

# 金銀花가 Cationic Bovine Serum Albumin 투여로 유발된 Membranous Nephropathy Mouse Model에 미치는 영향

이주호 · 조충식\* · 김철중

대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

## Effects of the Lonicerae Flos Extract on the Membranous Nephropathy Induced by Cationic Bovine Serum Albumin in Mice

Ju Ho Lee, Chung Sik Cho\*, Chul Jung Kim

Department of Oriental Medicine, Graduate school, Daejeon University

Membranous nephropathy(MN) is the most common cause of adult nephrotic syndrome worldwide. But treatment of MN is not defined. This study was to evaluate the effects of Lonicerae Flos Extract(LFE) on the MN induced by cBSA in mice. Mice were divided into 4 groups. The first group named for 'Normal' was injected with a saline solution. The second group named 'Control' treated with cBSA(10 mg/kg i.p) only. The third group named 'LFE-250', treated with cBSA(10 mg/kg i.p) and LFE(250 mg/kg, p.o). The fourth group named 'LFE-500' treated with cBSA(10 mg/kg i.p) and LFE(500 mg/kg, p.o). After cBSA and LFE treatment for 4 weeks, we measured change of body weight, 24hrs proteinuria, serum albumin, total cholesterol, triglyceride, BUN, creatinine, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IgA, IgM and IgG levels. The morphologic changes of renal glomeruli were also observed with a light microscope. The levels of 24 hrs proteinuria, total cholesterol, IgG, IgM, IgA, IL-6 were significantly decreased in both LFE groups. The level of triglyceride, IL-1 $\beta$  was significantly decreased in LFE-500 group. The level of Albumin was significantly increased in LFE-250 group. The level of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  were significantly decreased in LFE-250 group. The mRNA expression of IL-1 $\beta$  in splenocytes was considerably decreased in LFE-500 group. In histological findings of kidney tissue, thickening of GBM decreased in both LFE groups. This study shows that the LFE might be effective for treatment of MN. More clinical data and studies are to be done for efficient application.

Key words : Lonicerae flos extract(LFE), membranous nephropathy(MN), cationic bovine serum albumin(cBSA)

### 서론

막성 신증(Membranous Nephropathy : MN)은 사구체 외피 하 부위에 면역 복합체가 침착하여 발생하는 면역매개성 질환으로 다량의 단백뇨로 발현되며, 신증후군의 임상상을 보이는 질환이다<sup>1,2)</sup>. 신증후군으로 조직검사를 시행한 환자 중 원발성 사구체 질환의 경우 MN이 21%로서 미세변화신증후군에 이어 두 번째로 흔하며, 41세 이후의 환자 중에서는 42%로 가장 많은 원인을 차지한다<sup>1,2)</sup>.

서양의학적 치료는 단백뇨량에 따라 다르며, 신증후군을 동

반한 경우에도 징후가 경미하면 경과관찰이나 대증요법만으로 치료하고, 심한 경우에는 steroid 단독요법, 세포독성 면역억제제 요법 또는 steroid와 세포독성 면역억제제나 cyclosporine A의 병합 요법 등을 활용하고 있다<sup>1,2)</sup>. 하지만 아직 규범적 치료법이 확립되지 않고 있으며, 지속적으로 연구가 진행되고 있다<sup>1,4)</sup>.

한의학에서 MN은 임상증상 상 '浮腫', '水腫', '虛勞', '尿濁' 등의 범주에 속하며, 脾氣虛弱, 水濕貯留, 氣陰兩虛, 濕熱阻絡, 肝腎陰虛, 濕熱蘊結 등의 辨證에 따라 清熱利濕, 活血去瘀, 健脾活血, 益氣養陰 및 溫腎補陽의 치법이 활용되고 있다<sup>5-7)</sup>. 최근 국내에서는 膜性腎炎方<sup>8)</sup> 및 膜性腎炎方에 清熱<sup>9)</sup>, 活血<sup>10)</sup>, 補氣<sup>11)</sup>, 補陽<sup>12)</sup>의 치법을 더한 처방들에 대한 실험적 연구가 진행되었고, 단일 약물은 黃連<sup>13)</sup>과 黃芩<sup>14)</sup>에 대한 실험적 연구가 진행되어, MN에 유의한 효과가 있음을 보고하였다.

\* 교신저자 : 조충식, 천안시 두정동 621 대전대 부속천안한방병원 신계내과

· E-mail : choo1o2@chol.com, · Tel : 041-521-7531

· 접수 : 2009/08/11 · 수정 : 2009/08/25 · 채택 : 2009/09/23

金銀花는 淸熱解毒하고, 涼散風熱하는 대표적인 약물로, 癰腫疔瘡, 喉痺, 丹毒, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱 등을 치료하는 효과를 가지고 있다<sup>15)</sup>. 최근에는 항염증효과<sup>16)</sup>뿐만 아니라, cytokine 활성화에 유의한 영향을 줌으로써 면역치료에 활용될 수 있음이 보고<sup>17)</sup>되어 그 응용 범위를 넓히고 있다. 이러한 金銀花의 효능은 염증반응 및 면역학적 기전에 의해 발생하는 사구체 질환<sup>18)</sup>에 유의한 효과가 있을 가능성을 보여주며, 淸熱解毒의 효능을 가진 약물들이 MN에 유의한 효과가 있다는 보고<sup>9,13,14)</sup>는 그 가능성을 더해준다.

이에 저자는 金銀花가 MN에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여, cationic bovine serum albumin(cBSA)로 유발된 MN mouse에 金銀花의 추출물을 투여한 후 체중, 24시간 단백뇨, 혈액학적 변화와 면역학적 기전 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험에 사용된 mouse는 (주)중앙실험동물에서 7주령의 평균 31±1.4 g의 ICR계 female을 구입하여, 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 본 실험에 사용하였다. 물과 사료는 충분히 자유롭게 먹도록 하였으며, 사료성분은 조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제가 첨가되지 않은 고품사료(삼양사 Co.)를 사용하였다. 실험동물은 온도가 22±2℃로 일정하게 유지되고, 1일 중 12시간은 200~300Lux로 조명되며, 12시간은 조명이 차단되는 conventional system으로 조절되는 환경에서 사육하였다.

