

원저

음곡 금전초약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

윤광식 · 강재희 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Anti-inflammatory Effect on *Desmodii* Herba Pharmacopuncture at KI₁₀ on Nephritis in Rats

Yoon Kwang-shik, Kang Jae-hui and Lee Hyun

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives : This study was designed to evaluate the effects of *Desmodii* herb pharmacopuncture (DH-HA) at KI₁₀(*Umgok*) on nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rat.

Methods : Rats were injected LPS to induce nephritis. DH-HA group was treated with DH-HA at KI₁₀ three times for a week, NP group with 26 gauge needle, saline group with normal saline. To evaluate the effects of DH-HA at KI₁₀ on nephritis in rats, RBC, WBC, neutrophil in blood, TNF- α , CINC-1 in serum, creatinine and total protein in urine, renal TNF- α , renal MPO were measured and renal tissue was analyzed.

Results : WBC in blood, CINC-1 in serum, renal MPO significantly reduced in DH-HA group.

Conclusions : DH-HA at KI₁₀ is effective for nephritis in LPS-induced rats. Therefore, DH-HA at KI₁₀ may be useful for nephritis in clinical field.

Key words : nephritis, pharmacopuncture, KI₁₀, *Desmodii* herb

I. 서론

신장은 복막위장기로서 11흉추와 3요추 사이에 위치한다¹⁾. 신장의 기능은 요를 형성하여 체액의 양과 전해질 조성을 정상으로 유지하는 것이 가장 핵심이며 이 기능은 수분과 전해질의 배설량을 조절함으로

써 이루어진다. 항상성을 유지하는 신장의 기능은 체내의 수분, 나트륨, 염소, 칼륨, 마그네슘, 인산 및 수소이온의 균형을 유지하는 데 관여한다. 또한 신장은 혈관이 매우 발달되어 있어서 2개의 무게가 전체 몸 무게의 1/200에 불과하지만 심박출량의 20~25%가 신장으로 공급되며, 혈액공급을 받아 신장에서 여과 배설하는 역할을 하기 때문에 혈액 속에 포함된 약물

· 접수 : 2011. 5. 9. · 수정 : 2011. 6. 8. · 채택 : 2011. 6. 8.
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 서북구 두정동 621, 대전대학교 부속천안한방병원 침구과
Tel. 010-3405-6916 E-mail : ih2000@dju.ac.kr

및 독소에 쉽게 노출되어 손상에 취약하다²⁾.

급성 신장염은 고혈압, 혈뇨, 적혈구원주, 농뇨와 중등도의 단백뇨 임상양상과 사구체에 광범위한 염증성 손상으로 신사구체 여과율(glomerular filtration rate, GFR)이 감소하고 요독 증상과 함께 염분과 수분의 저류로 부종과 고혈압이 발생하는 질환이다^{3,4)}.

LPS(lipopolysaccharide)는 포도상구균이나 연쇄상구균과 같은 그람음성균의 세포벽에 위치하는 지질다당체의 일종으로서 내독소(endotoxin)라 불리며, 면역세포 특히 대식세포로 하여금 염증 촉발 물질의 급격한 생성증가를 유발한다. 그러므로 항염제 개발의 실험모델 수립에 있어 LPS와 같은 내독소에 의한 대식세포의 과도한 cytokine 생성에 많이 이용된다⁵⁻⁸⁾. LPS는 기도상피세포상의 낭포성섬유증막조절인자(CFTR)와 결합하며 이 과정은 숙주가 감염에 저항하는데 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다⁹⁾. 또한 mesangium 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며 mesangium 세포와 tubular epithelial cell에 Fas 발현을 증가시킴으로써 신장염, 사구체 경화증, 신부전과 같은 신장 기능 손상을 유발한다^{9,10)}.

음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴, 足少陰腎經·衝脈·陰維脈의 交會穴로서, 補腎培元, 調經利水の 효능으로 陽痿, 月經不調, 崩漏, 小便難을 치료한다^{11,12)}.

금전초(*Desmodii herba*)는 영초과의 다년생 초목인 過路黃의 全草로 性은 微寒하고, 味는 甘鹹하며, 歸經은 肝·膽·腎·膀胱經이며, 淸熱利濕·通淋·消腫의 효능이 있어 熱淋, 沙淋, 尿澀作痛을 치료한다¹³⁾.

국민건강보험공단 질병소분류별 다빈도 상병 급여 현황을 비교해보면 2004년에는 진료비로 약 17억 원이 지급되었지만 2008년에는 약 25억 원이 지급되어 47% 가량 증가하였다¹⁴⁾. 진료비가 점차 증가하는 신장염에 대하여 양방적인 치료에서 기본 원칙은 염증의 자연 관해가 일어날 때까지 항생제와 대증요법으로 감염을 제거하는 것에 초점을 맞추고 있어 한방적인 치료가 보다 효과가 있을 것으로 사료된다.

한방에서 신장 독성 및 기능저하에 관한 연구로는 최 등¹⁵⁻¹⁷⁾의 약물을 이용한 연구와, 구맥¹⁸⁾, 차진자¹⁹⁾, 동과인²⁰⁾약침을 음곡에 자침하여 신장염에 유의한 효과를 보인 예가 있었다. 금전초에 관한 연구로는 금전초 추출물을 투여하여 혈당강하에 유의한 효과를 보인 김²¹⁾의 연구와 비만을 유발한 흰쥐에 미치는 영향에 대한 이²²⁾의 연구가 있었으나 신장염에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 LPS로 유도된 신장염 병태모델 흰쥐로

음곡에 상응하는 부위에 금전초약침을 시술하고 혈액과 소변, 신장 내 염증 활성평가, 조직학적 분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

동물은 6주령의 웅성 SD rat을 (주)대한바이오링크(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 20~60%를 유지하였으며 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 규칙을 따랐다.

