creatinine	Uric acid	BUN
		(mg/dL)		
Normal		0.10 ± 0.06 <sup>d</sup>	3.94 ± 0.36 <sup>c</sup>	12.51 ± 1.67 <sup>c</sup>
Control		0.58 ± 0.26 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.48 <sup>a</sup>	16.53 ± 0.70 <sup>a</sup>
Furosemide	10	0.13 ± 0.05 <sup>d</sup>	3.82 ± 0.50 <sup>c</sup>	12.74 ± 1.06 <sup>c</sup>
QS nut	100	0.47 ± 0.08 <sup>ab</sup>	4.93 ± 0.44 <sup>bc</sup>	15.01 ± 1.89 <sup>a</sup>
	200	0.43 ± 0.05 <sup>abc</sup>	4.93 ± 0.99 <sup>bc</sup>	14.78 ± 2.37 <sup>ab</sup>
QS leaf	100	0.35 ± 0.24 <sup>cd</sup>	4.93 ± 0.82 <sup>bc</sup>	12.47 ± 1.91 <sup>c</sup>
	200	0.27 ± 0.23 <sup>cd</sup>	3.88 ± 0.32 <sup>bc</sup>	12.45 ± 1.02 <sup>c</sup>
QS branch	100	0.38 ± 0.04 <sup>bc</sup>	5.11 ± 0.97 <sup>bc</sup>	13.08 ± 0.59 <sup>bc</sup>
	200	0.40 ± 0.00 <sup>abc</sup>	5.47 ± 0.19 <sup>b</sup>	13.08 ± 0.50 <sup>bc</sup>

- 1) Values are expressed mean ± S.D. for groups of six experiments.
- 2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of urine pH, volume, creatinine and uric acid concentration in rat calcium oxalate urolithiasis model

Group	Dose (mg/kg)	pH	Volume (ml)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)
		Normal	9.00 ± 0.13 <sup>a</sup>	19.33 ± 1.87 <sup>a</sup>	43.40 ± 5.47 <sup>b</sup>
Control		8.24 ± 1.03 <sup>b</sup>	8.57 ± 5.72 <sup>b</sup>	76.07 ± 7.29 <sup>a</sup>	9.83 ± 2.84 <sup>b</sup>
Furosemide	10	9.10 ± 0.08 <sup>a</sup>	13.07 ± 0.99 <sup>ab</sup>	39.37 ± 4.98 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.29 <sup>a</sup>
QS nut	100	8.79 ± 0.31 <sup>a</sup>	8.83 ± 1.44 <sup>b</sup>	59.20 ± 6.76 <sup>ab</sup>	7.20 ± 2.61 <sup>b</sup>
	200	8.90 ± 0.29 <sup>a</sup>	7.67 ± 0.68 <sup>b</sup>	56.03 ± 6.91 <sup>ab</sup>	6.00 ± 2.93 <sup>b</sup>
QS leaf	100	8.94 ± 0.02 <sup>a</sup>	8.50 ± 0.89 <sup>b</sup>	56.30 ± 5.12 <sup>b</sup>	7.40 ± 0.14 <sup>a</sup>
	200	8.97 ± 0.26 <sup>a</sup>	13.67 ± 2.07 <sup>ab</sup>	44.87 ± 5.50 <sup>b</sup>	5.05 ± 0.52 <sup>a</sup>
QS branch	100	8.71 ± 0.35 <sup>ab</sup>	11.33 ± 3.71 <sup>ab</sup>	49.99 ± 7.89 <sup>b</sup>	7.96 ± 1.01 <sup>ab</sup>
	200	8.59 ± 0.17 <sup>ab</sup>	14.33 ± 0.48 <sup>ab</sup>	46.05 ± 7.93 <sup>b</sup>	8.70 ± 2.72 <sup>b</sup>

- 1) Values are expressed mean ± S.D. for groups of six experiments.
- 2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

로 furosemide군과 유의한 결과를 나타내었다.

혈액 및 뇨의 생화학적 분석으로 미루어 보아 alfacalcidol과 ethylene glycol에 의해 결석이 유도 되었음을 확인하였고, 참가시나무 시료투여로 인하여 상당히 결과가 호전된 것으로 사료된다.