#### 2) 약물

본 실험에 사용된 金銀花(Lonicerae Flos : LF)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

##### (1) 시약

실험에 사용된 시약은 bovine serum albumin(BSA), anhydrous ethyl enediamine(EDA), 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride(EDC), HCl, Freund's complete adjuvant, chloroform, glutaldehyde, glycine, NP-40, ethanol, hematoxylin, eosin, paraformaldehyde, triton X-100, RPMI-1640 media, phosphate buffered saline(PBS), RBC lysis buffer, 10% buffered formalin이며, 모두 Sigma(U.S.A.) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS), horse serum, Hoechst는 Hyclone(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

##### (2) 기기

본 실험에는 약재추출을 위하여 BÜCHI rotavapor R-200 모델(Flawil, Switzerland)을 사용하였고, 동결건조를 위해 Centrifugal vacuum concentrator(Hanil, Korea)를 사용하였다. 또한 cBSA의 isoelectric point(pI)를 측정하기 위하여

Bio-Rad(U.S.A.)사의 수평 전기영동장치를 사용하였고, cBSA의 크기를 알아보기 위하여 Bio-Rad(U.S.A.)사의 5% SDS-PAGE 수직 전기영동장치를 사용하였으며, 최종단백질 농도는 BCATM protein assay kit (Pierce, U.S.A.)를 사용하여 측정 계산하였다. 또한 단백뇨(proteinuria)의 측정은 Bayer (Germany)사의 Albustix®, cytometer는 FACS Calibur(Becton Dickinson, U.S.A.), ELISA 판독기는 Molecular Devices(Minnesota, U.S.A.)사 제품을 사용하였다. 실험동물의 신장조직 시료 제작에는 Serotec(U.S.A.)사의 cooling microtome(Washington DC, U.S.A.)을 사용하였으며, metabolic cage는 Techniplast(Varese, Italy)사의 제품을 사용하였고, 조직슬라이드 관찰을 위한 광학현미경은 Labophot-2(Nikon, Japan)를 사용하였으며, cell strainer는 Falcon(U.S.A.)사 제품을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액 조제

金銀花 400 g 을 50 g 씩 8회 나누어 증류수 1000 ml에 가해 열탕 추출기로 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결건조기(freeze dryer)로 완전 건조하여 22 g(수거율 : 5.5%)의 金銀花추출물(Lonicerae Flos extract, 이하 LFE)을 얻어 냉동 보관하고 적당 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

#### 2) Antigen, cationic BSA의 준비

Cationic BSA(cBSA, Sigma Chemical Co., U.S.A.)는 Border의 방법<sup>19)</sup>을 수정하여 BSA를 화학적으로 양이온화 하여 제조하였다. 20 g의 BSA를 증류수 12 ml에 녹이고, 다른 한편으로 20 ml의 증류수에 2.68 ml의 EDA를 섞고 HCl을 가해 pH 4.75의 anhydrous EDA를 만들어 25℃로 식혔다. 이 EDA solution을 앞서 준비한 BSA solution에 넣어 섞고, 곧이어 EDC 150 mg을 넣고 4시간동안 계속 저어주었다. 만들어진 용액은 1 ml EconoPac High S cationic ion-exchange column(Bio-Rad, CA)에 가하고 pH 6.8 phosphate buffer(40 mM)로 washing하여 양이온화 되지 않은 BSA를 제거한 후 pH 10.6의 phosphate buffer(40 mM)로 elution하였다. 5% thin-layer polyacrylamide gel에 제조된 cBSA와 control BSA를 loading하여 수평전기영동장치(Bio-Rad, U.S.A.)에서 cBSA의 isoelectric point(pI)를 측정하였다. 최종 단백질 농도는 BCATM protein assay kit (Pierce, U.S.A.)로 spectrophotometer 540nm에서 optical density(O.D.)를 측정하여 계산하였다.

#### 3) MN model 유발 및 검액 투여

8주령의 female ICR계 mouse를 각 군당 10마리씩 하여 정상군(non-treated group, Normal), 대조군(MN-induced by cBSA group, Control), LFE-250군(MN-induced by cBSA and LFE-low dose treated group, LFE-250), LFE-500군(MN-induced by cBSA and LFE-high dose treated group, LFE-500) 등의 4군으로 나누어, 정상군을 제외한 3군에 Freund's complete adjuvant와 섞은 0.2 mg의 cBSA를 6주간 총 3회(1회/2주)에 걸쳐 복강투여(intra-peritoneal injection)하였다. 정상군은 antigen 대신에

saline을 같은 방법으로 주사하여 면역화 시키지 않았다. 면역화 6주 후부터 6주간 10 mg/kg의 cBSA를 정상군을 제외한 3군에 매일 복강 투여하여 지속적으로 MN을 유발하는 동시에, LFE-250 군에는 金銀花 250 mg/kg를, LFE-500군에는 金銀花 500 mg/kg를 매일 경구 투여하여 MN에 대한 金銀花의 치료 효과를 관찰하였다. 4주간의 투여 후 모든 실험동물들을 metabolic cage에 두어 24시간 동안 물 공급을 자유롭게 하면서 절식하여 소변을 채취하였다. 소변채취 후 희생시켜 blood, kidney, spleen sample 등을 수거하여 분석에 사용하였다.

4) 체중 측정

실험시작 전 평균체중을 구하고 그 후 면역화 시키는 6주 동안은 3주마다, 그 후의 6주 동안에는 2주마다 체중을 측정하여 체중변화를 관찰하였다.

5) 24시간 단백뇨(24hrs proteinuria) 측정

Mouse의 뇨는 면역화시키는 6주간은 3주마다, 그 후 6주간은 2주마다 수거하여 단백뇨(proteinuria)의 배출상황을 관찰하였다. 뇨는 24시간 동안 metabolic cage에서 수거하여 -20℃에서 보관하였으며 후에 Albustix®(Bayer, Germany)를 이용하여 TBPB의 변색점 변화에 의해 소변 중의 albumin 수치를 측정하였다.

6) 채혈 및 혈청 분석

동물을 희생시키기 전 ethyl ether로 마취시킨 후 심장천자로 채혈하여 1시간 실온에서 방치 다음, 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 -80℃에 보관하였다. 혈청은 creatinine, blood urea nitrogen(BUN), albumin, total cholesterol, triglyceride 등의 serological analysis와 ELISA 분석에 사용되었다.

7) 신장 조직의 적출 및 보관

채혈 후 희생시켜 신장을 적출하여, 일부는 frozen tissue embedding solution에 넣어 freezing시키고, 일부는 10% buffered formalin에, 일부는 glutaldehyde에 fixing시켜 보관하였다.

8) Enzyme-linked immuno-sorbent assay

혈청의 면역글로블린(immunoglobulin, Ig)과 cytokines의 분석을 위해 IgA, IgM, IgG와 IL-6, TNF-α를 ELISA로 분석하였다. 사용된 antibody는 goat anti-mouse IgA, IgM, rat anti-mouse IL-6, rabbit anti-mouse TNF-α 등이었다. 이들 antibody를 coating한 96-well plate에 50 μl의 혈청을 분주하여 2시간동안 실온에서 방치한 후, washing solution으로 3회 washing하고 streptavidin-HRP antibody를 반응시키고, TMB substrate로 발색시켜, ELISA reader 450 nm에서 O.D.를 측정하여 혈청 내 단백질량을 정량하였다.