2) 약재

본 실험에 사용된 금전초(*Desmodii herba*, DH)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입 실온에서 보관하였고(원산지 중국), 사용 전 초음파 세척을 실시하였다.

3) 시약

시약명	제조사	제조국
Phosphate buffer saline(PBS) HBSS Collagenase type IV MTT Lipopolysaccharide(LPS) Gum-sucrose Formalin Absolute EtOH Harris hematoxlin Eosin B	Sigma	USA
RPMI 1640 media Antibiotics FBS	Hyclone	
TNF-alpha ELISA kit Creatinine assay kit CINC-1 ELISA kit MPO ELISA kit	Oxford Bio Assay Systems ALPCO Cellscience	
Ethyl ether		

4) 기기

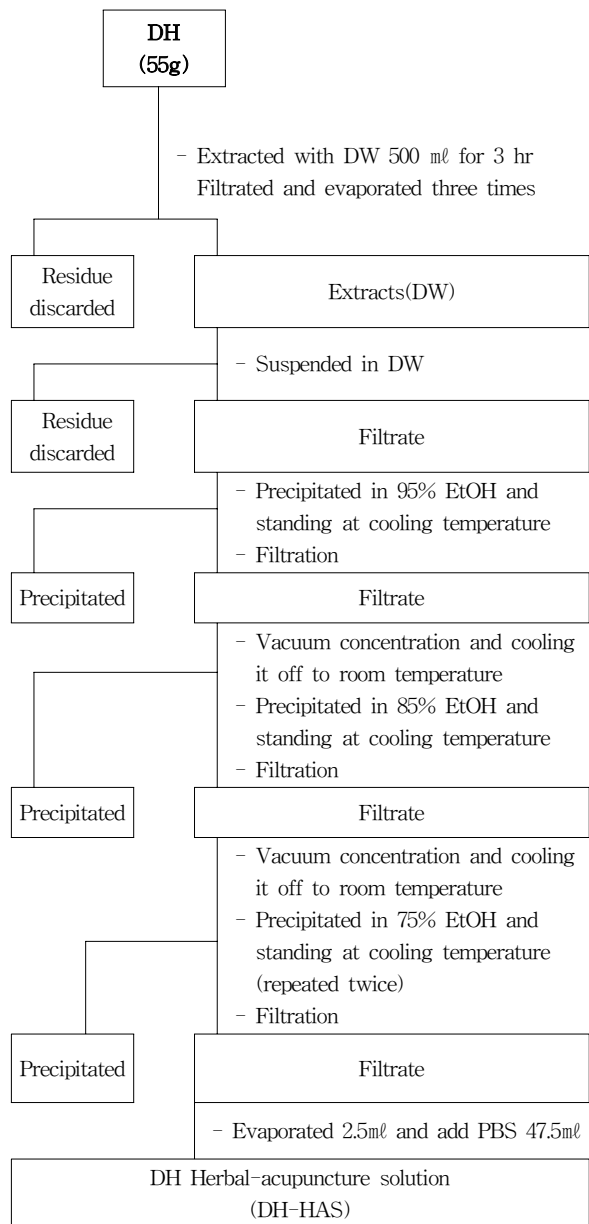
기기명	제조사	제조국
Bio-freezer	Sanyo	Japan
Rotary evaporator	Eyela	
Digital camera microscope	Nikon	
ELISA reader	TARAN	Canada
Sonicate	Fisher	USA
Ice maker	Vision science	Korea
Metabolic cage	B&P	
Cytological centrifuge	Hanil	
Micro centrifuge		
Cryotome	Shandon	UK

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 금전초 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 추출한 후, 추출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축하였다. 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 금전초 55g으로부터 얻은 약침액을 감압 농축하여 수분을 모두 날렸을 때 분말 수율은 1.628g이었다(수율 2.96%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다 (Scheme 1).

Scheme 1. Manufacturing Procedure of Pharmacopuncture Solution



2) 세포독성

(1) 간세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷 SD rat의 간 조직을 사용하였다. Rat을 ethyl ether를 이용하여 마취시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켰다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10% FBS)와 collagenase type IV(300u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 한다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포 분리가 잘 되

도록 하였다. 얻어진 간세포는 RPMI 1640 media에 세척한 후, 세포를 계수하였다.

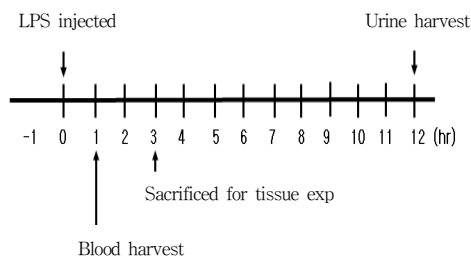
(2) MTT assay

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 금전초 전탕액을 농도별로 처리하고, 72시간 동안 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 (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 후에는 혈액을 채취했던 동물 5마리를 sacrifice하여 신장을 적출하였다. 각 실험군의 3마리 동물들로부터 LPS 투여 후 12시간 동안 소변 sample을 채취하였다(Scheme 2).

