

음곡에 시술한 석위약침이 Lipopolysaccharide로 유도된 흰쥐의 신장염에 미치는 영향

장승훈, 김재홍, 임윤경*

대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실



[Abstract]

The Effect of *Pyrrrosiae Herba* Herbal-acupuncture at KI₁₀ on Lipopolysaccharide Induced Nephritis in Rats

Seung Hoon Jang, Jea Hong Kim and Yun Kyoung Yim*

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

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effects of *Pyrrrosiae Herba* herbal-acupuncture(PH-HA) at KI₁₀(*Umgok*) on nephritis induced by lipopolysaccharide(LPS) in rats.

Methods : Rats were assigned to four groups: normal, LPS, saline and PH-HA. Rats in the saline and PH-HA groups were treated with saline injection and PH-HA respectively at KI₁₀, three times over the period of one week. All animals, except those in the normal group, were injected intra-peritoneally with LPS to induce nephritis. WBC, in blood, tumor necrosis factor alpha(TNF- α), cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1(CINC-1), blood urea nitrogen(BUN), creatinine in serum, urinal volume, total protein creatinine in urine, and renal myeloperoxidase (MPO) were analyzed.

Results : 1. PH-HA group showed significantly reduced levels of serum BUN, serum creatinine, TNF- α , and CINC-1 compared to the LPS group. Furthermore, a significant increase in urine output and more significant decreases in total protein in urine and MPO in renal tissue were observed in the PH-HA group when compared to the LPS group.

2. The PH-HA group showed significantly reduced levels of serum creatinine and renal MPO, and a more significant increase in urine output compared to the saline group.

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

Key words :

Pyrrrosiae Herba;
Herbal-acupuncture;
KI₁₀;
LPS;
Nephritis

Received : 2015. 06. 01.
 Revised : 2015. 08. 24.
 Accepted : 2015. 08. 25.
 On-line : 2015. 09. 20.

* Corresponding author : Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62, Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, 34520, Republic of Korea
 Tel : +82-42-280-2610 E-mail : docwindy@dju.kr

I. 서 론

신장의 활동은 내분비 기능, 혈압조절, 사구체 사이의 혈류 역학, 용질과 수분 전달, 산염기 평형, 약물의 대사물 제거 등 정교한 기능에 의해 모두 이루어진다. 신장은 단위의 구조가 정교한 만큼 질병에는 취약하다¹⁾.

신장염(nephritis)은 사구체, 세뇨관, 신간질조직의 증식과 염증을 유발하는 면역 기전에 의한 신장질환으로 고혈압, 부종, 신기능 감소 등의 임상 소견을 보이는 질환이다²⁾. 급성 신장염은 체액성 면역에 근거하는 III형 알레르기라고 사료된다. 즉 면역복합체(immune complex)나 세균에 대한 항체는 면역시스템을 활성화시키고 신장을 손상시켜, 혈뇨, 단백뇨 등을 유발하고, 여과기능의 손상까지 진행되면, 핏뇨와 요독증 등이 발생한다³⁾.

국민건강보험공단 질병소분류별 3단 상병 급여현황을 비교해보았을 때 신장질환에 지급된 진료비가 2011년에 비해 2013년에 15 % 가량 증가하였다. 이러한 증가 추세의 신장염에 대하여 서양 의학적인 치료는 사구체 염증의 자연 관해가 일어날 때까지 항생제와 대증 요법으로 감염을 억제하는 것에 초점을 맞추나, 항생제에 대한 내성이 생기는 등 대중적이면서 근본적이지 못한 한계를 분명히 가지고 있다. 최근 사구체신염의 병인에 대한 새로운 사실들이 밝혀지면서 그 과정을 차단하거나 경감시키는 근본 치료가 기대되고 있다. 그러나 아직은 기본적인 ACE 억제제/ARB 제제의 투여와 함께 비특이적인 면역억제요법이 시행되고 있는데, 스테로이드 제제를 근간으로 세포독성 약제들이나 사이클로스포린, mycophenolate mofetil, rituximab 투여 또는 혈장 대체요법 등이 그 주된 내용이다. 이러한 면역억제요법은 한편으로 심각한 부작용이 뒤따른다⁴⁾. 이러한 부작용이 있기에 저자는 신장염 치료에 대한 서양의학 적 치료나 다른 한의학 적 치료를 보완하기 위해 석위약침을 통한 한의학 적 치료를 연구해보았다.

음곡(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴이며 足少陰經·衝脈·陰維脈의 交會穴로서, 補腎培元, 調經利水하여 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難 등을 치료하는 데 이용된다⁵⁾.

석위(*Pyrrrosia Folium*, 이하 PF)는 고란초과에 속한 다년생 초본인 석위 *Pyrrrosia lingua*(Thunberg) Farewell 또는 기타 동속 식물의 葉으로, 性은 微寒하고 味는 甘苦하다. 歸經은 肺·膀胱經이며 利尿通淋, 清肺化痰하는 효능이 있어 淋證 중에서도 熱에 속하는 者에게 더욱 좋고, 肺熱咳嗽에 사용하기도 한다⁶⁾.

이에 저자는 석위의 利尿通淋의 효능이 신장염에 효과가 있을 것으로 사료되어 lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 신장

염 병태모델 흰쥐의 음곡 상응 부위에 석위약침을 시술하고 혈액과 소변, 신장 내 염증 활성평가, 조직학적 분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 6 주령의 웅성 SD rat(180±10 g)을 (주)대한바 이오링크(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 석위(*Pyrrrosiae Herba*, PH)는 대전대학교 한방병원에서 구입하여 실온에서 보관하였으며, 사용 전 초음파 세척을 하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 연구에 사용된 시약은 Table 1과 같다.