### 신장의 효소활성에 미치는 영향

Xanthine oxidase는 분자상의 산소를 수소(전자)수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매한다. 핵산에 함유되는 퓨린 화합물은 요산까지 분해되어 요 중에 배설된다. xanthine과 xanthine oxidase 반응의 생성물인 uric acid는 통풍의 원인이 되기도 한다.

Fig. 1은 신조직의 효소활성 cytosolic enzyme system에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. 정상군에 비하여 alfacalcidol과 ethylene glycol을 투여하여 신장결석을 유도한 control군의 xanthine oxidase의 활성이 증가하였다. 이에 반하여 furosemide군과 leaf 100, 200 mg/kg 투여군의 경우

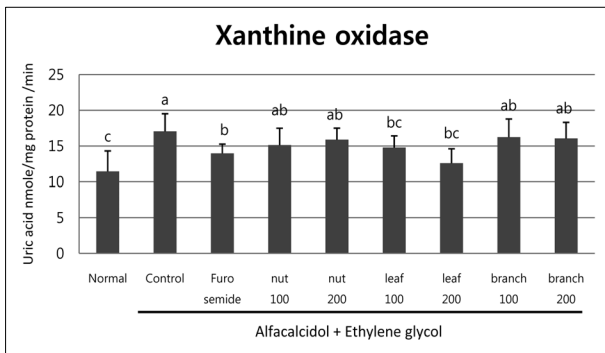


Fig. 1. Influence of *Quercus salicina* Blume Extract in renal cytosolic enzyme system activity on calcium oxalate urolithiasis model.

- 1) nut 100 : *Quercus salicina* Blum nut water extract treated 100 mg/kg, nut 200: *Quercus salicina* Blum nut water extract treated 200 mg/kg, leaf 100 : *Quercus salicina* Blum leaf water extract treated 100 mg/kg, leaf 200 : *Quercus salicina* Blum leaf water extract treated 200 mg/kg, branch 100 : *Quercus salicina* Blum branch water extract treated 100 mg/kg, branch 200 : *Quercus salicina* Blum branch water extract treated 200 mg/kg.
- 2) Control~branch 200: Alfacalcidol and ethylene glycol treated group.
- 3) Values are expressed mean  $\pm$  S.D. for groups of six experiments.
- 4) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

xanthine oxidase의 농도가 감소하는 경향을 보였고, 이는 정상군과 비슷한 수준으로 감소하는 것으로 미루어보아 leaf 군이 다른 투여군에 비하여 효과가 두드러지는 것을 확인할 수 있었다.

### 신장 조직의 Ca, Mg 함량

신장 조직 중 Ca, Mg 함량의 변동을 관찰하였다(Fig. 2). Ca, Mg 함량 모두 alfacalcidol과 ethylene glycol을 투여하여 신장결석을 유도한 대조군에서 가장 높게 나타났으며, leaf 200 mg/kg 투여군에서 정상군과 비슷한 함량을 나타내었다.

Ca함량의 경우 수치상 참가시나무 시료 처치군 전체에서 furosemide군과 비슷한 수치를 나타냄을 확인할 수 있었고, Mg함량의 경우 leaf 100, 200 mg/kg 투여군에서  $199.97 \pm 16.63$  ppm,  $207.98 \pm 20.23$  ppm으로 normal군과 비슷한 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

