

補氣膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향

이정원, 조충식, 김철중
대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Effects of *Bogimakseong-bang*(補氣膜性方) Treatment on cBSA-induced Membranous Nephropathy in Mouse Model

Jung-won Lee, Chung-sik Cho, Cheol-jung Kim

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea.

ABSTRACT

Objective : We aimed to identify the effects of *Bogimakseong-bang*(BGMSB) treatment on cBSA-induced MN in a mouse model.

Methods : We divided 20 mice into 4 groups. The normal group (NR) had no treatment. We used cBSA to induced MN to the other 3 groups. One group (CT) was treated with cBSA (7mg/kg i.p) only. The second (BG-250) was treated with cBSA (7mg/kg i.p) and BGMSB extract (250mg/kg, p.o). The third group (BG-500) was treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB extract (500mg/kg, p.o). After cBSA and BGMSB extract treatment for 4 weeks, proteinuria, serum albumin, total cholesterol, serum creatinine, BUN, total nucleated spleen cell number and total infiltrated kidney cell number of all groups were measured. CD3e+/CD19+ and CD4+/CD8 cells ratio of peripheral blood, kidney and spleen of all groups were analyzed. L-1 β and TNF- α , IL-6, IgG, IgM, and IFN- γ levels of all groups were gauged. Histological analysis of kidney tissue and immunohistochemical staining (CD4 CD8) of kidneys were observed.

Results : Proteinuria significantly decreased and serum albumin increased in groups treated with cBSA and BGMSB extract compared with the control. Total cholesterol decreased but not significantly. CD3e+/CD19cells ratio of peripheral blood decreased. CD3e+/CD19+ and CD4+/CD8 cells percentage of kidney and spleen showed no significant change. Level of IL-1 β , TNF- α and IL-6 significantly decreased, and IFN- γ increased but has not significantly. Concentration of IgG and IgM significantly decreased compared with control. Thickness of GBM decreased on histological analysis of kidney. Deposition of CD4 and CD8 decreased on immunohistochemical staining of kidney.

Conclusions : According to the above result, BGMSB had a significant effect for treating MN which is cBSA-induced.

Key words : *Bogimakseong-bang*(補氣膜性方), membranous nephropathy, cationic bovine serum albumin(cBSA), GBM, proteinuria, serum albumin

1. 서론

신증후군은 사구체 투과성이 증가되어, 성인의

경우 1일 3.5g 이상의 심한 단백뇨와 함께 부종, 저알부민혈증, 고지혈증 등을 나타내는 임상증후군이 다^{1,2}. 만성 신병증(Membranous Nephropathy: MN)은 신증후군의 일종으로서 사구체 기저막 외피 하 부위에 면역복합체가 침착되어 발생하는 면역매개성질환인데, 주된 특징은 사구체의 증식성 변화가 심하지 않으면서 모세혈관 기저막의 미만

· 교신저자: 김철중 대전광역시 중구 대흥동
대전대학교 부속대전한방병원 신계내과
TEL: 042-229-6880 FAX: 042-254-3403
E-mail: kidneykim@paran.com

성 증가가 나타나는 것이다.³

40대 성인 남자에게 많이 발생하며, 특발성 신증 후군의 25~30%를 차지하고, 환자의 80%이상은 신증후군 범위의 단백뇨가 나타난다.³ 병인은 명확하지 않지만, 사구체 외에서 형성된 항원과 IgG같은 항체가 결합하여 기저막(glomerular basement membrane : GBM)에 침착하거나, GBM의 외부 저밀도층에 분포하는 내인성 항원에 대한 항체의 반응으로 추정하고 있다.^{2,3}

서양의학에서는 일반적으로 steroid 요법을 6~12개월 정도 사용하며⁴, 고용량으로 6개월 이상 투여 시 예후가 좋아지는 반면 많은 부작용이 보고되고 있다.^{1,3} 또한 보존적인 치료만으로도 20~40% 정도 자연 관해되어 장기간 좋은 예후를 나타낸다는 보고가 있지만^{5,6}, 상당수의 환자들이 신기능의 저하를 일으킨다^{7,8}는 상반된 보고도 있다.

