

## 음곡 옥미수 약침이 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

김양섭, 임윤경

대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실

### Anti-inflammatory Effect of *Zae Stigma* Herbal-acupuncture at KI10 on LPS-induced Nephritis in Rats

Yang-seob Kim, Yun-Kyoung Yim

Dept. of Meridians & Acupoints, College of Oriental Medicine, Daejeon University

**Objectives:** The purpose of this study was to investigate the effects of *Zae Stigma* herbal-acupuncture (ZS-HA) at KI10 (Umgo) on nephritis induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats.

**Methods:** Rats were assigned to five groups, normal, LPS, NP, saline and ZS-HA. Rats in NP, saline, and ZS-HA groups were treated with needle prick, saline injection, and ZS-HA respectively at KI10, three times a week. All animals except the normal group were injected intra-peritoneally with LPS to induce nephritis. RBC and WBC, neutrophils in blood, TNF-alpha, CINC-1, creatinine in serum, urinal volume, total protein and creatinine in urine, and renal MPO were analyzed.

**Results:** Needle prick at KI10 significantly reduced WBC in blood and CINC-1 in serum of LPS-stimulated rats. Saline injection at KI10 significantly reduced TNF- $\alpha$  in serum and total protein in urine of LPS-stimulated rats. ZS-HA at KI10 significantly increased RBC in blood, and significantly reduced neutrophils in blood, TNF- $\alpha$  in serum, and total protein in urine of LPS-stimulated rats.

**Conclusions:** According to these results, it is postulated that ZS-HA at KI10 has anti-inflammatory and renal-protective effects on LPS-induced nephritis in rats, and both acupoint KI10 and herb *Zae Stigma* made contributions to this effect. Further studies on the interaction between acupoint KI10 and herb *Zae Stigma* may be needed.

*Key Words* : *Zae Stigma*, herbal-acupuncture, KI10, LPS, nephritis

### 서론

신장은 후복막위 장기로서 흉요접합부에 위치하며 전해질과 수분을 조절하여 순환혈액량을 조절하고, 요소를 포함한 독성물질을 배출함으로써 체내환경을 유지하는 장기로 순환혈액의 20~25%가 공급되며, 여과와 재흡수를 위하여 얇은 막구조를 가지고 있어

독성물질에 의한 손상에 취약하다<sup>1)</sup>.

신장염(nephritis)은 사구체, 세뇨관, 신간질조직을 침습하는 소상(巢狀) 또는 미만성 증식성 또는 과피성 과정을 말한다<sup>2)</sup>. 급성신장염은 감염에 의한 면역복합체나, 항체가 신장에 침착되어 발생한다. 신장에 침착된 면역복합체나 세균에 대한 항체는 면역시스템을 활성화시키고 신장을 손상시켜, 혈뇨, 단백뇨 등

• Received : 15 March 2013

• Revised : 20 May 2013

• Accepted : 20 May 2013

• Correspondence to : 임윤경(Yun-Kyoung Yim)

대전시 동구 용운동 대전대학교 한의학과 경락경혈학교실

Tel : +82-42-280-2610, Fax : +82-42-280-2641, E-mail : docwindy@dju.kr

을 유발하고, 여과기능의 손상까지 진행되면, 꾀뇨와 요독증이 발생한다<sup>3)</sup>.

2010년 건강보험공단의 질병 통계에 의하면 급성 신장염에 대한 진료비는 38억원 이상이고 기타 사구체질환에 대한 진료비는 450억원을 넘고 있다. 2004년 급성신장염에 대한 진료비가 17억원 수준이라는 것을 감안하면 2배 이상 증가하였다<sup>4)</sup>. 서양의학적 치료는 대체로 면역억제제의 투여를 기본으로 증상과 원인에 따라 추가적인 치료를 시행하게 되는데 주로 스테로이드와 항생제, 면역글로블린 등이 사용된다<sup>5,9)</sup>. 이처럼 현재 신장염 환자와 그 치료비는 동시에 급속도로 증가하고 있지만 양방적인 치료는 대중적이면서 어느 정도의 부작용을 가지고 있으며 근본적이지 못한 한계를 분명히 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 문헌적 검증을 통한 여러 가지 방법으로 부작용은 덜하면서도 보다 근본적인 원인에 접근할 수 있는 한의학적인 치료는 잘 이루어지지 않고 있는 게 현실이다.

이에 저자는 내복하는 한약탕전액에 비해 적은 양으로 특정 혈자리를 자극하는 약침요법의 적용을 생각하였다.

약침 혈위는 腎經의 陰谷을 선택하였다. 음곡(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의 효능이 있어 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難등을 치료한다<sup>10)</sup>.

옥미수(*Zea Stigma*, ZS)는 禾本科(벼과 ; Gramineae)에 속한 一年生 草本인 옥수수 *Zea mays* L.의 花柱(수염)를 건조한 것이다. 性은 平 甘淡 無毒하며 利尿退腫, 利膽退黃, 降血糖, 止血하는 효능이 있어 治腎炎水腫 할 수 있다<sup>11)</sup>.

지금까지 옥미수의 당뇨에 대한 연구<sup>12)</sup>와 신장염에 대한 효능에 관한 연구<sup>13)</sup>는 있었다. 또한 신장염의 음곡혈 약침시술도 여러 가지 약재가 연구 되었지만<sup>14,16)</sup> 아직까지 음곡의 옥미수 약침이 신장염에 미치는 효능에 대한 연구는 발견할 수 없었다.