9) Splenocyte의 RT-PCR

Mouse에서 spleen을 적출하여 주사기를 사용하여 cell을 분리하고, cell strainer(Falcon, U.S.A.)에 통과시켜 세포 이외의 조직과 불순물을 제거한 후, red blood cell(RBC) lysis buffer(8.3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA in 1 L of demineralized water)를 넣고 5분간 RBC를 용해시키고 PBS로 세척한 후에 cell을 수거하였다. 준비된 splenocyte는 TRIZOL(Invitrogen)을 사용하여 manufacturer's protocol에 따라 total RNA를 분리하였다. 즉, 간단히 요약하면 trizol reagent에 5분간 homogenize시킨 cell

을 trizol reagent 1 ml 당 0.2 ml의 chloroform을 넣고 15초간 흔들어서 주고 3분간 실온에서 보관한 후, 12,000rpm에서 15분간 4℃를 유지하며 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 새 EP tube로 옮기고, trizol 1 ml 당 0.5 ml 비율로 isopropanol을 넣고 10분간 실온에서 incubation시키고, 위의 조건으로 원심분리 하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 버리고 침전된 RNA는 75% ethanol로 씻고 건조시킨 후, DEPC에 녹여 spectrophotometer에서 농도와 purity를 측정하였다. 준비된 RNA와 oligo dT, dNTP, reverse transcriptase로 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 준비하였다. cDNA와 다음의 primer set을 가지고 PCR을 수행하여 splenocyte에서 IL-1β, IL-10, IFN-γ 등의 cytokines을 RNA level에서 분석하였다. Cytokines의 primer sequence 및 PCR 조건은 β-actin(25 cycles)을 제외하고는 30 cycles로 실시되었고 30초간 실시되었다. 구체적인 실험조건은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Primer Sequence of Each Cytokines in This Studies

Cytokine	Direction	Sequence	Annealing temperature
mouse β-actin	RT-actin-S	5'-ctatgtgggtgacgaggccc-3'	55℃
	RT-actin-AS	5'-gccctcgtagatggccacag-3'	
mouse IL-10	M IL-10 S	5'-gcatggcccagaaatcaagg-3'	58℃
	M IL-10 AS	5'-tccaaggaagaacccctcc-3'	
mouse IL-1β	M IL-1 b S	5'-tgaagggtgcttccaaacc-3'	58℃
	M IL-1 b AS	5'-gtccgacagcagaggcttt-3'	
mouse IFN-γ	M IFN-g S	5'-tgcggctagctctgagaca-3'	58℃
	M IFN-g AS	5'-cgcttgcgttgcgaaga-3'	

10) 광학현미경 관찰

Embedding solution에서 freezing시켜 놓은 조직을 rotary microtome을 이용하여 20 μm 두께로 dissection하여 슬라이드를 만들고 -80℃에 보관하였다. 준비된 슬라이드를 물에 넣어 rehydration시킨 후, hematoxylin에 1분간 담가 nuclear를 염색시키고, 흐르는 물에 몇 분 동안 washing한 후, eosin에 1분간 담가 cytoplasm을 염색시킨 다음, 다시 흐르는 물에 몇 분 동안 washing하였다. 이어 70%, 95%, 100%의 ethanol series에 연차적으로 담가 dehydration시키고, xylene에 1분간 반응시켜 안정화시킨 후, mounting solution을 올리고 cover glass로 슬라이드를 봉입하고 광학현미경(Labophot-2, Nikon, Japan)으로 400배의 배율에서 조직 상태를 관찰하였다.

11) 통계 분석

실험 결과들은 mean±standard deviation으로 기록하였고, one way ANOVA에 의해 p<0.05 수준에서 유의성 여부를 검증하였으며, 유의성이 나타날 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증 하였다.

성 적

1. 체중에 미치는 영향

대조군에서는 정상군에 비하여 급격한 체중 증가를 보였다. 두 실험군 모두 대조군에 비하여 체중이 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 1).

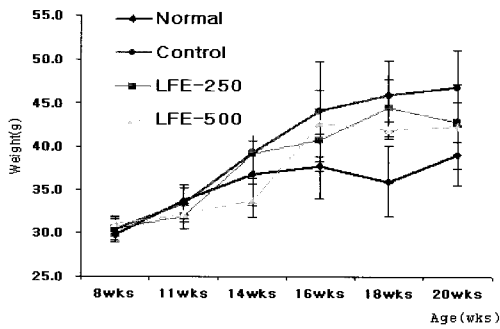


Fig. 1. Effects of LFE on the body weight in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract (250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract (500 mg/kg, p.o) group.

2. 24시간 단백뇨에 미치는 영향

단백뇨 수준의 변화를 살펴보면, 정상군의 24시간 단백뇨 지수(index of 24hrs proteinuria)는 0.1 ± 0.2, 대조군은 2.6 ± 1.3으로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고(p<0.001), LFE-250군은 0.25 ± 0.3 (p<0.01), LFE-500군은 0.13 ± 0.3 (p<0.01)으로 모두 단백뇨 지수가 level 1.0 이하 수준으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

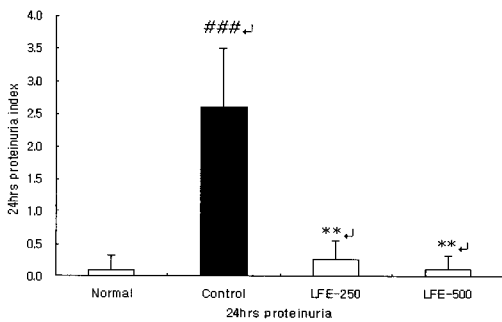


Fig. 2. Effects of LFE on index of 24hrs proteinuria in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. 0 : Trace or negative 1 : 0.30 g/L or 30 mg/dl 2 : 1.0 g/L or 100 mg/dl 3 : 3.0 g/L or 300 mg/dl 4 : ≥ 20.0 g/L or ≥ 200 mg/dl The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\* : p<0.01 vs control, ### : p<0.001 vs normal).

3. 혈청학적 변화에 미치는 영향

1) Albumin에 미치는 영향

혈청 중 albumin 농도는 정상군에서는 2.12 ± 0.04 g/dl이었고, 대조군에서는 1.47 ± 0.16 g/dl로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였고(p<0.001), LFE-250군에서는 1.91 ± 0.11 g/dl로 대조군에 비해서 유의성 있게 증가하였고(p<0.01), LFE-500군은 1.71 ± 0.23 g/dl로 증가하였지만 통계학적으로 유의성은 없었다(Fig. 3).