Scheme 2. Experimental Procedure



4) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), NP군(needle prick, NP), saline대조군(saline), 금전초약침군(DH-HA)의 5군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, NP군, saline대조군, DH-HA군은 각각 2mg/kg의

LPS를 복강에 투여하였다. NP군과 saline대조군, DH-HA군은 LPS 투여 1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 NP(needle prick)자극, saline 주입, 금전초약침처치를 주3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치를 하지 않은 정상 SD rat
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2mg/kg으로 복강 투여한 군
- ③ NP군(NP) : 실험 전 1주일간 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 26 gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 자입한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군
- ④ Saline대조군(saline) : 실험 전 1주일간 saline 0.2ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군
- ⑤ 금전초약침군(DH-HA) : 실험 전 1주일간 5%의 금전초약침액 0.2ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군

5) 신장염 평가

(1) 혈액 분석

LPS 처리 1시간 뒤, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 심장 채혈 법으로 각 동물에서 4ml의 혈액을 채취하였다. (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 RBC, WBC, Neutrophil의 비율을 측정하였다. 혈청 TNF- α (Tumor necrosis factor- α), CINC-1(Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변 분석

Metabolic cage에서 12시간 동안 채취한 소변을 (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 요중 total protein과 creatinine 농도를 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하여 방혈한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.05% sodium azide가 첨가된 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣고 sonicate(Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2000 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 분리

된 supernatant는 -80°C 에서 보관되었다가 ELISA kit을 이용하여 TNF- α 와 MPO(myeloperoxidase)의 농도를 측정하였다.

(4) 조직학적 분석

LPS 처리 3시간 후, 실험동물의 신장을 적취하여, 10%의 formalin에 고정한다. 고정된 조직은 왁스에 format시켜 5 μm 의 두께로 박절한 후 조직 절편을 슬라이드에 부착시키고 실내에서 30분 이상 방치하였다. 슬라이드에 부착된 조직은 Harris hematoxylin에서 1분 정도 염색을 실시하고 흐르는 물에 씻어주었다. 물기를 제거하고 1% acid alcohol에 2, 3번 정도 넣었다 빼 준 뒤, 흐르는 물에 슬라이드를 씻어준 후, 0.3% ammonia water에 중화시키기 위해 5~10번 정도 넣었다 빼 준다. 다시 흐르는 물에 슬라이드를 씻어주고, eosin에서 3분 정도 염색처리한 뒤, 95% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 주고, 다시 깨끗한 95% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼 준다. 남은 alcohol성분은 흡수지를 이용하여 완전하게 alcohol성분을 제거하고, 100% alcohol에 10번 정도 넣었다 빼 준 후, 다시 깨끗한 100% alcohol에서 10번 정도 넣었다 빼 준다. 남은 alcohol 성분을 제거하고, Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 주고, 다시 깨끗한 Xylene에서 10번 정도 넣었다 빼 준 뒤, 봉입한다. 봉입을 끝낸 조직은 광학현미경(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰한 후, digital camera(DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하였다.

6) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 결과값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 통계프로그램은 SPSS(14.0 Korean version)을 이용하여 분석하였고, n수가 30 미만이기 때문에 각각의 데이터는 모수검정을 통하였으며 정규성검정과 등분산성 검정을 만족하여 ANOVA-test와 *t*-test를 사용하였다. Fig. 1의 데이터는 ANOVA-test를 이용하여 여러 농도간 결과값의 평균을 비교하였으며, Fig. 2와 Fig. 3에서는 *t*-test를 이용하여 평균을 비교하였다. 이후 *in vivo* 실험의 데이터는 정상군과 LPS군의 평균을 *t*-test로 비교하고, 다시 LPS군, NP군, saline군, DH-HA군의 평균값을 ANOVA test를 이용하여 비교하였으며, ANOVA test의 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 신뢰도는 95%이상($p < 0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. 세포독성

금전초약침액을 1%, 2.5%, 5%, 10%로 희석하여 정상 rat의 간세포에 대한 세포독성을 확인하였다. 금전초약침액의 농도가 낮을수록 세포의 viability가 감소하였으나 1% 농도를 제외하면 유의성은 없었다(Fig. 1).

2. LPS투여에 따른 TNF- α 의 농도 변화

1) Serum TNF- α

Rat에 LPS를 복강 투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 serum TNF- α 의 농도를 관찰하였다. LPS 투여 1시간 후에 serum TNF- α 의 농도가 크게 증가하여 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 높았으며, LPS 투여 3시간 후에는 1시간 후에 비하여 serum TNF- α 의 농도가 감소하였다(Fig. 2).

2) Renal TNF- α

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

3. 금전초약침이 LPS에 의한 rat의 신장염에 미치는 영향

1) 혈액학적 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 RBC, WBC의 수와 WBC 중 neutrophil의 비율을 측정하였다.

(1) RBC

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈중 RBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 RBC는 normal군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다.

DH-HA군에서 LPS군에 비하여 혈중 RBC에 유의한 변화는 없었다(Fig. 4).

(2) WBC

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈중 WBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. NP군과 saline대조군, DH-HA군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

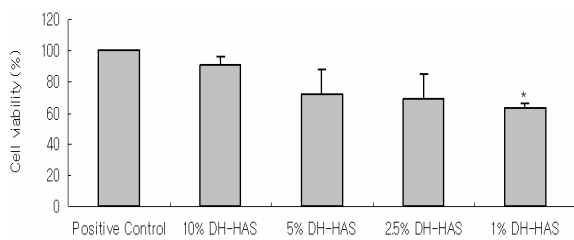


Fig. 1. Cytotoxicity of DH-HAS on rat liver cells

Liver cells from normal SD rat were cultured in RPMI 1640 with 10% FBS medium for 72h with or without various concentrations of DH-HAS (*Desmodii herba pharmacopuncture solution*). The cell viability were measured by MTT assay. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments.

