

Original Article

LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 대한 음곡(KI10) 저령약침의 효과

이정윤¹, 장승훈¹, 전종익¹, 임윤경¹

¹대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실

Effects of Polyporus Herbal-acupuncture at KI10 on LPS-induced nephritis in rats

Jeong-Yun Lee¹, Seung-Hoon Jang¹, Jong-Ik Jeon¹, Yun-Kyoung Yim¹

¹Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the effects of *Polyporus* Herbal-acupuncture(PO-HA) at KI10 (Umgok) on nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rats.

Methods: Rats were allocated into normal, control, and 2 experimental groups. The rats in the control group were intra-peritoneally injected with LPS for nephritis induction. The rats in the groups of experiment 1 and experiment 2 were treated with Saline injection, and PO-HA, respectively at KI10 three times for a week and then intra-peritoneally injected with LPS. To evaluate the effects of PO-HA at KI10, WBC count in blood, creatine, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1(CINC-1) in serum, urinary volume, creatinine, total protein in urine, myeloperoxidase(MPO) in kidney were measured.

Results: PO-HA at KI10 significantly suppressed the increase of WBC in blood, TNF- α , CINC-1 in serum, MPO in kidney of LPS-stimulated rats. PO-HA at KI10 significantly suppressed the increase creatinine, total protein in urine of LPS-stimulated rats.

Conclusions: According to these results, it is postulated that PO-HA at KI10 has an anti-inflammatory and renal-protective effects on LPS-induced nephritis in rats. Therefore, it is suggested that PO-HA at KI10 may be an useful therapeutics for nephritis in clinical field after further researches.

Key Words : LPS-induced nephritis, Polyporus Herbal-acupuncture, KI10

서론

신장은 후복막장기로 전해질과 수분을 조절하여 순환혈액량을 조절하고, 암모니아 대사산물인 요소를 포함한 독성물질을 배출함으로써 체내환경을 유지하는 장기로 순환혈액의 20~25%가 공급되며, 여과와 재흡수를 위하여 얇은 막구조를 가지고 있어 독성물질에 의한 손상에 취약하다¹⁾.

이러한 신장에 발생하는 질환 중 급성 신장염은

갑자기 시작하는 혈뇨, 단백뇨와 더불어 사구체 여과율 감소로 인한 질소혈증과 신장을 통한 염분과 수분의 축적이 특징적이다. 원인은 매우 다양하며 각종 감염에 의해 발생하는 것이 대부분이며, 전신성 홍반성 루푸스, 혈관염 등 전신질환에 의하거나, 1차성 사구체질환으로 인해 발생하기도 한다²⁾.

신장염은 한의학적으로 風水, 浮腫, 尿濁, 虛勞 등의 범주에 속하는 것으로 대개 風, 寒, 濕 外邪의 侵襲 후에 속발하는 병증으로 風寒, 風熱, 寒濕 등에

• Received : 8 June 2015 • Revised : 25 September 2015 • Accepted : 25 September 2015
• Correspondence to : 임윤경(Yun-Kyoung Yim)
대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실 12407호
Tel : +82-42-280-2610, Fax : +82-42-280-2647, E-mail : docwindy@dju.kr

신장이 손상되거나, 肝腎陰虛와 內熱로 인해 氣機가 失常하여 발생하는 질환이다. 한의학적인 신장염의 치료법은 병증에 따른 辨證施治를 원칙으로 하며, 기본적인 치법은 淸熱과 利水이다²⁾.

猪苓(*Polyporus*)은 多孔菌科(구멍쟁이버섯과 ; *Polyporaceae*)에 속한 真菌인 猪苓의 菌核을 乾燥한 것으로, 性은 平 無毒하고, 味는 甘淡하며, 歸經은 腎, 膀胱經이며, 利水滲濕하는 효능이 있고³⁾, 傷寒, 溫疫에 의한 大熱을 제거한다⁴⁾. 성분으로는 sterol 계통 화합물과 다당체 등이 알려져 있는데, ergosterol 화합물은 염증억제작용과⁵⁾ 암세포에 대한 세포독성이 보고되어 있고⁶⁾, 다당체는 항암력을 증가시키고⁷⁾, 대식세포의 기능을 증가시켜 면역효능을 높인다는 보고가 있다⁸⁻¹⁰⁾. 또한 저령의 다당체는 간세포에 대하여 만성 간염치료의 효능도 보고되어 있다¹¹⁾.