2) Total cholesterol에 미치는 영향

혈청 중 total cholesterol 농도는 정상군에서는 71.0 ± 3.4 mg

/dl이었고, 대조군에서는 107.8 ± 6.4 mg/dl로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며(p<0.001), LFE-250군에서는 82.6 ± 14.0 mg/dl (p<0.05), LFE-500군에서는 66.2 ± 14.6 mg/dl (p<0.001)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

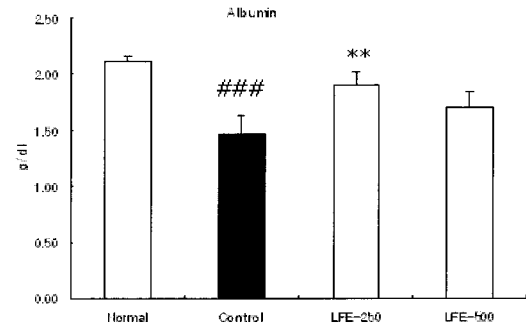


Fig. 3. Effects of LFE on serum albumin level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\* : p<0.01 vs control, ### : p<0.001 vs normal).

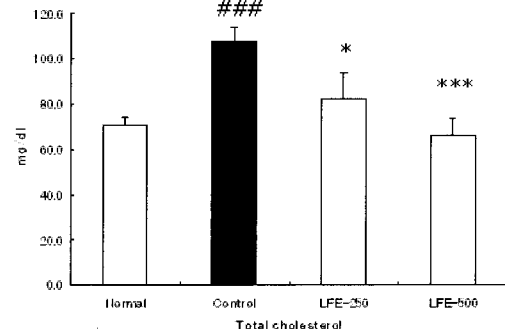


Fig. 4. Effects of LFE on serum cholesterol level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\* : p<0.05, \*\*\* : p<0.001 vs control, ### : p<0.001 vs normal).

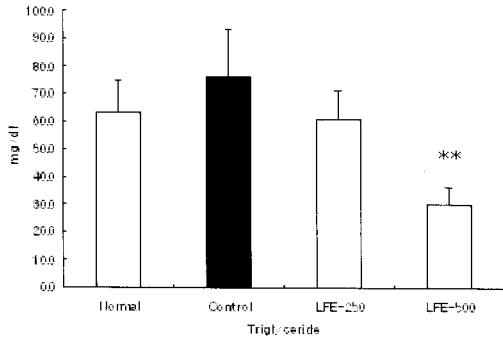
3) Triglyceride에 미치는 영향

혈청 중 triglyceride 농도는 정상군에서는 63.4 ± 11.7 mg/dl이었고, 대조군에서는 76.4 ± 17.2 mg/dl로 정상군에 비하여 증가하였다. LFE-250군에서는 61.2 ± 17.5 mg/dl로 대조군에 비하여 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었고, LFE-500군은 30.0 ± 14.9 mg/dl로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 5).

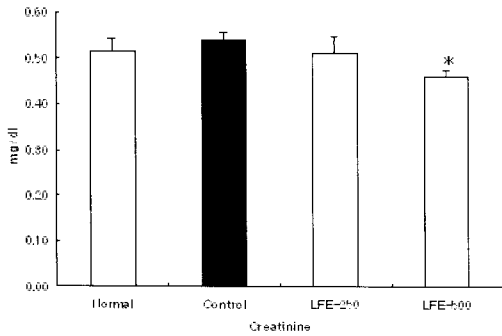
4) Creatinine에 미치는 영향

혈청 중 creatinine 농도는 정상군에서는 0.52 ± 0.03 mg/dl이었고, 대조군에서는 0.54 ± 0.02 mg/dl로 정상군에 비하여 증가하였다. LFE-250군에서는 0.51 ± 0.04 mg/dl로 대조군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었고, LFE-500군에서는 0.46 ± 0.05 mg/dl로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다

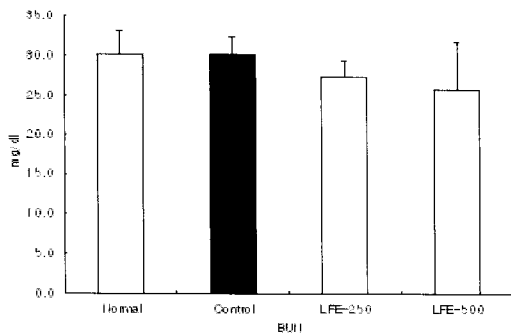
( $p < 0.05$ )(Fig. 6).



**Fig. 5. Effects of LFE on serum TG level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\* :  $p < 0.01$  vs control).



**Fig. 6. Effects of LFE on serum creatinine level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\* :  $p < 0.05$  vs control).



**Fig. 7. Effects of LFE on serum BUN level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group.

#### 5) BUN에 미치는 영향

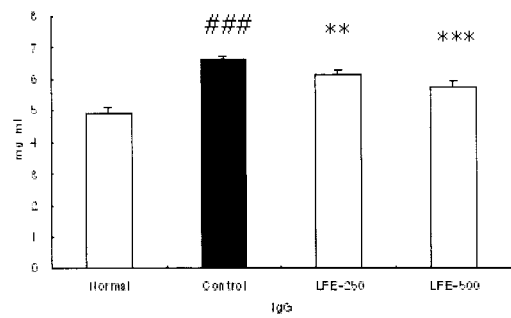
혈청 중 BUN 농도는 정상군에서는  $30.1 \pm 3.00$  mg/dl이었

고, 대조군에서는  $30.2 \pm 2.15$  mg/dl로 정상군과 큰 차이를 보이지 않았다. LFE-250군에서는  $27.3 \pm 2.06$  mg/dl, LFE-500군에서는  $25.7 \pm 6.06$  mg/dl로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

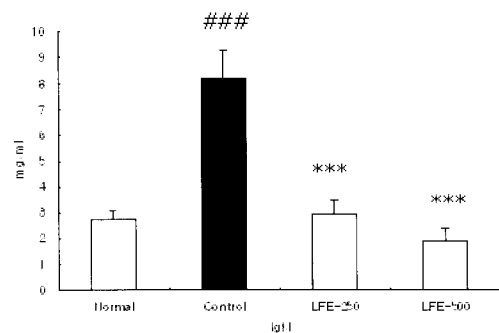
#### 4. 혈청 IgG, IgM, IgA에 미치는 영향

##### 1) IgG에 미치는 영향

혈청 중 IgG 농도는 정상군에서는  $5.0 \pm 0.2$  mg/ml이었고, 대조군에서는  $6.7 \pm 0.1$  mg/ml로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). LFE-250군에서는  $6.1 \pm 0.1$  mg/ml ( $p < 0.01$ ), LFE-500군에서는  $5.8 \pm 0.2$  mg/ml ( $p < 0.001$ )로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).



**Fig. 8. Effects of LFE on serum IgG level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  vs control, ### :  $p < 0.001$  vs normal).



**Fig. 9. Effects of LFE on serum IgM level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\*\* :  $p < 0.001$  vs control, ### :  $p < 0.001$  vs normal).

##### 2) IgM에 미치는 영향

혈청 중 IgM 농도는 정상군에서는  $2.8 \pm 0.3$  mg/ml이었고, 대조군에서는  $8.2 \pm 1.1$  mg/ml로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). LFE-250군에서는  $3.0 \pm 0.5$  mg/ml ( $p < 0.001$ ),

LFE-500군에서는  $1.9 \pm 0.6$  mg/ml ( $p < 0.001$ )로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9).