(2) 기기

본 연구에 사용된 기기는 Table 2와 같다.

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 석위 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

Table 1. Reagents

Reagent	Manufacturer	Country
Phosphate buffer saline(PBS)		
Hanks' balanced salt solution(HBBS)		
Lipopolysaccharide(LPS)	Sigma	
gum-sucrose		
absolute ethanol		
Antibiotics		
Fetal bovine serum(FBS)	Hyclone	
Bicinchoninic Acid(BCA) kit	Becton, Dickinson and Company(BD)	USA
Tumor necrosis factor alpha(TNF- α)		
Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit	Oxford	
Creatinine assay kit	Bio Assay Systems	
Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1(CINC-1) ELISA Kit	ALPCO	
Myeloperoxidase(MPO) ELISA Kit	Cellscience	
Ethyl ether		

Table 2. Instruments

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

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. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 석위 55 g에서 얻은 약침액을 감압농축하였을 때 건조분말은 1.311 g이었다(수율 2.38 %). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering을 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 2.5 %로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Fig. 1).

2) 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 5 마리를 sacrifice하여 신장을 적출하였다. 각 실험군의 나머지 3마리로부터 LPS 투여 후 12시간 동안 소변 sample을 채취하였다(Fig. 2).

3) 실험군 분류 및 처치

실험동물은 정상군(normal), LPS군(LPS), saline군(saline), 석위약침군(PH-HA)의 4군으로 나누었으며, 각 실험군에는 실험동물을 8마리씩 배정하였다. 정상군을 제외한 LPS군, saline군, 석위약침군은 각각 2 mg/kg의 LPS를 복강에 투여하였다. Saline군, 석위약침군은 LPS 투여 1주일 전에 좌우 교대로 음곡(KI₁₀) 상응부위에 saline 주입 또는 석위약침 처치를 주 3회 실시하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- ① 정상군(normal) : 아무 처치하지 않은 정상 SD rat
- ② LPS군(LPS) : 실험 당일 LPS를 2 mg/kg으로 복강 투여한 군
- ③ Saline군(saline) : 실험 전 1주일간 saline 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군
- ④ 석위약침군(PH-HA) : 실험전 1주일간 2.5 %의 석위약침액 0.2 ml를 주 3회 음곡(KI₁₀) 상응부위에 주입하고, 실험 당일 LPS 2 mg/kg을 복강에 투여한 군

4) 결과 분석

(1) 혈액 분석

LPS 처리 1시간 뒤 각 동물에서 혈액을 채취하여 (주)이원임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈중 WBC 수와 혈청 blood urea nitrogen(BUN)의 농도를 확인하였다. 혈청 TNF- α , cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1), creatinine의 농도는 ELISA kit를 이용하여 확인하였다.

(2) 소변 분석

Metabolic cage에서 12시간동안 소변을 채취하여, 배뇨량과 요중 total protein 및 creatinine 농도를 kit로 측정하였다.

