

# 음곡에 시술한 비해약침이 Lipopolysaccharide로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

김윤주, 강재희, 이현\*

대전대학교 한의과대학 침구의학교실



## [Abstract]

### The Effect of *Tokoro Rhizoma* Pharmacopuncture at KI<sub>10</sub> in Lipopolysaccharide Induced Acute Nephritis in Rats

Yun Joo Kim, Jae Hui Kang and Hyun Lee\*

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

**Objectives** : This study was designed to evaluate the effects of *Tokoro Rhizoma* pharomat KI<sub>10</sub> in nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rat.

**Methods** : Rats were divided into 4 groups and 3 groups(LPS, saline, *Tokoro Rhizoma* pharmacopuncture(TR-P) group) were injected LPS to induce nephritis. TR-P group was treated with TR at KI<sub>10</sub> three times for a week, saline group with normal saline. To evaluate the effects of TR at KI<sub>10</sub> on nephritis in rats, white blood cell(WBC), neutrophil in blood, creatinine, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1(CINC-1) in serum and urinary volume, creatinine in urine, renal myeloperoxidase(MPO) were measured and renal tissue was analyzed.

**Results** : TR-P group significantly reduced WBC, neutrophil in blood, creatinine, CINC-1 in serum, creatinine in urine and renal MPO than LPS group. TR-P group increased urinary volume but, not significant.

**Conclusion** : TR at KI<sub>10</sub> has a therapeutic effect on nephritis in LPS stimulated rat. Therefore, it is suggested that TR at KI<sub>10</sub> may be an useful therapeutics for nephritis in clinical field after further researches.

#### Key words :

*Tokoro Rhizoma*;  
 Nephritis;  
 Pharmacopuncture;  
 KI<sub>10</sub>;  
 LPS

Received : 2014. 05. 10.  
 Revised : 2014. 06. 02.  
 Accepted : 2014. 06. 09.  
 On-line : 2014. 06. 20.

\* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Cheonan Oriental Hospital of Daejeon University, 4, Notaesan-ro, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, 331-958, Republic of Korea  
 Tel : +82-41-521-7578 E-mail : lh2000@hanmir.com

## I. 서 론

급성 신장염이란 사구체를 침범하는 이상 면역 반응에 의한 질환으로 면역복합체가 사구체에 침착되어 유발된 것이다.

이 면역 복합체로 인해 사구체에 염증반응이 나타나 다수의 neutrophil이 침착되면서 사구체의 여과 및 재흡수 기능이 저하되어 신사구체여과율(glomerular filtration rate, GFR)이 감소하고 혈청 blood urea nitrogen(BUN), creatinine 등의 노폐물이 증가하여 혈뇨, 단백뇨, 핏뇨 및 부종, 고혈압 등의 전신증상이 나타나는 질환이다.<sup>2)</sup>

Lipopolysaccharide(이하 LPS)는 병원균의 내독소로서 그람 음성 세균의 막 구조를 형성하며 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있다. 이 물질은 염증세포 및 조직을 구성하는 세포들이 생산하는 cytokine들의 생산을 촉진하여 염증 반응을 연구하는 실험 모델로 많이 응용된다<sup>3-5)</sup>.

비해(*Tokoro Rhizoma*)는 利尿通淋藥의 하나로 마과(薯蕷科: dioscoreaceae)에 속하는 도꼬로마의 根莖이며 性은 平하고, 味는 苦하다. 歸經은 肝·胃·膀胱經이며, 利濕濁 祛風濕하는 효능이 있어 膏淋, 白濁, 帶下, 風濕痺痛 등을 치료한다<sup>6)</sup>. 기존 비해에 관한 연구로는 비해 추출물로 류머티스 관절염 및 염증반응에 유의한 효과를 보인 Hong<sup>7)</sup>의 연구가 있었으나 신장염과 관련된 연구는 없었다.

음곡(KI<sub>10</sub>)은 足少陰腎經의 合水穴로 祛濕通洩, 益腎興陽, 調理前陰, 利導下焦의 효능이 있어 陽萎, 陰萎, 月經不調, 崩漏, 帶下, 小便難 등을 치료한다<sup>8)</sup>.

기존 신장의 손상에 관한 연구로는 Ju et al<sup>9)</sup>, Lee et al<sup>10)</sup>, Lee et al<sup>11)</sup>, Yu et al<sup>12)</sup>, Lee et al<sup>13)</sup>, Kim et al<sup>14)</sup>, Kim et al<sup>15)</sup>, Jo et al<sup>16)</sup>의 단일약물 및 복합제제를 이용한 연구와, Park et al<sup>17)</sup>, Lee et al<sup>18)</sup>, Yoon et al<sup>19)</sup>, Her et al<sup>20)</sup>, Cho et al<sup>21)</sup>, Kwak et al<sup>22)</sup>의 여러 약침을 음곡에 시술하여 신장염에 유의한 효과를 보인 연구가 있었으나, 비해를 이용하여 신장염에 적용한 연구는 아직 접하지 못하였다.

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

## II. 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

동물은 6주령의 수컷 soft diet(SD) rat을 (주)대한바이오링크(경기도, 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 %를 유지하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리규정을 준수하여 시행하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 비해(*Tokoro Rhizoma*; 이하 TR, 중국)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

### 3) 시약 및 기기

(1) 시약(Table 1.)

Table 1. Reagents

Reagents	Manufacturer	Country
PBS	Sigma	USA
HBSS		
Collagenase type IV		
MTT		
LPS		
gum-sucrose absolute EtOH		
RPMI 1640 media	Hyclone	
Antibiotics		
FBS	BD	
BCA kit		
TNF-alpha ELISA kit		
Creatinine assay kit	Oxford	
CINC-1 ELISA kit	Bio Assay Systems	
MPO ELISA kit	ALPCO	
	Cellscience	
Ethyl ether		

PBS : phosphate buffer saline.

HBSS : Hank's balanced salt solution.