Control : culture medium without DH-HAS.
 10%, 5%, 2.5%, 1% DH-HAS : culture medium with 10%, 5%, 2.5%, 1% DH-HAS respectively.

* : $p < 0.05$, compared to control by ANOVA test.

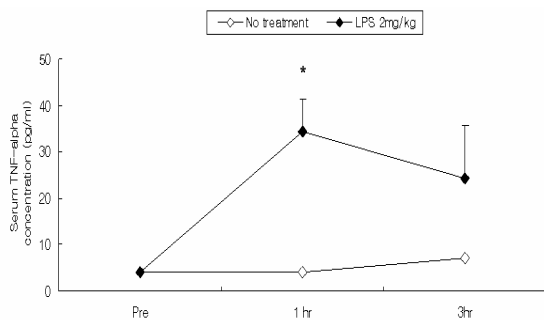


Fig. 2. Effect of LPS on serum TNF- α level in SD rats

The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS (lipopolysaccharide; 2mg/kg). Blood samples were taken from rat heart at 1 hr or 3 hr 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 without LPS challenge.
 LPS 2mg/kg : SD rat with LPS (2 mg/kg) challenge.
 * : $p < 0.05$, compared to no-treatment group by *t*-test.

(3) Neutrophil

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 WBC 중 neutrophil 비율을 측정하였다. LPS군의 neutrophil 비율은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. DH-HA군에서는 LPS군에 비하여 neutrophil 비율이 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

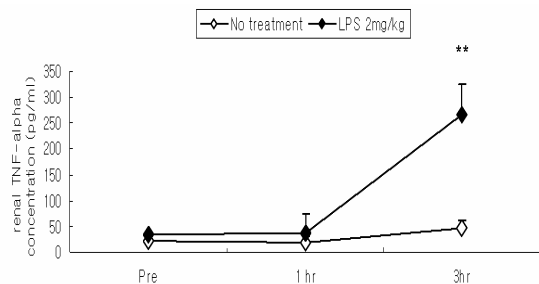


Fig. 3. Effect of LPS on renal TNF- α level in SD rats

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

No treatment : normal SD rat without LPS challenge.
 LPS 2mg/kg : SD rat with LPS (2 mg/kg) challenge.
 ** : $p < 0.01$, compared to no-treatment group by *t*-test.

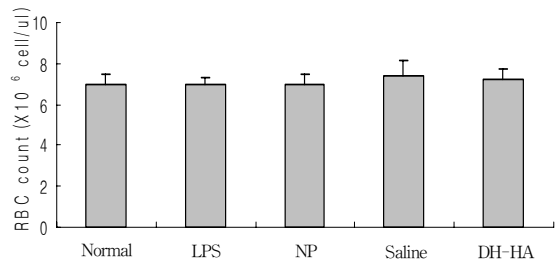


Fig. 4. Effects of DH-HA on RBC count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and RBC count was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.
 LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.
 NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.
 Saline : LPS (2 mg/kg) challenge and saline (200 μ l/rat) injection at KI₁₀.
 DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

2) Blood chemistry

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

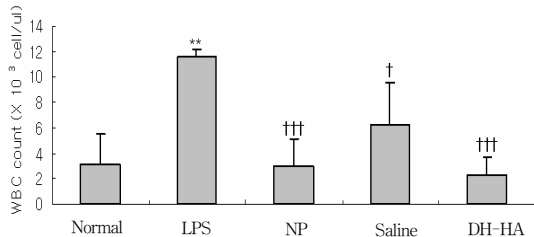


Fig. 5. Effect of DH-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and WBC count was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

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

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

** : $p < 0.01$, compared to normal group by ANOVA test.

††† : $p < 0.001$.

† : $p < 0.05$ compared to LPS group by ANOVA test.

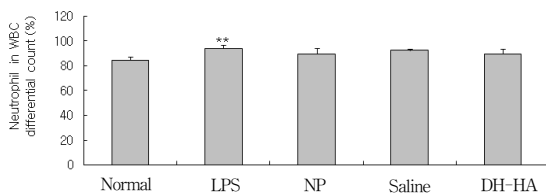


Fig. 6. Effect of DH-HA on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and the percentage of neutrophil out of WBC count was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

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

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

** : $p < 0.01$ compared to normal group by ANOVA test.

(1) TNF- α (Tumor necrosis factor- α)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 TNF- α 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 TNF- α 가 현저하게 증가하였다. Saline대조군에서는 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 유의하게 감소하였다. DH-HA군은 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α 농도가 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

(2) CINC-1(cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 CINC-1 농도를 확인하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. NP군 및 saline대조군에서는 LPS군에 비하여 CINC-1이 감소하였으나 유의성은 없었다. DH-HA군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

4) 소변 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요 중 creatinine과 total protein의 양을 측정하였다.

