

음곡 상응부위에 시술한 방기 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 염증성 신손상에 미치는 영향

김기춘 · 임윤경

대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실

The Effect of *Stephaniae tetrandrae Radix* Herbal-acupuncture at KI10 on LPS Induced Nephritis in Rats

Ki-Choon Kim, Yun-Kyoung Yim

Department of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives : This study aimed to evaluate the effects of *Stephaniae tetrandrae Radix* Herbal-acupuncture(SR-HA) at KI10(Umgok) on nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rats. **Methods :** Male SD rats (n=32) were allocated to four groups; normal, LPS, saline, and SR-HA. The rats in the LPS, saline, and SR-HA groups were injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg) to induce nephritis. The rats in the saline and SR-HA groups were treated with saline injection and SR-HA respectively at KI10 three times a week. To evaluate the effects of SR-HA at KI10 on nephritis in rats, the authors evaluated the numbers of WBC and neutrophils in blood, and the levels of creatinine, TNF- α , CINC-1 in serum, creatinine, total protein in urine and renal MPO. **Results :** SR-HA at KI10 significantly inhibited the increase of WBC and neutrophils in blood, TNF- α , CINC-1 in serum, creatine, total protein in urine and MPO in kidney of LPS-stimulated rats. **Conclusions :** SR-HA at KI10 may have therapeutic effects on nephritis in LPS-stimulated rats.

Key words : nephritis, herbal-acupuncture, KI10, *Stephaniae tetrandrae Radix*, LPS

서론

신장은 1쌍의 암적색을 띤 완두형의 장기로서 후복막장기 중 하나이다. 혈관이 발달되어서 심장으로부터 1분간 박출되는 혈액총량의 20~25%가 공급되어 노를 형성하여 체액의 양과 전해질조성을 정상으로 유지하는데 가장 핵심적인 역할을 담당한다. 또한 대사로서 생긴 노폐물, 독소 및 독소의 대사산물을 여과하고 체외배설하며, 세포외액의 양과 혈압을 조절하는 등의 역할로 체내환경의 항상성을 유지하는 장기로 여과와 재흡수의 기능이 있고, 타 장기에 비해 많은 혈류를 받아들여므로 독성물질에 의한 손상에 취약하

다¹⁾.

급성사구체신염은 갑자기 시작하는 혈뇨, 단백뇨와 더불어 사구체여과율의 감소로 인하여 염분과 수분이 체내에 축적되는 것이 특징으로 궤뇨, 폐울혈, 고혈압, 부종 등을 초래하며 주로 감염이나 전신질환에 의해 면역글로불린과 보체성분이 사구체내에 침착하여 발생한다¹⁾. 사구체 기저막에 침착된 면역복합체나 세균에 대한 항체는 면역시스템을 활성화시켜 사구체를 손상시킴으로써 혈뇨, 단백뇨 등을 유발하고 여과기능의 손상까지 진행되면 궤뇨와 요독증이 발생한다²⁾.

防己(*Stephaniae tetrandrae Radix*, SR)는 防己과(Menisper-

Received December 12, 2013, Revised December 17, 2013, Accepted December 17, 2013

Corresponding author: Yun-Kyoung Yim

Department of Meridian and Acupoint, College of Korean 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@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.

maceae)에 속한 다년생 초질등본인 粉防己의 뿌리를 건조한 것으로, 가을에 채취하여 코르크층을 제거하고 건조한다. 性은 寒하고 無毒하며 味는 苦辛하며 歸經은 膀胱, 腎, 脾經이며 祛風除濕, 利水消腫, 行氣止痛하는 효능이 있다³⁾.

음곡(KI10)은 足少陰腎經의 合水穴이며 足少陰腎經, 衝脈, 陰維脈의 交會穴로서, 補腎培元, 調經利水的 효능이 있어 遺尿, 小便淋瀝, 小便黃, 小便難등을 치료한다⁴⁾.

약침이란 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종으로 經絡論과 氣味論을 결합한 치료기술이다. 약침요법은 환자의 체질, 질병상태에 맞춰 경혈을 자극하는 물리적인 자극 뿐 아니라, 한약의 기미를 포함한 화학적 자극을 부가적인 치료수단으로 사용하여 자침과 약물의 효과를 동시에 얻을 수 있다⁵⁾.