(3) 신장 내 염증활성 평가

LPS 처리 3시간 후, ethyl ether로 rat를 마취하고 신장을 적출하였다. 적출된 신장조직은 0.010 % sodium azide

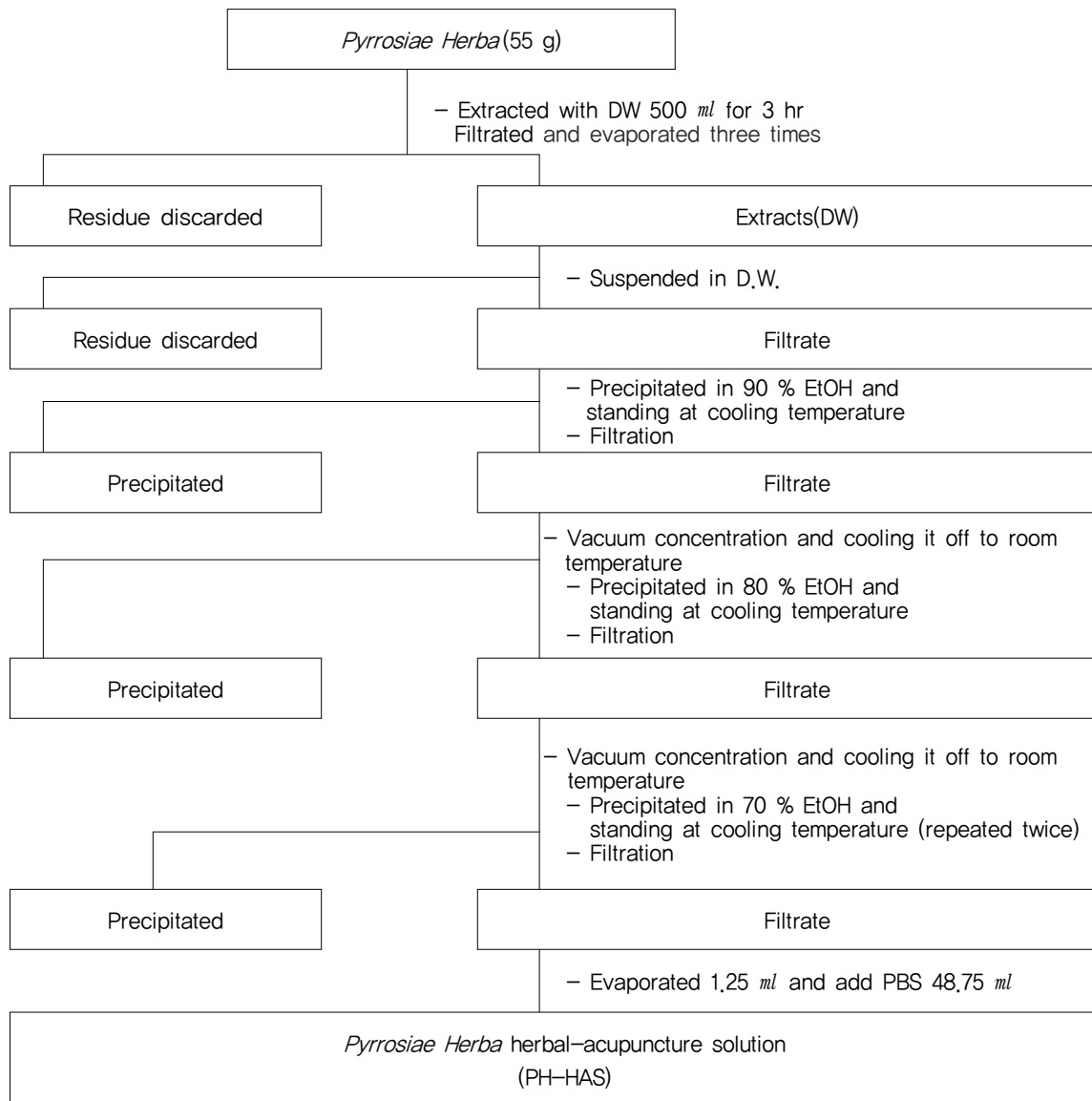


Fig. 1. Manufacturing procedure of *Pyrrrosiae Herba* herbal acupuncture solution

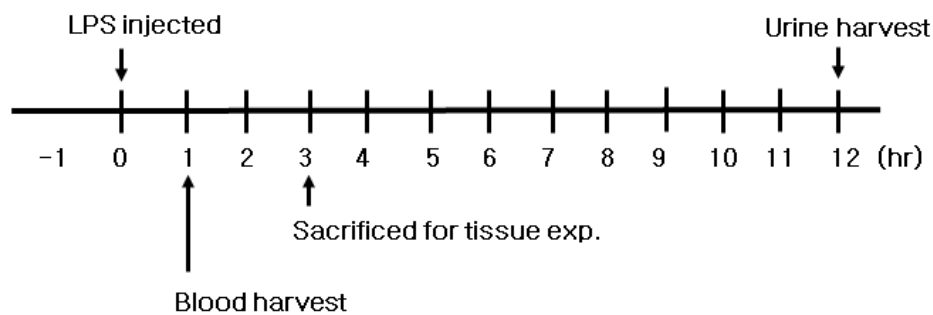


Fig. 2. Experimental procedure

가 첨가된 0.1 M phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 sonicate (Fisher, USA)하여 잘게 간 후, 2,000 ×g에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 supernatant는 -80℃에서 보관되었다가 ELISA kit을 이용하여 myeloperoxidase(MPO)의 농도를 측정하였다.

(4) 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(ver 18.0 KO)을 이용하였다. 결과값은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 군의 데이터는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석한 후 Mann Whitney U test로 군간 차이를 확인하였다. 신뢰도 95 % 이상(p<0.05)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 혈액 분석

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

(1) WBC in blood

LPS군의 혈중 WBC는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 석위약침군은 LPS군에 비하여 혈중 WBC가 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 3)

(2) Serum BUN

LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 증가하였다. Saline군 및 석위약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

(3) Serum creatinine

LPS군과 saline군은 정상군에 비하여 creatinine 농도가 유의하게 증가하였다. 석위약침군에서는 LPS군 및 saline군에 비하여 혈청 creatinine 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

(4) Serum TNF-α

LPS군, saline군, 석위약침군에서 정상군에 비하여 혈

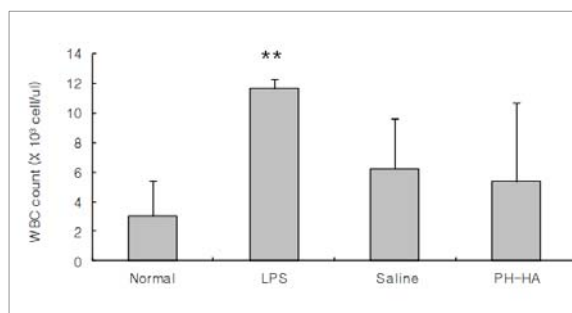


Fig. 3. Effect of PH-HA on WBC count in blood of LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean ± SD(n=5).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge,
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μl/rat) at Kl₁₀.
 **: p>0.01 compared to normal group by Kruskal-Wallis test.