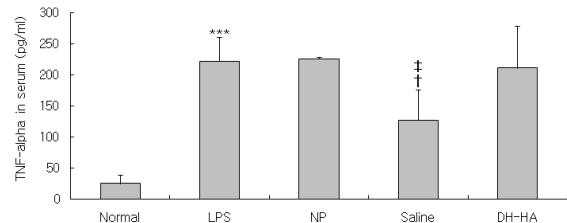


Fig. 7. Effects of DH-HA on serum TNF- α level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum TNF-alpha level was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

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

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀ at.

*** : $p < 0.001$ compared to normal group by ANOVA test.

† : $p < 0.05$ compared to LPS group by ANOVA test.

‡ : $p < 0.01$ compared to NP group by ANOVA test.

(1) Creatinine

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요 중 creatinine 양을 측정하였다. LPS군의 creatinine 농도는 정상군에 비하여 약간 증가하였으며, DH-HA군과 NP군에서는 LPS군에 비하여 요 중 creatinine 농도가 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 9).

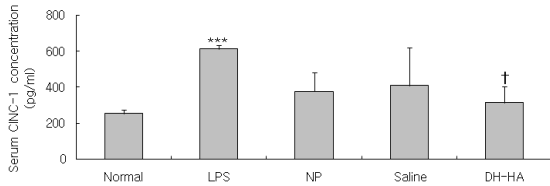


Fig. 8. Effects of DH-HA on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Blood samples were taken from rat hearts 1 hr after the LPS injection and serum CINC-1 level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

Saline : LPS (2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at KI₁₀.

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

*** : p<0.001 compared to normal group by ANOVA test.

† : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test.

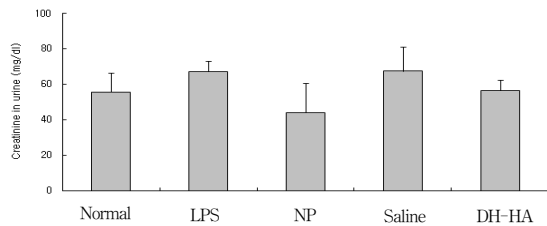


Fig. 9. Effects of DH-HA on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods 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 urinary creatinine level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

Saline : LPS (2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at KI₁₀.

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

(2) Total protein

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 요 중 total protein 양을 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 요 중 total protein이 증가하였으나 유의성은 없었다. DH-HA군의 요 중 total protein은 LPS군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

5) 신장 내 염증활성

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장 조직을 분획한 후 TNF-α와 MPO의 농도를 측정하였다.

(1) TNF-α

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 renal TNF-α의 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal TNF-α가 유의하게 증가하였으며, DH-HA군의 renal TNF-α는 LPS군에 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

(2) MPO(myeloperoxidase)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 renal MPO 농도를 측정하였다. LPS군에서는 정상군에 비하여 renal MPO가 현저하게 증가하였다. NP군 및 saline대조군에서는 LPS군에 비하여

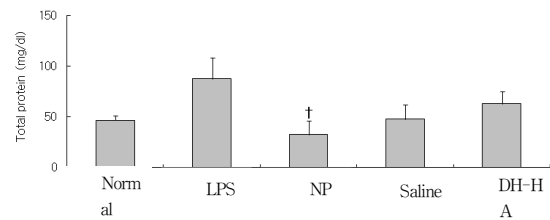


Fig. 10. Effects of DH-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods 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, total protein level in urine was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

Saline : LPS (2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at KI₁₀.

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μl/rat) at KI₁₀.

† : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test

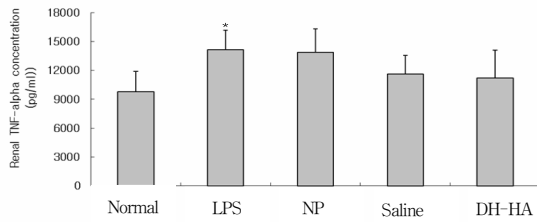


Fig. 11. Effects of DH-HA on renal TNF-alpha level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed and renal TNF- α level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

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

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

* : $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA test.

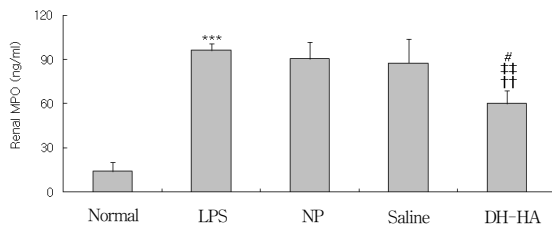


Fig. 12. Effects of DH-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed and renal MPO level was analysed by ELISA. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

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

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

*** : $p < 0.001$ compared to normal group by ANOVA test.

†† : $p < 0.05$ compared to LPS group by ANOVA test.

: $p < 0.01$ compared to NP group by ANOVA test.

: $p < 0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

renal MPO에 유의한 변화가 없었다. DH-HA군의 renal MPO는 LPS군 및 NP군, saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

6) 조직학적 분석

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색법으로 조직을 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. LPS군의 신장조직은 정상군에 비하여 사구체에 neutrophil의 집중과 조직의 조밀도 저하를 나타내었다. DH-HA군의 신장 조직은 정상군 만큼의 neutrophil의 집중이 줄어들지는 않았으나, LPS군에 비하여는 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 나타났다(Fig. 13).