본 연구는 급성 신장염 동물모델을 이용한 실험으로, 질병유발 전 약침시술을 수행함으로써 음곡 옥미수 약침의 신장보호효과와 신장염 억제효과를 관찰하였으며, 향후 다양한 실험모델을 이용하여 신장염 치료효과에 대한 후속 연구를 위한 기초연구로서 의

의가 있을 것으로 생각하였다.

이에 저자는 음곡에 시술한 옥미수 약침이 신장염에 미치는 영향을 확인하고자, 흰쥐의 음곡 상응부위에 옥미수 약침을 시술한 후 LPS로 급성신장염을 유발하여 혈액, 소변, 신장 내 염증활성 등을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

동물은 6 주령의 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 50~60%를 유지하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리규정을 준수하여 시행하였다.

#### 2) 약재

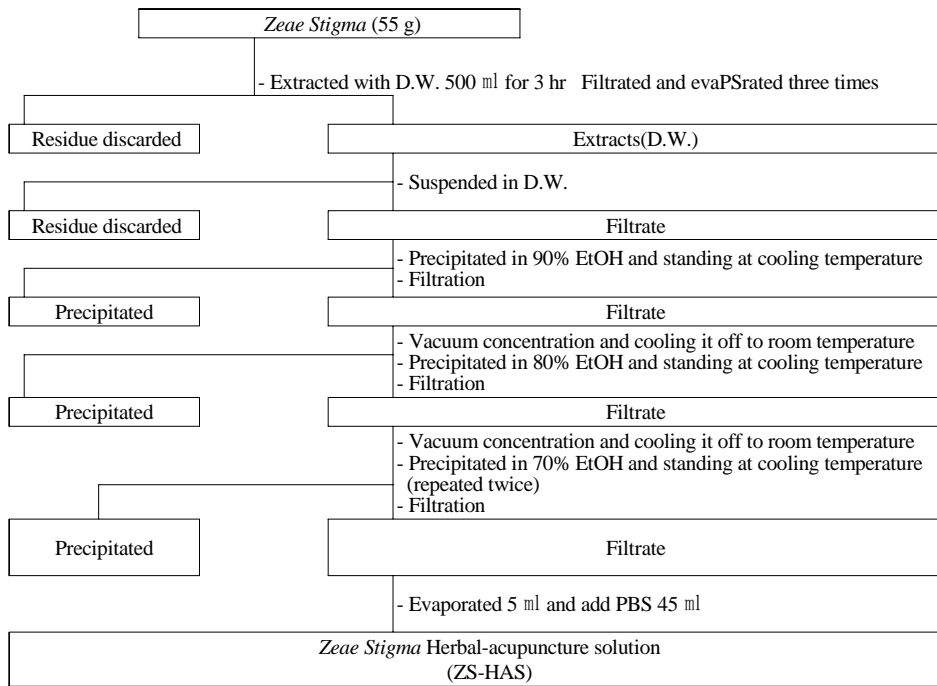
본 실험에 사용된 옥미수(*Zea Stigma*, ZS)는 대전대학교 한방병원에서 구입하여 실온에서 보관되었으며, 사용하기 전 초음파 세척을 실시하였다.

#### 3) 시약

Phosphate buffer saline (Sigma, USA), HBSS (Sigma, USA), Lipopolysaccharide (Sigma, USA), gum-sucrose (Sigma, USA), absolute EtOH (Sigma, USA), Antibiotics (Hyclone, USA), FBS (Hyclone, USA), BCA kit (BD, USA), TNF-alpha ELISA Kit (Oxford, USA), Creatinine assay kit (Bio Assay Systems, USA), CINC-1 ELISA Kit (ALPCO, USA), MPO ELISA Kit (Cellscience, USA)

#### 4) 기기

Rotary evaporator (Eyela, Japan), ELISA reader (TARAN, Canada), Sonicater (Fisher, U.S.A), Metabolic cage (B&P, Korea), Cytological centrifuge (Hanil, Korea), Micro centrifuge (Hanil, Korea)



Scheme 1. Manufacturing procedure of *Zeae Stigma* Herbal acupuncture Solution.

## 2. 방법

### 1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 옥미수 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 90% ethyl alcohol 30 ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 80% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 70% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 옥미수 55 g으로부터 얻은 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 날렸을 때 건조분말은 0.35 g이었다(수율 0.64%). 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) 신장염 동물 모델

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



Scheme 2. Experimental Procedure

### 3) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), N.P.군(needle prick, N.P.), saline군(Saline), 옥미수약침군(ZS-HA)의 5군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, N.P.군, saline군, ZS-HA군은 각각 2mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. N.P.군과 saline군, ZS-HA군은 LPS 투여 1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI10) 상응 부위에 NP(needle prick)자극, saline 주입, 옥미수 약침처치를 주3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- ① 정상군(Normal) : 아무 처치하지 않은 정상 SD rat군.
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2mg/kg으로 복강 투여한 군.
- ③ N.P.군(N.P.) : 실험 전 1주일간 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 26 gauge 주사기를 0.5 cm 정도 깊이로 자입한 후 즉시 제거하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.
- ④ Saline군(Saline) : 실험전 1주일간 saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.
- ⑤ 옥미수약침군(ZS-HA) : 실험전 1주일간 10%의 옥미수 약침액 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI10) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2mg/kg을 복강에 투여한 군.