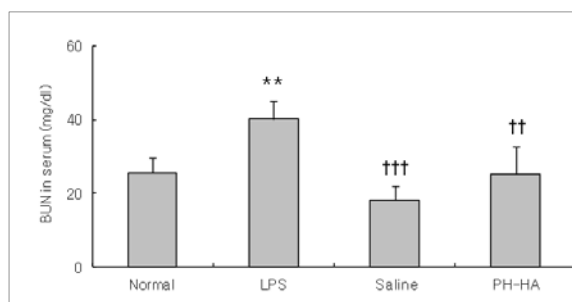


Fig. 4. Effects of PH-HA on serum BUN level in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean ± SD(n=5).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge,
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μl/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μl/rat) at Kl₁₀.
 **: p<0.01 compared to normal group by Kruskal-Wallis test.
 ††† : p<0.001 †† : p<0.01 compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

청 TNF-α가 유의하게 증가하였다. Saline군 및 석위약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 TNF-α가 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

(5) Serum CINC-1

LPS군에서는 정상군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 증가하였다. 석위약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 CINC-1이 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

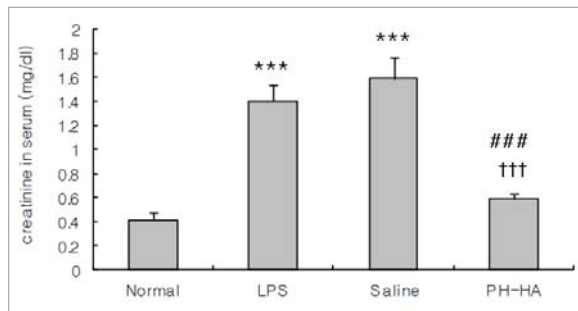


Fig. 5. Effects of PH-HA on serum creatinine level in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l/rat) at Kl₁₀.
 *** : $p < 0.001$ compared to normal group ANOVA test.
 ††† : $p < 0.001$, compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.
 ### : $p < 0.001$ compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

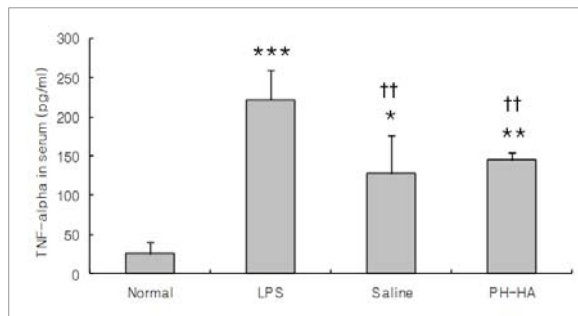


Fig. 6. Effects of PH-HA on serum TNF-alpha level in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l/rat) at Kl₁₀.
 *** : $p < 0.001$ ** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$ compared to normal group by Kruskal-Wallis test.
 †† : $p < 0.01$ compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

2. 소변 분석

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

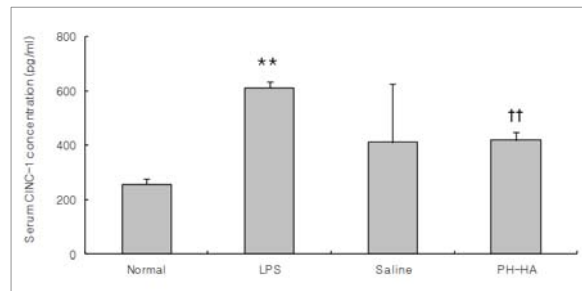


Fig. 7. Effects of PH-HA on serum CINC-1 level in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l/rat) at Kl₁₀.
 ** : $p < 0.01$ compared to normal group by Kruskal-Wallis test.
 †† : $p < 0.01$ compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

(1) 이뇨 활성

LPS군과 saline군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 유의하게 감소하였다. 석위약침군에서는 LPS군 및 saline군에 비하여 배뇨량이 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

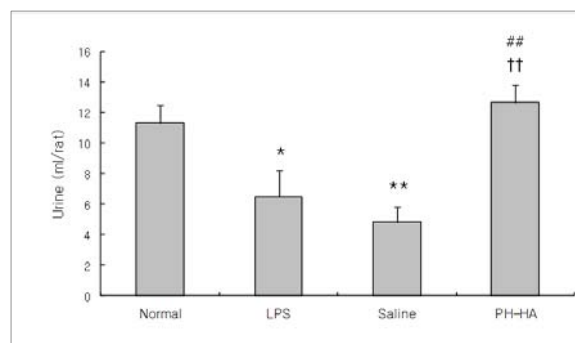


Fig. 8. Effect of PH-HA on urinary volume in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=3).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l/rat) at Kl₁₀.
 ** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$ compared to normal group by Kruskal-Wallis test
 †† : $p < 0.01$ compared to LPS group by Kruskal-Wallis test,
 ## : $p < 0.01$ compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

(2) Creatinine in urine

LPS군의 요중 creatinine 농도는 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 석위약침군에서는 LPS군에 비하여 요중 creatinine 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

(3) Total protein in urine

LPS군에서는 정상군에 비하여 요중 total protein이 유의하게 증가하였다. Saline군 및 석위약침군에서는 LPS군에 비하여 요중 total protein 양이 유의하게 감소하였다 (Fig. 10).

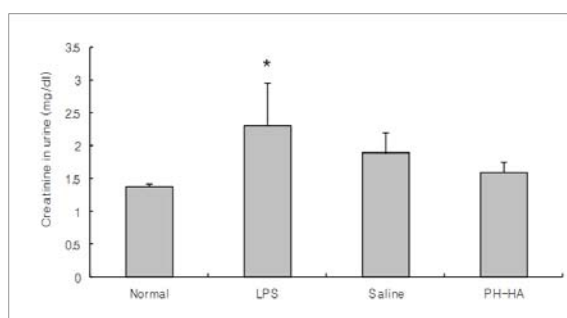


Fig. 9. Effects of PH-HA on urinary creatinine level in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=3).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l /rat) at Kl₁₀.
 * : $p < 0.05$ compared to normal group by Kruskal-Wallis test.