음곡에 시술한 약침이 신장염에 미치는 영향에 관한 기존의 실험 연구로는 차전자약침⁶⁾ · 목통약침⁷⁾ · 편측약침⁸⁾ · 구맥약침⁹⁾ 등을 이용하여 유효한 효과를 보인 연구가 보고된 바가 있고, 防己煎탕액을 투여하여 활성화된 비만세포로부터 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 분비를 억제한다는 연구¹⁰⁾가 보고된 바가 있으나 防己약침(*Stephaniae tetrandrae Radix* herbal acupuncture; SR-HA)을 이용한 신장염에 효과에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자는 음곡에 시술한 防己약침이 독소에 의한 염증성 신손상에 미치는 영향을 알아보고자 防己약침액(*Stephaniae tetrandrae Radix* herbal acupuncture solution, SR-HAS)을 만들어 흰쥐의 음곡(KI10) 상응부위에 약침시술을 하고 lipopolysaccharide(LPS)로 염증성 신손상을 유도하여 혈액분석, 소변분석 및 신장내 myeloperoxidase(MPO)활성평가 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Table 1. Reagents

Reagent	Manufacturer	Country
Phosphate buffer saline(PBS) HBSS	Sigma	USA
Lipopolysaccharide(LPS) Gum-sucrose		
Absolute EtOH		
Antibiotics FBS	Hyclone	
BCA kit	BD	
TNF- α ELISA kit	Oxford	
Creatinine assay kit	Bio Assay Systems	
CINC-1 ELISA kit	ALPCO	
MPO ELISA kit	Cellscience	
Ethyl ether		

방 법

1. 재료

1) **동물:** 동물은 6주령의 웅성 SD rat(180±10 g)을 (주)대한바이오링크(한국)에서 공급받아 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 실험 당일까지 고품사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하고, 실험실은 실온(22±2°C)과 습도 50~60%을 유지하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리규정을 준수하여 시행하였다.

2) **약재:** 본 실험에 사용된 방기(*Stephaniae tetrandrae Radix*; SR)는 대전대학교 한방병원에서 구입하여 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

(1) **시약:** 본 연구에 사용된 시약은 Table 1과 같다.

(2) **기기:** 본 연구에 사용된 기기는 Table 2와 같다.

2. 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 방기 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 90% 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 80% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 70% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 방기 55 g으로부터 얻은 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 날렸을 때 건조분말은 3.829 g이었다(수율 6.96%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거

Table 2. Instruments

Instrument	Manufacturer	Country
Rotary evaporator	Eyela	Japan
ELISA reader	TARAN	Canada
Sonicate	Fisher	USA
Metabolic cage	B&P	Korea
Cytological centrifuge	Hanil	
Micro centrifuge		

하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 10%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Fig. 1).

3. 염증성 신손상 동물 모델

6주령 수컷 SD rat에 LPS(2 mg/kg)를 복강에 투여하여 염증성

신손상을 유도하였다¹⁾. 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. 각 실험군의 나머지 3마리로부터 LPS 투여 후 12시간 동안 소변 sample을 채취하였다(Fig. 2).

