



Original Article / 원저

## 제생신기환이 허혈-재관류로 유발된 급성 신부전 마우스에 미치는 효과

한병혁<sup>1,2</sup>, 이현경<sup>1,2</sup>, 장세훈<sup>1,2</sup>, 태애림<sup>1,2</sup>, 윤정주<sup>1,2</sup>, 김혜읍<sup>1,2</sup>, 이윤정<sup>1,2</sup>, 이호섭<sup>1,2</sup>, 강대길<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의과대학 및 한의전문대학원, <sup>2</sup>원광대학교 한방심신증후군연구센터

### Effect of Jesaeng-sinkihwan on Renal Dysfunction in Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Renal Failure Mouse

Byung Hyuk Han<sup>1,2</sup>, Hyeon Kyoung Lee<sup>1,2</sup>, Se Hoon Jang<sup>1,2</sup>, Ai Lin Tai<sup>1,2</sup>,  
Jung Joo Yoon<sup>1,2</sup>, Hye Yoom Kim<sup>1,2</sup>, Yun Jung Lee<sup>1,2</sup>, Ho Sub Lee<sup>1,2</sup>, Dae Gill Kang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Oriental Medicine and Professional Graduate School of Oriental Medicine

<sup>2</sup>Hanbang Cardio-Renal Research Center, Wonkwang University

#### ABSTRACT

Renal ischemia-reperfusion injury (IRI), an important cause of acute renal failure (ARF), cause increased renal tubular injury. Jesaeng-sinkihwan (JSH) was recorded in a traditional Chinese medical book named "Bangyakhappyeon (方藥合編)". JSH has been used for treatment of diabetes and glomerulonephritis with patients. Here we investigate the effects of Jesaeng-sinkihwan (JSH) in a mouse model of ischemic acute kidney injury. The animals model were divided into four groups at the age of 8 weeks; sham group: C57BL6 male mice (n=9), I/R group: C57BL6 male mice with I/R surgery (n=9), JSH Low group: C57BL6 male mice with surgery + JSH 100 mg/kg/day (n=9) and JSH High group: C57BL6 male mice with surgery + JSH 300 mg/kg/day (n=9). Ischemia was induced by clamping the both renal arteries during 25 min, and reperfusion was followed. Mouse were orally given with JSH (100 and 300 mg/kg/day during 3 days after surgery. Treatment with JSH significantly ameliorates creatinine clearance (Ccr), Creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) in obtained plasma. . Treatment with JSH reduced kidney inflammation markers such as Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule-1 (KIM-1). JSH also reduced the periodic acid schiff (PAS) staining intensity and picro sirius red staining intensity in kidney of I/R group. These findings suggest that JSH ameliorates tubular injury including renal dysfunction in I/R induced ARF mouse.

© 2021 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Key words** : Jesaeng-sinkihwan (JSH), Ischemia/Reperfusion, acute renal failure, creatinine clearance, renal-dysfunction, renal-fibrosis.

## I. 서론

급성신부전증은 신장 기능의 저하를 야기한다고 알려져 있다. 또한 급성 신부전증은 만성신부전증으로 이어질 수 있는 위험성을 가진 급성신부전증 환자는 계속적으로 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 따라서 근본적으로 급성신부전증을 개선하고 치료할 수 있는 방법이 필요하다. 이 실험에서 사용된 신장의 허혈-재관류 모델은 다양한 신장 기능의 손상을 나타내며 급성신부전증을 일으킨다<sup>2)</sup>. 허혈-재관류에 의하여 유발되는 급성신부전증은 최근의 의료기술의 발전에도 불구하고 높은 질병률과 사망률을 나타낸다<sup>3)</sup>.

급성신부전증에 대한 병리학적 결과로 사구체의 여과 기능이 감소하게 된다<sup>4)</sup>. 허혈-재관류 이후 세포 손상 메커니즘은 혈관과 관 사이의 상호작용을 통하여 염증성 매개체의 방출과 산화적 스트레스의 증가를 유발한다<sup>5)</sup>. 임상적으로 급성신부전증을 알 수 있는 혈청 creatinine의 상승이나 요량 감소등이 있다. 급성신부전증이 발생하여올 때, 혈액 내에서 증가하거나 소변 배설이 증가되는 대표적인 표지자로서 kidney injury molecule-1(KIM-1)이 있다<sup>6)</sup>. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) 역시 다양한 세포에서 발현되며 감염, 악성 종양, 신세뇨관 같은 신장 손상에서 증가한다<sup>7-8)</sup>. NGAL은 급성 신부전증을 조기에 치료하고 이에 대한 예방을 향상시킬 수 있는 강력한 표지자 역할을 수행한다<sup>9-10)</sup>. 추가적으로 허혈로 손상을 받은 신장에서는 섬유화 및 병변이 발생하게 되며 신장의 기능장애 및 염증이 유발된다<sup>11)</sup>.