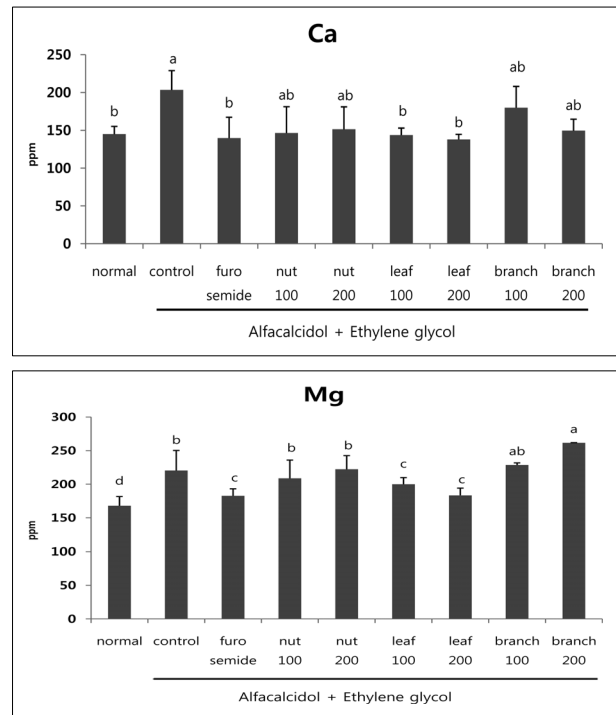


Fig. 2. Influence of *Quercus salicina* Blume in Kidney Ca, Mg concentration on calcium oxalate urolithiasis in rats.

- 1) Values are expressed mean  $\pm$  S.D. for groups of six experiments.
- 2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 신장 조직에 미치는 영향

Alfacalcidol과 ethylene glycol에 의해 신장결석을 유발한 흰쥐에 참가시나무 추출물을 투여한 후 조직의 변화를 광학현미경에서 비교 관찰하였다(Fig. 3).

이는 광학현미경에서 400배로 확대하여 사구체 및 핵등을 관찰한 결과이다. 그림에서 나타나는 바와 같이 정상군(A)과 비교 해봤을 때, alfacalcidol과 ethylene glycol에 의해 신장결석이 유도된 대조군(B)의 경우 신장의 사구체의 괴사가 일어났으며, 대조군에서 관찰되지 않았던 사구체의 형태가 참가시나무 시료투여군 모든군(D~I)에서 있으며 사구체의 형태가 개선되었다.

신기능 이상과 함께 광학현미경 검사에서 alfacalcidol 및 ethylene glycol의 투여로 인하여 근위 및 원위세뇨관의 팽범위한 괴사가 특히, furosemide군(C)과 QS leaf군인 F, G에서 사구체와 핵의 형태가 온전한 것으로 미루어 보아 앞선 실험의 결과들과 동일한 결과를 알 수 있었고, 참가시나무 잎 열수 추출물이 신장기능 향상에 큰 도움을 주는 것으로 사료된다.

조직학적 검사에서 apoptosis score 또는 acute tubular necrosis score(Ramesh G. Reeves WB. 2004)를 관찰하지는 않았으나, 추가 연구시에 이에 대한 면밀한 검토가 병

행이 된다면 조직괴사와 자멸사에 대한 영향 및 항산화제 사용으로 인한 세포독성의 회복에 대해 더 보완적인 정보를 제공할 수 있을 것이라 기대된다.

### 고 찰

현재 신장결석은 국내에서 100명당 3명의 유병률을 보이고 있으며, 서구는 이보다 높은 100명당 4~8명의 유병률을 보이고 있다. 이렇게 흔한 질환임에도 불구하고, 신장결석의 형성기전은 아직 완전하게 규명되어 있지 않다. 많은 학설이 대두되었고 여러가지 원인요소들이 복합적으로 상호작용하여 신장결석이 형성되는 것으로 추정하고있다. 주 요소로는 포화, 과포화, 결정화, 결정체의 성장과 응집, 결정체 축적이 있으며 이러한 단계의 결과물이 신장결석이라 할 수 있다. 신장결석 형성에는 여러가지 위험인자가 있다. 유전적 요인이 있으며, 여성보다 남성에서 약 2배정도 호발한다. 연평균 기온이 가장 높은 시기 1~2개월 후에 호발하는데 이는 땀으로 인한 소변농축으로 결정화가 쉽게되고, 어느정도 축적되는 시기가 반영된 것으로 보인다(Ye *et al.*, 2007). 신장결석의 가장 흔한형태는 수산칼슘석으로 전체 신장결석의 80~85%를 차지하며, 그 밖에 요산석,