3) IgA에 미치는 영향

혈청 중 IgA 농도는 정상군에서는  $2.4 \pm 0.4$  mg/ml이었고, 대조군에서는  $6.6 \pm 1.8$  mg/ml로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). LFE-250군에서는  $2.3 \pm 0.4$  mg/ml ( $p < 0.001$ ), LFE-500군에서는  $2.1 \pm 0.5$  mg/ml ( $p < 0.001$ )로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10).

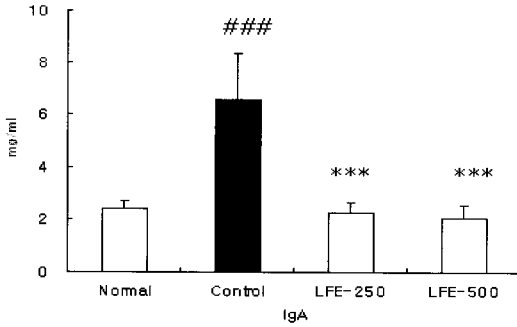


Fig. 10. Effects of LFE on serum IgA level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\*\* :  $p < 0.001$  vs control, ### :  $p < 0.001$  vs normal).

5. 혈청 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 에 미치는 영향

1) TNF- $\alpha$ 에 미치는 영향

혈청 중 TNF- $\alpha$ 의 농도는 정상군에서는  $145.3 \pm 10.7$  pg/ml이었고, 대조군에서는  $320.4 \pm 16.1$  pg/ml로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). LFE-250군에서는  $156.8 \pm 28.7$  pg/ml로 유의성 있게 감소하였고( $p < 0.001$ ), LFE-500군에서는  $251.0 \pm 73.0$  pg/ml로 대조군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 11).

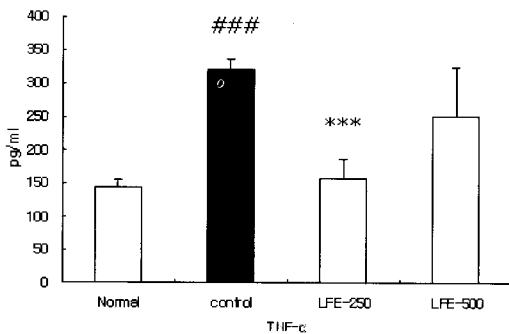


Fig. 11. Effects of LFE on serum TNF- $\alpha$  level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\*\* :  $p < 0.001$  vs control, ### :  $p < 0.001$  vs normal).

2) IL-6에 미치는 영향

혈청 중 IL-6 농도는 정상군에서는  $19.1 \pm 1.5$  pg/ml이었고, 대조군에서는  $62.0 \pm 9.6$  pg/ml로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). LFE-250군에서는  $23.6 \pm 7.2$  pg/ml ( $p < 0.001$ ), LFE-500군에서는  $46.3 \pm 9.8$  pg/ml ( $p < 0.05$ )로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

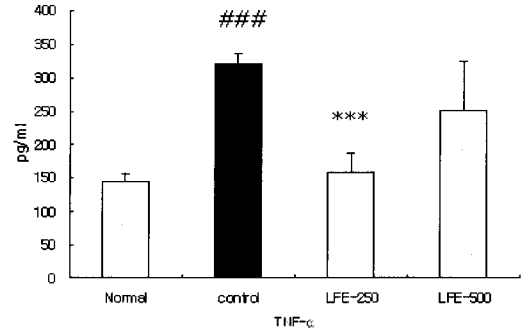


Fig. 12. Effects of LFE on serum IL-6 level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  vs control, ### :  $p < 0.001$  vs normal).

3) IL-1 $\beta$ 에 미치는 영향

혈청 중 IL-1 $\beta$  농도는 정상군에서는  $80.8 \pm 8.4$  pg/ml이었고, 대조군에서는  $196.3 \pm 62.3$  pg/ml로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ). LFE-250군에서는  $108.8 \pm 70.7$  pg/ml로 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었고, LFE-500군에서는  $90.8 \pm 41.9$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 13).

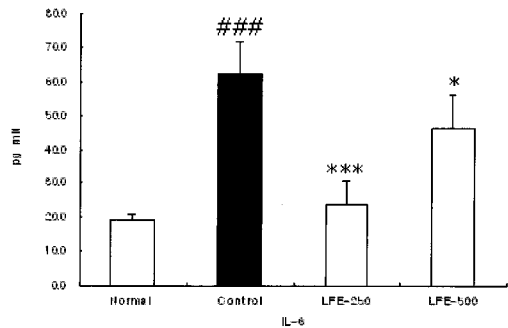
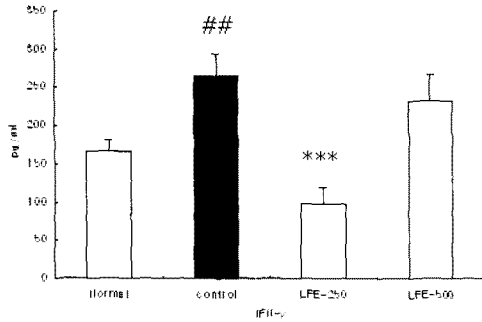


Fig. 13. Effects of LFE on serum IL-1 $\beta$  level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. The results are expressed the mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\* :  $p < 0.05$  vs control, # :  $p < 0.05$  vs normal).

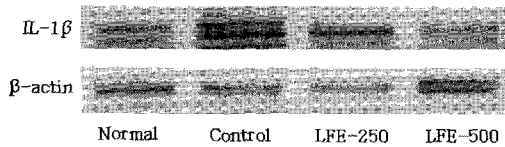
4) IFN- $\gamma$ 에 미치는 영향

혈청 중 IFN- $\gamma$  농도는 정상군에서는  $166.0 \pm 13.5$  pg/ml이었고

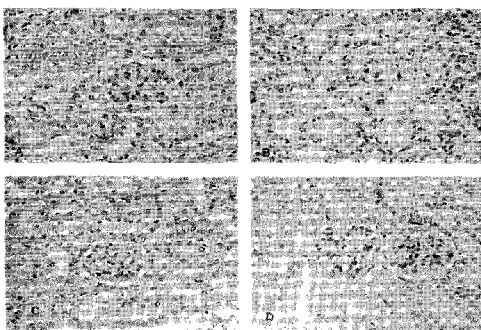
고, 대조군에서는  $265.2 \pm 29.1$  pg/ml로 정상군에 비하여 증가하였다. LFE-250군에서는  $98.5 \pm 20.5$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고( $p < 0.001$ ), LFE-500군에서는  $232.83 \pm 34.5$  pg/ml로 대조군에 비하여 감소하였지만 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 14).