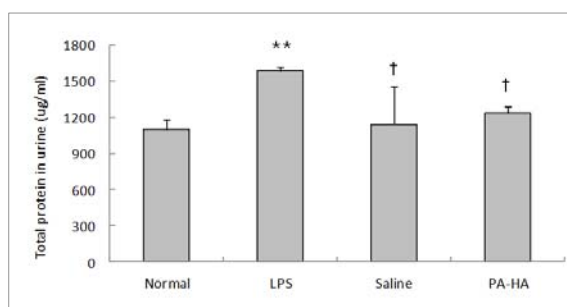


Fig. 10. Effects of PH-HA on total protein level in urine of LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=3).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge.
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l/rat) at Kl₁₀.
 ** : $p < 0.01$ compared to normal group by Kruskal-Wallis test.
 † : $p < 0.05$ compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.

3. 신장 내 염증활성

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

Renal MPO는 LPS군, saline군, 석위약침군에서 정상군에 비하여 renal MPO가 유의하게 증가하였다. 석위약침군의 renal MPO는 LPS군 및 saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

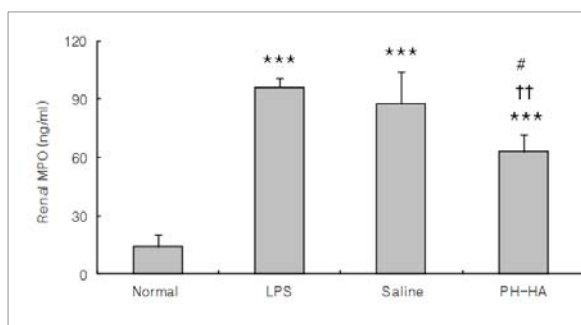


Fig. 11. Effects of PH-HA on renal MPO level in LPS-stimulated rats

Data were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : normal SD rat,
 LPS : LPS(2 mg/kg) challenge,
 Saline : LPS(2 mg/kg) challenge and saline(200 μ l/rat) injection at Kl₁₀.
 PH-HA : LPS(2 mg/kg) challenge and PH-HA(2.5 %, 200 μ l/rat) at Kl₁₀.
 *** : $p < 0.001$ compared to normal group by Kruskal-Wallis test.
 †† : $p < 0.01$ compared to LPS group by Kruskal-Wallis test.
 # : $p < 0.05$ compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

IV. 고 찰

馬蹄形의 복막 후 장기인 신장은 제11흉추와 제3요추 사이에 있는 좌우 한 쌍의 장기이다. 체위 혹은 호흡운동 등에 따라 위아래로 약 3 cm(혹4~5 cm)가량 이동이 가능한 까닭에, 와위에서는 제12흉추와 제2요추 사이에, 입위(立位)에서는 제1요추와 제4요추 사이에 위치하고, 무게는 평균 150 g(남성: 125~170 g, 여성: 115~155 g)이고, 길이는 종축 10~12 cm, 횡축 5~7.5 cm이며, 두께는 2.5~3 cm이다²⁾.

신장은 심박출량의 약 20 % 또는 분당 1,000 ml 의 혈류가 신장으로 들어간다¹⁾. 신장은 혈장, 즉 세포외액의 구성과 양을 조절하며 모든 세포막에서 이루어지는 물과 용질의 지속적인 교환을 통해 세포내액의 조성에도 영향을 주며, 요소, 크레아티닌 같은 질소 대사의 비회발성 부산물뿐

만 아니라 음식에 포함된 과잉의 물과 대사되지 않은 용질의 배출을 위한 기능을 수행한다. 이와 같이 다양한 물질의 교환을 위해서 신장은 얇은 막 구조로 형성되어 있는데, 이는 신장의 기능을 수행하는 데에 필수적이지만, 그 구조가 외부의 침입에 취약하여 독성 물질에 의한 손상 가능성이 높다²⁾.

급성 신장염은 체액성 면역에 근거하는 III형 알레르기라고 추측되며, 면역복합체(immune complex)가 보체를 활성화하여, 활성화된 보체는 비만세포나 호염기구에 작용해 히스타민 등 화학 전달 물질을 방출하여, 혈관 투과성 항진이나 평활근 수축을 촉진시켜, 결과적으로 면역 복합체는 조직에 매우 침착하기 쉬운 상태가 된다. 면역 복합체가 조직에 침착하면, 혈소판이 응집해 그 주위에 굳어지므로, 면역 복합체의 침착에 점점 유리하게 된다. 또 보체에는 호중구를 주화(chemotaxis)시키는 작용도 있으며, 달러운 호중구는 조직에 침착한 면역 복합체를 탐식하기 시작해, 스스로 가지고 있던 리소좀 효소를 뿌려 조직은 장애를 받게 된다. 그리고 허약해진 사구체의 수복기전으로 mesangium 세포나 혈관 내피세포 등의 세포 성분이 증식하고, 모세혈관의 투과성 항진이 뚜렷해지면, 단백질의 여과에도 문제가 생긴다³⁾.

염증반응은 조직의 손상에 면역세포의 국소적인 방어보호 회복반응이다. 세균, 바이러스 등 이물질을 인식한 면역세포가 활성화되어 cytokine을 분비하여 염증반응을 유발시킨다. Cytokine은 염증 및 면역 반응을 조절하고 세포증식과 분화에 관여하는 단백질 인자로서⁷⁾ 사구체신염의 발병과 진행에 매우 중요한 역할을 한다.