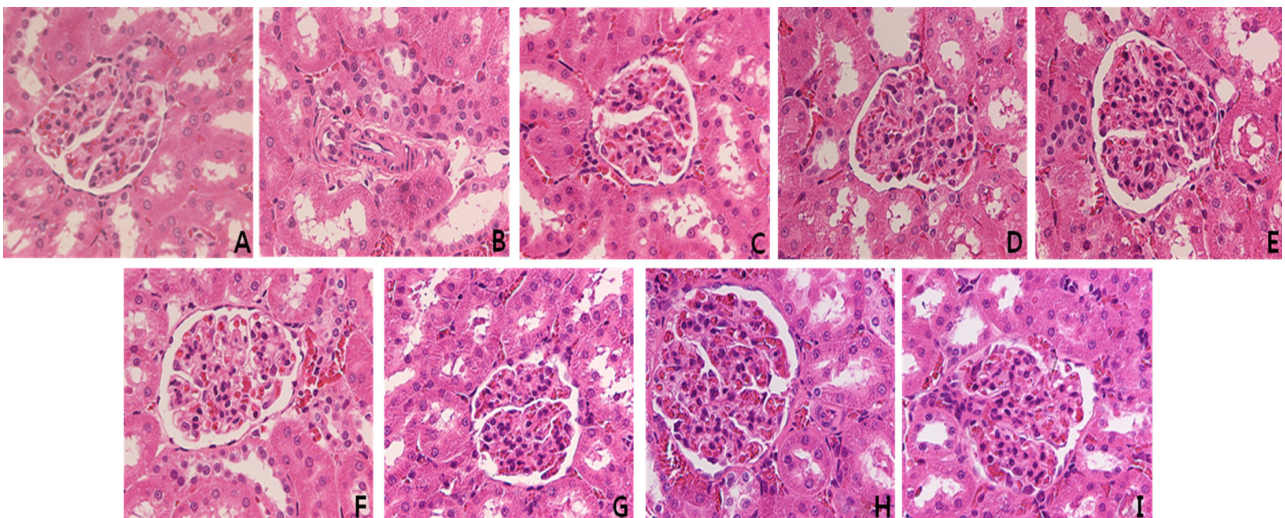


Fig. 3. A-D: Histological appearances of the kidney tissue in rat. (Hematoxylin and eosin, x400). (A) Kidney section from normal rats. (B) Kidney section from Alfacalcidol and ethylene glycol induced urolithiasis model. (C) Kidney section from furosemide (positive control) treated group. (D) Kidney section from QS nut 100 mg/kg treated group. (E) Kidney section from QS nut 200 mg/kg treated group. (F) Kidney section from QS leaf 100 mg/kg treated group. (G) Kidney section from QS leaf 200 mg/kg treated group. (H) Kidney section from QS branch 100 mg/kg treated group. (I) Kidney section from QS branch 200 mg/kg treated group.

스트루바이트석, 시스틴석 등이 있다(Goto *et al.*, 1967).

이 원리를 바탕으로 본 실험은 수산의 전구물질인 ethylene glycol을 경구로 투여하여 결석의 원인이 되는 물질을 증가시켰다. 특히 기존의 ethylene glycol 뿐만 아니라 vitamin D로 알려진 alfacalcidol을 함께 투여하는 방법으로 만성 신장결석을 유도하였다. 이후 참가시나무 추출물(잎, 열매, 가지)이 결석치료제인 furosemide와 같은 유효성이 있는지에 대하여 살펴보았다.

예비실험으로 참가시나무 잎, 열매, 가지 각각의 추출물을 투여한 후 단위투여독성을 통하여 안전성을 확인한 후 본 실험에 임하였다.

신장은 체액, 전해질 및 산-염기 상태를 조절하는 장기로, 혈중 노폐물을 제거하는 중요한 역할도 담당하며 여러 질환들에서 합병증으로 신장기능이 떨어지거나, 혹은 신장 자체가 침범되어 신장 기능에 영향을 받는다. 신기능 손상 정도를 파악하고, 치료에 어느 정도 반응하는지, 또 신대체 요법이 필요할것인지 등을 파악하고자 할 때, 몇가지 생화학적 검사로 신기능을 평가할 수 있다(Choi *et al.*, 2010).