**Fig. 14. Effects of LFE on serum IFN- $\gamma$  level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** The results are expressed the mean $\pm$ standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(\*\*\* :  $p < 0.001$  vs control, ## :  $p < 0.01$  vs normal).



**Fig. 15. Effects of LFE on mRNA expression of cytokines in splenocytes.** The results are expressed the mean $\pm$ standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group.



**Fig. 16. H&E staining of renal glomeruli in cBSA-induced membranous nephropathy mouse.** A. Normal : non-treated group. B. Control : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) group. C. LFE-250 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(250 mg/kg, p.o) group. D. LFE-500 : treated with cBSA(10 mg/kg, i.p) and LF extract(500 mg/kg, p.o) group. Control shows diffuse thickening of glomerular basement membrane. H&E staining : original magnification  $\times 400$ .

**6. Splenocyte에서 IL-1 $\beta$ 의 mRNA발현에 미치는 영향**

Splenocyte를 IL-1 $\beta$  RNA level에서 분석한 결과, IL-1 $\beta$ 는 LFE 투여군 모두에서 대조군에 비하여 mRNA 발현이 감소됨을

관찰할 수 있었고, 특히 LFE-500군에서 현저하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 15).

**7. 광학현미경적 소견에 미치는 영향**

정상군에서는 사구체 기저막의 비후가 나타나지 않았으나, 대조군에서는 cBSA와 면역복합체의 침착으로 추정되는 사구체 기저막의 비후가 관찰되었으며, LFE-250군과 LFE-500군에서는 대조군에 비하여 사구체 기저막의 비후가 감소되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 16).

**고 찰**

MN은 의피하 부위에 면역복합체가 침착하여 발생하는 면역매개성 질환으로 사구체 기저막의 비후와 상피하 침전물의 소견을 보이는 질환이다<sup>1,2,20</sup>. 국내 성인 특발성 신증후군 가운데 41세 이상에서 42%로 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 과거에 비해 MN의 비율은 유의한 증가를 보이고 있다<sup>20</sup>.

환자의 80% 이상에서 다량의 단백뇨로 발현되고, 대부분 신증후군의 임상상을 나타내며, 나머지 환자들은 무증상성 단백뇨를 보인다<sup>1</sup>. 일반적으로 사구체 크기는 약간 증가하나 세포의 증식은 없으며, 모세혈관벽이 비후되어, 혈관벽이 팽팽하게 보이고, 은염색상 모세혈관고리 밖으로 뾰족한 돌기모양(spike)이나 구멍(hole)이 관찰된다<sup>1,2,18</sup>.

임상경과는 신증후군의 자연관해와 재발 및 만성 신부전의 진행 등 매우 다양한 경과를 취하며, 치료는 대증 요법과 steroid 단독 또는 세포독성 면역억제제의 병합요법을 사용하나 효과에 대한 일차된 보고는 없으며, 부작용에 비해 효과가 확실하지 않다<sup>1-4</sup>.

한의학에서 MN은 임상증상 상 '浮腫', '水腫', '虛勞', '尿濁' 등의 범주에 속하며, 脾, 肺, 腎 三臟의 기능실조와 관련이 있다<sup>21</sup>. MN에 대하여 陳<sup>22</sup>은 발병원인을 濕熱의 蘊結 및 脾胃虧損으로 보아 初期에는 清熱利濕 益氣活血하고, 中後期에는 健脾補腎 益氣活血하는 처방을 사용하였고, 何<sup>23</sup>는 清熱解毒, 活血利濕의 治法이 신혈류량을 증가시키고 면역반응을 개선시켜 신사구체 상피세포에 면역 복합물 침착을 억제시킨다고 보고하였다. 국내에서는 膜性腎炎方<sup>8</sup>과 그 가미방<sup>9-12</sup> 등의 복합처방과 清熱燥濕의 효능을 가진 黃連<sup>13</sup>과 黃芩<sup>14</sup>의 MN에 대한 실험적 연구가 진행되어, 유의한 효과가 있음이 보고되었다.

金銀花는 인동과에 속한 *Lonicera japonica* THUNB., *L. hypoglauc* MIQ., *L. confusa* DC., *L. dasystyla* REHD의 花蕾를 건조한 것으로 우리나라에서는 *Lonicera japonica*가 많이 분포되어 있다<sup>15,24</sup>. 性은 寒無毒하고 味는 甘하며, 肺, 胃, 心經으로 귀경하고, 清熱解毒과 涼散風熱의 효능을 가지고 있어, 상기도 감염 및 화농성 피부 질환에 다용한다. 또한, 金銀花의 항균효과<sup>25</sup>, 항염증효과<sup>26</sup>, 항산화작용<sup>27</sup>, 항암작용<sup>28,29</sup>이 실험적 연구로 확인되었으며, 염증관련 단백질 및 cytokine에도 유의한 영향을 주는 것으로 보고<sup>17</sup>되었다.

사구체 손상은 많은 경우 면역학적 기전에 의해 발생하며,

면역학적 기전은 대부분의 원발성 사구체 질환의 사구체 손상 주 기전으로 작용한다. 면역학적 기전은 크게 항체 매개성 손상과 세포 매개성 손상으로 나타나며, 이 중 항체 매개성 손상은 자가 항원 또는 이식항원들에 대한 항체의 반응에 의해 나타난다<sup>12,18)</sup>. 이러한 과정에서 염증 반응 및 염증 매개 물질은 그 손상을 가중 시킨다<sup>12,18)</sup>. MN 역시 외피하에 면역복합체가 침착하여 사구체에 손상이 생기는 질환으로, 항염증작용과 cytokine의 감소 작용 등의 효능을 가진 金銀花는 MN의 치료에 일정한 효과가 있을 것으로 유추할 수 있다.

이에 저자는 金銀花가 MN에 미치는 영향을 실험적으로 확인하고자 저농도와 고농도의 金銀花 추출물을 MN model mouse에 투여한 후 체중의 변화, 24시간 단백뇨, 혈액학적 변화, 조직병리학적 변화를 관찰하고, IgG, IgA, IgM의 면역 글로블린과 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  등 대표적인 염증 관련 cytokine의 변화를 관찰하였다.

MN 유발은 양전하를 띤 BSA를 외부항원으로 이용하여 사구체 기저막의 음전하를 띠는 부분과 결합시켜 면역복합체를 발생시키는 방법을 사용하였고, 유발 및 약물치료 실험에 적당한 생쥐모델을 사용하였다<sup>30)</sup>.

체중은 대조군에서 정상군보다 현저히 체중이 증가하였으며, 실험군에서 정상군보다 체중은 증가였으나, 대조군에 비해서는 체중 증가 범위가 낮았다. 이러한 결과는 金銀花의 투여가 사구체 여과능 회복에 영향을 미쳐서 단백뇨 및 혈장 삼투압이 개선되어, MN으로 인한 체액저류를 감소시키기 때문으로 생각된다.