약침요법은 신침요법의 일종으로 혈위주사요법이라고도 하며, 경락학설과 약물이론에 근거하여 환자의 질병에 상응하는 경혈과 약물을 선택하고 약침액을 경혈 내에 자입하여 경혈과 약물이 질병에 대해 종합적인 작용을 발휘하여 질병을 치료하는 방법으로 약물의 흡수가 빠르고¹²⁾, 경구투여가 불가능한 경우에 처치할 수 있으며, 환처에 처치할 수 있는 등의 장점이 있다^{13,14)}. 이러한 약침요법을 신장염 치료에 상응하는 경혈에 함께 시술한다면, 단지 신장염 치료에 상응하는 경혈에 침 시술을 하는 것 보다 더 좋은 효과를 거두리라 예상하였다.

陰谷(KI10)은 무릎 뒤안쪽면, 반힘줄근 힘줄 (semitendinosus tendon)의 바로 가쪽, 오금주름 (popliteal crease) 위에 위치하며, 오금주름 위, 반힘줄근의 힘줄(semitendinosus tendon)과 반막근의 힘줄(semimembranosus tendon) 사이에서 취혈한다. 陰谷(KI10)은 足少陰腎經의 滲水穴이며, 足少陰腎經, 衝脈, 陰維脈의 交會穴로서, 補腎培元, 調經利水の 효능이 있어, 小便急引, 陰痛, 陰痿, 小便黃, 陽痿, 月經不調, 崩漏, 小便難 등을 치료한다¹⁵⁾.

陰谷(KI10)에 시술한 약침이 신장염에 미치는 영향에 관한 기존의 실험 연구로는 瞿麥약침,¹⁶⁾ 車前子약침,¹⁷⁾ 冬瓜仁약침,¹⁸⁾ 金錢草약침,¹⁹⁾ 木通약침²⁰⁾

등을 이용하여 유효한 효과를 얻은 연구가 보고된 바 있으나, 아직 저령약침(*Polyporus Herbal-acupuncture, PO-HA*)을 이용한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 저령약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자, 저령약침액을 제조하여, LPS로 유도된 신장염 병태모델 흰쥐의 陰谷(KI10) 상응 부위에 시술하고, 혈액 및 혈청 분석, 소변 분석, 신장실질내 염증활성 분석을 시행하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 동물

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

2) 약재

본 실험에 사용된 저령 (*Polyporus*; 이하 PO)는 ○○대학교 한방병원에서 구입하여 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

2. 방법

1) 약침액의 조제

분쇄기를 이용해서 저령 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3 시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축 하였다. 농축액에 90% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액