LPS는 그람음성박테리아 세포막의 구성성분으로 면역세포를 자극하여 cytokine을 분비시키며 증가된 혈청 내 proinflammatory cytokine은 LPS에 의한 신체손상을 매개한다. 신장의 경우 LPS는 신장의 혈행 역학 장애를 유발하며 IL-1, IL-6, TNF- α 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 증가시킴으로써 직간접적으로 신장 손상을 초래하여, 최근의 실험에서 신장 독성으로 인한 사구체 신염, 급성 신부전, 간질성 신염, 신독성 신염 등의 병태모델에 많이 사용되고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

한의학적으로 신장염은 尿不利, 尿濁, 淋病, 浮腫 등에 속하며, 대개 風寒濕의 外邪 침습 후 속발하는 병증으로 그 치료법은 대개 利尿通淋, 清熱利濕, 通利小便 등의 방법을 사용하므로²⁾ 본 연구에서는 利尿通淋하는 효능이 있는 석위를 사용하였다.

약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종으로, 수침요법, 혈위주사요법으로도 불린다. 약침요법은 치료 경혈 및 체표 반응점에 정제 추출한 약물을 주입하여 질병을 치료하는 방법으로, 자침과 약물의 효과를 동시에 얻고, 약물의 경구 투여가 불가능할 때 시술할 수 있는 장점이 있다¹¹⁾.

陰谷(KI₁₀)은 足少陰腎經의 合水穴, 自性穴이며 足少陰腎·衝脈·陰維脈의 交會穴로, 무릎 안쪽 경골 뒤 큰 근육 아래 작은 근육 위에 손으로 눌러보면 脈動處로 屈膝取之한다. 祛濕通復 滋腎清熱, 疎泄厥氣, 利導下焦, 補腎培元, 調經利水하는 효능이 있어 陽萎, 月經不調, 崩漏, 小便難 등의 治療穴이 된다¹²⁾. 韓醫學에서는 骨과 骨髓를 五臟 중 腎臟에 배속시키는데, 腎經의 合水穴이고 補腎하는 효능과 調經利水하는 효능이 있는 陰谷이 골수성 백혈구인 호중구의 급속한 증가를 보이는 신장염 치료에 유효할 것으로 사료되어 이穴을 선정하여 석위약침을 시술하였다.

한의학에서는 주로 清熱法으로 염증질환에 응용하여 왔고, 신장염에 대한 약침 관련 연구는 Kim et al¹³⁾, Kwak et al¹⁴⁾의 논문이 있으나 석위약침으로 신장염에 효과를 나타낸 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

석위는 고사리과(Polypodiaceae)에 속하는 상록 다엽년생 본초로서 우리나라 각지의 樹林이나 石上에서 자생하며 예로부터 매우 강한 利尿通淋, 消散結石 작용이 있어서 비뇨기계 각 부분의 감염, 출혈 등의 병증에 君藥 또는 補助藥으로 사용되어 왔다¹⁵⁾. 임상보고에 따르면 급성 및 만성 신염, 신우신염의 치료에도 이용되었는데, 급성 사구체신염 39례의 치료에 효과가 있었고, 신우신염 20례 중 17례에서 효과가 있었다고 하였다¹⁶⁾.

이러한 석위의 효능을 살펴본 저자는 음곡 석위약침이 신장염에 미치는 영향을 알아보고자 석위약침을 시료로 흰쥐의 음곡 상응부위에 석위약침을 시술한 후 LPS로 신장염을 유발하고, 혈액 및 혈청분석, 소변분석, 신장 내 염증활성 분석 등을 시행하였다.

선행 연구 보고¹³⁾를 근거로, 혈청 검사는 LPS 투여 1시간 후에, 신장조직 검사는 LPS 투여 3시간 후에 시행하였고, 소변은 LPS 투여 후 12시간 동안 채취하였다.

백혈구는 골수에서 유래하고 호중구, 호산구, 호염구, 림프구, 단핵구 등으로 구성되며 염증이 발생하면 혈관의 내피 사이를 빠져나가 혈관 밖으로 유주하고 화학주성에 의해 항원과 이물로 이동하여 각각의 기능을 수행하여 염증반응을 유발한다¹⁷⁾. 본 실험에서 혈중 WBC는 음곡 석위약침군에서 LPS군에 비해 낮은 수준이었으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

BUN은 혈중에 존재하는 요소 내 질소를 표현하는 것으로

로 신장질환과 관계가 깊은 질소대사 산물이다. 혈중 요소는 거의 모두가 사구체에서 여과되어 배설되지만, 그 일부는 세뇨관 및 유두부에서 수동적으로 재흡수 되어 혈류로 유입된다. 재흡수량은 생체 내 수분 양에 따라 규제를 받는데 사구체 여과치가 50 %이하로 떨어지면 혈중 요소가 기준 범위 이상으로 증가하여 혈중 creatinine의 증가와 더불어 증가한다¹⁸⁾. BUN 상승은 대부분 신장질환 또는 요도에 폐색이 있어 배설이 잘 안 되는 경우이다¹⁹⁾. 본 실험에서는 saline군 및 석위약침군에서는 LPS군에 비하여 혈청 BUN 농도가 유의하게 감소하였으므로(Fig. 4), 석위약침군은 요배설이 LPS군이나 saline군과 비교했을 때 원활함을 보여준다.