MTT : 3 - [4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl] - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide.

RPMI : roswell park memorial institute.

FBS : fetal bovine serum.

BCA : bicinchoninic acid.

TNF : tumor necrosis factor.

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay.

CINC-1 : cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1.

MPO : myeloperoxidase.

(2) 기기(Table 2.)

Table 2. Instruments

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

## 2. 방법

### 1) 약침액의 제조

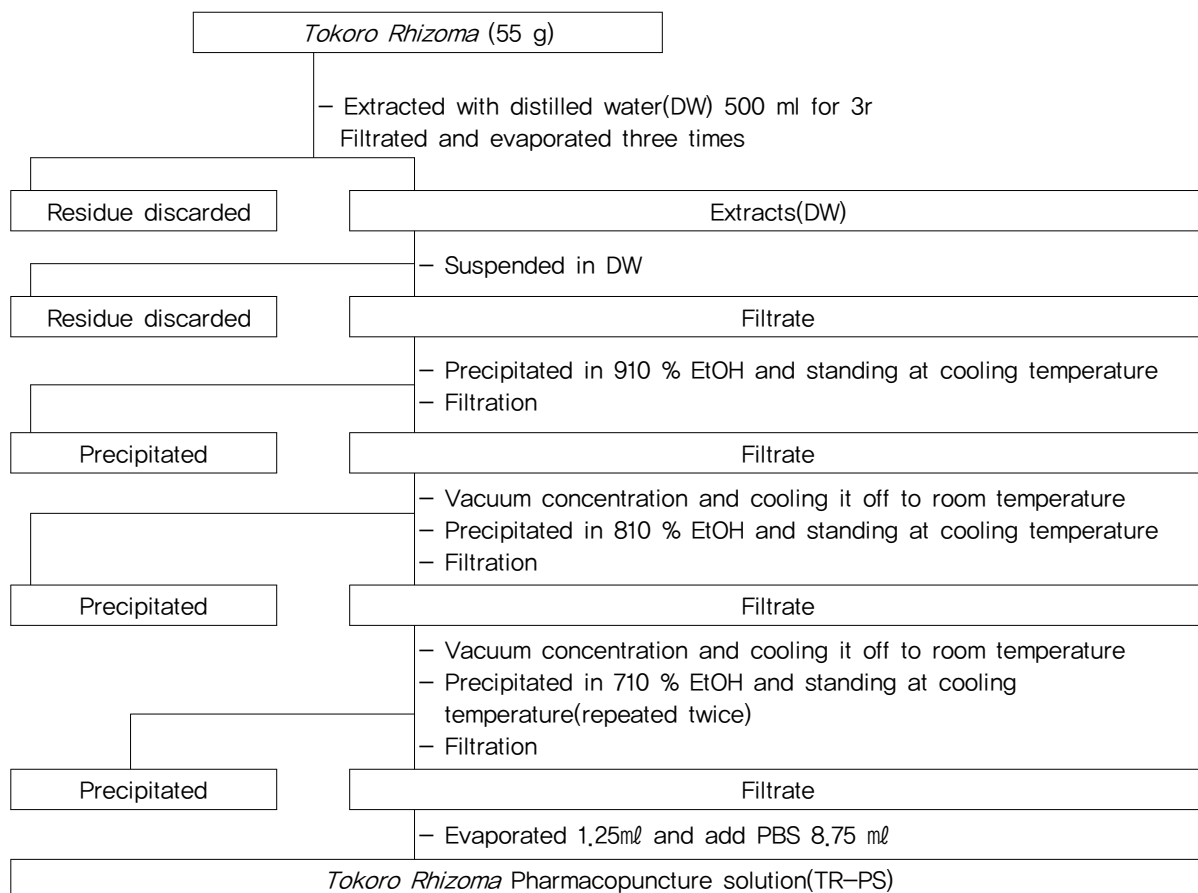
분쇄기를 이용해서 비해 55 g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500 ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축 하였다. 농축액에 910 % ethyl alcohol 30 ml

를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 810 % ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 710 % ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 비해 55 g에서 얻은 약침액을 감압 농축하여 수분을 모두 날렸을 때 건조분말은 1.252 g이었다(수율 2.28 %). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4 °C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 2.5 %로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).

### 2) 세포독성

(1) 간세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD rat의 간 조직을



Scheme 1. Manufacturing procedure of Tokoro Rhizoma pharmacopuncture solution

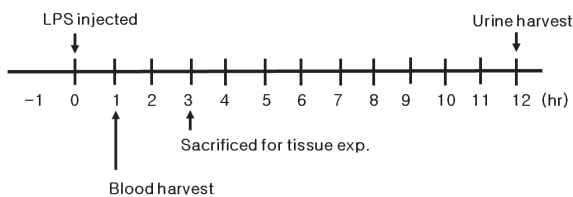
사용하였다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10 % FBS)와 collagenase type IV(300 u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 하였다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간 세포가 잘 분리되도록 하였으며, 얻어진 간 세포는 RPMI 1640 media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.

(2) 3 - [4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl] - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay

분리된 간 실질세포의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96 well plate에 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, FBS 10 %와 antibiotics를 첨가한 RPMI 1640 media에 비핵약침액을 농도별로 처리하고, 72시간동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution (5mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20  $\mu$ l씩 분주하고 5시간 동안 37  $^{\circ}$ C에서 incubation을 실시하였다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100  $\mu$ l씩 버리고, solubilizing solution을 100  $\mu$ l씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 optical densities로 확인하였다.