### 4) 신장염 평가

#### (1) 혈액 분석

LPS 처리 1시간 뒤, 각 동물에서 4 ml의 혈액을 채취하였다. (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 RBC, WBC, Neutrophils의 비율을 측정하였으며, 혈청 TNF- $\alpha$ , CINC-1, creatinine의 농도를 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

#### (2) 소변 분석

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

### (3) 신장 내 염증활성 평가

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

### 5) 통계분석

본 실험에서 얻은 결과값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 PASW statistics 18 (SPSS 18.0)을 이용하였다. Fig. 2와 Fig. 3에서는 t-test를 이용하여 LPS 처리군과 비처리군의 평균을 비교하였다. 그 외에는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 사용하여 군간 비교를 하였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95% 이상일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 성적

### 1. LPS투여 따른 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화

#### 1) Serum TNF- $\alpha$

Rat에 LPS를 복강투여를 실시하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 serum TNF- $\alpha$ 의 농도를 관찰하였다. LPS 투여 1시간 후에 serum

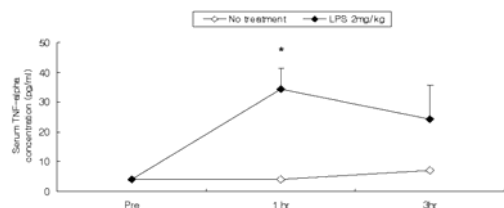


Fig. 1. Effect of LPS on serum TNF- $\alpha$  level in SD rats.

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

\* : p<0.05, □compared to no-treatment group by t-test

TNF- $\alpha$ 의 농도가 크게 증가하여 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 높았으며, LPS 투여 3시간 후에는 1시간 후에 비하여 serum TNF- $\alpha$ 가 감소하여 no-treatment군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig 1).

2) Renal TNF- $\alpha$

Rat에 LPS를 복강투여하여 신장염을 유도하고, 1시간 후와 3시간 후에 각각 신장을 적출하여 renal TNF- $\alpha$ 의 농도를 관찰하였다. LPS 복강투여 1시간 후에 renal TNF- $\alpha$ 의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 차이를 보이지 않았으며, LPS 투여 3시간 후 renal TNF- $\alpha$ 의 농도는 LPS를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 증가하였다 (Fig. 2).

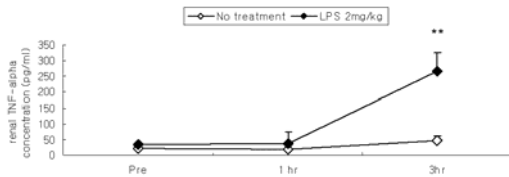


Fig. 2. Effect of LPS on renal TNF- $\alpha$  level in SD rats.

The male SD rats were injected intra-peritoneally with LPS (2mg/kg). Rat kidney was removed at 1 hr or 3 hr 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 (2mg/kg) challenge

\*\* : p<0.001, compared to no-treatment group by t-test

2. 음곡에 시술한 옥미수 약침이 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. ZS-HA군은 normal군, LPS군, N.P.군에 비하여 혈중 RBC 수가 유의하게 높게 유지되었다(Fig. 3).

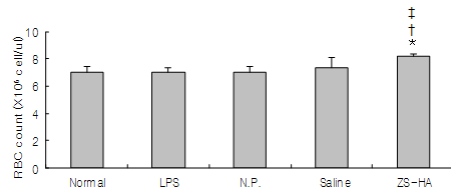


Fig. 3. Effects of ZS-HA on RBC count in blood of LPS-stimulated rats.

The male SD rats were treated as described in the materials and method and injected intra-peritoneally with LPS (2mg/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 (2mg/kg) challenge

N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at KI10

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 $\mu$ l/rat) injection at KI10

ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200 $\mu$ l/rat) at KI10

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

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

‡ : p<0.05 compared to N.P. group by ANOVA test

(2) WBC

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈중 WBC 수를 측정하였다. LPS군의 혈중 WBC는 normal군에 비하여 유의하게 증가하였다. N.P.군의 혈중 WBC는 LPS군에 비하여 유의하게 낮게 유지되었다. ZS-HA군은 LPS군에 비하여 혈중 WBC수가 낮게 유지되었지만 유의성은 나타

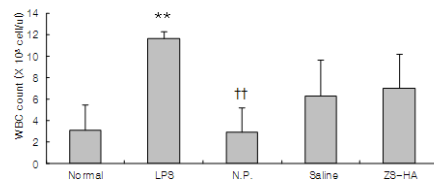


Fig. 4. Effect of ZS-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats.

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

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at KI10

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 $\mu$ l/rat) injection at KI10

ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200 $\mu$ l/rat) at KI10

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

†† : p<0.01 compared to LPS group by ANOVA test

나지 않았다(Fig. 4)

(3) Neutrophil

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고, 1시간 후에 rat의 혈액을 채취하여 WBC 중 neutrophil 비율을 측정하였다. normal군에 비하여 LPS군의 WBC 중 neutrophil 비율이 유의하게 증가하였다. ZS-HA군에서는 normal군, LPS군, N.P.군, saline군에 비하여 neutrophil 비율이 유의하게 낮게 유지되었다(Fig. 5).