신기환가미방 (腎氣丸加味方)은 신기환 (腎氣丸), 금계신기환 (金櫃腎氣丸), 제생신기환 (濟生腎氣丸, JSH)으로 분류된다. 신기환가미방에 대한 내용은 방약합편 (方藥合編, 1884)에 기록되어 있으며 특히 전신부종, 신장 기능 저하와 같은 만성 신장염에 처방되었

다. 특히 신기환가미방 중 제생신기환은 신장 염증 증후군을 통하여 급성신부전증이 발생할 때 단백뇨, 저단백혈증, 고지혈증 개선 등의 효과를 나타내었다<sup>12)</sup>. 따라서 제생신기환이 허혈-재관류에 의하여 유발된 급성신부전증에서 신장 기능의 개선과 치료에 효과가 있을 것으로 판단되어 본 연구를 수행하게 되었다.

본 연구에서는 C57BL6 mouse에 허혈-재관류에 의한 급성신부전증을 유발시켜 제생신기환을 투여한 후 신장 기능에 미치는 효과를 연구하고 그 결과를 보고하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 제조

실험에 사용한 약제는 (주)청웅제약에서 구입하였다 (임실, 전라북도). 제생신기환 추출물을 얻기 위하여 Table 1과 같이 약제 10 종류 (총 중량 = 1520g)를 혼합하여 100°C 증류수 4L에서 전기추출기 (COSMOS-660, Kyungseo Machine Co., 인천, 한국)를 사용하여 2시간 동안 추출하였다. 추출물은 4°C의 온도에서 10분 동안 3,000 rpm의 속도로 원심분리 하였다. 상층액은 진공 동결건조기 (N-11, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)를 사용하여 동결 건조 시켜주었다. 제생신기환의 물 추출물의 양은 121.506 g (수율 7.99%)이었다.

### 2. 실험동물 및 식이

동물 실험은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 심의를 받은 후 진행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다 (승인번호, WKU16-59). 9 주령 수컷 C57BL6 마우스는 샘타코에서 구입하였다. 실험이 진행되는 동안 metabolic cage에서 온도(23 ± 2°C), 습도(50~60%), 그리고 12시간 동안 암기와 명기 주기를 유지해 주었다. 적응기 3일을 거친 후, 다

\*Corresponding author: Dae Gill Kang. College of Oriental Medicine and Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, Republic of Korea.  
Tel : +82-63-850-6933, Fax : +82-63-850-7260, E-mail : dgkang@wku.ac.kr

•Received : January 9, 2021 / Revised : February 10, 2021 / Accepted : February 18, 2021



음과 같이 군을 나누었다. 1) sham (n = 9), 2) I/R (ARF) (n = 9), 3) JSH Low (I/R + JSH 100 mg/kg/day) (n = 9) 그리고 4) JSH High (I/R + JSH 300 mg/kg/day) (n = 9). I/R 군은 신장 허혈-재관류 수술을 시켰다. 양쪽의 신동맥에 클립을 25 분 동안 끼워 허혈을 시켜준 후, 재관류를 시행하였다. JSH Low 군은 허혈-재관류 수술 후 제생신기환 10 mg/kg/day를 식이로 투여해 주었고, JSH High 군은 제생신기환 300 mg/kg/day를 투여 해주었다. 약물 투여는 3일 동안 진행하였다.

### 3. 혈액과 조직 샘플링

실험이 끝난 후, 신장조직은 10% 파라포름알데하이드에 고정하였다. 실험동물을 희생시켜 나온 혈액은 1 mg/ml ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) 튜브에 수집하였다 수집한 혈액은 3000 rpm, 15분, 4°C에서 원심분리하여 혈청만 분리해 -80°C에 보관하였다.

### 4. 혈액 및 소변 생화학적 분석

혈청의 Blood urea nitrogen (BUN)과 소변과 혈청의 creatinine의 혈액생화학적 수치는 자동 생화학 측정기(automated clinical chemistry analyzer, FUZI DRI-CHEM NX700, FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. 신장 기능 지표로서 creatinine청소율 (Ccr)을 확인하였으며 그 계산 방법은 아래와 같다.

$$\frac{UV(ml) * Ucr(mg/ml)}{Pcr(mg/ml) * BW(kg) * min}$$

### 5. 단백질 분리와 western blot 분석

적출한 신장 조직을 lysis buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6) 으로 용해 시켜 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 bradford 법을 이용하여 정량하였으며, 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 비특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 BSA가 함유된 용액에 상온에서 1 시간 동안 blocking 하

였다. Blocking된 membrane을 1:1000으로 희석한 각 타겟 단백질의 1차 항체 (KIM-1, NGAL; Santa Cruz, TX, USA)를 처리한 다음 1:2000으로 희석한 2차 항체 (Goat anti-mouse IgG, Enzo, NY, USA)를 상온에서 1 시간 반응시키고 ECL solution을 반응시켜 발현 정도를 Chemi-doc image analyzer (iBright FL100, ThermoFisher scientific, MA, USA)를 사용하여 측정 후 정량 하였다.