요소는 주로 간에서 urea cycle 종말 대사물로 간, 신장 이외의 조직에서 생성된 ammonia를 glutamine으로 합성되어 간으로 운송된다. 간에서는 glutaminase의 작용으로 ammonia가 유리되고 이 ammonia와 이산화탄소로 carbamylphosphate가 합성된다. Carbamylphosphate는 요소회로로 들어가고 arginase의 작용에 의해 arginine으로부터 요소가 생성된다. 생성된 요소는 혈류로 들어가 사구체를 거쳐 요로 배설된다. 이 요소는 체액으로 방출되고 세포내외로 쉽게 확산된다(Uchida, K, 1974).

혈중요소질소(BUN)의 변동은 단백질섭취량, 요소의 합성 및 배설등 3가지 인자로 좌우되며 주로 요소 질소가 체내에서 증가하는 경우는 ammonia 생성이 증가하여 요소합성이 증가하는 예로 주로 대수술, 체내출혈, 악성종양, 기아, 고열, 화상, 갑상선 기능항진증, 췌장 괴사, 중증 감염증 등에서 조직 단백질의 이화항진이 일어나 증가되며 신장 기능 장애의 경우 현저히 증가되는 것으로 알려져 있다.

그리고 creatinine은 BUN과 함께 신장 기능의 중요한 지표이나 BUN은 신장이외의 다른 인자의 영향을 받기 쉬우므로 신장 기능의 지표(Cho, 1994, Neil *et al.*, 1975)로서는 creatinine이 활성도가 높은 점을 감안하여 신장결석을 확인할 목적으로 creatinine을 측정하였다.

Creatinine은 신장 실질 장애가 진행되면 내인성 삼투압

이뇨가 생겨 요소의 세뇨관 재흡수를 저해하여 creatinine, creatine, 요산 등에 비하여 상대적으로 뇨중 배설이 증가된다. 또 다른 신장기능의 지표로서 요산을 들수 있는데 요산은 세포핵의원형질에 있는 핵산대사로 인하여 생긴 것으로 혈중 요산은 골수, 근육, 간 등에서 형성된 후, 75%는 신장의 사구체에서 여과되어 오줌으로 배설되고 나머지는 담즙과 함께 장으로 배설된다. 요산은 통풍, 신장기능장애, 요관 결석의 원인이 되는 물질로서(Kalyani *et al.*, 2010) 기능을 한다.

정상군에 alfacalcidol과 ethylene glycol을 투여하였을 때 혈액 및 뇨중 요소질소, 요산 및 creatinine함량이 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 참가시나무 추출물을 oxalate를 유도한 세포에서 MTT 및 SOD의 저해효과가 있다는 보고(Manabu *et al.*, 2007) 및 ethylene glycol로 유도한 흰쥐의 신장결석에서 참가시나무 추출물이 뇨중 및 혈중에서 BUN, creatinine과 무기질(Ca, Mg)이 신장결석의 유도로 증가되던 것이 추출물을 14일간 처리하였을때, 현저히 억제된 결과와 유사하다(Manabu *et al.*, 2009). 특히, 저자들이 실험에서 사용한 용량(100, 200 mg/kg) 및 4주간 투여하였을 때의 수치가 유사하였으며, 이 결과를 바탕으로 xanthine oxidase의 활성을 관찰하였다.

Xanthine oxidase는 촉매로 작용하여 분자상의 산소를 수소(전자)수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid으로 산화시킨다. 핵산에 함유되는 퓨린 화합물은 요산까지 분해되어 뇨로 배설된다. Uric acid는 통풍의 원인이 되기도 한다(Choi *et al.*, 2010)

Xanthine oxidase 저해제는 퓨린대사에 큰 영향을 주지 않으면서 혈중 요산 양을 줄일 수 있어 요산혈중 치료제로 사용되어 왔고, 시판제제로는 allopurinol(hypoxanthine 유도제), lloxanthine 등(Stripe and Della, 1969)과 probenecid, colchicine 등이 알려져 있으나 이들은 대체로 치료제 내성유발, 항암제 대사억제, 재생불량성 빈혈 등의 부작용이 있다.