Creatine은 아르기닌, 글리신, 메티오닌의 아미노산 복합체로서 척추동물에서 발견되는데 에너지 소모가 많은 근육 세포, 뇌 세포의 에너지 대사에 중요한 역할을 한다. Creatinine은 주로 간이나 신장에서 합성되어 혈류를 통해 에너지 요구가 높은 뇌와 근육으로 전달되어 인산과 결합하여 크레아틴인산으로 존재하다가 에너지 수요가 높으면 adenosine disphosphate(ADP)를 모든 생물체의 기본적인 에너지원 형태인 adenosine triphosphate(ATP)로 변환시킨다. 근육 에너지 대사에서의 이러한 특성으로 인해 운동수행능력 증진을 위한 보충제로도 사용되고 있으며, 무산소 상태에서 그 비중이 급격히 증가하는 경향을 보인다. 그리고 최종적으로 염기성 물질인 크레아티닌으로 대사되어 소변으로 배설된다. 크레아티닌은 신장의 배설능력을 측정하는 지표로 자주 쓰이며 혈중 크레아티닌은 그 전구 물질이다. 즉 크레아틴은 염증으로 조직의 산소 소모가 많아진 상황에서 몸이 적응하기 위한 반응으로 간과 신장에서 합성되어 혈중농도가 증가하는 경향을 보인다²⁰⁾. 본 실험에서는 음곡 석위약침군이 LPS군에 비해 혈중 creatine 농도가 유의하게 낮게 유지되었다(Fig. 5). 염증 반응의 활성화를 나타내는 크레아틴 수치가 낮게 유지되었다는 것은, 석위약침이 신장염을 억제하는 작용을 하는 것으로 생각해볼 수 있다.

TNF- α 는 그람-음성 박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 급성 염증반응에 의해 활성화된 림프구에 의해서 생산되며, 내피세포와 대식세포를 자극하여 백혈구의 주화성과 보충을 유도하는 chemokine을 분비토록하며, 혈액 단백질과 T 림프구, 호중구, 혈관내피세포, 피부섬유아세포 등의 세포에서 IL-8 유전자 발현을 유도한다. TNF- α 로 유도된 chemokine인 IL-8은 염증세포들을 활성화하고 그들을 염증부위로 유인하는 화학유인인자(chemotactic factor, chemokines)의 작용을 하는데, CINC-1은 IL-8 family의 일원이다^{21,22)}.

본 실험에서 TNF- α 의 혈중 농도는 LPS군에 비해 음곡 석위약침군에서 유의하게 감소되었으며 saline군에서도 LPS군에 비해 유의하게 낮게 유지되었다(Fig. 4). CINC-1의 혈중 농도는 음곡 석위약침군에서도 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

즉, 본 실험에서 LPS에 의해 증가한 혈중 creatine, TNF- α , CINC-1이 음곡 석위약침군에서는 감소한 것은 음곡 석위약침이 LPS로 유도된 신장염 병태모델에서 염증을 억제하고 신장의 기능을 보호하는데 일조한 것으로 추정되었다. 또한 TNF- α 의 경우 saline군에서도 LPS군에 비해 유의하게 감소하였다. 이는 음곡에 대한 saline 주입이 염증 억제에 영향을 줄 수 있다는 것을 나타낸다.

이노 활성 부분을 살펴보았을 때, LPS군과 saline군에서는 정상군에 비하여 배뇨량이 유의하게 감소한 반면, 석위약침군에서는 LPS군 및 saline군에 비하여 배뇨량이 유의하게 증가하였다(Fig. 8). 이는 신장염의 주요 증상 중 하나인 핍뇨에 대해 석위약침이 효능이 있음을 보여주는 대목이다.

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 증가하면 단백질이 소변으로 나오게 된다¹⁾. 본 실험에서는 흰쥐의 소변을 채취하여 요 중 creatinine 및 total protein을 측정하였다. 요 중 creatinine과 total protein 모두 LPS 투여에 의해 증가하고 음곡 석위약침군에서는 증가하지 않는 경향을 나타내었다.

요 중 creatinine은 유의성 있는 수준은 아니지만 음곡 석위약침군에서 LPS군이나 saline군에 비하여 농도가 감소하였고(Fig. 9), total protein은 음곡 석위약침군과 saline군 모두에서 LPS군에 비해 유의성 있게 수치가 낮았다(Fig. 10). 즉, total protein은 유의하게 낮았으므로 음곡 석위약침이 신장여과조직에 보호효과가 있다고 추정할 수 있고, 음곡 saline 주입 치료도 어느 정도 효과가 있을 수 있다고 추정된다.

MPO는 호중구가 탐식한 세균에 대하여 free radical을 생산하여 살균작용으로 선천성 면역 방어기전에 관여하지만, 적혈구를 용해시키고 세포막의 지질과 단백질을 변성시키는 작용을 통해 조직을 손상시킬 수 있으며 주로 사구체 신염 등에서 고빈도를 보여 염증의 지표로도 사용된다²³⁾. 본 실험에서는 신장 실질 내 염증활성도 측정을 위해 MPO의 농도를 측정된 결과 음곡 석위약침에 의해 MPO 농도는 LPS군 및 saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 11). 사구체 신염에서 고빈도를 보이는 MPO 농도가

석위약침군에서 감소한 것은, 석위약침이 신장염을 완화시키는 작용을 하는 것을 알 수 있다.

이상의 결과를 요약하면, 음곡 석위약침은 LPS로 유도된 흰쥐의 신장염에 대하여 혈청 TNF- α 와 CINC-1 등, inflammatory cytokine을 유의하게 억제하였으며, 신장 내 MPO를 유의하게 감소시켰다. 또한 배뇨량을 유의하게 증가시키고, 혈청 BUN, 혈청 creatinine, 소변 내 total protein농도 증가를 유의하게 억제하였다. 따라서 음곡에 대한 석위약침은 신장염의 억제와 신장 보호에 효과가 있을 것으로 생각된다.