### 6. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (Real time RT-qPCR)

신장으로부터 RNA 분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하였으며 RNA 농도는 흡광도 260 nm 에서 정량하였다. cDNA 합성을 위하여 500 ng mRNA과 20 ml 의 reverse transcription reaction incubated in the SimpliAmp Thermal Cycler (Life technology, Carlsbad, CA, USA)를 섞은 후 42°C 에서 60 분, 94°C 에서 5분 배양하여 합성된 cDNA 실험에 사용할 때까지 -20°C에서 보관 하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 Real time RT-qPCR을 실시하였다. 사용된 primer의 염기 서열은 다음과 같다. KIM-1 (forward: 5'-GCA ACG GAC ATG CCA ACA TA-3', reverse: 5'-TGG CAC TGT GAC ATC CTC AGA-3'), NGAL (forward: 5'-TCA CGC TGG GCA ACA TTA-3', reverse: 5'-TTG GGA CAG GGA AGA CGA-3'), GAPDH (forward: 5'-CGA GAA TGG GAA GCT TGT CAT C-3', reverse: 5'-CGG CCT CAC CCC ATT TG-3'). 1 mL cDNA sample, 1 mL primer pairs, 8 mL ultra-pure distilled water, 그리고 10 ml SYBR Green PCR Master Mix를 섞어준 다음 Step-One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 95°C 에서 10 분 동안 denaturation step 을 거쳤다. 그 후 95°C 에서 15 초 동안 총 40 번을 반복하였으며, 60°C 에서 60 초 진행하였다. 각각의 RNA sample 은 세번 반복 실험을 하였다. mRNA 측정 결과는 GAPDH mRNA 측정 결과에 의하여 표준화 하였다.

### 7. PAS 염색

적출된 신장 조직을 10% 포르말린 (pH 7.4)에 3

일 고정시킨 후, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 50% 알코올에서부터 100% 알코올까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기 (Microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 3  $\mu\text{m}$ 으로 자른 뒤 슬라이드 위에 부착 시켜 절편을 만들었다. PAS staining은 Xylene과 에탄올 100%을 이용하여 슬라이드의 파라핀을 제거한 후, 0.5% periodic acid solution에 10 분간 반응시켰다. 반응 후, 흐르는 물에 수세 한 후, Schiff 시약으로 10 분간 반응시켰다. 수세 한 후, hematoxylin으로 3 분간 반응 시킨 후 탈수 과정을 거치고 Canada balsam (Junsei chemical co., Ltd, Chuo-ku, Tokyo, Japan)으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다 (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan).

#### 8. Picrosirius Red 염색

적출된 신장 조직을 10% 포르말린 (pH 7.4)에 3 일 고정시킨 후, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 50% 알코올에서부터 100% 알코올까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기 (Microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 3  $\mu\text{m}$ 으로 자른 뒤 슬라이드 위에 부착 시켜 절편을 만들고 Picrosirius Red Stain Kit (Picrosirius Red stain, Polysciences, USA)의 제조사에서 제공하는 실험 방법에 따라 염색을 진행하였다. 간략하게 요약하면, 먼저 조직 절편을 탈파라핀, 수화시켜준 다음 Hematoxylin으로 염색하여 준 다음 세척하여준다. 그 다음 Phosphomolybic acid, Picrosirius Red 염색 용액, .1 N Hydrochloride acid를 차례로 처리하여준 다음 70% 에탄올로 세척한 다음 탈수 후 Canada balsam (Junsei chemical co., Ltd, Chuo-ku, Tokyo, Japan)으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다 (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan).

#### 9. 통계처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 SigmaPlot

10.0 프로그램을 이용하여 Students t-test 를 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

### III. 결과

#### 1. 제생신기환 투여에 의한 신장무게, 몸무게 변화

실험이 진행이 되는 동안, 제생신기환 투여 시 실험이 끝나는 날 신장무게를 몸무게로 나눈 %를 측정 한 결과 I/R군에서 유의성 있는 증가가 있었으며 ( $p < 0.01$ ), 제생신기환 투여군에서 감소하는 효과를 확인하였다 ( $p < 0.01$ , Fig. 1A). 실험동물 희생 후 신장을 촬영한 결과에서도 I/R군에서 신장이 비대해 졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B).