MN에서 나타나는 임상적 병증을 고려하면 동양의학적으로는 ‘浮腫’, ‘虛勞’, ‘尿濁’ 등의 範疇에 屬하며^{2,9}, 脾氣虛弱, 水濕貯留, 氣陰兩虛, 濕瘀阻絡, 肝腎陰虛, 濕熱蘊結 등의 辨證에 따라 益氣健脾, 活血和濕, 益氣養陰, 活血化瘀, 滋陰柔肝, 清利濕熱, 清熱解毒 등의 다양한 治法을 活用할 수 있다.^{2,9} 陳¹⁰은 MN의 병기를 濕熱蘊結, 脾腎虧損, 損瘀絡으로 보고 益氣活血, 清熱利濕, 溫補脾腎의 效能이 있는 膜性腎炎方을 活用하여 脾虛濕熱, 脾腎陽虛, 肝瘀脾虛 등으로 辨證하여 투여한 결과 有效한 效果를 얻었다고 보고하였고, 국내에서는 金¹¹이 실험적으로 MN에 膜性腎炎方이 有의한 效果가 있음을 보고하였다. 또한 崔 등^{12,13}은 膜性腎炎方에 清熱과

活血하는 藥물을 가한 처방으로 MN에 效果가 있음을 보고한 바 있다.

이에 저자는 陳 등¹⁰⁻¹³의 보고에 근거하여 膜性腎炎基本方에 人蔘을 蒸熟한 紅蔘¹⁴ 加味한 補氣膜性方의 效果를 실험적으로 규명하고자, cationic bovine serum albumin(cBSA) 투여로 유발된 MN mouse의 24시간 요중 단백, 혈액학적 변화와 면역학적 기전 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 有의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 동 물

실험 동물은 한국생명공학연구원에서 평균체중 20±0.5g의 雄性 Balb/c 8주령을 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 사용하였고, 물은 충분히 공급하였다.

2) 약 물

실험에 사용된 補氣膜性方(BGMSB)의 구성 藥물은 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Bogimakseong-bang* (BGMSB)

Herbs	Scientific Name	Galenical Name	Amount(g)
黨 蔘	Codonopsis Pilosulae Radix	<i>Codonopsis pilosula</i> (Franch) NANNF	30
白花蛇舌草	Oldenlandiae Diffusae Herba	<i>Oldenlandia Diffusa</i> (WILLD.) ROXB.	30
薏苡仁	Coicis Semen	<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>maryuen</i> (Roman.)	30
黃 芪	Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE	60
當 歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	20
淫羊藿	Epimedii Herba	<i>Epimedium koreaum</i> NAKAI	15
紅 蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY.	6
Total amount			191

3) 시 약

본 실험에 사용된 시약은 bovine serum albumin, anhydrous ethylenediamine (EDA), 1-ethyl-3 [(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride](EDC), complete Freund's adjuvant, Dulbecco's minimum essential medium(DMEM), 2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 media, isopropanol, RBC lysis solution, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, acrylamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma(Saintlouis, U.S.A.)사, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone(Logan, U.S.A.)사, agarose는 FMC(U.S.A.)사, propidium iodide (PI), RNase는 Pharmingen(Torreyana, U.S.A.)사, IL-6, TNF- α ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, U.S.A.)사, Dextran sodium sulfate는 Zoetermeer(Netherlands)사 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 약재추출을 위하여 BÜCHI Rotavapor R-200 모델과 BÜCHI heating bath B-490 모델(Flawil, Switzerland)을 이용하였다. cBSA의 isoelectric point(pI)를 측정하기 위하여 Bio-Rad사(U.S.A.)의 수평 전기영동장치를 사용하였고, cBSA의 크기를 알아보기 위하여 Bio-Rad사(U.S.A.)의 5% SDS-PAGE 수직 전기영동장치를 사용하였다. 또한, 단백뇨(proteinuria)의 측정은 Bayer사의 Albustix[®], cytometer는 Becton Dickinson FACSCalibur(San Jose, CA, USA), ELISA 판독기는 Molecular Devices (Minnesota, U.S.A.)사 제품을 사용하였다. 실험동물의 신장조직 시료는 Serotec (U.S.A.)사의 cooling microtome(Washington, DC, U.S.A.)을 사용하였으며, metabolic cage는 Techniplast (Varese, Italy)사를 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액조제