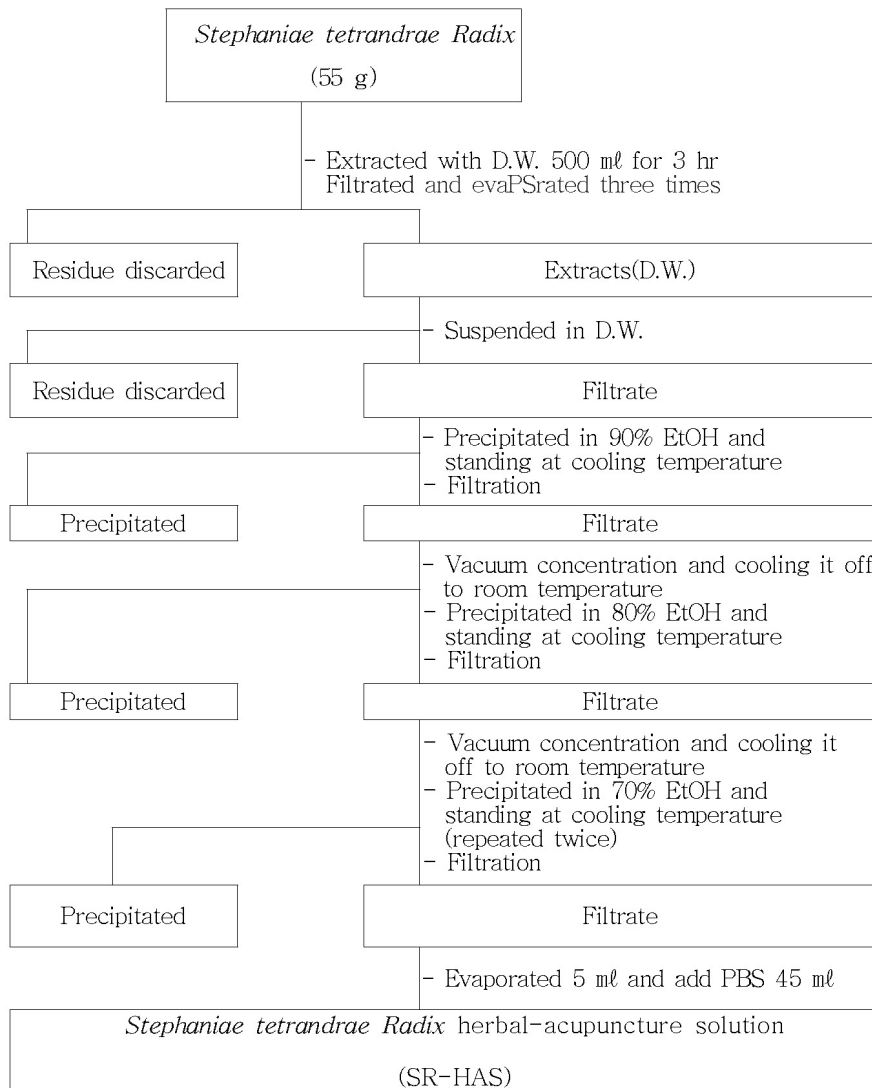


Fig. 1. Manufacturing procedure of *Stephaniae tetrandrae Radix* herbal acupuncture Solution.

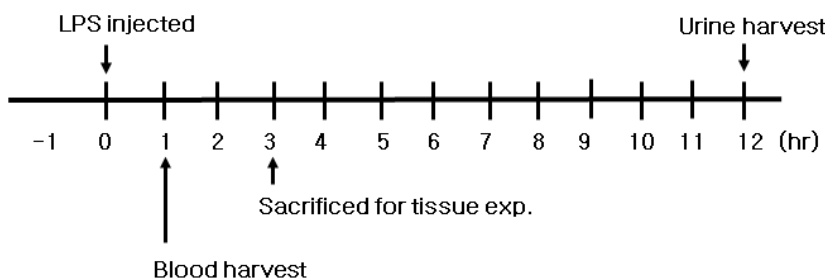


Fig. 2. Experimental procedure.

4. 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), saline군(saline), 방기약침군(SR-HA)의 4군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, saline군, 방기약침군은 각각 2 mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. Saline군, 방기약침군은 LPS 투여 1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI10) 상응부위에 saline 주입 또는 방기약침 처치를 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) Saline군(saline): 실험 전 1 주일간 saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군.
- 4) 방기약침군(SR-HA): 실험 전 1 주일간 10%의 방기 약침액 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군.

5. 결과 분석

1) **혈액 분석:** LPS 처리 1시간 뒤, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 심장채혈법으로 각 동물에서 4 ml의 혈액을 채취하였다. (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 WBC 및 WBC 중 neutrophils의 비율을 측정하였으며, 혈청 TNF- α , cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1(CINC-1), creatinine의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

2) **소변 분석:** Metabolic cage에서 12시간동안 소변을 채취하여, 배뇨량을 측정하고 뇨 중 total protein과 creatinine 농도를

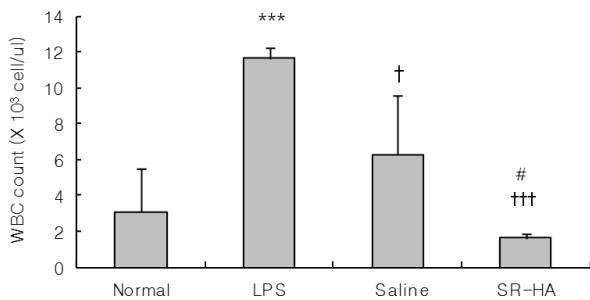


Fig. 3. Effect of SR-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats. Data were expressed as mean±SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI10, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10. *** p < 0.001 compared to normal group by Kruskal-wallis test. ††† p <0.001, † p < 0.05 compared to LPS group by Kruskal-wallis test. # p < 0.01 compared to saline group by Kruskal-wallis test.

kit를 이용하여 측정하였다.