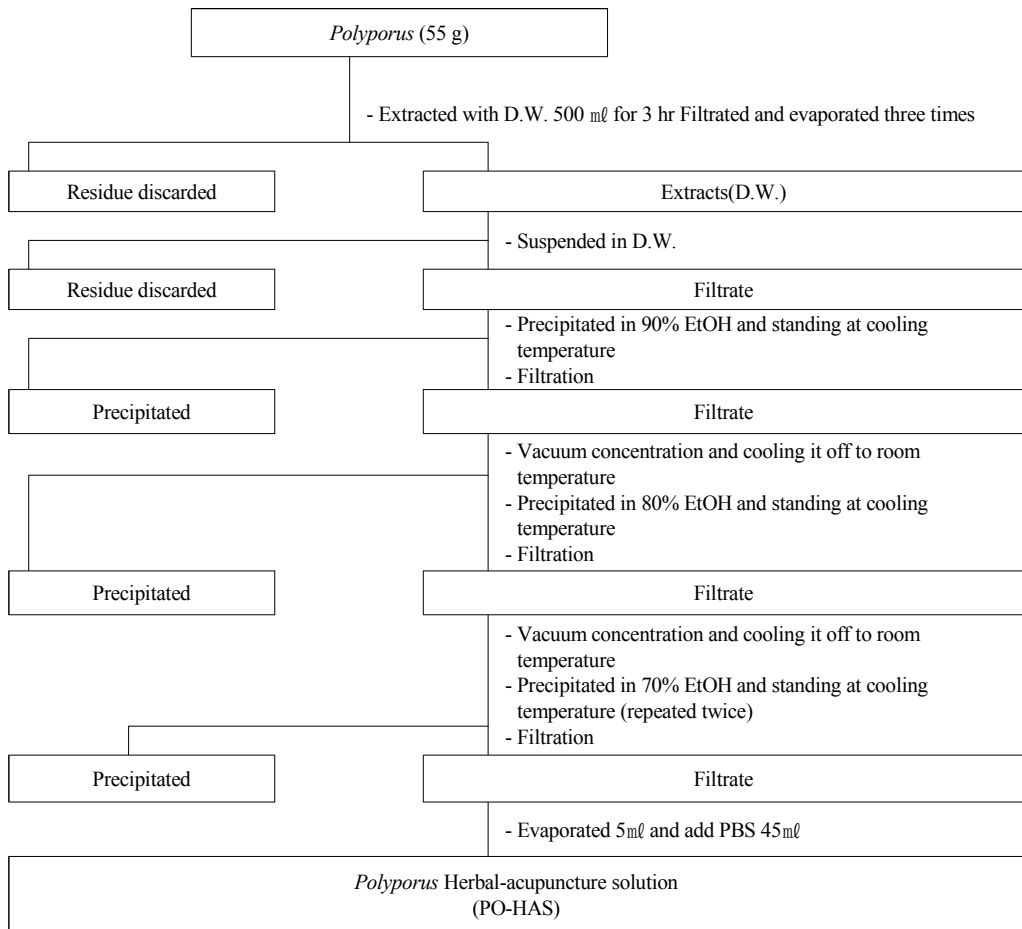
을 다시 여과하였다. 이 여과액에 80% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 70% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 저령 55g 으로부터 얻은 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 날렸을 때 건조분말은 1.299 g이었다(수율 2.36%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된

농축액에 PBS를 첨가하여 10%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).

2) 세포독성

(1) 간세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD rat의 간조직을 사용하였다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10% FHO)와 collagenase typeIV(300u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 하였다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 잘 분리되도록 하였으며, 얻어진 간세포는 RPMI 1640 media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.



Scheme 1. Manufacturing procedure of *Polyporus* Herbal-acupuncture Solution.

(2) MTT assay

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

3) 신장염 동물 모델

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

4) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), Saline 대조군(Saline), 저령약침군(PO-HA)의 4군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, Saline군, 저령약침군은 각각 2mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. Saline군과 저령약침군은 LPS 투여 1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI10) 상응부위에 Saline 주입 또는 저령약침 처치를 주3회 실시하였다. 음곡(KI10) 상응부위는 후지 오금주름 위, 반힘줄근 힘줄의 바로 가쪽에 취하였다.

각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

(1) 정상군(Normal) : 아무 처치하지 않은 정상

SD rat.

- (2) LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2mg/kg으로 복강 투여한 군.
- (3) Saline군(Saline) : 실험전 1주일간 Saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.
- (4) 저령약침군(PO-HA) : 실험전 1주일간 10%의 저령 약침액 0.2ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.

5) 결과 분석

(1) 혈액 분석

LPS 처리 1시간 뒤 각 동물에서 혈액을 채취하여 (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 WBC 수를 측정하였다. 혈청 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1(CINC-1), creatinine의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변 분석

Metabolic cage에서 12시간동안 소변을 채취하여, 배뇨량과 뇨중 total protein과 creatinine 농도를 kit를 이용하여 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후 ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.010% sodium azide가 첨가된 0.1M phosphate buffer (pH7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80 $^{\circ}$ C에서 보관되었다가 ELISA kit을 이용하여 MPO의 농도를 측정하였다.

(4) 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(ver 18.0 KO)을 이용하였다. 결과값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 실험군의 데이터는 Kruskal-wallis test를 이

용하여 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. 저령약침액의 세포독성

저령약침액을 1%, 2.5%, 10%로 희석하여 정상 rat의 간세포에 대한 세포독성을 확인하였다(Figure 1).

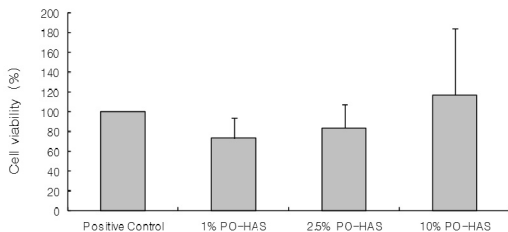


Fig. 1. Cytotoxicity of PO-HAS on rat liver cells.