3) 신장염 동물 모델

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



Scheme 2. Experimental procedure

4) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(Normal), LPS군(LPS), saline군(Saline), 비핵약침군(TR-P)의 4군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, Saline군, 비핵약침군은 각각 2 mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. Saline군과 비핵약침군은 LPS 투여

1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI<sub>10</sub>) 상응 부위에 saline 주입 또는 비핵약침 처치를 주 3회 실시하였다. 비핵약침액의 농도는 세포독성을 확인한 세 가지 농도 중 임의로 2.5 %의 농도로 정하여 약침시술을 시행하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치하지 않은 정상 SD rat
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군
- ③ Saline군(Saline) : 실험 전 1주일간 saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI<sub>10</sub>) 상응 부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군
- ④ 비핵약침군(TR-P) : 실험 전 1주일간 10 %의 비핵약침액 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI<sub>10</sub>) 상응 부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군

5) 결과분석

(1) 혈액분석

LPS 처리 1시간 뒤 각 동물에서 혈액을 채취하여 (주)이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 white blood cell(WBC) 수 및 WBC 중 neutrophils의 비율을 측정하였으며, 혈청 CINC-1와 creatinine의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변분석

Metabolic cage에서 12시간동안 소변을 채취하여, 배뇨량과 요중 creatinine 농도를 kit으로 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat을 마취하고 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.010 % sodium azide가 첨가된 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2000 $\times$ g에서 10분간 원심분리 하였다. 분리된 supernatant는 -80  $^{\circ}$ C에서 보관하였다가 ELISA kit을 이용하여 MPO의 농도를 측정하였다.

(4) 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(ver 18.0 KO)을 이용하였다. 결과 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. Fig. 1, 2의 신장염 유도 실험 결과는 Mann-Whitney U test를 이용하여 LPS 처리군과 비처리군을 비교하였다. 비핵약침 실험 결과는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석한 후 Mann-Whitney U test를 이용하여 각 군간 차이를 확인

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

### III. 성 적

#### 1. 세포독성

비해 약침액을 1, 2.5, 5 %로 희석하여 정상 rat의 간 세포에 대한 세포독성을 확인하였다. 농도가 높을수록 cell viability가 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

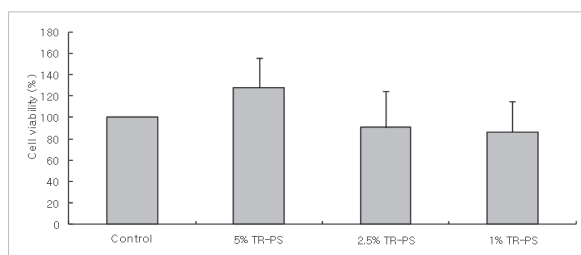


Fig. 1. Cytotoxicity of TR-PS on rat liver cells

Liver cells from normal SD rat were cultured in RPMI 1640 with 10 % FBS medium for 72 h with or without various concentrations of TR-PS (*Tokoro Rhizoma* pharmacopuncture solution).

The cell viability were measured by MTT assay.

Values represent the means  $\pm$  SD of 3 independent experiments.

Control : culture medium without TR-PS.

5, 2.5, 1 TR-PS : culture medium with 5, 2.5, 1 TR-PS, respectively.

#### 2. LPS 투여에 따른 TNF-alpha의 농도 변화

##### 1) Serum TNF-alpha

Rat에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 serum TNF-alpha의 농도를 관찰하였다. LPS 투여 1시간 후에 serum TNF-alpha의 농도가 크게 증가하여 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 높았으며, LPS 투여 3시간 후에는 1시간 후에 비하여 serum TNF-alpha가 감소하여 no-treatment군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2). 그에 따라 본 동물실험에서 혈액분석을 위하여 LPS 투여 1시간 후에 혈액을 채취

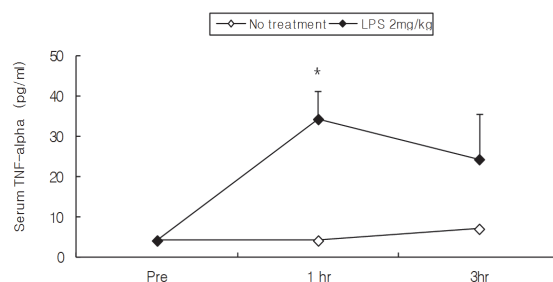


Fig. 2. Effect of LPS on serum TNF-alpha level in SD rats

The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS (lipopolysaccharide; 2 mg/kg). Blood samples were taken from rat heart at 1hr or 3hr after the LPS injection, and serum TNF-alpha level was analysed by ELISA.

Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

No treatment : normal SD rat.

LPS 2 mg/kg : SD rat with LPS (2 mg/kg) challenge.

\* :  $p < 0.05$ , compared to no-treatment group by Mann-Whitney U test.

하였다.

##### 2) Renal TNF-alpha

Rat에 LPS를 복강 투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 각각 신장을 적출하여 renal TNF-alpha의 농도를 관찰하였다. LPS 복강투여 1시간 후에 renal TNF-alpha의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 차이를 보이지 않았으며, LPS 투여 3시간 후 renal TNF-alpha의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 3). 그에 따라 본 동물실험에서

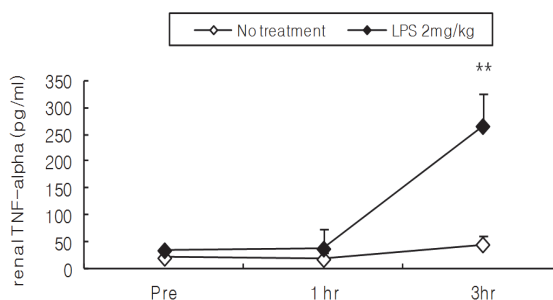


Fig. 3. Effect of LPS on renal TNF-alpha level in SD rats

The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Rat kidney was removed at 1hr or 3hr after the LPS injection, and renal TNF-alpha level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

No treatment : normal SD rat without LPS challenge.

LPS 2 mg/kg : SD rat with LPS (2 mg/kg) challenge.

\*\* :  $p < 0.001$ , compared to no-treatment group by Mann-Whitney U test.

LPS 투여 3시간 후에 신장을 적출하여 신장 내 염증활성을 분석하였다.