3) **신장 내 염증활성 평가:** LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.01% sodium azide가 첨가된 0.1 M phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 sonicate하여 잘게 간 후, 2,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80°C에서 보관하였다가 ELISA kit을 이용하여 MPO의 농도를 측정하였다.

4) **통계분석:** 통계분석은 SPSS(ver 18.0 KO)를 이용하였으며, 결과값은 평균±표준편차로 나타내었다. 실험 결과는 Kruskal-wallis test를 이용하여 분석한 후 Mann Whitney U test를 이용하여 각 군간 차이를 확인하였다. 신뢰도 95% 이상(p <0.05)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈액학적 분석

Rat의 혈액을 채취하여 WBC의 수와 WBC 중 neutrophil의 비율을 측정하였다.

1) **WBC:** LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. Saline군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다. 방기약침군의 혈중 WBC는 LPS군 및 saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

2) **Neutrophil:** 정상군, LPS군, saline군의 WBC 중 neutrophil 비율은 유의한 차이가 없었다. 방기약침군에서는 LPS군에 비하여 WBC 중 neutrophil 비율이 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

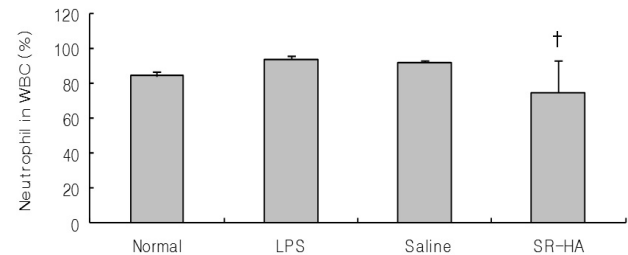


Fig. 4. Effect of SR-HA on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats. Data were expressed as mean±SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI10, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10. † p <0.05 compared to LPS group by Kruskal-wallis test.

2. Blood chemistry

Rat의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후, 혈청 creatinine, TNF- α 그리고 CINC-1의 농도를 측정하였다.

1) **Creatinine:** LPS군과 saline군에서는 정상군에 비하여 혈청 creatinine이 유의하게 증가하였다. 방기약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 creatinine 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

2) **TNF- α :** LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 TNF- α 가 유의하게 증가하였다. Saline군과 방기약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

3) **CINC-1:** LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. Saline군 및 방기약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

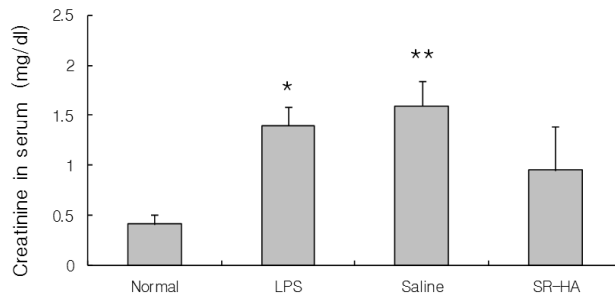


Fig. 5. Effects of SR-HA on serum creatinine level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD(n=5). Normal : normal SD rat, HJ : oral administration with HJ(0.5 mg/ml, 1 ml), LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline (200 μ l/rat) injection at KI10, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10. ** p <0.01, * p <0.05 compared to normal group ANOVA test.

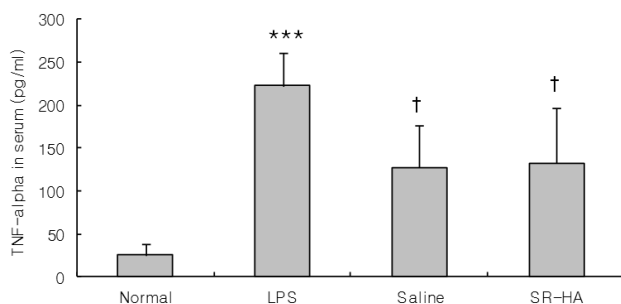


Fig. 6. Effects of SR-HA on serum TNF- α level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI10, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10. *** p <0.001 compared to normal group by Kruskal-wallis test, † p <0.05 compared to LPS group by Kruskal-wallis test.

3. 소변 분석

LPS 투여 후 12시간 동안 rat의 소변을 채취하여 소변 양을 측정하고, 뇨 중 creatinine과 total protein의 농도를 분석하였다.