#### 2. 제생신기환 투여에 의한 신장 기능 에 미치는 영향

허혈-재관류 수술 1일 후 얻은 혈액과 실험동물 희생 후 얻은 혈액에서 신장 기능 지표인 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine을 측정한 결과 I/R군은 sham군과 비교하였을 때, 유의하게 수치가 증가 하였다. 제생신기환을 투여한 군에서 BUN과 creatinine 수치가 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다 (Table 2). 또한 실험 종료 시점에서, 신장의 사구체 여과율의 지표인 creatinine clearance(Ccr) 를 측정한 결과, I/R 군은 sham 군과 비교했을 때, 유의하게 Ccr 수치가 감소하였고 ( $p < 0.01$ ), 제생신기환 저농도군과 고농도군 모두에서 유의하게 Ccr 수치가 증가하였다 ( $p < 0.05$ , Fig. 2).

#### 3. 제생신기환 투여에 의한 KIM-1, NGAL 발현에 미치는 영향

급성신부전모델에서 제생신기환이 신장기능과 신장 질환지표인 KIM-1, NGAL 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot법을 시행하였다. 그 결과 I/R에 의하여 유발된 급성신부전모델 군에서 정상군에 비하여 KIM-1과 NGAL의 단백질 발현양이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 ( $p < 0.01$ ). 반면, 제생신기환을 투여한 군에서는 유의한 감소를 보였다 ( $p < 0.01$ , Fig. 3A). 또한 허혈-재관류 수술을 통하여 증가된 mRNA 발현양 역시 제생신기환 투여군에서 유의한 감소를 나타냄을 확인할 수 있었다 ( $p < 0.01$ , Fig. 3B).



#### 4. 신장의 조직 병리학적 변화 및 신장 섬유화에 대한 변화 분석

허혈-재관류에 유발된 급성신부전증 모델에서 제생신기환에 의한 신장의 조직 병리학적 변화를 측정하기 위해 PAS 염색을 시행하였다. 그 결과, 정상군에서 관찰되지 않았던 기저막(basement membrane)과 메산지움 기질(mesangial matrix)을 포함한 세포외 기질 (extracellularmatrix: ECM)의 형태학적인 손상이 확인되었다. 제생신기환을 투여한 군에서는 정상군과 유사하게 회복되었고, 메산지움 기질을 포함한 세포외기질의 일부 손상이 관찰되었으나, 이 역시 정상군에 비해 현저히 낮았다 (Fig. 4). 또한, 신장의 섬유화 정도를 확인하기 위하여 picrosirius red 염색을 시행하였다. 그 결과 I/R군에서 섬유화를 확인할 수 있었으며 제생신기환을 처리한 군에서 섬유화가 감소되었음을 확인하였다. 특히 고농도의 제생신기환을 처리한 군에서 정상군과 거의 유사한 정도로 회복되었음을 확인하였다 (Fig. 5).

#### IV. 고찰

제생신기환 (濟生腎氣丸, JSH)은 숙지황(熟地黃), 산약(山藥), 산수유(山茱萸), 백복령(白茯苓), 목단피(牡丹皮), 택사(澤瀉), 우슬(牛膝), 차전자(車前子), 육계(肉桂), 부자(附子)로 구성되어진 처방으로 방약합편(方藥合編)에 기록되어 있다. 특히 제생신기환은 신장의 음(陰)과 양(陽)의 기운을 보하기 위하여 주로 처방되어져 왔다<sup>13)</sup>. 본 연구에서는 제생신기환이 허혈(虛血)로 인한 급성신부전 모델에서의 신장 기능 개선과 신손상에 효과가 있음을 확인하고자 실험을 수행하였다.

급성신부전이란 포괄적으로는 모든 신기능 장애를 의미하며, 특히 혈액학적 원인이나 외부의 기계적인 요인의 제거에 의하여 호전되지 않는 급격한 신기능의 장애를 의미한다<sup>14)</sup>. 이러한 원인으로 인한 신장 기능의 이상은 짧게는 수 시간에서 길게는 수일에 걸쳐 급격하게 신장의 기능을 저하시킨다고 알려져 있다. 이러한 신장의 기능에 이상이 생기게 되면 체내의 여과가 제대로 이루어지지 않게 되어 신체 내에 질소 노폐물이 축적되며 이로 인하여 결과적으로는 혈액 내에 고질소혈증이 일어나고, 체액 및 전해질 균형에 이상이 생긴다고 알려져 있다<sup>15)</sup>. 급성신부전

의 발병원인은 매우 다양하며 특히 허혈 손상, 신 독성 손상, 신 혈관 및 간질 손상 등에 의하여 유발하게 된다. 이러한 다양한 급성신부전의 원인 중 특히 허혈에 의한 급성세뇨관 괴사가 높은 빈도를 차지하고 있다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. 본 연구는 제생신기환을 허혈-재관류에 의하여 유발된 급성신부전 동물모델에 투여하여 제생신기환의 신장 기능 및 신장 손상에 대한 개선 효과를 조사하였다. 실험은 정상군 (sham), 급성신부전증 모델군 (I/R), 제생신기환 저농도 처리군 (I/R + JSH 100 mg/kg/day), 그리고 제생신기환 고농도 처리군 (I/R + JSH 300 mg/kg/day)인 4 군으로 나누어 진행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