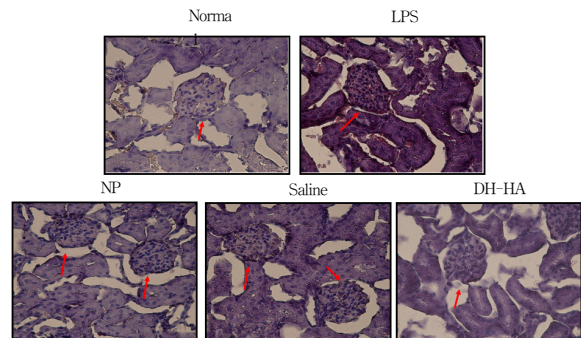


Fig. 13. Histological analysis of renal tissue in LPS-stimulated rats (H&E stain)

The male SD rats were treated as described in the materials and methods and injected intra-peritoneally with LPS (2 mg/kg). Three hours after the LPS stimulation, rat kidney was removed. The renal tissue was sliced and embedded in OCT compound, and 8 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin. (\uparrow : glomerulus, $\times 400$)

Normal : normal SD rat.

LPS : LPS (2 mg/kg) challenge.

NP : LPS (2 mg/kg) challenge and administration with NP at KI₁₀.

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

DH-HA : LPS (2 mg/kg) challenge and pharmacopuncture with DH (5%, 200 μ l/rat) at KI₁₀.

IV. 고찰

신장은 1쌍의 암적색을 띤 완두형의 장기로서 지방피막(adipose capsule)에 싸여 복막과 후복벽 사이에 있는 복막 후 장기의 하나이다²⁾. 신장은 생명유지 장기 중의 하나로 체액의 양과 조성을 일정하게 유지하여 항상성에 관여하며 이를 위해 내인성 조절뿐만 아니라, 신경성 및 호르몬성 조절이 모두 관여한다²³⁾. 또한 신장에서의 배설 기능은 사구체에서의 혈액 여과와 세뇨관에서의 재흡수, 분비의 관계에 의해서 이

루어지는데 능동수송에 의한 왕성한 대사작용으로 인해 독성물질에 대한 감수성이 높다.

급성 신장염의 원인은 매우 다양하며 대부분 각종 감염 후에 일어나며 상기도 감염 및 피부 감염도 신장염의 원인 중 일부이다. 신장염은 사구체의 기능 손실을 초래하여 혈뇨, 단백뇨, 고혈압, 부종 등을 유발하고 만성으로 이행될 경우 신부전으로 발전할 수 있다²⁴⁾.

신장염은 한의학적으로 尿不利, 癃閉, 淋症 등의 범주에 속하며 일반적으로 동통이 없는 증상이지만 시일이 오래 지나면 尿毒이 內攻하여 頭暈, 心悸, 浮腫, 惡心嘔吐 등의 증상과 심하면 昏迷抽搦의 증상을 동반할 수 있다고 하였다. 치료는 대개 清熱利濕, 通利小便의 방법을 사용하게 된다²⁾.

陰谷(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴로 무릎 뒤쪽의 오목하게 들어간 부분에 위치하며 祛濕通洩, 滋腎清熱, 疏泄厥氣, 利導下焦의 穴性으로 尿道炎, 陰道炎, 陰痿, 子宮出血, 小便難, 崩漏 등 신장의 기능과 관련된 다양한 질환의 치료혈로 널리 쓰인다¹²⁾.

금전초(*Desmodii herba*)는 애초과(보춘화과: *Primulaceae*)에 속한 다년생 초목인 過路黃의 全草로 性味が 甘鹹微寒하여 甘淡은 滲利하고 鹹은 軟堅하며, 寒은 清熱하므로, 양호한 利尿通淋, 利濕 및 清熱解毒 작용을 가지고 있어 淋症을 치료하는 데 비교적 좋은 효과가 있다²⁵⁾.

신장염의 양방적인 치료로는 염증의 자연 관해가 일어날 때까지 적절한 항생제의 투여와 그 후 대증요법을 적용하는 처치만 있어 한방적인 처치가 보다 효과적일 수 있다. 기존의 연구로는 구맥¹⁷⁾, 차전자¹⁸⁾, 동과인¹⁹⁾ 약침을 음곡에 자침하여 유의한 효과를 보인 연구가 있었으나 금전초약침을 시술하여 신장염에 효과를 보인 연구는 아직 보고된 바는 아직 없었다.

이에 저자는 음곡에 시술한 금전초약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보기로 하여 금전초약침액을 시료로 정상 흰쥐의 간세포에 대한 세포 독성을 확인하고 LPS 투여 후 혈청과 신장 내 TNF- α 의 농도를 측정하였고, 음곡에 금전초약침 투여 후 혈액 및 혈청 분석, 소변 분석, 신장 내 염증활성, 조직학적 분석을 시행하였다.

정상 흰쥐의 간세포에 DH-HA를 여러 가지 농도로 투여한 후 간세포에 대한 세포 독성을 확인한 결과 DH-HA 농도가 높을수록 세포의 *viability*가 증가됨을 알 수 있었으나 유의성은 없었고, 1% DH-HA에서는 세포의 *viability*가 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

Cytokine 중의 하나인 TNF- α 는 T cell과 대식세

포를 활성화하고 다른 pro-inflammatory cytokine을 증가시켜 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다²⁶⁾. LPS 투여에 따른 TNF- α 의 농도 변화를 분석하여 염증반응이 일어나는 정도를 살펴보고자 각각 혈청과 신장 조직에서 정상군과 LPS 투여군의 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 혈청 검사에서 LPS 투여 후 1시간과 3시간 후 모두 TNF- α 가 증가하였으나, 1시간 후에는 유의한 증가를 보였고 3시간 후에는 유의한 차이를 보이지 않았다. 신장 조직검사에서는 LPS 투여 1시간 후에는 거의 차이가 없었으나 3시간 후에는 정상군에 비해 현저한 증가를 보였다(Fig. 2, 3). 따라서 LPS 투여에 따른 효과를 보다 정확하게 측정하기 위해서 혈청 검사는 LPS 투여 1시간 후, 신장 조직 내 검사는 LPS 투여 3시간 후에 시행하였다.