Xanthine oxidase 저해 효과를 갖는 천연물로는 감잎 추출물(Moon *et al.*, 2001), 우롱차(An *et al.*, 1992), 양파 껍질(Ra *et al.*, 1998) 등과 *Aspergillus* sp. F184(Park *et al.*, 2000) 등이 보고되었다.

실험에서 사용한 참가시나무 잎 열수추출물 또한 XO의 활성을 저해시켰다. 이러한 결과로 미루어 보아 정상쥐에 alfacalcidol과 ethylene glycol의 투여로 의하여 나타나

는 신장결석이 참가시나무 잎 등 열수추출물 동시투여로 xanthine oxidase반응을 억제하며 uric acid생성에 영향을 주는것으로 사료된다.

또한 positive control로 사용된 furosemide의 경우 강력 이뇨제에 속하는 약물로써 뇨의 농축, 회석기구를 억제하여 혈장과 거의 동일한 침투압의 뇨를 생성한다. 참가시나무 열수 추출물의 경우 furosemide군과 비슷한 양의 뇨를 얻었으며, uric acid수치 또한 유의한 결과를 얻었다.

이로써 참가시나무의 이뇨작용 또한 신장결석을 해소시켰으며 이러한 결과는 alfacalcidol과 ethylene glycol투여로 인한 신기능 이상과 함께 광학현미경검사에서 근위 및 원위세뇨관의 광범위한 괴사 또한 참가시나무 잎 열수 추출물 투여로 인하여 개선되었다.

이로보아 신장결석에 의한 참가시나무 열수추출물의 작용은 이뇨작용 및 요산의 생성억제로 인하여 신장결석을 개선하여 줄 것으로 사료된다.

### 적 요

참가시나무 열수 추출물은 강한 항산화제로 xanthine oxidase반응을 억제하며 uric acid생성에 영향을 주어 alfacalcidol과 ethylene glycol로 결석이 유도된 흰쥐에 따르는 혈중 및 뇨의 위험요소 감소시킨 것으로 추측된다. 또한 강력한 이뇨제인 furosemide군과 비슷한 유의성을 나타내었다. 따라서 참가시나무 잎 열수 추출물은 신장결석 예방과 치료를 위해 적합하다고 생각된다.

### 인용문헌

An, B.J., W.K. Kim, J.Y. Choi and I.B. Kim. 1992. Structure and isolation of xanthine oxidase inhibitor from oolong tea. Korean J. Food Sci. Technol. 24(6):558-562 (in Korean).

Bernard, Q., J.F. Thibault and P. Coussement. 1994. Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. LWT-Food Sci. Technol. 27(2):125-132.

Cho, J.Y., S.Y. Park, M.J. Shin, T.C. Gao, J.H. Moon and K.S. Ham. 2010. Isolation and identification of antioxidative compounds in fermented glasswort (*Salicornia herbacea* L.) juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39(8):1137-1142 (in Korean).

Cho, W.S. 1994. A study on relationship between urinary

stones patients and dietary intake in Korean people. Korean J. Food Nutr. 7(4):307-317 (in Korean).

Choi, J.W., H.O. Kang, Y.S. Jung, H. Rim and B. Hur. 2010. Effects of supplementation with a schizandrin C derivative DDB-mixed preparation (DWP-04) on antioxidant activity in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. J. Korean Nephrol. 29:3-16 (in Korean).

Kagchana, G. and P. Sundaramoorthi. 2008. *In vitro* studies of calcium mixed minerals growth in different growth faces and semiconductor laser induced suppression of nuclei strategy. Bull. Mater. Sci. 31(7):981-985.

Goto, K., S. Ito, F. Otani and J. Liu. 1967. Clinical effects of urocalun for upper urinary urolithiasis. Hinyokika Kyo 13(8):842-852.

Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 344 (8924) :721-724.

Ikegami, F., T. Sekine and Y. Fujin. 2001. Anti-dermatophyte activity of phenolic compounds in 'mokusaku-eki'. Yakigaku Zasshi 118(1):27-30.

Inoue, T. and H. Shiozaki. 1967. Clinical evaluation of Urocalun in urolithiasis. Hinyokika Kyo 13(11):848-852.