신장의 비대화와 신장무게와 체중의 비율 수치 증가는 급성 신부전증 초기 단계에서 나타나는 증상이 다<sup>16)</sup>. 실험 결과 제생신기환을 투여한 군은 허혈성 급성 신부전증에 의해 증가된 신장의 비대화와 신장무게/체중의 수치가 유의성 있게 감소하였다. Blood urea nitrogen(BUN)은 체내에서 단백질의 이화작용으로 생긴 대사산물로써 90% 이상이 신장으로 배설된다. 따라서 BUN 수치는 신장 배설 기능을 알아볼 수 있는 지표이다<sup>17)</sup>. 실험동물로부터 얻은 혈액을 이용하여 BUN 수치를 측정한 결과 제생신기환은 허혈성 급성신부전증 유발군에 비해 BUN 수치가 유의하게 감소시켜주었다. 이와 같은 결과를 통하여 제생신기환이 신장의 손상과 신장의 기능을 회복하는 것으로 사료된다. 또한 혈액 내 creatinine은 신장의 사구체에서 여과 되는 동안 재흡수 되지 않고 전부 요 중 에 배설된다. 따라서 creatinine의 요 중 배설량은 체내의 creatinine 생성량과 동일하며, 혈중 creatinine 수치는 신장 기능의 평가에 매우 중요하게 사용되는 지표이다<sup>18)</sup>. 본 실험 결과에서 제생신기환은 허혈성 급성신부전증 군에 비해 creatinine 청소율이 현저하게 증가되었다. 따라서 제생신기환은 신장의 여과 기능과 재흡수 기능을 동시에 억제하고, 신기능을 부분적으로 회복하는 것으로 사료된다.

신장의 손상과 신장 기능저하의 대표적인 지표로는 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)과 kidney injury molecule-1 (KIM-1) 등이 있다. NGAL과 KIM-1은 신장 기능의 급격한 변화 이후에 매우 빠르게 상승하는 수치이다<sup>19)</sup>. KIM-1과 NGAL은 새롭게 부각되고 있는 급성신부전으로 인한

신장 손상의 정확한 정도를 나타낼 수 있는 생물학적 분자이며<sup>20-21</sup>), 특히 NGAL은 급성신장손상에 의하여 증가하는 유전자이다<sup>22</sup>). 또한 KIM-1은 신장의 근위관 부상 정도를 나타내주는 단백질이다<sup>23</sup>). 따라서 NGAL과 KIM-1은 급성 신부전증과 관련된 매우 정확한 평가 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서는 제생신기환을 통한 신장 손상 지표인 NGAL과 KIM-1의 발현을 분석하였다. 허혈-재관류 수술을 통하여 급성 신부전증이 유발된 군에서는 NGAL과 KIM-1의 발현이 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였으며 제생신기환이 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 제생신기환이 신장의 손상을 개선시키는 데 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

관의 확장, 관 내피 손상, 병변의 형성과 이물질의 축적은 급성 신손상이 일어나게 되면 신장의 내수질(inner medulla)과 외수질(outer medulla)에서 발생하게 된다<sup>24</sup>). 또한 신장 손상이 일어나게 되면 사구체 간질의 확장, 사구체 기저막과 내피세포, 외피세포들의 비대화, 세포외기질의 축적등이 일어나게 된다<sup>25</sup>). 따라서 본 실험에서는 신장의 부상을 확인하고 제생신기환에 의한 신장 손상의 회복 효과를 PAS 염색을 통하여 확인하였다. 그 결과 허혈-재관류를 통한 급성신손상이 생긴 군에서 사구체의 손상을 확인하였다. 또한 내수질과 외수질을 관찰한 결과 형태학적인 변형 및 액포(vacuole)의 생성을 확인할 수 있었다. 제생신기환은 이러한 사구체의 손상과 신장의 형태학적 손상을 저하시켜주는 효과를 나타내었다. 신장의 섬유화는 우리 몸의 장기 조직이 외부적 또는 내부적인 자극을 받은 경우 조직에 염증이 생기게 되고 손상되어 두꺼워지는 현상이다<sup>26</sup>). 또한 섬유화는 면역매개물질에 의하여 유도되며 이는 세포 외기질의 축적 및 콜라겐 합성을 증가시켜 조직의 경화를 유도 한다<sup>27</sup>). 본 실험에서는 제생신기환에 의한 신장 섬유화의 억제 효능을 확인하기 위하여 picrosirius red 염색을 통하여 신장을 염색한 후 신장의 섬유화 정도를 관찰하였다. 실험 결과, 허혈-재관류 모델에서 증가한 신장의 섬유화 정도가 제생신기환에 의하여 감소되는 것을 확인하였다.