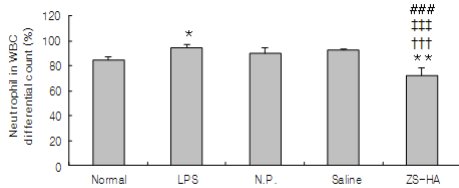


Fig. 5. Effect of ZS-HA on neutrophil count in blood of LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=5).  
 Normal : normal SD rat  
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge  
 N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at K110  
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200µl/rat) injection at K110  
 ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200µl/rat) at K110  
 \*\* : p<0.01 \* : p<0.05 compared to normal group by ANOVA test  
 ††† : p<0.001 compared to LPS group by ANOVA test  
 ‡‡‡ : p<0.001 compared to N.P. group by ANOVA test  
 ### : p<0.001 compared to saline group by ANOVA test

2) Blood chemistry

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

(1) Creatine

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 creatine 농도를 확인하였다. normal군에 비하여 모든 군의 creatine 농도가 유의하게 증가하였다. N.P.군과 ZS-HA군에서는 LPS군에 비하여 혈청 creatine 농도가 낮게 유지되었으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 6).

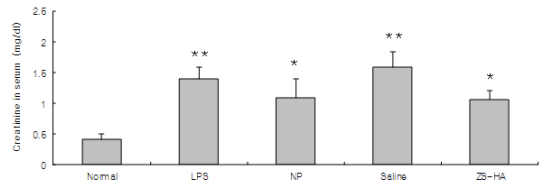


Fig. 6. Effects of ZS-HA on serum creatine level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=5).  
 Normal : normal SD rat  
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge  
 N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at K110  
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200µl/rat) injection at K110  
 ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200µl/rat) at K110  
 \*\* : p<0.01 \* : p<0.05 compared to normal group ANOVA test

(2) TNF-α

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 TNF-α 농도를 확인하였다. Normal군에 비하여 모든 군에서 혈청 TNF-α가 유의하게 증가하였다. Saline군과 ZS-HA군에서는 LPS군과 N.P.군에 비하여 혈청 TNF-α가 유의하게 낮게 유지되었다(Fig. 7).

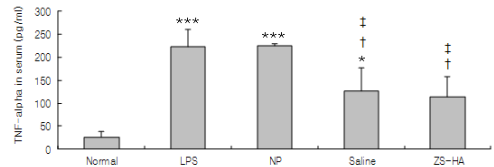
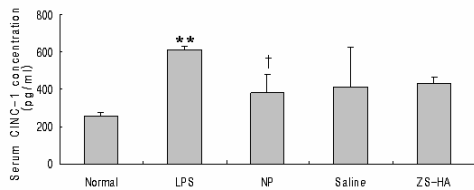


Fig. 7. Effects of ZS-HA on serum TNF-alpha level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean ± SD (n=5).  
 Normal : normal SD rat  
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge  
 N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at K110  
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200µl/rat) injection at K110  
 ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200µl/rat) at K110  
 \*\*\* : p<0.001 \* : p<0.05 compared to normal group by ANOVA test  
 † : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test  
 ‡ : p<0.05 compared to N.P. group by ANOVA test

(3) CINC-1 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 1시간 후에 rat의 혈청 CINC-1 농도를 확인하였다. LPS군에서는 normal군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. NP군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 유의하게 낮게 유지되었다. ZS-HA군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1 농도가 낮게 유지되었으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 8).

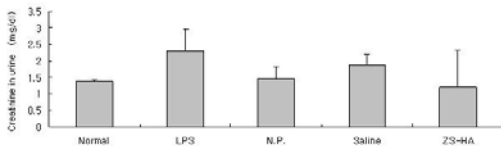


**Fig. 8.** Effects of ZS-HA on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats.

Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).  
 Normal : normal SD rat  
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge  
 N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at K110  
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 $\mu$ l/rat) injection at K110  
 ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200 $\mu$ l/rat) at K110  
 \*\* : p<0.01 compared to normal group by ANOVA test  
 † : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test

3) 소변 분석

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



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

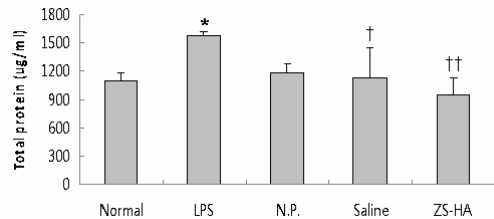
Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).  
 Normal : normal SD rat  
 LPS : LPS (2mg/kg) challenge  
 N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at K110  
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 $\mu$ l/rat) injection at K110  
 ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200 $\mu$ l/rat) at K110

(1) Creatinine

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 뇨중 creatinine 양을 측정하였다. LPS군의 뇨중 creatinine 농도는 normal군에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. ZS-HA군에서도 LPS군에 비하여 뇨중 creatinine 농도가 낮았지만 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 9).

(2) Total protein

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 12시간 동안 소변을 채취하여 뇨중 total protein 양을 측정하였다. LPS군에서는 normal군에 비하여 뇨중 total protein이 유의하게 증가하였다. Saline군과 ZS-HA군에서는 LPS군에 비하여 뇨중 total protein이 유의하게 낮게 유지되었다(Fig. 10).



**Fig. 10.** Effects of ZS-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  
 N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at K110  
 Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 $\mu$ l/rat) injection at K110  
 ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200 $\mu$ l/rat) at K110  
 \* : p<0.05 compared to normal group by ANOVA test  
 †† : p<0.01 † : p<0.05 compared to LPS group by ANOVA test

4) 신장 내 MPO(myeloperoxidase)활성

Rat에 LPS로 신장염을 유도하고 3시간 후에 신장을 적출하여 신장조직을 분획한 후 MPO의 농도를 측정하였다. Normal군에 비하여 모든 군에서 renal MPO가 현저하게 증가하였다. ZS-HA군의 renal MPO는 LPS군에 비하여 낮게 유지되었으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 11).