Liver cells from normal SD rat were cultured in RPMI 1640 with 10% FBS medium for 72h with or without various concentrations of PO-HAS (*Polyporus Herbal-acupuncture solution*). The cell viability were measured by MTT assay.

Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments. Control : culture medium without PO-HAS
10%, 2.5%, 1% PO-HAS : culture medium with 10%, 2.5%, 1% PO-HAS respectively

2. 음곡 저령 약침이 rat의 신장염에 미치는 영향

1) 혈액 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 WBC의 수를 측정하고, 혈청을 분리하여 serum creatinine, TNF- α , CINC-1의 농도를 측정하였다.

(1) WBC in blood

LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. Saline군은 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다. 저령약침군은 LPS군과 Saline대조군에 비하여 혈중 WBC수가 유의하게 감소하였다(Figure 2).

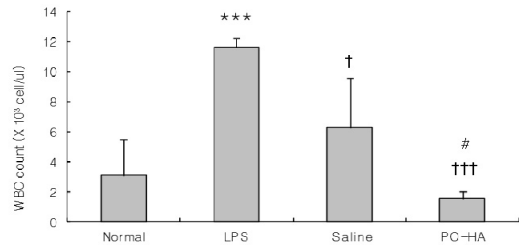


Fig. 2. Effect of PO-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200 μ l/rat) injection at KI10
PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10

*** : p(0,001 compared to normal group by Kruskal-wallis test

††† : p(0,01 compared to LPS group by Kruskal-wallis test

: p(0,05 compared to Saline group by Kruskal-wallis test

(2) serum creatinine

LPS군, Saline군, 저령약침군에서 정상군에 비하여 creatinine 농도가 유의하게 증가하였다. 저령약침군에서는 혈청 creatinine 농도가 Saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Figure 3).

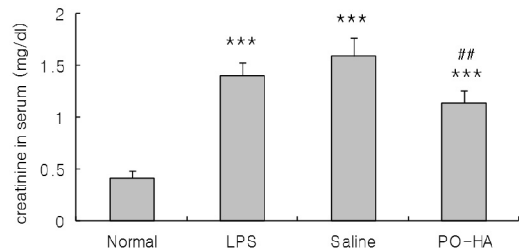


Fig. 3. Effects of PO-HA on serum creatinine level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200 μ l/rat) injection at KI10

PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10

*** : p(0,001 compared to normal group by Kruskal-wallis test

: p(0,01 compared to Saline group by Kruskal-wallis test

(3) serum TNF- α

LPS군, Saline군, 저령약침군에서 정상군에 비하여 혈청 TNF- α 가 유의하게 증가하였다. Saline군과 저령약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 가 유의하게 감소하였다(Figure 4).

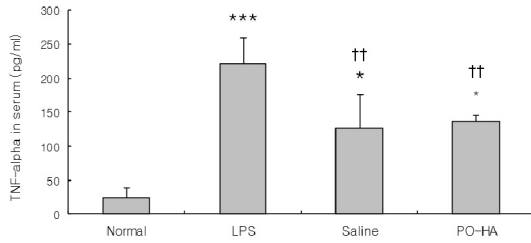


Fig. 4. Effects of PO-HA on serum TNF-alpha level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200μl/rat) injection at K110

PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200μl/rat) at K110

*** : p(0,001) * : p(0,05) compared to normal group by Kruskal-wallis test

† † : p(0,01) compared to LPS group by Kruskal-wallis test

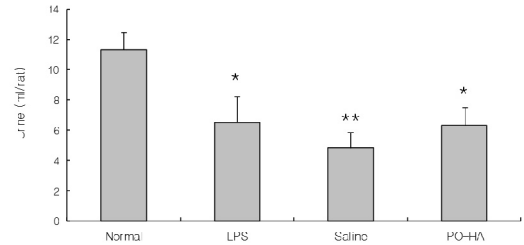


Fig. 6. Effect of PO-HA on urinary volume in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200μl/rat) injection at K110

PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200μl/rat) at K110

** : p(0,01) * : p(0,05) compared to normal group by Kruskal-wallis test

(4) serum CINC-1

LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. 저령약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 감소하였다(Figure 5).