1) **이뇨 활성:** LPS군과 saline군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 유의하게 감소하였다. 방기약침군에서는 saline군에 비하여 배뇨량이 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

2) **Creatinine:** LPS군과 saline군의 뇨 중 creatinine 농도는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 방기약침군에서는 saline군에 비하여 뇨 중 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

3) **Total protein:** LPS군에서는 정상군에 비하여 뇨 중 total protein이 유의하게 증가하였다. 방기약침군의 뇨 중 total protein은 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

4. 신장 내 염증활성

LPS군 및 saline군은 정상군에 비하여 renal MPO가 유의하게

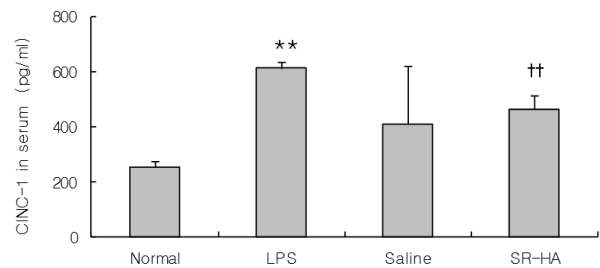


Fig. 7. Effect of SR-HA on urinary volume in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI10, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10. ** p <0.01, †† p <0.01 compared to normal group by Kruskal-wallis test, †† p <0.01 compared to LPS group by Kruskal-wallis test

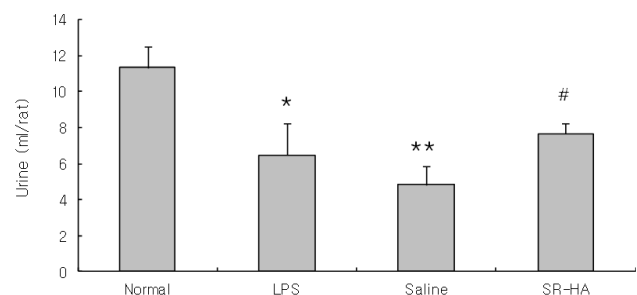


Fig. 8. Effect of SR-HA on urinary volume in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at KI10, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10. ** p <0.01, * p <0.05 compared to normal group by Kruskal-wallis test, # p <0.05 compared to saline group by Kruskal-wallis test.

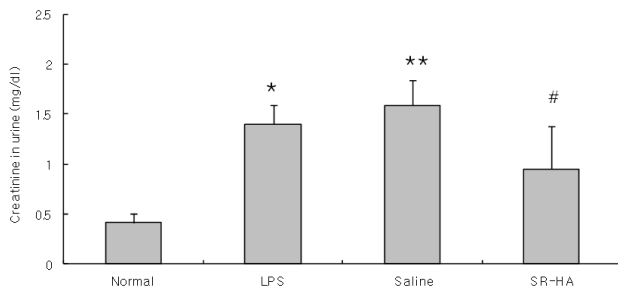


Fig. 9. Effects of SR-HA on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean±SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at K110, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μl/rat) at K110. ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ compared to normal group by Kruskal-wallis test, # $p < 0.05$ compared to saline group by Kruskal-wallis test.

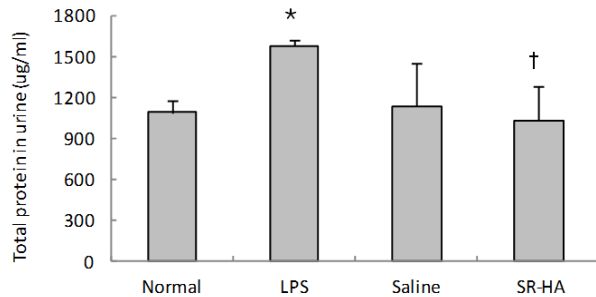


Fig. 10. Effects of SR-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean±SD(n=3). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at K110, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μl/rat) at K110. * $p < 0.05$ compared to normal group by Kruskal-wallis test. † $p < 0.05$ compared to LPS group by Kruskal-wallis test.

증가하였다. 방기약침군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

고 찰

신장은 후복막부에 11흉추와 2요추 사이의 좌우에 위치하는 완두콩 모양의 장기¹⁾로 얇은 치밀조직의 피막에 의하여 싸여 있다. 여과장치인 사구체의 집합으로 혈액 중에 축적된 노폐물을 여과하여, 소변으로 배출하는 장기이다. 그러나 면역복합체나 그 외 여러 가지 원인에 의하여 사구체에 염증이 일어나면 여과기능이 약화되어 노폐물의 배출이 감소하게 되어 체내에 축적된다¹¹⁾.