### 3. 비해 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

LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으며, TR-P군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

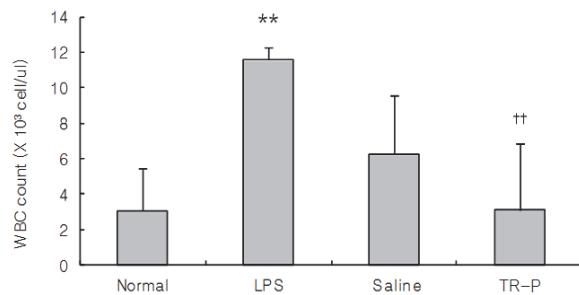


Fig. 4. Effect of TR-P on WBC count in blood of LPS-stimulated rats

Normal : normal SD rat.  
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.  
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 µl/rat) injection at K<sub>10</sub>.  
 TR-P : LPS(2 mg/kg) challenge and TR-P(2.5 %, 200 µl/rat) at K<sub>10</sub>.  
 \*\* :  $p < 0.01$ , compared to Normal group by Kruskal-Wallis test.  
 †† :  $p < 0.01$ , compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

##### (2) Neutrophil

WBC 중 neutrophil 비율은 TR-P군에서 정상군, LPS군, saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

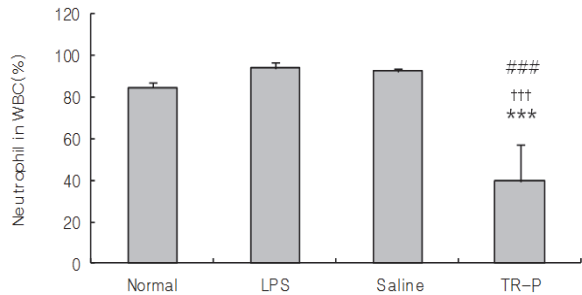


Fig. 5. Effect of TR-P on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats

\*\*\* :  $p < 0.001$ , compared to normal group by Kruskal-Wallis test.  
 ††† :  $p < 0.001$ , compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.  
 ### :  $p < 0.001$ , compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

#### 2) Blood chemistry

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

##### (1) Creatinine

LPS군과 saline군에서는 정상군에 비하여 혈청 creatinine이 유의하게 증가하였다. TR-P군에서는 LPS군 및 saline군에 비하여 혈청 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

##### (2) Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1(CNC-1)

LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하

Table 3. Blood Cell Counts in LPS-stimulated Rats

	Normal	LPS	Saline	TR-P
WBC( $\times 10^3$ cell/ml)	3,07 $\pm$ 2,397	11,624 $\pm$ 0,631	6,25 $\pm$ 3,33	3,078 $\pm$ 3,74
Neutrophil(%)	84,6 $\pm$ 2,79	94,2 $\pm$ 2,387	92,6 $\pm$ 1,140	39,8 $\pm$ 17,810

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

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 µl/rat) injection at K<sub>10</sub>.

TR-P : LPS(2 mg/kg) challenge and TR-P(2.5 %, 200 µl/rat) at K<sub>10</sub>.

Table 4. Blood Chemistry Analysis in LPS-stimulated Rats

	Normal	LPS	Saline	TR-P
Creatinine(mg/dl)	0.412±0.091	1.408±0.190	1.593±0.249	0.666±0.033
CINC-1(pg/ml)	255.429±19.029	612.714±21.3	411±212.454	379.143±92.60

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

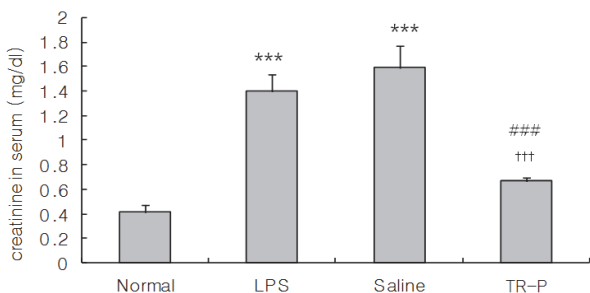


Fig. 6. Effects of TR-P on serum creatinine level in LPS-stimulated rats

\*\*\* :  $p < 0.001$ , compared to normal group ANOVA test,  
 ††† :  $p < 0.001$ , compared to LPS group by Kruskal-Wallis test,  
 ### :  $p < 0.001$ , compared to Saline group by Kruskal-Wallis test.

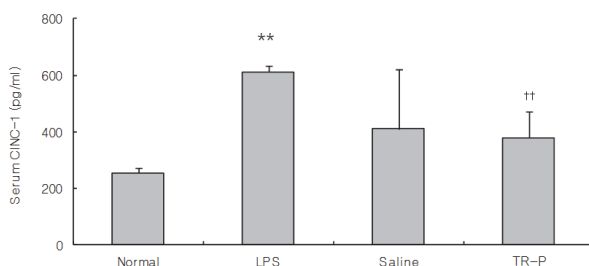


Fig. 7. Effects of TR-P on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats

\*\* :  $p < 0.01$ , compared to normal group by Kruskal-Wallis test,  
 †† :  $p < 0.01$ , compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

게 증가하였다. TR-P군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

### 3) 소변 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 소변 양과 요중 creatinine을 측정하였다.

#### (1) 이뇨 활성

LPS군과 Saline군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 현

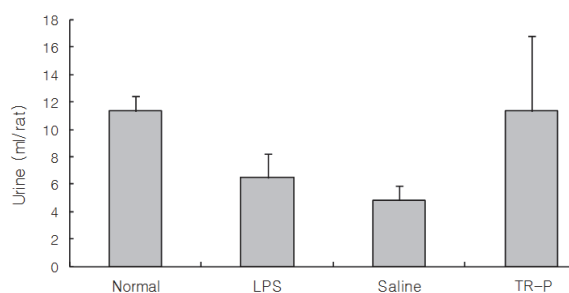


Fig. 8. Effect of TR-P on urinary volume in LPS-stimulated rats

저하게 감소하였다. TR-P군에서는 LPS군 및 saline군에 비하여 배뇨량이 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 8).