24시간 단백뇨는 대조군에서 급격한 증가를 보였고, 실험군에서는 유의한 감소를 보였다. 신증후군에서 단백뇨는 사구체 기저막의 단백여과에 대한 전기적 장애와 공간적 장애 기전이 기능을 상실하고, 기저막의 투과력이 변화 되어 나타나는데<sup>12)</sup>, 실험군에서 대조군에 비하여 단백뇨가 유의성 있게 감소한 것은 金銀花 추출물이 사구체 기저막의 여과장벽에 영향을 주어, 사구체 조직의 구조적인 개선을 유발하여 나타난 것으로 보여진다.

본 실험에서 혈청 albumin은 대조군에서 정상군에 비하여 감소하였고, 실험군에서는 대조군에 비하여 유의한 상승을 보였다. 반대로 혈청 total cholesterol 및 triglyceride의 농도는 대조군에서 정상군에 비하여 상승하였으며, 실험군에서는 유의성 있는 감소를 보였다. 이러한 결과는 金銀花의 사구체 여과장벽의 개선에 따른 단백뇨 감소 및 이에 따른 혈청 알부민 농도 상승, 보상적 합성의 감소와 부산물 생성의 감소 때문으로 생각되며, 金銀花의 지질대사 개선 작용 또한 직접적으로 영향을 미친 것으로 사료된다.

혈청 creatinine은 LFE-500 군에서 유의한 감소를 보였고, BUN은 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 혈청 creatinine과 BUN의 증가는 신장 질환에서 사구체 여과율이 저하될 때 나타나는 혈액학적 변화들로<sup>131)</sup>, 실험군에서 혈청 creatinine이 대조군에 비하여 감소한 것은 金銀花의 투여가 사구체 여과율의 회복에 영향을 준 것으로 판단할 수 있으나, 각각 군에서 크게 편차가 관찰되지 않은 것은 모든 군에서 사구체 여과율이 일정수준 유지되어 신부전으로 진행하지 않았음을 보여준다고 생각된다.

MN에서는 IgG의 침착이 주된 소견이며, IgA와 IgM이 다양한 빈도로 동반된다<sup>1)</sup>. 본 실험에서 IgG, IgM, IgA 모두 대조군에서 정상군에 비하여 증가하였고, 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 관찰되었다. IgG는 농도 의존적인 결과를 보였으며, IgA와 IgM은 농도에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. IgM은 혈중에서의 농도는 낮으나 면역반응의 초기에 빠르게 증가하며 보체활성화능력이 강한 Ig이고, IgG는 면역반응의 초기보다는 1차적인 면역반응이 일어난 후 2차적인 면역반응 때 생산되어 활성화되는 Ig이며, IgA는 혈청 외의 눈, 코, 구강, 기도, 소화관 등의 분비물에 높은 농도로 포함되어 국소면역을 담당하는 대표적인 Ig이다<sup>32,33)</sup>. 이에 본 실험에서 IgM과 IgA가 유의성 있게 감소한 것은 金銀花의 투여가 MN에서 지속적으로 나타나는 면역학적 과정 및 새롭게 나타날 수 있는 면역학적 과정을 억제하여 나타난 것으로 생각되며, IgG가 감소한 것은 금은화 투여가 2차적 면역반응의 감소뿐만 아니라 면역학적 개선을 통한 MN의 회복에도 영향을 주는 것으로 유추할 수 있다.

본 실험에서 혈청 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 는 모두 대조군에서 정상군보다 증가하였고, IL-1 $\beta$ 는 LFE-500군에서 유의성 있게 감소하였으며, 나머지 cytokine은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. IL-1은 단핵구와 대식세포로부터 분비되어 T-세포와 B-세포를 활성화시키고 다양한 lymphokine을 분비시키며, 폐산지움 세포 증식과 세포의 기질 축적을 자극하는 cytokine이며, TNF- $\alpha$ 도 폐산지움, 내피세포, 외피세포를 자극함으로써 procoagulant 분비와 염증세포 침윤, 산화 물질 생성을 촉진하고 사구체 손상을 일으키는 cytokine이다<sup>32,35)</sup>. 또한 IL-6는 B세포 분화증식, 급성기 단백 합성자극, 혈소판 생산자극의 작용뿐 아니라 신장의 폐산지움 세포나 피부 각화세포 증식 등에도 관여하는 기능을 가진 cytokine이며, IFN- $\gamma$ 는 다양한 기능을 갖는 면역조절체로서 T세포와 자연 살해세포(NK cell)에서 생산되고 대식세포를 활성화시키는 세포성 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokines이다<sup>32-35)</sup>. 대조군에서 cytokine의 양이 정상군에 비해 증가한 결과는 신증후군과 cytokine의 증가가 일정한 관계가 있다는 보고<sup>36,37)</sup>와 일치하며, 실험군에서 감소한 효과는 金銀花가 cytokine의 감소에 유의한 효과가 있다는 보고<sup>17)</sup>와 유사하다. 특히 사구체 질환과 밀접한 관련이 있는 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 감소는 金銀花의 사구체 질환 치료 가능성 및 기타 면역 질환의 치료 가능성을 말해준다고 볼 수 있겠다. 또한 IL-1 $\beta$ 를 제외한 나머지 cytokine에서 LFE-250군의 결과가 더욱 양호했던 것은 사구체 질환 및 면역 질환의 치료에서 적절한 약물 양의 조절이 필요함과 동시에 추가적 연구의 필요성을 나타낸다.

Splenocyte에서 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현을 분석한 결과, 실험군에서 모두 대조군에 비하여 mRNA 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었고, 특히 LFE-500군에서 현저하게 감소되는 것으로 보여졌다. 이러한 결과 역시 金銀花가 proIFNflammatory cytokine으로 면역반응에 중심적 역할 및 강력한 염증 조절 작용을 하는 IL-1 $\beta$ 의 발현에 영향을 주어 나타난 결과로, 사구체 질환 및 면역 질환의 치료 가능성을 보여준다.