## V. 결론

본 연구 결과를 통하여 제생신기환을 통한 신장 손

상 개선 효과 및 신장 기능의 개선 효과를 확인해 볼 수 있었으며, 허혈로 인한 급성신부전증 동물 모델의 신장 손상을 제생신기환이 억제함으로써 허혈성 질환의 억제제로 효과가 있다고 사료된다. 따라서 이에 대한 추가 연구 및 심도 있는 연구를 통하여 제생신기환이 허혈성 신장 질환의 치료에 매우 우수한 보조제로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문의 연구는 2019학년도 원광대학교 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Wan X, Hou LJ, Zhang LY, Huang WJ, Liu L, Zhang Q, Hu B, Chen W, Chen X, Cao CC. IKK  $\alpha$  is involved in kidney recovery and regeneration of acute ischemia/reperfusion injury in mice through IL10-producing regulatory T cells. *Dis Model Mech*. 2015;8(7):733-42.
2. Zhou JQ, Qiu T, Zhang L, Chen ZB, Wang ZS, Ma X, et al. Allopurinol preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting HMGB1 expression in a rat model. *Acta Cir Bras*. 2016;31(3):176-82.
3. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004;364(9447):1814-27.
4. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Inhibition of NF- $\kappa$ B ameliorates sepsis induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. *Am J Physiol*. 2010;298(1):196-204.
5. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med*. 2008;14(7-8):502-16.
6. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002;62(1):



- 237-44.
7. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin--an emerging troponin for kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23: 3737-43.
  8. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005;115(3):610-21.
  9. Merika L, Rasić S, Serdarević N. Importance of determination of urine neutrophil gelatinase associated lipocalin in early detection of acute kidney injury. *Coll Antropol.* 2014;38(1): 161-6.
  10. Kidher E, Harling L, Ashrafian H, Naase H, Chukwuemeka A, Anderson J. Pulse wave velocity and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as predictors of acute kidney injury following aortic valve replacement. *J Cardiothorac Surg.* 2014;9:89.
  11. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007;7(3):518-26.
  12. Oh SD. The effects of saryungopisan and jesaengsinkihwan on rats with nephrosis induced by puromycin aminonucleoside. Dept of internal medicine College of Oriental Medicine, Kyung Hee University. 1997;20.
  13. Heojun. Dongyibogam. Yeogang Publisher. Seoul. 2005:352,353,608,1066.
  14. Chung KY, Park JJ, Kim YS. The role of high-mobility group box-1 in renal ischemia and reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate. *Transplant Proc.* 2008;40(7): 2136-38.
  15. Zhong TY, Tang J, Liu YW, Li ZJ, Chen DY, Zhao MZ, et al. High mobility group box-1 stimulates proinflammatory cytokine production in endothelial cells via MAP kinases. *Europe PMC.* 2009;29(8):1517-20.
  16. Jai P, Martin HB, Marie L, Frank O, Pieter AK, Harry VG, et al. Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion-induced injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(11):2086-97.
  17. McCullough PA, Wolyn R, Rocher LL, Levin RN, O'Neill WW. Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. *Am J Med.* 1997;103(5):368-75.
  18. Spector DA, Yang Q, Wade JB. High urea and creatinine concentrations and urea transporter B in mammalian urinary tract tissues. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):467-74.
  19. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life.* 2008;60:199-203.
  20. Fu WJ, Li BL, Wang SB, Chen ML, Deng RT, Ye CQ. Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;95(1):105-9.
  21. Filho LT, Grande AJ, Colonetti T, Della ESP, Rosa MID. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Nephrol.* 2017;10:1979-88.
  22. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven PS. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab.* 2003;80(4): 365-76.
  23. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.* 1998;273(7):4135-42.
  24. Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, Epstein FH, et al. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *J Clin Invest.* 1988;82(2): 401-12.

25. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007;27: 195-207.
26. Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* 1997;51:1388-96.
27. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18: 816-27.





**Table 1.** Composition of JSH

Herbal medicine	Scientific name	Amount (g)	Source	비고
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	320	Imsil, Korea	국내산
山藥	<i>Discorea Rhizoma</i>	160	Imsil, Korea	국내산
山茱萸	<i>Cornus Fructus</i>	160	Imsil, Korea	국내산
白茯苓	<i>Poria Cocos (Schw.) Wolf</i>	120	Imsil, Korea	국내산
牡丹皮	<i>Moutan Radicis Cortex</i>	120	Imsil, Korea	국내산
澤瀉	<i>Alisma Rhizoma</i>	120	Imsil, Korea	국내산
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	120	Imsil, Korea	국내산
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	120	Imsil, Korea	국내산
肉桂	<i>Cinnamomi Cortx Spissus</i>	120	Imsil, Korea	국내산
附子	<i>Aconiti Lateralis Radix Preparata</i>	120	Imsil, Korea	국내산
Total		1520		