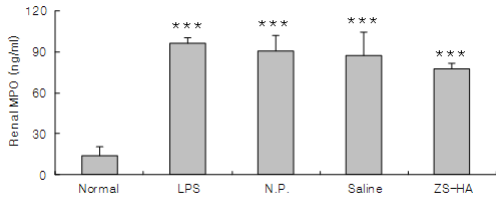


Fig. 11. Effects of ZS-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats.

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

Normal : normal SD rat

LPS : LPS (2mg/kg) challenge

N.P.: LPS (2mg/kg) challenge and a needle prick at KI10

Saline : LPS (2mg/kg) challenge and saline(200 $\mu$ l/rat) injection at KI10

ZS-HA : LPS (2mg/kg) challenge and ZS-HA(10%, 200 $\mu$ l/rat) at KI10

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

### 고찰

신장염은 감염에 의한 면역복합체나, 항체가 신장에 침착되어 발생한다. 전신적인 혈관의 염증성 질환 등도 신장염의 원인이 된다. 신장에 침착된 면역복합체나 세균에 대한 항체는 자가조직을 손상시키는 면역시스템을 활성화시켜 신장염이 촉발된다. 신장염은 신장의 막구조를 손상시켜, 혈뇨, 단백뇨 등을 유발하고, 여과기능의 손상까지 진행되면, 폐뇨와 요독증이 발생한다<sup>4,6)</sup>.

LPS는 그람음성박테리아 세포막의 구성성분으로 면역세포를 자극하여 cytokine을 분비시키며 증가된 혈청내 proinflammatory cytokine은 LPS에 의한 신체손상을 매개한다. 신장의 경우 LPS는 신장의 혈행역학장애를 유발하며 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine을 분비시키고 IL-8, MCP-1 등의 chemokine을 분비하여 면역세포의 화학주성을 유발한다. 또 LPS는 메산지움 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며 메산지움 세포와 tubular epithelial cell에 Fas 발현을 증가시킴으로서 직간접적으로 신장 손상을 초래하며, 최근의 실험에서 신장독성으로 인한 사구체신염, 급성 신부전, 간질성신염, 신독성신염 등의 병태모델에 많이 사용되고 있다<sup>17-19)</sup>.

陰谷(KI10)은 足少陰腎經의 合水穴, 自性穴이

며 足少陰腎, 衝脈, 陰維脈의 交會穴로, 무릎안쪽 경골뒤 큰 근육 아래 작은 근육 위에 손으로 눌러 보면 脈動處로 屈膝取之한다. 祛濕通漚 滋腎清熱, 疎泄厥氣, 利導下焦, 補腎培元, 調經利水的 효능이 있어 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難등의 治療穴이 된다<sup>10)</sup>.

韓醫學에서는 骨과 骨髓를 五臟 중 腎臟에 배속시키는데 골수성 백혈구인 호중구의 급속한 증가를 보이는 급성신장염 치료에 腎經의 合水穴이고 補腎하는 효능과 調經利水하는 효능이 있는 陰谷을 選穴하였다.

옥미수 (Zae Stigma, ZS)는 禾本科(벼과 ; Gramineae)에 속한 一年生 草本인 옥수수 Zea mays L.의 花柱(수염)를 건조한 것이다. 性은 平甘淡 無毒하며 利尿退腫, 利膽退黃, 降血糖, 止血하는 효능이 있어 治腎炎水腫 할 수 있다<sup>11)</sup>.

현재 신장염의 서양의학적 치료는 대체로 면역억제제 투여를 기본으로 하며, 원인 질환에 따라 약제의 선정, 치료기간, 투여 방법이 다르다. 주로 스테로이드 제제, 사이클로스포린 및 면역글로블린 등을 사용하는데, 신장염에 고혈압이 동반되면 만성신부전으로의 진행이 빨라지므로 혈압을 철저히 관리해준다. 항고혈압제로는 앤지오텐신 전환효소 억제제(ACE inhibitor)나 앤지오텐신 수용체 차단제(angiotensin receptor blocker, ARB)가 일차적으로 선택되는데, 이러한 약제가 단백뇨를 줄이고 신기능 저하속도를 낮추는 데 효과적이다. 또한 부종이 동반된 경우에는 적당한 양의 이뇨제를 사용하여 조절한다<sup>5-9,20-22)</sup>. 특히 사이클로스포린의 경우 신독성을 지니고 있어 더욱 주의가 요한다. 약제의 처방시 크레아티닌 청소율(Creatinine clearance, ml/min)을 계산하여 복용량을 조절하는 것이 최근 추세이다<sup>20-22)</sup>.

현재 신장염 환자와 그 치료비는 동시에 급속도로 증가하고 있지만, 상기한 바와 같이 양방적인 치료는 대증적이면서 근본적이지 못한 한계를 분명히 가지고 있다. 또한 신장염이 있는 환자의 경우 모든 종류의 내복약 복용에 신중을 기해야 하는데 한약 또한 부적절한 처방과 과한 용량은 되려 해가 될 수도 있어서 한의사에 의한 정확한 처방이 필요하며 또한 경구투여하는 한약전탕액



외에도 다른 치료법을 연구해 볼 필요가 있다.

이에 저자는 급성신장염에 대한 치료에 있어서 1회 통상적으로 120cc내외로 하루 3회 처방되는 한약전탕액이 아닌 1회 시술시 1cc내외의 양으로 적절한 혈자리의 자극과 함께 시술되는 약침의 치료 효과가 더 효과적이면서도 부작용이 적을 것이라는 생각을 하였다.