WBC는 인체보호 시스템 중 자발적으로 움직일 수 있는 세포로 부분적으로 골수와 림프조직에서 형성된다. 백혈구는 대부분 감염과 염증부위로 이동하는 것으로 염증반응을 감별하는 중요한 혈액검사 중 하나이다²⁷⁾. 본 실험에서 LPS 투여군에 비해 DH-HA군에서 백혈구가 유의하게 감소하였고, NP군과 Saline 군에서 역시 혈중 백혈구가 유의하게 감소하였다(Fig. 5). 이는 음곡에 시술한 금전초약침과 음곡혈 자침이 신장염 병태모델에서 염증반응을 억제한 것으로 사료된다.

TNF- α 의 발현은 cytolysis, 세포독성, 면역조절, 세포증식, 항바이러스 반응을 포함한 생물학적 기능을 가지고 있으며 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 하며^{28,29)}, neutrophil의 유입에 관여하는 것으로 알려진 CINC-1은 그 농도를 측정함으로써 염증에 관여하는 neutrophil의 활성화 정도를 평가하여 염증 부위의 염증 정도를 파악할 수 있다³⁰⁾. 본 실험에서 흰쥐의 혈청에서 TNF- α , CINC-1의 농도를 측정한 결과 TNF- α 는 saline군에서 LPS군에 비하여 유의하게 감소하였으며, CINC-1은 LPS군에 비해 DH-HA군이 유의하게 감소하였다(Fig. 7, 8). 이것으로 보아 CINC-1의 감소는 neutrophil 활성화의 감소를 의미하므로 금전초약침의 清熱利尿, 解毒消腫의 작용이 어느 정도 염증 반응을 억제한 것으로 보인다.

신장에서 소변의 생성은 혈액 여과와 세뇨관에서의 재흡수, 분비의 관계에 의해서 이루어진다. 정상적인 신장은 사구체에서 여과과정을 거쳐 소변을 생성하는데, 생성된 소변에는 적혈구, 백혈구, 단백질 등이 일반적으로 배출되지 않거나 극소량 발견되지만, 사구체 손상 등으로 사구체 여과에 이상이 생기면 소변

에서 단백질이 발견된다³¹⁾. 본 실험에서는 흰쥐의 소변을 채취하여 요 중 creatinine과 total protein을 측정하였다. 요 중 creatinine과 total protein 모두 LPS 투여군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다(Fig. 9, 10).

MPO는 호중구가 탐식한 세균에 대하여 free radical을 생산하여 살균작용을 보여 선천성 면역 방어 기전에 관여하지만, 적혈구를 용해시키고 세포막의 지질과 단백질을 변성시키는 작용을 통해 조직을 손상시킬 수 있으며 주로 사구체신염 등에서 고빈도를 보여 염증의 지표로도 사용된다^{32,33)}. 본 실험에서는 신장 내 염증 활성도를 측정하기 위해 신장 조직 내 TNF- α 와 MPO의 농도를 측정하였는데 TNF- α 는 DH-HA군이 LPS군에 약간 감소하였으나 유의성은 없었고, MPO의 농도는 DH-DA군이 LPS군, NP군, saline군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 11, 12). MPO의 감소는 금전초의 淸熱利濕·通淋·消腫의 효능으로 보이나, 앞서 보인 혈청 neutrophil의 감소에는 유의성이 없어 향후 이에 대해 더 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

LPS로 신장염을 유도한 후 신장을 적출하여 손상을 관찰한 결과 LPS군의 신장 조직은 정상군에 비하여 사구체에 neutrophil의 집중과 조직의 조밀도 저하를 나타내었다. DH-HA군의 신장 조직은 정상군만큼의 neutrophil의 집중은 줄어들지는 않았으나, LPS군에 비하여는 neutrophil의 집중이 감소된 것으로 나타났다. 따라서 DA-HA군에서는 LPS와 같은 독성물질로 유발된 신장염의 조직 손상을 막는데 효과가 있을 것으로 생각된다(Fig. 13).

이상의 결과로 음곡에 시술한 금전초약침은 LPS로 유발된 흰쥐의 신장염에 대해서 백혈구의 증가를 억제하며, CINC-1과 신장 실질 내 MPO를 감소시켰다. 한편 saline군에서는 백혈구, TNF- α 가 유의하게 감소하였고, NP군에서는 백혈구, 소변 내 total protein이 유의하게 감소하였는데 이는 금전초의 약리 작용뿐만 아니라 음곡 경혈의 祛濕通洩, 滋腎淸熱, 疏泄利導下焦의 효능에 따른 치료 효과도 작용했을 것으로 보인다. 따라서 음곡에 금전초약침은 신장의 염증반응을 억제시키는 효과가 있는 것으로 생각되며 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다 생각된다.