Jayakumari, S. and G.S. Rao. 2007. Effect of *Dichrostachys cinerea* (Linn.) root extract on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. Natural Product Sciences 13(3):180-185.

Jung, M.J., S.I. Heo and M.H. Wang. 2007. Comparative studies for component analysis in Acron powders from Korea and China. Korean. J. Pharmacogn. 38(1):90-94 (in Korean).

Jung, H.S., E.J. Lee, J.H. Lee, J.S. Kim and S.S. Kang. 2008. Phytochemical studies on *Astragalus* Root(3)-triterpenoids and sterols. Korean. J. Pharmacogn. 39(3):186-193 (in Korean).

Kalyani, D., A.T. Pawar, S.B. Chandrasekhar, S.B. Dighe and D. Goli. 2010. Protective effect of the hydro-alcoholic extract of *Rubia cordifolia* roots against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. J. Food Chem. Toxicol. 48:1013-1018.

Kim, J.I., H.H. Kim, H. Kim, S.U. Kim, K.T. Lee, I.H. Ham and W.K. Whang. 2008. Antioxidative compounds from *Quercus salicina* Blum stem. J. Arch. Pharm. Res. 31(3):274-278 (in Korean).

Kim, J.S., M.H. Uean, S.Y. Lee, J.H. Lee and S.S. Kang. 2009. Phytochemical studies on *Lonicera caulis*. Korean. J. Pharmacogn. 40(4):334-338 (in Korean).