그래서 저자는 음곡 옥미수 약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 옥미수 약침액을 시료로 흰쥐의 음곡 상응부위에 옥미수약침을 시술한 후 LPS로 급성신장염을 유발하고, 혈액 및 혈청 분석, 소변분석, 신장내 염증활성 분석 등을 시행하였다.

예비실험 결과, LPS 투여에 따른 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화는, 혈청에서는 LPS 투여 1시간 후에, 신장 조직에서는 LPS 투여 3시간 후에 정상군과 LPS투여군 간에 차이가 뚜렷하게 나타났다(Fig 1. 2). 따라서 본 실험에서 혈청 검사는 LPS 투여 1시간 후에, 신장조직내 검사는 LPS 투여 3시간 후에 시행하였다.

적혈구는 혈액의 구성성분으로 골수에서 유래하여 구형이나 타원형을 띠는 조직으로서 핵이 없고 헤모글로빈을 포함한 구조로 이루어져 있어 자신이 소모하는 산소가 거의 없이 최대한의 산소를 운반하고 노폐물인 이산화탄소를 다시 폐로 운반하는 운반체 역할을 수행한다. 즉 염증발생시 발생하는 노폐물을 염증조직 외로 이동시키며 손상된 조직에 산소를 공급해 주는 역할을 하므로 염증발생시 증가해야만 조직이 빠르게 재생할 수 있다<sup>23)</sup>.

본 실험에서는 음곡 옥미수 약침을 시술한 쥐의 경우 LPS군에 비해 RBC의 수가 유의하게 높은 수준으로 유지되었다(Fig. 3).

백혈구는 골수에서 유래하고 호중구, 호산구, 호염구, 림프구, 단핵구 등으로 구성되며 염증이 발생하면 혈관의 내피 사이를 빠져나가 혈관 밖으로 유주하고 화학주성에 의해 항원과 이물에 이동하여 각각의 기능을 수행하여 염증반응을 유발한다<sup>20)</sup>. 본 실험에서 혈중 WBC는 음곡 옥미수 약침군에서 LPS군에 비해 낮은 수준이었으나 유의성은 없었고 NP군의 경우 LPS군에 비해 유의

하게 그 수가 낮게 유지되었다(Fig. 4).

호중구는 과립구의 한 형태로서 면역작용을 하는 백혈구중 가장 숫자가 많으며(65~70%) 가장 빠르고 극렬한 면역반응을 일으키며 세포의 수명도 짧은 편이다. 즉 염증이 발생할 경우 급하게 증가하게 되는데 장기적으로 호중구의 비중이 높다는 것은 몸에 염증반응이 상존하고 있다는 반증이므로 전체 혈액에서의 호중구 비율 증가가 장기적이면 바람직하지 않고 염증의 발생이 적으면 그 비중이 줄어들게 되는데<sup>23)</sup> 본 실험에서는 LPS로 염증을 유발한 흰쥐 군에 비해 음곡 옥미수 약침을 시술한 흰쥐군의 경우 호중구의 비율이 유의한 수준으로 낮게 유지되었다(Fig. 5).

위의 3가지 혈액분석 결과를 놓고 볼때 음곡의 옥미수 약침은 손상조직에 산소를 공급해줄수 있는 RBC를 유의한 수준으로 높게 유지하였고, 염증이 급속도로 증가하는 호중구의 경우 유의하게 낮은 수준으로 유지한 것으로 염증 억제효과가 있다고 볼 수 있다.

Creatine은 아르기닌, 글리신, 메티오닌의 아미노산 복합체로서 척추동물에서 발견되는데 에너지 소모가 많은 근육 세포, 뇌 세포의 에너지 대사에 있어 중요한 역할을 한다. 크레아틴은 주로 간이나 신장에서 합성되어 혈류를 통해 에너지 요구가 높은 뇌와 근육으로 전달되어 인산과 결합하여 크레아틴인산으로 존재하다가 에너지 수요가 높은 경우에 ADP (adenosine diphosphate)를 모든 생물체의 기본적인 에너지원 형태인 ATP (adenosine triphosphate)로 변환시킨다. 근육 에너지 대사에서의 이러한 특성으로 인해 운동수행능력 증진을 위한 보충제로도 사용되고 있다. 무산소 상태 하에서 그 비중이 급격히 증가하는 경향을 보인다. 그리고 최종적으로 염기성물질인 크레아티닌으로 대사되어 소변으로 배설된다. 크레아티닌이 신장의 배설능력을 측정하는 지표로 자주 쓰이며 혈중 크레아틴은 그 전구물질이다. 즉 크레아틴은 염증으로 조직의 산소 소모가 많아진 상황에서 몸이 적응하기 위한 반응으로 간과 신장에서 합성되어 혈중농도가 증가하는 경향을 보인다<sup>24)</sup>. 본 실험에서는 NP군과 음곡 옥미수 약침군의 경우 LPS군에 비해 혈중 creatine농도가

낮게 유지되었으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

TNF- $\alpha$ 는 그람-음성 박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 급성염증반응에 의해 활성화된 림프구에 의해서 생산되며, 내피세포와 대식세포를 자극하여 백혈구의 주화성과 보충을 유도하는 케모카인을 분비토록하며, 혈액 단핵구와 T 림프구, 호중구, 혈관내피세포, 피부섬유아세포 등의 세포에서 IL-8 유전자 발현을 유도한다. TNF- $\alpha$ 로 유도된 chemokine인 IL-8은 염증세포들을 활성화하고 그들을 염증부위로 유인하는 화학유인인자(chemotatic factor, chemokines)의 작용을 하는데, CINC-1은 IL-8 family의 일원이다<sup>25-26</sup>.