BGMSB에 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기로 3시간 가열, 추출하고 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결 건조기(freeze dryer)를 이용, 완전 건조한 후, BGMSB 27.5g의 추출물을 얻어(수율 14.4%), 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) cBSA 준비

Crystalline fraction V bovine serum albumin (Miles laboratories, Elkhart, IN, U.S.A.)를 사용하여 cBSA를 제조하였다. Ethylenediamine solution(anhydrous ethylenediamine 67ml과 deionized water(DIW 50ml를 6N HCl로 pH4.75로 맞추)에 20% BSA를 25ml 넣어서 1.8g의 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide-hydrochloride를 2시간 교반한 후, 4mol acetate로 pH 4.75로 맞추어 -70도에 보관하여 사용하였다.

3) cBSA isoelectric point(pI) 측정

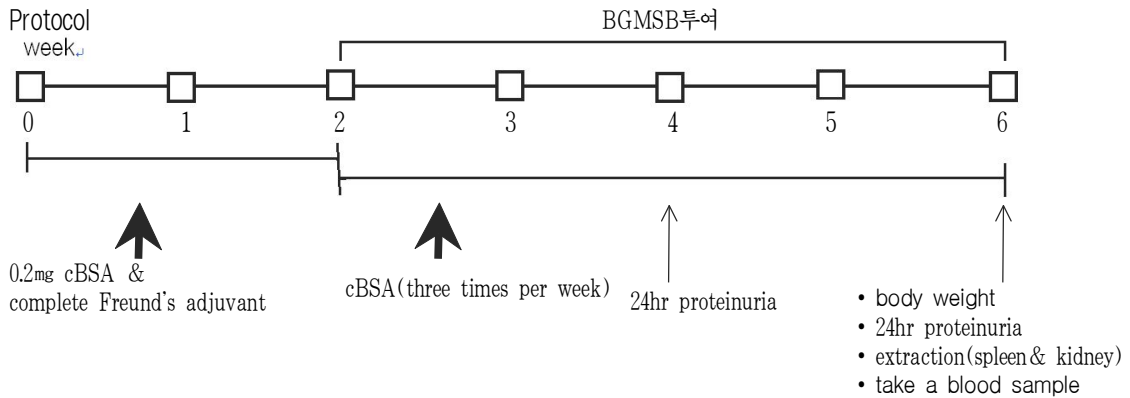
cBSA의 등전점을 확인하기 위하여 isoelectric point(pI)측정은 수평 전기영동장치인 5% Thin-layer polyacrylamide gel을 사용하여 pH3.5~9.5에서 Bio-RAD horizontal electrophoresis cell(Bio-Rad laboratories)을 사용하였다. cBSA의 분자량을 확인하기 위하여 Bio-Rad 회사의 수직 전기영동장치로 5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 만들어 Coomassie brilliant blue(CBB) 염색으로 확인하였다.

4) MN 유발 및 투약

MN을 유도하는 최상의 cBSA 적정 농도를 결정하기 위하여 BALB/c 雄性 8주령을 대상으로 실험하였다. Mouse 5마리를 1군으로 하여 normal군, control군, BG-250군, BG-500군으로 나누고, normal군을 제외한 실험군에 0.2mg의 cBSA와 동량의 complete Freund's adjuvant를 쥐에 주사하여 cBSA에 대한 항체를 형성시켰다. 2주 뒤 boosting과 MN을 유발하기 위하여, 일주일에 1회/2일, 3번

cBSA를 2주간 주사하였다. MN을 유도하는 적절한 농도를 결정하기 위하여 실험군에 1, 3, 5, 7mg/kg 주사하여 단백뇨를 측정하여 하였고, 본 실험에서는 적정 농도인 7mg/kg을 사용하여 MN을 유발

하였다. 그리고 BG-250군은 BGMSB 250mg/kg, BG-500군에는 BGMSB 500mg/kg을 cBSA와 동량의 complete Freund's adjuvant를 주사하고 2주 후부터 4주간 경구투여 하였다.