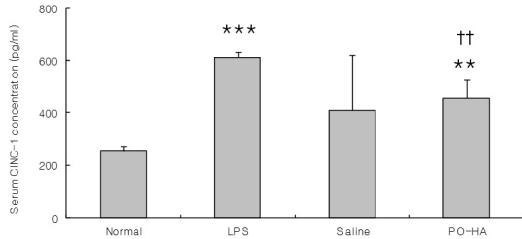


Fig. 5. Effects of PO-HA on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200μl/rat) injection at K110

PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200μl/rat) at K110

*** : p(0,001) ** : p(0,01) compared to normal group by Kruskal-wallis test

† † : p(0,01) compared to LPS group by ANOVA test

2) 소변 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 소변 양과 뇨중 creatinine과 total protein의 양을 측정하였다.

(1) 이노 활성

LPS군과 Saline대조군, 저령약침군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 유의하게 감소하였다(Figure 6).

(2) Creatinine in urine

LPS군의 뇨중 creatinine 농도는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 저령약침군에서는 LPS군 및 Saline군에 비하여 뇨중 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Figure 7).

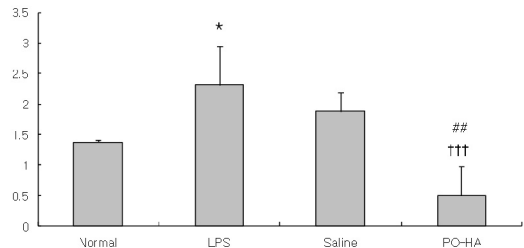


Fig. 7. Effects of PO-HA on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200μl/rat) injection at K110

PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200μl/rat) at K110

* : p(0,05) compared to normal group by Kruskal-wallis test

† † † : p(0,001) compared to LPS group by Kruskal-wallis test

: p(0,01) compared to Saline group by Kruskal-wallis test

(3) Total protein in urine

LPS군에서는 정상군에 비하여 뇨중 total protein이 유의하게 증가하였다. Saline군과 저령약침군에서는 LPS군에 비하여 뇨중 total proteain 양이 유의하게 감소하였다(Figure 8).

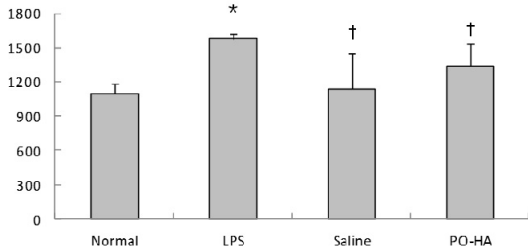


Fig. 8. Effects of PO-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD (n=3).
 Normal : normal SD rat
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200 μ l/rat) injection at KI10
 PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10
 * : p(0,05 compared to normal group by Kruskal-wallis test
 † : p(0,05 compared to LPS group by Kruskal-wallis test

3) Renal MPO 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장조직을 분획한 후 MPO의 농도를 측정하였다. LPS군, Saline군 및 저령약침군에서는 정상군에 비하여 renal MPO가 유의하게 증가하였다. 저령약침군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Figure 9).

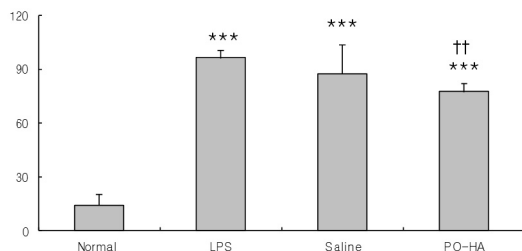


Fig. 9. Effects of PO-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean \pm SD (n=5).
 Normal : normal SD rat
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and Saline(200 μ l/rat) injection at KI10
 PO-HA : LPS (2mg/kg) challenge and PO-HA(10%, 200 μ l/rat) at KI10
 *** : p(0,001 compared to normal group by Kruskal-wallis test
 † † : p(0,01 compared to LPS group by Kruskal-wallis test

고찰

신장염은 한의학적으로 風水, 浮腫, 尿濁, 虛勞 등

의 범주에 속하는 것으로 기본적인 치법은 淸熱과 利水이다²⁾. 猪苓(Polyporus)은 性은 平 無毒하고, 味는 甘淡하며, 歸經은 腎, 膀胱經이며, 利水滲濕하는 효능이 있고³⁾, 傷寒, 溫疫에 의한 大熱을 제거한다⁴⁾. 陰谷(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, 調經利水の 효능이 있다. 따라서 약침요법을 시행할 약물로서 猪苓을 선택하고, 약침요법을 시행할 경혈로서 陰谷(KI10)을 선택하여 신장염 모델에 약침요법을 시행한다면 신장염 치료에 유의미한 결과가 있을 것으로 생각하였다.