**Table 2.** Effects of JSH on Plasma BUN and creatinine

Group	Day 1		Day 3	
	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)
sham	26.34 ± 0.16	0.26 ± 0.01	29.2 ± 0.55	0.22 ± 0.01
I/R	133.1 ± 5.16 <sup>##</sup>	1.30 ± 0.07 <sup>##</sup>	51.96 ± 7.43 <sup>#</sup>	0.40 ± 0.04 <sup>##</sup>
JSH Low	110.04 ± 14.96 <sup>**</sup>	0.51 ± 0.05 <sup>**</sup>	32.34 ± 2.87	0.34 ± 0.01
JSH High	109.4 ± 1.23 <sup>**</sup>	0.62 ± 0.09 <sup>**</sup>	38.76 ± 3.32 <sup>*</sup>	0.35 ± 0.02

JSH, jesaeng-sinkihwan; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; sham group, C57BL6 male mice; I/R group, C57BL6 male mice with I/R surgery; JSH Low group, I/R + JSH 100 mg/kg/day; and JSH High group, I/R + JSH 300 mg/kg/day. Values were expressed as mean ± S.E. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. sham; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.01 vs. JSH.

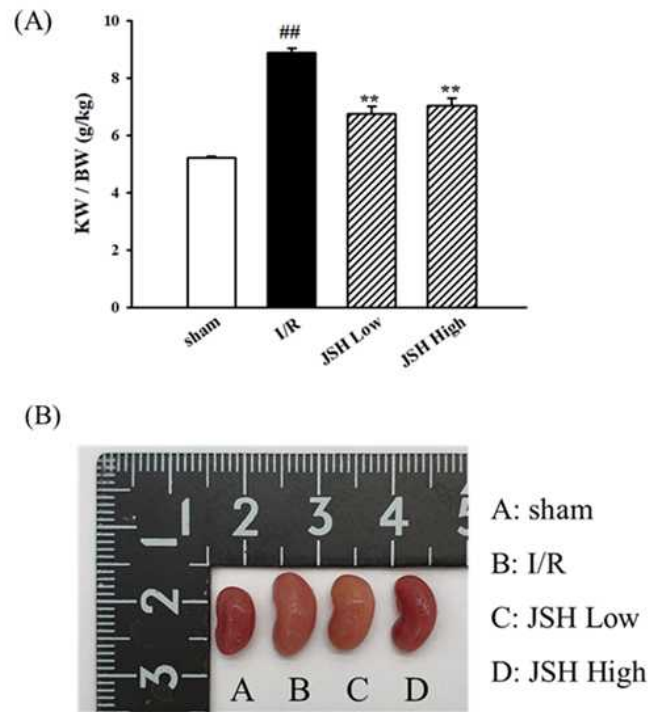


Fig. 1. Effects of JSH on Kidney Weight % of BW and Kidney Size. Values were expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5). \*\*p < 0.01 vs. sham; ##p < 0.01 vs. JSH.