#### (2) Creatinine

LPS군의 요중 creatinine 농도는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. TR-P군에서는 LPS군에 비하여 요중 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

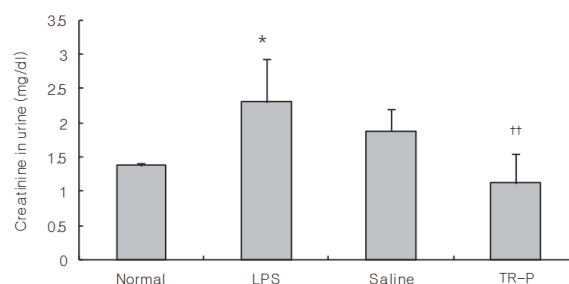


Fig. 9. Effects of TR-P on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats

\* :  $p < 0.05$ , compared to normal group by Kruskal-Wallis test,  
 †† :  $p < 0.01$ , compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

### 4) 신장 내 염증활성

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

Table 5. Urine Analysis in LPS-stimulated Rats

	Normal	LPS	Saline	TR-P
Urine(ml/rat)	11,333±1,155	6.5±1,732	4,833±1,041	11,333±5,507
Creatinine(mg/dl)	1,373±0,044	2,307±0,637	1,884±0,314	1,117±0,44

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 the metabolic cages and the urine was collected for 12 hours. And the level of urinary creatinine was analysed.

Table 6. Inflammatory Activity in Kidney of LPS-stimulated Rats

	Normal	LPS	Saline	TR-P
MPO (mg/dl)	14,275±6,094	96,283±4,585	87,717±16,422	69,643±6,844

The male SD rats were treated as described in the materials and method and injected intra-peritoneally with LPS(2 mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed and the level of renal MPO was analysed by ELISA.

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 Kl<sub>10</sub>

TR-P : LPS(2 mg/kg) challenge and TR-P(2.5 %, 200 µl/rat) at Kl<sub>10</sub>

LPS군, saline군, TR-P군은 정상군에 비하여 renal MPO가 유의하게 증가하였다. TR-P군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

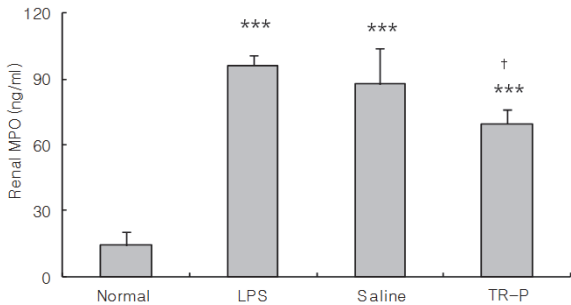


Fig. 10. Effects of TR-P on renal MPO level in LPS-stimulated rats

\*\*\* :  $p < 0.001$ , compared to normal group by Kruskal-Wallis test.

† :  $p < 0.05$ , compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

#### IV. 고 찰

신장은 복막의 바깥쪽, 복부의 뒤쪽 벽에 있는 한 쌍의 특화된 기관으로 12흉추와 3요추 사이에 위치하고 성인에서 신장의 무게는 한 개가 150 g 정도로 양쪽 신장은 체중의 0.5 %를 차지한다. 양쪽 신장으로 가는 혈류는 전체 심박출량의 20~25 %라는 사실을 고려할 때 다른 조직에 비

해 혈류량이 극히 높으며 체액을 여과하는데 있어 많은 부분을 할애하고 있다<sup>23,24</sup>. 신장은 음식물 섭취 및 대사에 의해 생성된 urea, uric acid, creatinine, bilirubin, 호르몬 등의 물질을 신속히 제거하고 몸속으로 흡수된 독성물과 이물질을 청소한다. 또한 체내 항상성 유지를 위해 물과 전해질의 여과 및 흡수를 통해 체액의 양과 전해질 균형을 조절하고 체액의 양과 혈관 활성 물질을 통해 혈압조절에도 관여한다.<sup>25</sup>

급성 신장염은 일반적으로 사구체 손상이 수일에서 수주에 걸쳐 발생하는 것을 의미한다. 신장에 손상을 주는 것은 원발성 감염보다는 주로 상기도감염이나 피부감염 등에서 보이는 연쇄상 구균의 감염 후 만들어진 항체가 항원과 반응하여 불용성의 면역복합체가 생성되고, 이것이 사구체의 기저막에 포획되어 또 다른 염증반응이 나타나 발생한다.<sup>26</sup> 사구체의 손상 및 저하된 GFR로 염분과 수분의 저류 때문에 체액증가, 부종 및 고혈압이 발생하고 심할 경우 호흡곤란과 기좌호흡, 수포음이 나타나며 혈뇨, 단백뇨, 핏뇨 등의 증상이 발생하게 된다. 수주에서 수개월 이내 호전되나 20 % 이상의 성인에서는 1년 후까지 지속되는 만성적인 신기능의 저하가 올 수 있다<sup>24,26</sup>.

신장염은 한의학적으로 風水, 浮腫, 尿濁, 尿不利, 癃閉, 淋症 등의 범주에 속하며 風寒濕 外邪의 侵襲 후에 속발하는 병증이다. 尿毒이 內攻하여 頭暈, 心悸, 浮腫, 惡心嘔吐 등의 증상과 심하면 昏迷抽搐 증상을 동반할 수 있다고 하였으며, 치료는 대개 清熱利水, 祛風消腫의 방법을 사용하게 된다<sup>23,24</sup>.

비해는 도꼬로마(*Dioscorea tokoro* MAKINO)의 根莖을 건



조한 것으로 性味는 平苦하고 歸經은 肝·胃·膀胱으로 利濕濁, 祛風濕의 효능이 있어 下焦濕熱로 인한 淋濁과 白帶에 사용한다<sup>27)</sup>.