이에 저자는 陰谷(KI10) 부위에 시술한 저령약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 저령약침액을 시료로 정상 rat의 간세포에 대한 세포독성을 확인하고, LPS로 유도된 신장염 모델 흰쥐의 陰谷(KI10) 상응 부위에 저령약침 처치 후 혈액 및 혈청 분석, 소변 분석, 신장실질내 염증활성 분석을 시행하였다.

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성박테리아의 세포막의 구성성분으로 대식세포의 활성화 인자이며 자극된 대식세포는 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-10 등과 같은 cytokine을 생성하여²¹⁻²³⁾, 세포매개성 면역반응 및 염증 반응을 유발한다. 또 LPS는 매산지움 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며 매산지움 세포와 tubular epithelial cell에 Fas 발현을 증가시킴으로서 직간접적으로 신장손상을 초래한다²⁴⁻²⁶⁾.

먼저 시술에 사용할 저령약침액의 세포독성을 파악하고자 저령약침액을 1%, 2.5%, 10%로 희석하여 정상 rat의 간세포의 viability를 관찰, 간세포에 대한 세포독성을 확인하였다. 저령약침액의 농도가 높을수록 세포의 viability가 증가하였다. 본 연구에서는 cell viability가 가장 높았던 10% 저령약침액을 사용하여 실험을 수행하였다(Figure 1).

WBC는 골수에서 유래하고 호중구, 호산구, 호염구, 림프구, 단핵구 등으로 구성되며, 염증이 발생하면 혈관의 내피 사이를 빠져 나가 혈관 밖으로 유주하고 화학주성에 의해 항원과 이물로 이동하여 각각

의 기능을 수행하여 염증반응을 유발한다.

본 실험에서 LPS에 의해 유의하게 증가된 혈중 WBC는 저령약침에 의해 Saline보다 더 유의하게 감소하였다. 이는 저령약침이 신장염 모델에서 염증 반응을 억제하였음을 의미하는 것으로 사료된다 (Figure 2).

혈액 내의 creatinine은 creatine phosphate에서 생성된 creatine이 탈수되어 생긴 대사의 최종산물로, creatinine량은 인체 근육량에 비례하여 일정량이 생성되어 신장을 통하여 배설된다. Creatinine은 오로지 신장을 통해서만 체외로 배설되고 체내에서 재순환을 하지 않아 혈중 creatinine농도는 사구체의 여과에 따라 변하므로, creatinine 수치 역시 신기능의 지표가 된다²⁷⁾.

Proinflammatory cytokine인 TNF- α 는²⁷⁾ 그람 음성박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 급성염증 반응의 주된 매개자로, 내피세포와 대식세포를 자극하여 WBC의 주화성과 보충을 유도하는 chemokine을 분비토록하며, 혈액 단핵구와 T 림프구, neutrophil, 혈관내피세포, 피부섬유아세포 등의 세포에서 IL-8 유전자 발현을 유도하여^{28,29)} IL-8의 분비³⁰⁾ 및 활성화와 neutrophil의 침투로 인한 조직손상을 통해서 lysosomal 효소와 neutrophil에 의해 과산화음이온을 방출시킨다³¹⁾. TNF- α 로 유도된 chemokine인 IL-8은 염증반응에서 neutrophil를 유도하며 cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1(CINC-1)은 IL-8 family의 일원이다.

본 실험에서 혈청 creatinine, TNF- α , CINC-1의 농도를 측정한 결과, LPS에 의해 증가한 혈청 creatinine 농도가 저령약침군에서는 LPS군 및 Saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Figure 3). LPS에 의해 증가한 혈청 TNF- α , CINC-1은 Saline과 저령약침에 의해 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Figure 4, 5). 이는 저령약침이 LPS로 유도된 신장염 병태모델에서 염증을 억제하고 신장의 기능을 보다 정상으로 회복시켰음을 의미하는 것으로 사료된다.