특히, 음곡 석위약침군에서 saline군에 비하여 혈청 creatinine, 신장 내 MPO가 유의하게 감소하고 배뇨량이 유의하게 증가한 것으로 보아 석위의 약리적 효능이 작용하였을 것으로 추정되며, 또한 saline군에서 LPS군에 비하여 혈청 BUN, 혈청 TNF- α , 뇨 중 total protein이 유의하게 감소한 것으로 보아 음곡 saline 주입도 어느 정도 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 결 론

음곡(KI₁₀)에 시술한 석위약침이 LPS로 유도된 신장염 흰쥐에 미치는 영향을 알아보고자, 흰쥐의 음곡 상응 부위에 석위약침을 시술하고, LPS를 투여하여 신장염을 유발한 후, 혈액학적 분석, 혈청분석, 소변분석, 신장 내 염증 활성 분석 등을 수행하여, LPS만 투여한 LPS군 및 식염수 주입 후 LPS를 투여한 saline군과 비교분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음곡 석위약침군에서 LPS군에 비하여 혈청 TNF- α , 혈청 CINC-1, 혈청 BUN, 혈청 creatinine, 뇨 중 total protein, renal MPO가 유의하게 감소하고, 배뇨량이 유의하게 증가하였다.
2. 음곡 석위약침군에서 saline군에 비하여 혈청 creatinine, renal MPO가 유의하게 감소하고, 배뇨량이 유의하게 증가하였다.

이상의 결과, 음곡(KI₁₀) 석위약침은 LPS로 유발한 흰쥐의 신장염 억제와 신장 기능 회복에 유효한 것으로 사료된다.

VI. References

1. Internal Medicine of Korea, Harrison's internal medicine, 17th ed, Seoul : MIP, 2010 : 2101-14.
2. Committee of Korean Renal Internal Medicine Textbook Publisher, Renal internal medicine, Seoul : Koonjachulpansa, 2011 : 30-59, 197.
3. Takahashi S. STEP internal medicine, Seoul : Hankook Medicine, 2011 : 99-114.
4. Iim CG. Treatment of primary glomerulonephritis, Korean J Med, 2013 ; 84(1) : 13-8.
5. Meridians & Acupoints Compilation Committee of Korean Oriental Medical Colleges. Details of meridians & acupoints: a guidebook for college students, Daejeon : Euibang Publishing Co, 2010 : 754-5.
6. Committee of Korean Textbook Publisher. Herbology, Seoul : Yeonglimsa, 2005 : 355-6.
7. Song GY, Ji JG, Ham EG. Essential pathology, Seoul : Koryu Medicine, 1998 : 69-75.
8. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner J-D, Cohen J. Septic shock: pathogenesis, The Lancet, 1991 ; 338(8769) : 732-6.
9. Ohmori Y, Hamilton TA. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. Biochem Biophys Res Commun, 1990 ; 168(3) : 1261-7.
10. Tannenbaum CS, Koemer TJ, Jansen MM, Hamilton TA. Characteriation of Lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression, J Immunol, 1988 ; 140(10) : 3640-5.
11. Committee of Korean Acupuncture, Journal of Pharmacopuncture, Pharmacopuncturology, Seoul : Elsevierkorea, 2008 : 3-8.
12. Meridians & Acupoints Compilation Committee of Korean Oriental Medical Colleges. Details of Meridians & Acupoints: A Guidebook for College Students, Daejeon : Euibang Publishing Co, 2010 : 754-5.
13. Kim YS, Yim YK. Anti-inflammatory effect of *Zeeae Stigma* herbal-acupuncture at KI₁₀ on LPS-induced nephritis in rats, J Korean Med, 2013 ; 34(3) : 25-36.

14. Kwak KI, Kang JH, Lee H. The effect of *Phaseoli Semen* herbal-acupuncture at KI₁₀ in lipopolysaccharide induced acute nephritis in rats. *The Acupuncture*. 2013 ; 30(3) : 61-73.
15. Kim JH. Illustrated natural drugs encyclopedia (color edition). Vol. 2, Seoul : Namsandang. 1984 : 292.
16. Kim CM, Shin MK, Ahn DK et al. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Seoul : Jungdam Publishing Co. 2004 : 2293.
17. Jung HJ, Lim CG, Go GS et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition(ACEi) in serum HBsAg(+) glomerulonephritis(GN), *Korean J Med*. 1994 ; 46(6) : 817-25.
18. Lee GY, Kwon HH. File of clinical pathology. 3th ed. Seoul : Publisher of Medical history. 2000 : 95-8, 102-5, 1436-9.
19. Lee SY, Kwon YS, Kwon HO, Song KS. Clinical laboratory. Seoul : Yonsei University Publish, 2000 : 234-7, 617-9.
20. Kim JH, Yang KS. Effects of polygonatum odoratum on mercuric chloride induced renal failure rats. *Nat Prod Sci*. 2002 ; 33(3) : 200-6.
21. Nakagawa H, Komori N, Shibata F et al. Identification of cytokine-induced 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(2) : 545-50.
22. 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.
23. Lee KN, Kwon OH. Clinical Pathology File. Seoul : Medical Culture Press. 2003 : 95-8, 102-5, 1437.