음곡(KI<sub>10</sub>)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로 補腎培元, 調經利水의 효능이 있으며 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難을 치료하는데 選穴된다<sup>28,29)</sup>.

염증은 병원성 미생물, 물리적 자극, 화학적 자극, 면역학적 자극 등과 같은 여러 가지 자극으로부터 발생한 손상에 의해 야기되는 생체의 반응으로 손상된 조직이나 장기의 치유 및 침범한 미생물을 파괴하는 과정이다. 이때 활성화된 면역세포들은 각종 cytokine을 분비하여 염증반응을 조절하는데, 사구체 신염에서도 그 역할을 담당하게 된다<sup>1,30)</sup>.

지질 다당체의 한 종류로 그람 음성균의 외막성분인 LPS는 내독소로 작용하여 대식세포로 하여금 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ), IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시키며, nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2) 등 염증매개물질을 분비시켜 염증 반응을 일으킨다<sup>31,32)</sup>. 이런 물질들은 역작용으로 신장의 mesangium cell을 자극해 NO분비를 유발시켜 정상적인 신기능을 파괴하고, 세포증식을 일으켜 신장손상에 관여한다<sup>33,34)</sup>.

급성 신장염의 치료는 자연관해가 일어날 때 까지 항생제와 대증요법으로 연쇄상 구균 감염을 제거하는 데 초점을 맞추고 있으며 부종과 고혈압을 조절하기 위해 이뇨제와 항고혈압제제를 사용하나, 10~15% 이상의 성인에서 만성화되어 혈뇨, 단백뇨, 신기능 저하가 나타날 수 있다<sup>25,35)</sup>. 급성 신장염에는 약물을 이용한 대증치료 보다 한의학적 치료가 보다 유효하다고 생각되는데, 임상에서 신장염 환자들의 한약에 대한 부정적인 인식 때문에 약물치료보다 외부 자극인 침이나 약침치료가 효율적이라고 생각된다. 신장염과 관련된 한의학적 연구로는 Park et al<sup>17)</sup>, Lee et al<sup>18)</sup>, Yoon et al<sup>19)</sup>, Her et al<sup>20)</sup>, Cho et al<sup>21)</sup>, Kwak et al<sup>22)</sup>에서 여러 약침을 음곡에 자침하여 유의한 효과를 보인 연구가 있었으나 利濕濁, 祛風濕의 효능이 있어 下焦濕熱로 인한 증상을 치료하는 비해를 신장염에 적용한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 비해약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 비해약침을 시료로 정상 흰쥐의 간 세포에 대한 세포 독성을 확인하고 LPS투여 후 혈청과 신장 조직 내 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정하였고, 음곡에 비해약침 투여 후 혈액분석, 소변분석, 신장 내 염증활성 평가를 시행하였다.

우선 정상 흰쥐의 간 세포에 비해약침을 1, 2.5, 5%의 농도로 투여 후 간 세포에 대한 세포 독성을 확인한 결과

농도가 높을수록 cell viability가 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이가 없어서(Fig. 1), 중간 농도인 2.5%의 TR-P를 사용하였다.

TNF- $\alpha$ 는 cytokine의 하나로 염증 반응과 면역 반응에서 일차적 중개자로 작용하며 조직의 보호와 항상성 유지에 중추적 역할을 한다<sup>36)</sup>. Hruby et al<sup>37)</sup>의 연구에서는 TNF- $\alpha$ 에 대한 항혈청 및 protease억제제에 의해 신사구체의 파괴가 감소했다고 하였으며 TNF- $\alpha$ 가 신사구체를 손상시켜 그 기능에 영향을 미치는 것으로 알려졌다.

염증 반응이 가장 활발히 나타난 시간대를 알아보고자 LPS 투여에 따른 시간당 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화를 분석하였는데, 각각 정상군과 LPS투여군의 혈청과 신장조직에서 TNF- $\alpha$  농도변화를 분석하였다. 혈청검사에서는 정상군보다 LPS투여군에서 TNF- $\alpha$ 가 1시간과 3시간 후 모두 증가하였으나 1시간 후 측정치가 유의하게 증가하였다. 신장조직검사에서는 정상군과 LPS투여군에서 TNF- $\alpha$ 가 1시간 후에는 차이를 보이지 않았고, 3시간 후에는 유의하게 증가하였다. 이에 LPS 투여에 따른 염증 반응을 극대화하기 위해 혈청검사는 투여 1시간 후, 신장조직검사는 투여 3시간 후에 시행하였다(Fig. 2, 3). WBC는 인체보호 시스템 중 자발적으로 움직일 수 있는 세포로 골수와 림프조직에서 형성되고 다양한 종류의 화학적 인자들에 반응하여 감염 부위와 염증 부위로 이동하므로 염증반응을 감별하는 중요한 혈액검사 중 하나이다<sup>1)</sup>. WBC의 구성 중 하나인 neutrophil은 가장 많은 분포를 차지하며 염증반응 초기에 주역을 담당하여 이물을 탐식하고 살균하는 역할을 담당한다<sup>38)</sup>. 본 실험에서 TR-P군의 혈중 WBC는 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고, Saline군에서도 혈중 WBC가 감소하였으나 유의성은 없었다. 특히 WBC 중 염증 초기와 관련 있는 neutrophil 비율을 보았을 때 TR-P군에서 정상군, LPS군, saline군에 비해 유의하게 감소하였다. 이는 음곡(KI<sub>10</sub>)에 시술한 비해 약침이 신장염 병태모델에서 염증반응을 억제한 것으로 사료된다(Fig. 4, 5).