염증은 조직의 상처나 병리적 미생물의 침입으로 촉발된 혈관이

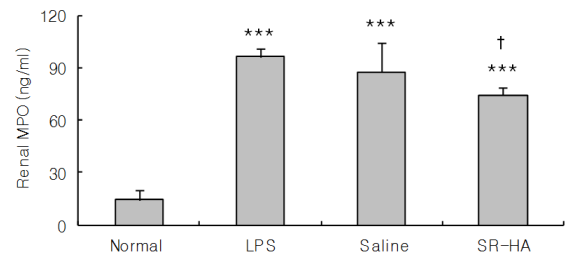


Fig. 11. Effects of SR-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean±SD(n=5). Normal : normal SD rat, LPS : LPS(2 mg/kg) challenge, Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at K110, SR-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and SR-HA(10%, 200 μl/rat) at K110. *** $p < 0.001$ compared to normal group by Kruskal-wallis test, † $p < 0.05$ compared to LPS group by Kruskal-wallis test.

완, 투과도 증가, 화학주성으로 이루어진 복합적인 사건들의 결과이다¹²⁾.

LPS는 그람음성박테리아 세포벽을 구성하는 강력한 면역활성화 인자로서 T세포의 분열과 성숙 및 분화를 자극하고 대식세포를 활성화하며, 활성화대식세포는 반응성 대사산물, nitric oxide, eicosanoid, 사이토카인 등을 생산하고 사구체 혈류변화를 유도하여 신손상을 일으킬 수 있으며, 활성화대식세포가 분비하는 IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, 등의 cytokine¹³⁾은 백혈구의 침윤 및 활성화에 관여하여 신손상을 유도한다¹³⁾.

특히 IL-8은 호중구에 강한 화학주성인자로 작용한다. 또 LPS는 메산지움 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며 메산지움 세포와 tubular epithelial cell에 Fas발현을 증가시킴으로써 직간접적으로 신장손상을 초래한다¹⁴⁻¹⁶⁾.

다형핵백혈구에서 분비되는 myeloperoxidase는 양성전하를 가져 기저막에 쉽게 침착되고 여기에 H₂O₂와 같은 산소 라디칼과 할로젠 화합물이 결합되어 독성물질이 생성됨으로써 기저막을 직접 손상시키며, 대식세포는 oxidant와 protease를 분비하여 기저막을 손상시키고, 섬유소 및 반월체를 형성시키며 cytokine 및 성장인자를 분비하여 사구체세포에서 세포외기질형성을 자극할 수 있다¹⁷⁾.

본 실험에서는 흰쥐에 LPS를 복강투여하여 신장손상을 유발하였다. 이는 사람에게 있어서 신장염에 해당하는 병중에 대한 방기약침의 효과를 알아보기 위한 기초실험으로 흰쥐에 LPS를 투여하여 염증성 신손상을 유발한 병태모델을 만들었다. 기존 연구 보고⁶⁻⁹⁾를 근거로 하여 혈액 채취는 LPS 투여 1시간 후에 시행하였고, 신장적출은 LPS 투여 3시간 이후에 시행하였다. 그리고 LPS 투여 후 12시간 동안 소변량을 측정하였다.

WBC는 호중구, 호산구, 호염기구, 림프구, 단핵구 등으로 구성

되며, 골수에서 유래한다¹⁸⁾. Neutrophil은 골수에서 생산되어 방출된다. 감염에 반응해 평소보다 더 많은 양의 neutrophil을 방출하여, 순환하는 특성으로 인해 감염이 있는 곳에 가장 먼저 도달하며, 증가되어 감염의 지표로 사용된다¹²⁾.

염증의 부산물은 혈장인자 및 세포와 상호작용하여 호중구를 감염된 지역으로 유인하는 화학주성을 발현하는데, 호중구는 이 화학주성에 의해서 호중구가 항원에 부착한 후 증가된 운동성으로 즉각적인 세포내 유입, 즉 탐식작용을 한다¹⁸⁾.