Scheme 1. Representation of experimental paradigms used.

5) 체중측정

실험시작 전 평균체중을 구하여 각 군으로 분류하고 실험종료일에 각 군의 평균체중을 측정하였다.

6) 24시간 요중 단백 측정

실험동물의 소변은 cBSA투여 후 1회/2주로 4주간 2회 24 시간 동안 metabolic cage에서 모았으며, 원심 분리하여 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다. 단백뇨 측정은 Bayer사의 Albustix[®]를 이용하였고, Albustix[®]는 뇨 중의 알부민과 TBPB의 변색 점 변화에 의해 측정되며 1-3의 수치는 100-300mg/dl의 함량을 의미한다.

7) 신장조직 적출 및 무게측정

cBSA투여 후 4주째 소변을 채취하고, 실험동물을 ether로 마취시킨 후 신장을 적출하여 무게를 측정한 후 조직학적 검사를 하였다. 신장조직은 1.5ml microcentrifuge tube에 1ml의 10% formalin 용액을 사용하여 고정시켰다.

8) 채혈 및 혈청 분석

신장을 적출하기 전 실험동물을 ether로 마취시

킨 후, 심장에서 3ml 주사기로 1ml를 채혈하여, 4℃, 3,000rpm에서 10분간 원심분리 후, 혈청을 얻어 생화학적 검사 전까지 -70℃에 보관하였다. 혈청의 생화학적 검사에서는 creatinine, blood urea nitrogen(BUN), albumin, total cholesterol 등을 측정하였다.

9) 비장, 말초혈액 및 신장의 형광유세포 분석

Mouse에서 spleen과 kidney를 각각 적출한 후, 100mesh로 세포 분리하여, D-PBS로 1700rpm상태에서 5분간 원심분리 하였다. 이후 2회 세척한 후 cell strainer(Falcon사, U.S.A.)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 kidney는 잘게 chopping한 후, collagenase 1 mg/ml(in 2% FBS + RPMI1640)를 넣고 37℃ shaker(180rpm, 20min.) 배양기에서 배양 후, 상층액을 회수하는 방법을 4회 반복하였다. 이들 세포들과 peripheral blood에 ACK 용액(8.3g NH₄Cl, 1g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)으로, 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구

를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척 후, 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 spleen cells, kidney cells과 peripheral blood cells을 5×10^5 세포로 조정된 후, 4°C에서 면역 형광 염색(immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, PE-anti-CD8, 그리고 FITC-anti-CD19를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후, 3회 이상 인산완충 생리식염수로 세척 후, flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3e+, CD19+, CD4+, CD8+세포 수를 백분율(%)로 분석한 후 spleen cells과 kidney cells는 총세포수를 적용하여 각 조직의 절대 세포 수(absolute number)를 산출하였다.

10) 효소결합면역분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay)

IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , thromboxane B2 혈청 내 농도 측정은 MN 실험 종료 후, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA, Endogen, U.S.A.)로 생산량을 측정하였다. 각 well에 MN 생쥐 혈청을 100 μ l (1/100dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치하여 2회 washing 완충 용액으로 세척한 후, antibody avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고, 다시 1시간 실온에서 방치하여 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고, 암실에서 30분간 방치 후, 50 μ l의 stop 용액을 처리하여 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) H&E 일반염색