본 실험에서 TNF- $\alpha$ 의 혈중 농도는 LPS군에 비해 음극 옥미수 약침군에서 유의하게 낮게 유지되었으며 saline군에서도 LPS군에 비해 유의하게 낮게 유지되었다(Fig. 7), CINC-1의 혈중농도는 NP군의 경우 LPS군에 비해 유의하게 낮게 유지되었고 음극 옥미수 약침군에서도 낮게 유지되었으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

즉, 본 실험에서 LPS에 의해 증가한 혈중 creatine, TNF- $\alpha$ , CINC-1이 음극 옥미수 약침에 의해 증가치 아니한 것은 음극 옥미수 약침이 LPS로 유도된 신장염 병태모델에서 염증을 억제하고 신장의 기능을 보호하는데 일조한 것으로 추정되지만 유의성이 분명하지 않았으며, 추후 용량 및 개체수의 변화를 줘서 재차 확인할 필요가 있어 보인다. 또한 TNF- $\alpha$ 의 경우 saline군에서도 LPS군에 비해 유의하게 감소하였고 CINC-1의 경우 NP군에서 LPS군에 비해 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 혈자리에 대한 침자극과 수액주입이 염증 억제에 영향을 줄 수 있다는 것을 나타낸다. 이 또한 향후 더 정확한 취혈과 수액용량 조절, 그리고 대상 개체 수에 변화를 줘서 다시 확인해볼 필요가 있어 보인다.

신장은 전해질과 수분을 조절하여 순환혈액량을 유지하고 혈압을 조절하며, 암모니아 대사산물인 요소와 기타 독성물질을 소변으로 배출하는데, 정상신장에서 적혈구와 단백질은 신원(nephron)을 통하여 여과되지 않는다. 그러나 사구체가 파괴되거나 투과성이 증가되면 단백질이 소변으로 나오게 된다<sup>1)</sup>. 본 실험에서는 흰쥐의 소변을 채취하여

요중 creatinine 및 total protein을 측정하였다. 뇨중 creatinine과 total protein 모두 LPS 투여에 의해 증가하고 음극 옥미수 약침시술군에서는 증가하지 않는 경향을 나타내었다.

요중 creatinine의 경우 유의성 있는 수준은 아니지만 농도가 감소하였고(Fig. 9), total protein의 경우는 음극 옥미수 약침군에서 LPS염증 유발 흰쥐군에 비해 유의성 있게 수치가 낮아진 모습을 보였고 saline군에서도 LPS군에 비해 단백질 수치가 유의성 있게 낮았다(Fig. 10). 즉, total protein은 유의하게 낮았으므로 옥미수약침이 염증억제 작용과 신장여과조직 보호효과가 있다고 추정할 수 있고, 수액치료도 일정 정도 효과가 있을 수 있다고 추정된다. 따라서 추후 더 자세한 연구가 필요해 보인다.

MPO는 호중구가 탐식한 세균에 대하여 free radical을 생산하여 살균작용을 보여 선천성 면역 방어기전에 관여하지만, 적혈구를 용해시키고 세포막의 지질과 단백질을 변성시키는 작용을 통해 조직을 손상시킬 수 있으며 주로 사구체신염 등에서 고빈도를 보여 염증의 지표로도 사용된다<sup>27)</sup>. 본 실험에서는 신장 실질내 염증활성도를 측정하기 위해 MPO의 농도를 측정한 결과 음극 옥미수 약침에 의해 MPO 농도는 낮게 측정되었으나 유의성은 없었다(Fig 11). 그러나 MPO감소폭이 다른 군에 비해 더 컸으므로 약침의 농도와 용량을 조절하여 심화연구할 필요가 있겠다.

이상의 결과를 요약하면, 음극 옥미수 약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 대하여 혈구분석 결과 혈액내 적혈구를 유의하게 높게 유지하여 노폐물운반과 산소의 공급을 원활하게 하였으며 호중구의 증가를 유의하게 억제하였다. 또한 기타 혈액수치분석결과 TNF- $\alpha$ 의 증가를 유의하게 억제시켰다. 즉 inflammatory cytokine을 억제하는 효과가 있다고 할 수 있다. 또한 소변분석상 소변내 total protein농도 증가를 유의하게 억제하였다.

또한, saline군에서 LPS군에 비해 혈청내 TNF- $\alpha$  농도 증가의 유의한 억제, 총단백량 증가의 유의한 억제를 유발한 것과, NP군에서도 LPS군에 비해 혈청내 WBC, CINC-1 증가의 유의한 억제를 도출한 것은, 옥미수의 약리적 작용뿐만 아니라

음곡의 경혈 특이성도 작용한 것으로 생각된다.