Creatinine은 creatine으로부터 변환 되는 질소 화합물이다. 이는 BUN과 달리 단백 섭취나 위장관 출혈과 같은 외적 인자의 영향을 받지 않아 특이성이 크고 신장 기능에 뛰어난 지표로 사구체에서 배설되고 세뇨관에서 재흡수되지 않는다. 혈중 creatinine 농도는 신장의 배설 기능과 관련이 있는데, 신장 손상으로 인해 신혈류량이 감소하거나 GFR이 감소할 때 증가한다<sup>39,40)</sup>. 본 실험에서 혈청 creatinine은 LPS군과 saline군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, TR-P군은 LPS군과 saline군에 비해 유의하게 감소하였다.

CINC-1은 IL-8계통으로 내피세포에서 분비되어

neutrophil을 유도하며 활성화시키며 그 농도를 측정하여 염증에 관여하는 neutrophil의 활성도를 평가할 수 있다<sup>41)</sup>. 본 실험에서 CINC-1은 LPS군에서 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, TR-P군은 LPS군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 음곡(KI<sub>10</sub>)에 시술한 비해약침이 신장염과 관련된 혈청검사지표를 유의하게 감소시킨 것으로 보아 비해약침의 祛濕濁, 祛風濕의 효능으로 신장 실질 내 염증을 억제하는데 유효한 것으로 사료된다(Fig. 6, 7).

신장은 사구체에서의 여과과정을 통해 소변을 생성하는데, 염증반응으로 인해 WBC가 침윤되고 mesangium cell 및 내피세포가 증식하여 사구체가 비대해지면 혈관이 폐쇄되고 정상적인 여과과정이 일어나지 않아 소변량이 줄고 체액량이 증가하게 된다. 결과적으로 고혈압, 부종, 핏뇨 등의 전신증상이 나타나며, 염증에 의한 혈관 손상으로 정상적인 여과 과정에서 통과할 수 없는 적혈구, 단백질 등이 소변으로 배출된다<sup>2,31)</sup>.

본 실험에서 12시간동안 흰쥐의 소변을 채취하여 배뇨량과 요중 creatinine 농도를 측정하였다. 배뇨량은 LPS군과 saline군이 정상군에 비해 현저하게 감소하였고, TR-P군은 LPS군과 saline군에 비해 배뇨량이 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 요중 creatinine은 LPS군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, TR-P군은 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. 이는 비해의 祛濕濁효과로 신장의 기능 개선에 도움을 주는 것으로 보이나, 요량 증가에 대한 유의성은 나타나지 않아 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 보인다(Fig. 8, 9).

MPO는 골수계의 세포에 존재하는 peroxidase로 전골수 세포의 azurophilic granules에서 합성되고 성숙 호중구가 될 때까지 세포 내에 존재하게 된다. MPO는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 halogen ion의 존재 하에서 강력한 살균작용을 하여 여러 미생물에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하지만 정상적인 조직도 손상시킬 수 있으며 신사구체도 이에 영향을 받을 수 있다고 알려져 있다<sup>38, 42-43)</sup>. 본 실험에서 LPS군, saline군, TR-P군은 정상군에 비하여 renal MPO가 유의하게 증가하였고, TR-P군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다. 이는 음곡(KI<sub>10</sub>) 비해약침이 신장 실질 내 염증을 억제하는데 유효한 것으로 사료된다(Fig. 10).

이상의 결과를 요약하면 음곡(KI<sub>10</sub>) 비해약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 대하여 혈액 내 WBC, neutrophil의 증가를 억제하며, 혈청 creatinine 축적을 감소시키고, CINC-1을 감소시켰다. 또한 여과율의 감소로 인한 핏뇨를 개선하고, 소변 내 creatinine농도를 감소시켰으며, 신장 MPO의 농도를 감소시켰다. 이러한 결과는 비해의 祛濕濁,

祛風濕의 효과가 작용한 것으로 생각되며, 따라서 음곡에 시행한 비해약침은 신장염의 치료에 효과가 있을 것으로 생각되는바 향후 이에 대한 기초연구와 임상적 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

음곡(KI<sub>10</sub>)에 시술한 비해약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염 모델에 미치는 영향을 알아보기 위하여 약침액을 시료로 정상 흰쥐의 간 세포에 대한 독성을 확인하고 LPS 투여 후 혈청 및 신장 내 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정하였고, 음곡에 비해약침 시술 후 혈액 및 혈청 분석, 소변량 및 소변분석, 신장 내 염증활성 평가를 통해 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. TR-P군에서 혈중 WBC, neutrophil의 비율, 혈청 creatinine, CINC-1의 농도가 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다.
2. TR-P군에서 배뇨량이 증가하였으나 유의성은 없었고, 요중 creatinine의 농도와 신장 조직의 MPO가 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다.

## VI. References

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Seoul : Jungdam, 2002 : 418-21, 318-9, 446-9.
2. Futoshi S. Steps to internal medicine. Seoul : Jungdam, 2008 ; 7 : 116-20.
3. Marriot JB, Westby M, Cookson S, Guckian M, Goodbourn S, Muller G. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- $\alpha$  production. *J Immunol*, 1998 ; 161(8) : 4236-43.
4. Lindermann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes: Activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J DentRes*, 1988 ; 67(8) : 1131-5.
5. Abdel-Bakky MS, Hammad MA, Walker LA, Ashfaq MK. Silencing of tissue factor by antisense deoxyoligonucleotide prevents monocrotaline/LPS