본 실험에서 흰쥐의 혈액을 채취하여 혈중 WBC 수를 분석한 결과 saline군에서는 LPS군에 비해 유의한 감소를 보였고, 방기약침군에서는 LPS군과 saline군에 비해 WBC 수가 유의하게 감소하였다(Fig. 3). Saline군에서 LPS군에 비하여 WBC 수가 감소한 것은 음곡의 경혈자극이 영향을 미친 것으로 추정된다. 한편, 방기약침군에서 saline군에 비해 WBC 수가 유의하게 감소한 것은 防己의 약리적 작용에 의한 것으로 사료되며, 따라서 음곡방기약침은 음곡의 경혈자극과 방기의 약리작용이 상호 협조적으로 작용하여 신장에서의 염증을 억제한 것으로 추정된다.

혈중 백혈구 중 neutrophil 비율도 LPS군에 비해 방기약침군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 4). 이로 보아 음곡 防己약침이 LPS로 유도된 초기 혈액학적 염증반응을 억제하는데 의미있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

TNF- α 는 proinflammatory cytokine으로 세균감염이나 내독소의 자극을 받아 대식세포에서 분비된다^{19,20)}. TNF- α 는 혈관투과도를 증가시켜 혈관을 확장시키고, 대식세포를 자극하여 IL-1, IL-6, IL-8 등의 cytokine를 분비한다²¹⁾. CINC-1은 IL-8 계열의 하나로 이를 측정하여 neutrophil의 활성화 정도를 평가할 수 있다²²⁾. 본 실험에서 혈중 TNF- α 는 방기약침군 및 saline군에서 LPS군에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 6). 또한 CINC-1도 saline군과 방기약침군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 7). 그러나 방기약침군에서 saline군에 비해 혈중 TNF- α 와 CINC-1에 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 이는 방기약침의 효과보다는 음곡이라는 경혈 자체의 효능이 더욱 크게 작용한 것으로 보인다.

신장은 혈액을 여과하고, 순환혈액량과 혈압을 유지하며, 기타 독성물질을 소변으로 배출하는 장기이다. 급성신장염은 신장에의 급성 염증에 의하여 육안적 혹은 현미경적 혈뇨와 단백뇨, 부종, 고혈압이나 사구체 여과율 감소 등 급격한 신기능 악화에 의한 증상이 출현한다¹⁾.

본 실험에서 LPS군의 배뇨량은 normal군에 비하여 유의하게 감소하였으며, 방기약침군에서는 LPS군에 비하여 배뇨량이 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

Creatinine은 인산염과 같이 근육에서 생기며 creatinine배설량은 근육량에 비례하여 일정량이 생성되어 오로지 신장을 통해서만 체외로 배설된다. 그러므로 근육량이 일정하다면 사구체의 기능에 의해서만 그 양이 변화하기 때문에 혈청 creatinine 수치 역시 신기능의 지표가 된다¹⁾.

방기약침군에서 혈청 creatinine의 양은 LPS군 및 saline군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었으며(Fig. 5), 뇨 중 creatinine은 LPS군 및 saline군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

신장기능 이상으로 인한 사구체 여과에 문제가 생기면 사구체에서 빠져나오는 뇨 중 단백량이 증가하게 된다¹⁾. 본 실험에서 뇨 중 total protein은 LPS군에 비해서 방기약침군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

이상과 같이 방기약침군에서 LPS군에 비하여 배뇨량이 증가하고, 뇨 중 creatinine과 total protein이 감소한 것으로 볼 때, 음곡 防己약침이 급성신장염의 진행에 따라 유발되는 신장여과 기능의 손상을 억제하는 데 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

MPO는 neutrophil의 활성을 측정하는데 사용되는데, 염증질환의 진단지표와 함께 호중성 백혈구의 면역 염색표식자로도 활용되고 있다²³⁾. 본 실험에서 방기약침군의 신장내 MPO 활성이 LPS군에 비하여 유의하게 감소한 것은 음곡 防己약침이 염증성 신손상의 신장실질 내 염증을 유의하게 억제하였음을 의미한다고 할 수 있다(Fig. 11).

이상의 결과를 요약하면 음곡 防己약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 염증성 신손상에 대하여 혈중 WBC 수와 백혈구 중 neutrophil 비율의 증가를 억제하였고, 혈청 내 TNF- α , CINC-1의 증가를 억제하였으며, 소변 내의 creatinine과 total protein의 증가를 억제하였고, 신장실질 내 MPO 활성을 유의하게 억제하였다.

이상을 토대로 음곡 防己약침은 동물모델에서 급성 염증성 신손상 초기단계의 염증 및 신장기능 저하를 억제하는 것으로 확인되었다.