신장의 여러 역할 중 뇨를 형성하여 체액의 양과

전해질 조성을 정상으로 유지하는 것은 신장의 가장 핵심적인 역할이다. 정상적인 사구체에서 혈액 속의 적혈구나 단백질은 사구체를 통과할 수 없다. 그러나 사구체에 질환이 있어 파괴되거나 투과성이 증가되면 단백질이 나오게 된다¹⁾.

본 실험에서는 흰쥐의 소변을 채취하여 소변양과 뇨중 creatinine, total protein의 양을 측정하였다. 소변량은 LPS군과 Saline대조군, 저령약침군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 유의하게 감소하였다 (Figure 6). 뇨중 creatinine은 LPS군 및 Saline군에 비하여 저령약침군에서 농도가 유의하게 감소하였다(Figure 7). 뇨중 total proteain 양은 Saline군과 저령약침군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Figure 8). 이는 저령약침이 신장염에 따른 사구체의 손상을 예방하였음을 보여주는 것으로 사료된다.

Myeloperoxidase(MPO)는 neutrophil로부터 주로 방출되는 효소이므로 MPO 분석은 염증의 지표로서 조직 속의 neutrophil의 수를 측량하는데 사용된다³²⁾.

본 실험에서는 신장실질내 염증활성도를 측정하기 위해 rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장조직을 분획한 후 MPO의 농도를 측정하였다. 저령약침군의 renal MPO는 Saline군과 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Figure 9). 따라서 저령약침이 신장실질내 염증을 억제하는데 유효한 것으로 사료된다.

이상의 결과, 陰谷(KI10)에 시술한 저령약침은 LPS로 유도된 rat의 신장염에 대하여 혈액 내 WBC의 증가를 억제하며, 혈청 내에서 creatinine 등의 노폐물 축적을 감소시키고, TNF- α , CINC-1을 감소시켜 Inflammatory cytokine을 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 효과는 LPS에 의해 증가한 혈청 TNF- α , CINC-1이 저령약침에 의해 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다는 점을 통해 알 수 있다. 뇨중 creatinine은 LPS군 및 Saline군에 비하여 저령약침군에서 유의하게 감소하였고, 뇨중 total proteain 양은 Saline군과 저령약침군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하여 저령약침이 신장여과조직 보호

효과가 있음을 보여주고 있으며^{1),33)}, 저령약침군의 renal MPO가 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다는 점을 통해 저령약침이 신장실질내 염증을 억제하는데 유효한 것도 알 수 있었다. 또한 Saline군에서도 LPS군에 비하여 혈중 WBC 수, 혈청 TNF- α , 뇨중 total protein이 유의하게 감소하여, 저령의 약물 효과 외에도 陰谷(KI10)의 경혈자극 효과가 작용하였을 것으로 추정된다.

따라서 陰谷(KI10)에 시술한 저령약침은 신장염의 염증반응을 유효하게 억제하고, 신장염에 따른 신기능저하를 유효하게 회복시키는 효과가 있는 것으로 생각되며, 이에는 저령의 약물효과와 陰谷(KI10)의 경혈자극 효과가 함께 작용하였을 것으로 추정된다.

결론

LPS로 유도된 신장염 모델 흰쥐의 陰谷(KI10) 상응 부위에 저령약침을 시술한 후 혈액 및 혈청 분석, 소변 분석, 신장실질내 염증활성 분석을 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저령약침군은 LPS군과 Saline대조군에 비하여 혈중 WBC수가 유의하게 감소하였고, LPS군에 비하여 혈청 TNF- α , 혈청 CINC-1, renal MPO가 유의하게 감소하였다.
2. 저령약침군에서는 LPS군 및 Saline군에 비하여 혈청 creatinine 농도와 뇨중 creatinine 농도가 유의하게 감소하였으며, LPS군에 비하여 뇨중 total protein 양이 유의하게 감소하였다.

이상의 결과를 볼 때 陰谷(KI10)에 시술한 저령약침은 신장염의 염증반응을 억제하고, 신장기능을 회복시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Du HK. Oriental Kidney System Internal Medicine. Seoul:Institute of the oriental science.