V. 결 론

음곡(KI₁₀)에 시술한 금전초약침이 LPS로 유도한 흰쥐의 신장염 모델에 미치는 영향을 알아보기로 금전초약침액을 시료로 정상 흰쥐의 간세포에 대한 독성을 확인하고 LPS 투여 후 혈청과 신장 내 TNF- α 의 농도를 측정하였고, 음곡에 금전초약침 투여 후 혈액 및 혈청분석, 소변분석, 신장 내 염증활성, 조직학적 분석을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DH-HA 군에서 혈청 CINC-1이 NP군, saline군에 비해 유의하게 감소하였다.
2. DH-HA 군에서 신장 내 MPO가 LPS군, NP군, Saline군에 비해 유의하게 감소하였다.
3. 혈중 WBC가 NP군, Saline군, DH-HA 군에서 모두 유의하게 감소하였다.
4. DH-HA 군에서 신장의 조직학적 분석에서 사구체의 neutrophil의 집중이 LPS군에 비해 감소하는 경향을 보였다.

VI. 참고문헌

1. 대한신장학회. 임상신장학. 서울 : 광문출판사. 2001 : 9.
2. 두호경. 동의신계학. 서울 : 정보사. 2003 : 85-97, 225-301.
3. FAUCI 외. Harrison's principles of Internal Medicine. 17th ed. Seoul : MIP. 2010 : 916-25, 2155.
4. Mark H Beers, Robert Berkow. The Merck Manual. 2003 : 1993-2014.
5. Anzai M, Maezawai R, Ohara T, Kodama K, Fukuda T, Kurasawa K. Systemic lupus erythematosus associated with facial edema. overproduction of interleukin-5. and eosinophilia. J Clin Rheumatol. 2008 ; 14(6) : 361-2.
6. 이지영, 고성훈, 이용재, 이세연, 박효준, 신태용, 전훈. IFN- γ 와 LPS로 자극된 쥐의 복강 대식세포에서 구척 메탄올 추출물의 항염증 효과. 생약학회지. 2010 ; 41(2) : 108-14.
7. 조혜연, 노경희, 조미경, 장지현, 이미옥, 김소희, 송영선. LPS 주사한 BALB/c 마우스에서 Genistein

- 의 산화적 스트레스 억제효과 및 항염증 효과. 한국식품영양과학회지. 2008 ; 37(9) : 1126-35.
8. 하남주, 한신하, 성기현, 임동술, 이숙연, 이정길, 김균재. The effect of Linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7. 대한약학회지. 2002 ; 25(2) : 170-7.
 9. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock Pathogenesis. Lancet. 1991 ; 338 : 732-6.
 10. 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.
 11. 임윤경, 김준표, 김태한. 대한경락경혈학 각론. 대전 : 오비기획. 2006 : 676-8.
 12. 대한침구학회 교재편찬위원회. 침구학(상). 파주 : 집문당. 2008 : 175-6.
 13. 康秉秀, 高雲彩, 金圭烈, 金先熙, 盧昇鉉, 朴涌基 외. 本草學. 서울 : 영림사. 2000 : 373-4.
 14. 국민건강보험공단. 2008, 2004년 질병소분류별 다빈도 상병 급여현황.
 15. 최정배, 이경환, 김용성. 육미지황탕가황기인삼 추출물의 Cisplatin 유도 신장독성 보호효과. 대한한방내과학회지. 2003 ; 24(3) : 579-87.
 16. 황영근, 정지천. 수은으로 유발된 토끼의 신장 기능 손상에 대한 단삼의 효과. 대한한방내과학회지. 2000 ; 21(2) : 227-34.
 17. 윤철호, 정지천, 신의섭. Bromobenzene으로 유도된 신장 기능저하에 미치는 녹용 약침의 항산화 효과. 대한한방내과학회지. 1999 ; 20(2) : 287-302.
 18. 김경민, 이현, 강희정, 이용흠, 임윤경. 음곡에 시술한 구맥 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2009 ; 26(1) : 61-77.
 19. 박병문, 허부, 임윤경. 음곡 차전자 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2009 ; 26(2) : 127-43.
 20. 이정환, 김정호, 김영일. 음곡에 시술한 동과인 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2010 ; 13(2) : 51-65.
 21. 김옥경. Streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐에 대한 금전초 추출물의 혈당 강하 효과. 생약학회지. 2004 ; 35(4) : 300-8.
 22. 이훈규, 변준석, 변성희, 김상찬. 금전초 추출물이 고지방식이로 유발한 비만 흰쥐에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2002 ; 10(1) : 61-72.
 23. 김현철, 박성배, 박원균, 안기성, 임학. 통합강의를 위한 신장학. 서울 : E-public. 2006 : 16.
 24. 최규현 역. SIM 내과학. 서울 : 정담. 2008 : 116-45.
 25. 김기의. 국시본초학. 서울 : 군자출판사. 2006 : 165.
 26. Beutler B and Cerami A. The biology of cachetin TNF-R primary mediator of the host response. Annu. Rev. Immunol. 1989 ; 7 : 625-55.
 27. C Guyton, John E Hall. Textbook of Medical Physiology, 10e. Seoul : Jungdam. 2002 : 446-9.
 28. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu Rev Immunol. 1991 : 411-52.
 29. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factors. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem. 1991 : 7313-6.
 30. Bressan E de Queiroz, Cunha F, Tonussi CR. Concentration of TNF-alpha, IL-1 beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. Cytokine. 2006 ; 36 : 83-9.
 31. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울 : 고려의학. 1998 : 573-610.
 32. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 서울 : 의학문화사. 2003 : 95-8, 102-5, 1437.
 33. Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. Clin Chem Lab Med. 2002 ; (40) : 2-8.