- renal injury in mice. Arch Toxicol. 2011 ; 85(10) : 1245-56.
6. Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine. Herbology. Seoul : Yeonglimsa. 2007 : 361-2.
  7. Hong YN. Anti-arthritic substances isolated from the rhizomes of *Dioscorea tokoro* MAKINO and their regulation of inflammatory cytokines [dissertation]. Seoul : Seoul National Univ. 2008. English.
  8. Lee SR. Gyeonghyeolhak. Seoul : Cheonghong. 2007 : 526-7.
  9. Ju SM, Park JM, Jeon BJ et al. Preventive effect of *Puerariae Radix* and *Rehmanniae Radix Preparata* on cisplatin-induced rat mesangial cell apoptosis. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2008 ; 22(5) : 1140-6.
  10. Lee HS, Han SH, Han SH. Effects of lycii fructus water extracts on the lead-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2001 ; 22(2) : 193-8.
  11. Lee YK, Yoon KM, Jang SY, Kang SB. Nephroprotective effects of *Daebuncheong-eum* aqueous extracts on cisplatin-induced acute renal failure in rats. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2009 ; 30(4) : 821-31.
  12. Yu DJ, Yoon KM, Jang SY, Lee YK, Kang SB. Nephroprotective effects of *Taeksa-san* aqueous extracts on cisplatin-induced rat acute renal failure. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2009 ; 30(4) : 832-44.
  13. Lee KH, Han YH, Kim YS. Effects of astragali radix(AR) on chronic renal injury in rats. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2010 ; 31(1) : 66-78.
  14. Kim TU, Yoon GM, Im EY, Shin HC, Kang SB. Nephroprotective effects of *Opi-san* aqueous extracts on cisplatin-induced rat acute renal failure. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2010 ; 31(3) : 600-11.
  15. Kim DN, Yoon GM, Shin HC, Kang SB. Nephroprotective effects of *Manjeonmoktong-san* on cisplatin-induced rat acute renal failure. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2010 ; 31(3) : 620-30.
  16. Jo SI, Kim HW. Beneficial effect of nodus nelumbinis rhizomatis extract on cisplatin-induced kidney toxicity in rats. The Korea Journal of Herbology. 2003 ; 18(4) : 127-34.
  17. Park BM, Hur B, Yim YK. Anti-inflammatory effect of plantaginis semenHerbal-acupuncture at KI<sub>10</sub> on LPS-induced nephritis in rats. The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2009 ; 26(2) : 127-43.
  18. Lee JH, Kim JH, Kim YI. Anti-inflammatory effect of benincasae semen herbal-acupuncture at KI<sub>10</sub> on nephritis in rats. Journal of Pharmacopuncture. 2010 ; 13(2) : 51-65.
  19. Yoon KS, Kang JH, Lee H. Anti-inflammatory effect on desmodii herba pharmacopuncture at KI<sub>10</sub> on nephritis in rats. The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2011 ; 28(3) : 43-54.
  20. Her MS, Kim JH, Kim YI. Herbal-acupuncture at KI<sub>10</sub> on LPS-induced Nephritis in Rats. The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2011 ; 28(6) : 69-83.
  21. Cho E, Kang JH, Lee H. Anti-inflammatory effect of akebiae lignum pharmacopuncture at KI<sub>10</sub> on LPS-induced acute nephritis in rats. The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2012 ; 29(3) : 41-53.
  22. Kwak KI, Kang JH, Lee H. The effect of phaseoli semen herbal-acupuncture at KI<sub>10</sub> in lipopolysaccharide induced acute nephritis in rats. The Acupuncture. 2013 ; 30(3) : 61-73.
  23. Du HK. Oriental kidney system internal medicine. Seoul : Sungbosa. 2003 : 249, 393-401.
  24. Frank HN. The CIBA collection of medical illustrations. Seoul : Jungdam. 2000 : 2-3, 131.
  25. Futoshi S. Steps to internal medicine. Seoul : Jungdam. 2008 : 12-23, 120
  26. E Braunwakd, A Fauci, D Kasper, S Hauser, D Longo, J Jameson. Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. Seoul : MIP. 2006 : 1827, 1832-4.
  27. Joo YS. Ungok herbology. Jeonbuk : Woosuk. 2013 : 742-4.
  28. Yim YK, Kim JP, Kim TH. University of meridian & acupoint(Kakron). Daejeon : Obikihoek. 2006 :

- 676–8.
29. Korean Acupuncture & Moxibustion Society Text–book Compilation Committee. The acupuncture and moxibustion. Sang. Gyeonggi : Jipmoondang, 2008 : 175–6.
30. Song KY, Ji JG, Ham EG. Core pathology. Seoul : Korea Medical Books Pub. 1998 : 63, 78–79, 573–84
31. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 ; 211 : 32–24.
32. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 ; 4(3) : 281–6.
33. Ifuku M, Miyake K, Watanebe M et al. Various roles of the cytokine mRNA expression in different forms of glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 2013 ; 38(2) : 115–23.
34. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner J–D, Cohen J. Septic shock Pathogenesis. *Lancet.* 1991 ; 338(8769) : 732–6.
35. Committee of Korean Renal Internal Medicine Text–book Publisher. Renal internal medicine. Seoul : Koonjachulpansa, 2011 : 40–5.
36. Dayer JM, Burger D. Interleukin–1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors. *Eur Cytokine Netw.* 1994 ; 5(6) : 563–71.
37. Hruby ZW, Shirota K, Jothy S, Lowry RP. Antiserum against tumor necrosis factor–alpha and a protease inhibitor reduce immune glomerular injury. *Kidney Int.* 1991 ; 40(1) : 43–51.
38. Futoshi S. Steps to internal medicine. Seoul : Jungdam, 2008 : 71–80.
39. Lee SY, Chong YS, Kwon OH, Song KS. Clinical laboratory medicine. 7th ed. Seoul : Yonsei University Press, 2000 : 239–41.
40. Yi KN, Kwon OH. Clinical pathology file. 3th ed. Seoul : Eui–Hak Publishing & Printing Co, 2000 : 102–5.
41. Min BK, Lee GI, Ha JY et al. Inhibitory effects of triterpenoids on interleukin–8/CINC–1 induction in LPS–stimulated rat peritoneal macrophages. *Natural Product Sciences.* 1996 ; 2(1) : 48–55.
42. Lubbert M, Herrmann F, Koeffler HP. Expression and regulation of myeloid–specific genes in normal and leukemic myeloid cells. *Blood.* 1991 ; 77(5) : 909–24.
43. Malle E, Buch T, Grone HJ. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int.* 2003 ; 64(6) : 1956–67.