본 연구는 실험상의 한계로 인하여 약침 시술 후 질병유발을 하였다. 향후 실질적인 신장염 치료에 대한 효과를 확인하기 위해서는 질병 유발 후 약침 시술의 효과를 확인할 수 있는 동물실험 및 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

음곡(KI10)에 시술한 防己약침이 LPS로 유도된 염증성 신손상 모델 흰쥐에 미치는 영향을 알아보고자 防己약침을 음곡에 시술한 후 LPS를 투여하여 염증성 신손상을 유발시키고 혈액분석, 혈청분

석, 소변분석, 신장내 염증활성 평가를 통해서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 방기약침군에서 LPS군에 비해 혈중 WBC 수, WBC 중 neutrophil 비율, 혈청 TNF- α , 혈청 CINC-1, 뇨 중 total protein 및 신장 내 MPO 활성이 유의하게 감소하였다.

2. 방기약침군에서 saline군에 비해 혈중 WBC 수와 뇨 중 creatinine이 유의하게 감소하였고, 배뇨량이 유의하게 증가하였다.

이상의 결과 음곡 防己약침은 급성 염증성 신손상에서 염증 및 신장기능 저하를 억제하여, 신장염 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

References

- Du HK. Oriental Kidney System Internal Medicine. Seoul: Sung Bo Sa. 2003 : 226, 237, 247, 256-7, 312, 334-5, 360-2, 402-4.
- Russel CJ. Claude B, Fred P. Cecil textbook of medicine. 20th ed. Philadelphia : Saunders. 1996 : 552, 575-7.
- Committee of Korean Textbook Publisher. Herbology. 6th ed. Seoul: Yeong Lim Sa. 2000 : 263-4.
- Meridian & Acupoint Compilation Committee of Korean Oriental Medical Colleges. Principles of Meridian & Acupoint (Sang). 6th ed. Taejeon : JongRyeoNaMu. 2012 : 634-6.
- Korean Pharmacopuncture Institute. Pharmacopuncturology 2th ed. Seoul : Elsevier Korea L.L.C. 2011 : 3.
- 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.
- Kang CE, JH. and Lee HY. Anti-inflammatory effect of akeniae lignum parmacopuncture at KI10 on LPS-induced acute nephritis in rats. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. 2012 ; 29(3) : 41-53.
- Yim YK. Anti-inflammatory Effect of Polygoni Avicularis Herba Herbal-acupuncture at KI10 on LPS-induced nephritis in rats. Journal of Korean Acupuncture. 2012 ; 29(4) : 598-603.
- Kim KM, Lee HY, 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.
- Kim DH, Song BK, Lee EJ, Kim HK. Inhibitory effect of mase cell-mediated anaphylactic reactions and tumor necrosis factor-a production by aqueous extract of sinomenium acutum stem. Journal of Korean Oriental Med. 2000 ; 20(2) : 52-9.
- Song KY, Ji JK, Ham UK. Core Pathology. Seoul : Korea Medical Book Publishing company. 1998 : 573.
- Richard AG, Thomas JK, Barbar A. Osborne. Immunology. 4th ed. New York : W.H. freeman and Company. 2000 : 9, 44-5.
- Seoul Nation univerisity Collage of Medicine Publishing Committe, Nephrourology. Seoul : Seoul National university Publishing Committe. 2005 : 213-4.
- Glaiser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock, Pathogenesis. Lancet. 1991 ; 338 : 732-6.
- Ohmori Y, Hamilton TA. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. Biochemical and Biophysical Research Community. 1990 ; 168 : 1261-7.
- Tannenbaum CS, Koemer TJ, Jansen MM, Hamilton TA. Characteriation of lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression. Journal of Immunology. 1988 ; 140 : 3640-5.
- Korean Society of Nephrology, Clinical Nephrology, Seoul : KwangMun. 2005 : 199.
- William FG MD. Review of Medical Physiology. Seoul : Hanuri. 1999: 556.
- Papayianni. A Cytokines, growth factors, and other inflammatory γ mediators in glomerulonephritis. Renal Failure. 1996 ; 18 : 725-40.
- Wardle EN. Cytokine growth factors and glomerulonephritis. Nephron. 1991 ; 57 : 257-61.
- Hers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. FEBS Letters. 1991 ; 285 : 199-212.
- Iida M, Watanabe K, Tsurufuji M, Takaishi K, Iizuka Y, Tsurufuji S. Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. Infection and Immunity. 1992 ; 60(4) : 1268-72.
- SLee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. Brain. 2008 ; 131 : 616-29.