따라서 음곡에 대한 옥미수약침은 신장염의 억제와 신장 보호에 효과가 있을 것으로 생각되며 NP군과 Saline군에서도 일부 효과가 분명하게 나타난 것으로 보아 향후 이에 대한 지속적 연구와 추가임상실험이 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

음곡(KI10)에 시술한 옥미수 약침이 LPS로 유도된 신장염 흰쥐에 미치는 영향을 알아보기로, 흰쥐의 음곡 상응 부위에 단순 침자극, 생리식염수 주입, 옥미수 약침 시술을 시행한 후 LPS를 투여하여 급성신장염을 유발하고 혈액 분석, 소변분석, 신장 내 염증 활성 분석 등을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 음곡 옥미수약침시술에 의해 혈중 RBC 수가 대조군에 비해 유의하게 높게 유지되었고, 혈중 neutrophil 비율, 혈중 TNF- $\alpha$ , 요중 total protein이 유의하게 낮은 수준으로 유지되었다.
2. 음곡 단순 침자극에 의해 혈중 WBC와 CINC-1이 대조군에 비해 유의하게 낮게 유지되었다.
3. 음곡 생리식염수 주입에 의해 혈중 TNF- $\alpha$ 와 요중 total protein이 대조군에 비해 유의하게 낮게 유지되었다.

## 참고문헌

1. Du HK. Oriental Kidney System Internal Medicine. Seoul : Oriental Science Research Association. 1993 : 226, 228, 247, 238-47, 326, 334-6.
2. Lee WJ. Medical Dictionary. The 2<sup>nd</sup> Edition. Seoul:Academy Press. 2000: 724.
3. J. CLAUDE bennett, FRED PLUM. Cecil textbook of medicine. 20th. philadelphia : saunders. 1996 : 552, 575-7.
4. Frequent 22 Disease Classification Payroll Status. 2004-2011. Available at: URL:[http://stat.kosis.kr/nsieu/view/tree.do?task=branchView&id=350\\_35001\\_6\\*MT\\_O](http://stat.kosis.kr/nsieu/view/tree.do?task=branchView&id=350_35001_6*MT_O)

5. Acute Glomerulonephritis. 2005. Available at: URL: <http://www.amc.seoul.kr/dept/bbs/view.do?dtCode=D022&dtType=F&menuId=5897&id=62466>. Accessed October 2, 2012.
6. Seo SJ. Diagnosis and Management of the Renal Diseases - Treatment of Glomerulonephritis . The Korean Journal of Medicine. 1962;5(2):81-5.
7. Hong SK. Diagnosis and Management of the Renal Diseases - Theoretical Analysis of Plasma Clearance Concept . The Korean Journal of Medicine. 1962;5(2): 75-8.
8. Kim YI. Symposium : Management of the Idiopathic Nephrotic Syndrome in Adults . The Korean Journal of Medicine. 1978;21(10):811-9.
9. Lee BY. Diagnosis and Management of the Renal Diseases : Nephrotic Syndrome. The Korean Journal of Medicine. 1962;5(3):141-4.
10. Meridians & Acupoints Compilation Committee of Korean Oriental Medical Colleges. Details of Meridians & Acupoints ; A Guidebook for College Students. Daejeon:Jongryeonamu Publishing Co. 2012:634-6.
11. Committee of Korean Textbook Publisher. Herbology. Seoul: Yeong Lim Sa. 2004: 353-4.
12. Yoon HJ. The Glucoregulstory Effects of MAYDIS STIGMATA in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. The Journal of Jeahan Oriental Medical Academy. 1995; 1(1): 178-87.
13. Cho JH. Effect of *Zea Stigma* on Renal injury induced by Gentamicin Sulfate in rats. J. of Herbology. 1994; 9(1): 143-57.
14. 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): 127-143.
15. 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 Society. 2012;29(3): 41-53.
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): 61-77.
  17. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock Pathogenesis. Lancet. 1991;338: 732-6.
  18. Ohmori Y, Hamilton TA. Amacrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. Biochem Biophys Res Commun. 1990; 168: 1261-7.
  19. Tannenbaum CS, Koemer TJ, Jansen MM, Hamilton TA. Characteriation of Lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression. J immunol. 1988; 140 : 3640-5.
  20. Jung HJ, Lim CG, Go GS, Ahn JH, Lee TW, Kim MJ, et al. Effects of Angiotensin - Converting Enzyme Inhibition ( ACEi ) in Serum HBsAg ( + ) Glomerulonephritis ( GN ), The Korean Journal of Medicine. 1994; 46(6): 817-825
  21. No JU. Therapeutic Guidelines of Rapidly progressive Glomerulonephritis, IgA Nephropathy, Membranoproliferative Glomerulonephritis. The Korean Journal of Nephrology. 2001; 20(suppl 3): 354-369
  22. Lee KW. Blood pressure control in chronic kidney disease. 7. Available at: URL: <http://www.medicofonews.com/news/bbs.html?bcode=imsang>. Accessed October 2, 2012
  23. Kang MS, Kim HR, Kim SK. Physiology. Seoul: Korea national Open University Press. 2003: 72-76, 97-108.
  24. Kim JH, Yang KS. Effects of Polygonatum odoratum on Mercuric Chloride Induced Renal Failure Rats. Natutal Product Sciences. 2002; 33(3): 200-206.
  25. Nakagawa H, Komori N, Shibata F, Ikesue A, Konishi K, Fujioka M, et al. Identification of cytokineinduced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2 alpha and CINC-2 beta, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. Biochem. J. 1994 ; 301: 545 - 50.
  26. Taie S, Chujo K, Asaga T, Iwanaga Y, Ono J, Maekawa N. Urinary trypsin inhibitor reduces inflammatory response in kidney induced by lipopolysaccharide. Ueki J Biosci Bioeng. 2007 ; 104(4) : 315-20.
  27. Lee KN, Kwon OH. Clinical Pathology File. Seoul: Medical Culture Press. 2003: 95-8, 102-5, 1437.