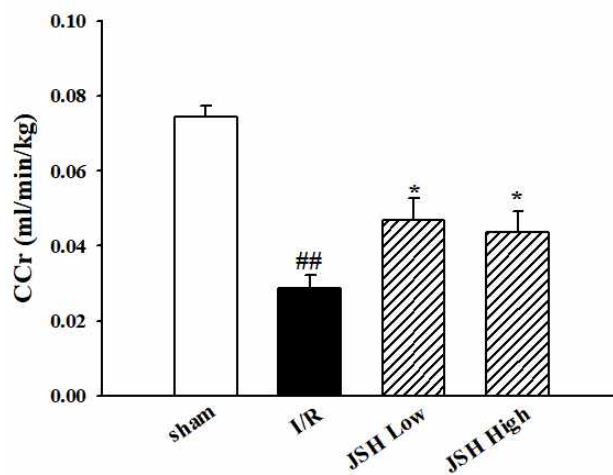
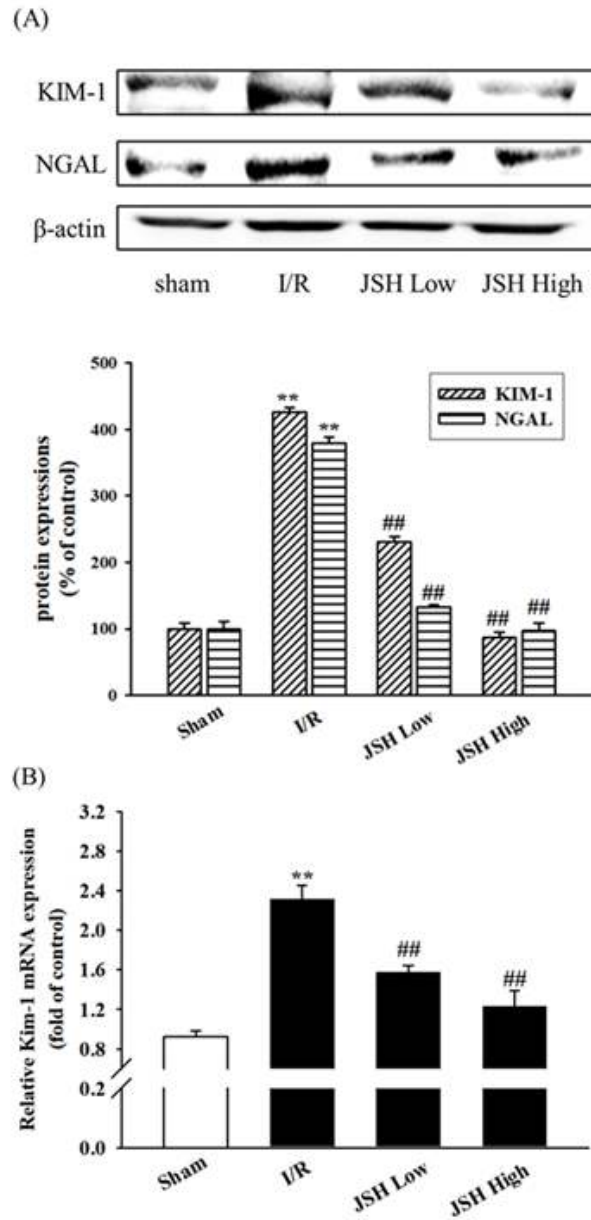
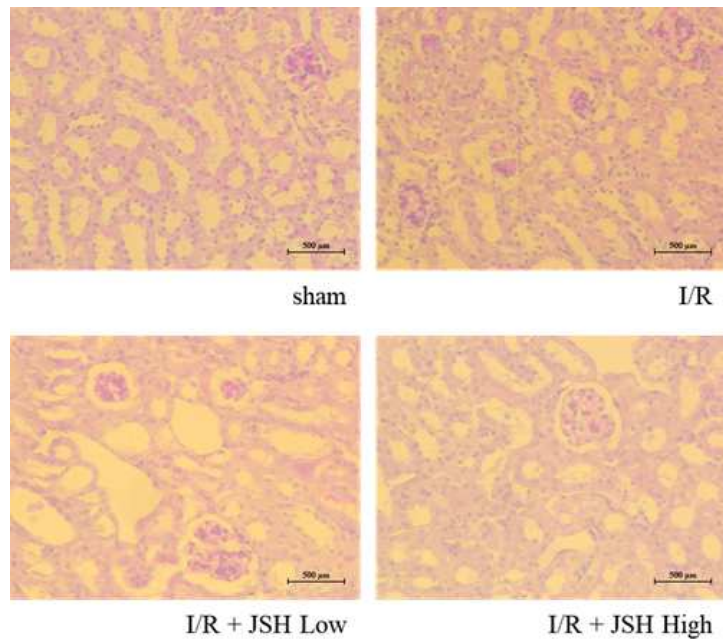


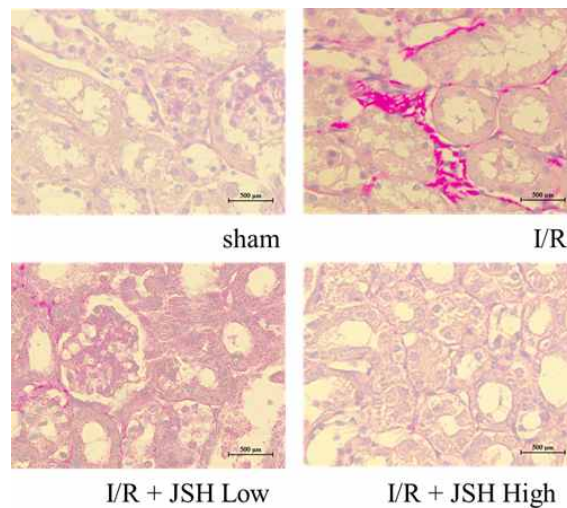
Fig. 2. Effects of JSH on Creatinine Clearance. Values were expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5). \*\*p < 0.01 vs. sham; #p < 0.05 vs. JSH.



**Fig. 3.** Effect of JSH on KIM-1 and NGAL Levels in Kidney. (A) Western blots analysis on KIM-1 and NGAL protein expression. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. (B) Real-time RT-qPCR analysis of KIM-1 and NGAL mRNA expression. Values were expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5). \*\*p < 0.01 vs. sham; ##p < 0.01 vs. JSH.



**Fig. 4.** Periodic Acid Schiff (PAS) Staining of Kidney in Sham, I/R, JSH Low and JSH High mouse. The histological damages were in terms of glomerular fibrosis and tubular expansion in I/R group, which were administration of JSH improved tubular damage induced by ARF (Original magnification: X200).



**Fig. 5.** Effect of JSH on Fibrosis in Kidney Tissues. Typical findings of picro sirius red staining in kidney of mouse (Original magnification: X200).