- Kim, H.S., Y.S. Yoon and J.W. Cho. 2008. Quantitative analysis of flavonoids from *Salicomia herbacea* L. extract by LC-MS. Korean J. Medicinal Crop Sci. 16(4):231-237 (in Korean).
- Kim, H.J., S.W. Kim and C.W. Shin. 2000. Analysis of chemical composition in leaf and root of *Acorus calamus* L. Korean J. Food Sci. Technol. 32(1):37-41 (in Korean).
- Kim, H.H., M. Jo, C. Kwak, S.S. Jeon and S.W. Kim. 1996. Development of animal model of nephrolithiasis. Korean J. Urol. 37(3):223-240 (in Korean).
- Kim, M.Y., J.H. Yi, Y.Y. Hwang, K.S. Song and M.R. Jun. 2008. Isolation and identification of antioxidant substances from the stems of Butterbur (*Petasites japonicus*). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37(8):979-984 (in Korean).
- Lee, M.H., J.H. Jeong and M.J. Oh. 1992. Antioxidative activity of gallic acid in Acorn extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 21(6):693-700 (in Korean).
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Rendall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:26-30.
- Luciana, G., A.R. Maria, M. Valentina, M. Nicoletta, R. Anna and G. Maurizio. 2011. Vitamin D receptor activators and clinical outcomes in chronic kidney disease. Int. J. Nephrol. 2011:1-13.
- Manabu, T.M., M. Katsuhito, N. Kumiko, T. Mitsushi and S. Koji. 2007. Reduction in oxalate-induced renal tubular epithelial cell injury by an extract from *Quercus salicina* Blume/*Quercus stenophylla* Makino. J. Urol. 35:295-300.
- Manabu, T.M., S. Koudai, M. Katsuhito, T. Tatsuro, H. Masaya, N. Kumiko, O. Michiko, T. Mitsushi and S. Koji. 2009. Inhibitions of urinary oxidative stress and renal calcium level by an extract of *Quercus salicina* Blume/*Quercus stenophylla* Makino in a rat calcium oxalate urolithiasis model. Int. J. Urol. 16:397-401.
- Masayuki, K., N. Yukio, K. Mika, A. Yusuke, N. Naki, S. Hiroyoshi, Y. Kunio, N. Kuniyoshi and I. Tomohiko. 2008. Low dose tamsulosin for stone expulsion after extracorporeal shock wave lithotripsy: Efficacy in Japanese male patients with ureteral stone. Int. J. Urol. 15(6):495-498.
- Mayer, W., H. Seitz and J.C. Jochims. 1969. On tannin compounds from the wood of chestnut and oak. IV. The structure of castalagin. Justus Liebig's ANN. Chem. 721: 186-193.
- Meng, Z., Y. Zhou, J. Lu, K. Sugahara, S. Xu and H. Kodama. 2001. Effect of five flavonoid compounds isolated from *Quercus dentate* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins. J. Clin. Chim. Acta 306(1):97-102.
- Michael, L. and C. Gregory. 2000. Effects of calcium and magnesium on urinary oxalate excretion after oxalate loads. J. Urol. 163:1565-1569.
- Moon, S. H., M.K. Lee and K.S. Chae. 2001. Inhibitory effects of the solvent fractions from Persimmon leaves on xanthine oxidase activity. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 14(2):120-125 (in Korean).
- Moon, J.Y. and S.H. Cho. 1998. Studies on the distribution of polyphenols in the parts of *Quercus acutissima*. Anal. Sci. Technol. 11(6):478-484 (in Korean).
- Nam, J.H., S.Z. Choi and K.R. Lee. 2004. Phytochemical constituents of *Synurus excelsus*. Korean J. Pharmacogn. 35(2):116-121 (in Korean).
- Neil B., C. Carmelo, C. Dichoso and C.J. Eugene. 1975. Blood urea nitrogen and serum creatinine; physiology and interpretations. J. Urol. 5(5):583-588.
- Olah, N.K., R. Laura, M. Cristina, H. Daniela and G. Simion. 2003. Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) hydroalcoholic extracts. J. Pharm. Biomed. Anal. 33:117-123.
- Park, J.C. and S.H. Kim. 1995. Flavonoid analysis from the leaves of *Eucommia ulmoides*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 24(6):901-905 (in Korean).
- Park, H.W. and D.K. Kim. 2005. Tannin components from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. Korean J. Pharmacogn. 36(3):191-194 (in Korean).
- Park, S.H., S.W. Yoon, J.M. Park, S.H. Ohk, J.H. Yu and D.H. Bai. 2000. Studies on xanthine oxidase inhibitor produced from *Aspergillus* sp. F184. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28(2):92-26 (in Korean).
- Pote, S., S. Sunthon and P. Vitoon. 1998. An indirect method for urinary oxalate estimation. Clinica Chimica Acta. 273:59-68.
- Ra, K.S., S.H. Chung, H.J. Suh, J.Y. Son and H.K. Lee. 1998. Inhibitor of xanthine oxidase from onion skin. Korean J. Food Sci. Technol. 30(3):697-701 (in Korean).
- Rajagopalan, V., I. Fridovich and P. Handler. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. In purification and properties. J. Biol. Chem. 237(92):922-928.
- Ramesh, G. and W.B. Reeves. 2004. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor alpha. Kidney Int. 65:490-499.

- Sung, I.S., E.M. Park, M.K. Lee, E.K. Han, J.Y. Jang and S.Y. Cho. 1997. Effect of Acron extracts on the antioxidative enzyme system. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26(3):494-500 (in Korean).
- Sung, I.S., M.J. Kim and S.Y. Cho. 1997. Effect of *Quercus acutissima carruthers* extracts on the lipid metabolism. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26(2):327-333 (in Korean).
- Stripe, F. and C.E. Della. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). J. Biol. Chem. 244:3855-3863.
- Surachet, W., Z.H. Rayhan, Y. Chatchai, S. Pote, O. Yoshihide and S. Seiichi. 2011. Effects of *Orotosiphon Grandiflorus*, *Hibiscus sabdariffa* and *Phyllanthus amarus* extracts on risk factors for urinary calcium oxalate stones in rats. J. Urol. 185: 323-328.
- Uchida, K. and K. Tejima. 1974. Use of a mixture of a phenol reagent and urease solution in the urease indophenols method analysis of blood urea nitrogen. Rinsho. Byori. 22(10):207-217.
- Ye, S.J., E.S. Yoo and Y.K. Park. 2007. Analysis of urinary stone components during the last two decades. Korean J. Urol. 48(12):1285-1288 (in Korean).

(Received 14 May 2012 ; Revised 2 July 2012 ; Accepted 25 October 2012)