- 1993:226, 228, 247, 238-47, 326, 334-6, 361-2, 454-9, 514-6.
2. Du HK. Oriental Kidney System Internal Medicine. Seoul:Institute of the oriental science. 1993:225, 238-47, 256-7, 334-5, 359-401.
3. Committee of Korean Textbook Publisher. Herbology. 6th ed. Seoul:Yeong Lim Sa. 1999: 304-5.
4. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. The encyclopedia of Oriental herbal medicine. Seoul:Jung Dam. 2004:3700.
5. Sun Y, Yasukawa K. New anti-inflammatory ergostane-type ecdysteroids from the sclerotium of Polyporus umbellatus. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008;18:3417-20.
6. Ohsawa T, Yukawa M, Takao C, Murayama M, Bando H. Studies on constituents of fruit body of Polyporus umbellatus and their cytotoxic activity. Chem Pharm Bull. 1992;40 :143-7.
7. Oh YH, Lee UY, Lee MW, Shim MJ, Lee TS. Immuno-modulatory and Antitumor Effect of Crude Polysaccharides Extracted from Sclerotium of Grifolia umbellata. The Korean Journal of Mycology. 2004;32:23-30.
8. Zhang Y, Liu Y, Yan SC. Effect of Polyporus umbellatus polysaccharide on function of macrophages in the peritoneal cavities of mice with lesions. Cheih Ho Tsa Chih. 1991;11: 211-5.
9. May L, Yun SC. Therapeutic investigation of Polyporus umbellatus polysaccharide on the children with pure immunity. J Traditional Chinese Medicine. 1990;3:168-9.
10. Chang YF, Liu YY, Yun SC. Effect of Polyporus umbellatus polysaccharides on macrophages of liver damaged mice. Intergrated J Chinese and Western Medicine. 1991;11:

- 225-6.
11. Xiong LL. Therapeutic effect of combined therapy of *Salvia miltiorrhizae* and *Polyporus umbellatus* polysaccharide in the treatment of chronic hepatitis B. *Cheih Ho Tsa Chih*. 1993; 13:516-7.
 12. Korean Pharmacopuncture institute. *Aqua-acupuncture and clinical use*. Seoul:Korean Pharmacopuncture institute. 1997:1-5.
 13. Textbook Compilation Committee of Korean acupuncture & moxibustion medicine society. *The acupuncture and Moxibustion (volume I)*. Seoul:JipMoonDang. 2001:531-63, 1457-60.
 14. Choi MS, Ko HK, Kim CH. A study on aqua-acupuncture. *Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society*. 1990;7(1): 315-29.
 15. Meridian & Acupoint Compilation Committee of Korean Oriental Medical Colleges. *Detail of meridians & acupoints (volume II) : a guidebook for college students*. Daejeon:JongRyeoNaMu. 2012:634-6.
 16. Kim KM, Lee H, 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):66-77.
 17. 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.
 18. Lee JH, Kim JH, Kim YI. Anti-inflammatory Effect of *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture at KI10 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 KI10 on Nephritis in Rats. *Journal Of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society*. 2011;28(3):43-54.
 20. Cho E, Kang JH, Lee H. Anti-inflammatory Effect of *Akebiae Lignum* Pharmacopuncture at KI10 on LPS-induced Acute Nephritis in Rats. *The Journal Of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society*. 2012;29(3): 41-53.
 21. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signal activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
 22. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000 ; 406(6797) : 782-7.
 23. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Toll-like receptor 4(TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J immunol*. 1999;162(7): 3749-52.
 24. Baumgartner J-D, Cohen J. Septic shock Pathogenesis. *Lancet*. 1991;338:732-6.
 25. Ohmori Y, Hamilton TA. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:1261-7.
 26. Tannenbaum CS, Koemer TJ, Jansen MM, Hamilton TA. Characteriation of Lipopolysaccharide -induced macrophage gene expression. *J immunol*. 1988;140:3640-5.
 27. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. trans. Kang JS et al. Seoul: PanMunSa. 2002:23-40, 240-3, 567-8.
 28. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential

- involvement of interleukin-8(IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994;56:559-64.
29. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 1988;167:1883-93.
30. Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science*. 1989;243:1467-9.
31. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*. 1993;365:654-7.
32. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984;87:1344-55.
33. Song KY, Ji JK, Ham UK. *Core Pathology*. Seoul:Korea Medical Book Publishing company. 1998:79-80, 573, 576-80.