이상의 결과는 金銀花의 清熱解毒, 涼散風熱의 효능이 항염



증 및 면역학적 개선을 통하여 cBSA로 유발된 MN mouse에 유의한 효과가 있음을 보여준다. 또한 단백뇨의 완전 관해는 MN의 좋은 예후를 시사하는 소견이라는 보고<sup>39)</sup>로 보아 金銀花의 단백뇨 억제 소견은 MN의 관해에 일정한 의의를 가질 것으로 사료되며, 좀 더 구체적인 기전과 임상적 경과 및 적절한 약물 농도에 대한 지속적이고 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

cBSA로 유발된 MN mouse에 金銀花 추출물을 투여하여 체중, 24시간 단백뇨 및 혈액학적 변화와 면역 및 조직 병리학적 형태에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

金銀花 추출물은 모두 대조군에 비하여 24시간 단백뇨를 유의성 있게 감소시켰다. 金銀花 추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 중 total cholesterol의 농도를 유의성 있게 감소시켰으며, 500 mg/kg 투여군에서 triglyceride 농도를 유의성 있게 감소시켰다. 金銀花 추출물은 250 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 Albumin의 농도를 유의성 있게 증가시켰다. 金銀花 추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 중 IgG, IgM, IgA 농도를 유의성 있게 감소시켰다. 金銀花 추출물은 250 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 중 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 의 농도를 유의성 있게 감소시켰다. 金銀花 추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 중 IL-6의 농도를 유의성 있게 감소시켰다. 金銀花 추출물은 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 중 IL-1 $\beta$ 의 농도를 유의성 있게 감소시켰다. 金銀花 추출물은 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현을 감소시켰다. 金銀花 추출물은 모두 대조군에 비하여 광학현미경 소견에서 사구체 기저막의 비후를 감소시켰다.

## 참고문헌

1. 대한신장학회. 임상신장학. 서울, 광문출판사, pp 77, 221-232, 244-248, 2001.
2. 김현철, 박성배, 박원균, 안기성, 임화. 통합강의를 위한 신장학. 서울, E-PUBLIC, pp 263-272, 291-300, 2006.
3. 윤설영, 이은주, 허정훈, 손영기, 한경근, 안원석, 김성은, 김기현. 특발성 막성 신병증의 임상 경과. 대한내과학회지 66(2):175-185, 2004.
4. 신현필, 이상호, 이태원, 김명재, 임천규. 특발성 막성 신병증 환자의 치료 결과 및 예후인자 분석. 대한내과학회지 66(3):267-273, 2004.
5. 두호경. 동의신계학. 서울, 동양의학연구원출판부, pp 89, 238-242, 301, 305, 369-378, 393-396, 842, 852, 855, 915, 1993.
6. 張大寧. 實用中醫醫病學. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 90-96, 344-346, 1990.
7. 白雲貞, 陳志康. 膜性腎病的中醫臨床與實驗研究進展. 天津中醫雜誌 18(2):53, 2001.
8. 김재형, 조충식, 김철중. 膜性腎炎方이 Cationized Bovine

- Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 경락경혈학회지 24(4):163-180, 2007.
9. 최인구, 조충식, 김철중. 淸熱膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 29(1):104-116, 2008.
10. 김두희, 조충식, 김철중. 活血膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한의학회지 29(4):68-82, 2008.
11. 이정원, 조충식, 김철중. 補氣膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 29(4):1083-1099, 2008.
12. 임범수, 조충식, 김철중. 補陽膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한의학회지 30(2):63-78, 2009.
13. 채은영, 조충식, 김철중. 黃連이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한본초학회지 24(1):99-110, 2009.
14. 김만호. 黃耆이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대전대학교 박사학위 논문. 2007.
15. 전국한외과대학 본초학교수. 本草學. 서울, 永林社, pp 198-199, 2000.
16. Lee, J.H., Ko, W.S., Kim, Y.H., Kang, H.S., Kim, H.D., Choi, B.T. Anti-IFN $\lambda$  inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaB $\alpha$  degradation in rat liver. Int J Mol Med Jan., 7(1):79-83, 2001.
17. 이동언, 이재령, 김영우, 권영규, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 금은화 및 금은화전초가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(2):481-489, 2005.
18. 대한내과학회 편. HARRISON 내과학 16th. 서울, MIP, pp 1827-1848, 2006.
19. Border, W.A., Ward, H.J., Kamil, E.S., Cohen, A.H. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. J Clin Invest 69(2):451-461, 1982.
20. 성장훈, 황은아, 곽진호, 진규복, 한승엽, 박성배, 김현철. 성인 특발성 신증후군의 임상적 고찰(단일 기관 성적). 신장학회지 26: 61-69, 2007.

21. 沈慶法, 執行. 中醫臨床腎臟病學. 上海, 上海科學技術文獻出版社, pp 186-190, 1997.
22. 高志卿, 鄧躍毅, 王琳. 陳以平教授分期論治膜性腎病. 上海中醫藥雜誌, 38(2):35-36, 2004.
23. 何衛民, 張文藏. 復腎湯對家兔膜性腎病的實驗觀察. 天津醫科大學學報, 5(4):70-72, 1999.
24. 나민균, 하티탄훙, 안인파, 이상명, 김영호, 이종필, 성라선. 금은화의 품질 평가. 생약학회지 31(3):340-344, 2000.
25. 배지현, 김미순, 강은혜. 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. 37(4):642-647, 2005.
26. Lee, S.J., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. AntiIFNlammatory activity of *Lonicera japonica*. *Phytotherapy Research* 12(6):445-447, 1998.
27. 정규찬, 박정옥, 배기철, 권동열, 백석환. 금은화 ( *Lonicerae Flos* ) Ethyl Acetate 분할의 과산화지질생성억제에 관한 연구. 자원문제연구논문집, 9(1):97-107, 1990.
28. Rim, B.M., Rim, C.W., Choi, J.Y., Chung, Y.S., Heong, H.G. Effects of *Lonicera japonica* extract as a biological response modifier. *Environ. Mut. Car* 12(1):45-54, 1992.
29. 정규찬, 권동열, 백석환, 김성환, 장현욱. 금은화의 Ethyl Acetate 분획이 돌연변이원성에 미치는 영향. 약학회지 32(5):328-333, 1988.
30. Chen, J.S., Chen, A., Chang, L.C., Chang, W.S., Lee, H.S., Lin, S.H., Lin, Y.F. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine albumin: antigen dose-response relations and strain differences. *Nephrology Dialysis Transplantation* 19(11):2721-2728, 2004.
31. 서울대학교 의과대학. 신장학. 서울, 서울대학교출판부, pp 158-191, 1998.
32. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 서울, 의학문화사, pp 265-281, 716-727, 2003.
33. 강재성 역. 세포분자면역학. 서울, 범문사, pp 53, 247-274, 2004.
34. Papayianni, A. Cytokines, growth factors, and other IFNlammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren Fail* 18(5):725-740, 1996.
35. Wardle, E.N. Cytokine growth factors and glomerulonephritis. *Nephron* 57(3):257-261, 1991.
36. Van den Berg, J.G., Weening, J.J. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin. Sci. (Lond)* 107(2):125-136, 2004.
37. Hyla-Klekot, L., Kucharska, G., Cieślak, W., Siekiera, U., Pulcer, B. Genetic conditions of synthesis of selected cytokines in children with nephrotic syndrome. *Wiad Lek* 58 Suppl 1: 45-49, 2005.
38. Ponticelli, C., Zucchelli, P., Passerini, P., Cesana, B., Locatelli, F., Pasquali, S., et al. A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy. *Kidney Int* 48(5):1600-1604, 1995.