일반염색을 하여 광학현미경 관찰을 위한 표본을 제작하기 위하여, 신장조직을 세절하여 10% buffered formalin에 하루정도 담가두어 완전히 고정시킨 뒤, 수세하여 남아있는 formalin을 제거하고 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethyl alcohol에서 각각 1시간씩 탈수과정(dehydration)을 자동적으로 맞추어 기계에 작동시켰다. Xylene 치환과 paraffin 침투과정을 거친 후, 포매하여 paraffin 블록을 제작하였다. 준비된 paraffin 블록을 회전형 박절기(microtome)의 틀에 고정시켜 5-6 μ m 두께로 자르

고 slide glass 위에 놓은 후, xylene에 1분씩 3회, ethanol에 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% 순으로 1분씩, 탈 파라핀과정을 거친 후, 흐르는 수돗물에 10분간 수세하였다. Hematoxylin에서 1~3분, 수돗물에서 1분간 수세한 후, 1% acid alcohol에 침적 후, 수돗물에 1분간 수세하였다. Ammonia에 3회 침적하고 수돗물로 5분정도 수세하였으며, eosin에 1~3분정도 염색을 한 후 바로 탈수과정으로 들어갔다. ethanol을 80%, 90%, 100% 2회, ethanol : xylene의 1:1에 각각 1분씩, 그리고 xylene에 1분씩 2회 정도 침적한 후, 봉입하여 광학현미경으로 조직상태를 관찰하여 촬영하였다.

12) 면역조직화학법 (Immunohistochemistry)

일반염색으로 조직의 상태를 관찰한 후, 원하는 단백질의 발현경향과 위치를 알아보기 위하여 면역조직화학법을 수행하였다. 면역조직화학법을 위한 조직절편은 H&E 염색을 위한 paraffin 블록을 사용하였으며, 실험과정은 먼저 slide glass 위에 절편한 조직을 xylene 1분씩 3회, ethanol 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% 순으로 1분씩 탈 파라핀과정과 탈수과정을 거친 후, 내재성 퍼옥시다제(endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 RBS에 희석한 1% H₂O₂에서 15분간 반응시켜, 1분씩 3회 PBS/Tween 20으로 세척한 후, 0.1% Tween 20과 1% bovine serum albumin이 함유된 PBS로 상온에서 30분정도 비특이적인 반응을 위한 blocking을 수행하였다. 1차 항체인 mouse anti-CD4, mouse anti-CD8을 1/400로 희석한 후, 0.05% bovine serum albumin, 1.5% horse serum 및 0.3% Triton X-100이 들어 있는 1차 항체용액에 넣어 상온에서 1시간정도 반응시켰으며, 반응이 끝나면 조직을 PBS/Tween 20으로 1분씩 3회 세척한 후, 2차 항체용액을 1/500으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS/Tween 20으로 1분씩 3회 세척하여 발색용액에서 반응시켰다. 발색용액의 반응을 육안으로 관찰하며 수세작업을 하였고, hematoxylin으로 counter staining하고 탈수과정에 들어갔으며, 마

지막 침적한 후, 봉입하여 광학현미경으로 조직상태를 관찰하여 사진을 찍었다. 실험과정에 조직절편에 1차 항체 없이 반응한 negative control도 수행하였다.

13) 통계 분석

본 연구의 모든 실험 결과 수치는 Mean±SE로 표시하였고, one way ANOVA에 의해 p<0.05 수준에서 유의성 여부를 검증하였으며, 유의성이 나타날 경우 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

III. 성적

1. MN 모델 유발

BSA에 anhydrous ethylenediamine을 EDC를 사용하여 부착시켜 cationized BSA를 제조하였다 (Fig. 1). 원료로 사용한 crystallized bovine serum albumin의 pH 4.5-5.1 정도였으나 제작 후 cBSA는 pH 9.5 이상으로 변화를 나타내었다. cBSA는 MN 질환의 유도를 위하여 cBSA의 적정 농도를 결정하고자 4가지의 농도로 나누어 동물실험을 하였다. 일주일에 3번 cBSA를 1, 3, 5, 7mg/kg으로 실험을 하여 적절한 농도를 결정하였다. 80%정도 단백질이 측정되어지는 7mg/kg을 적정 cBSA의 농도로 결정하였다(Fig. 1).

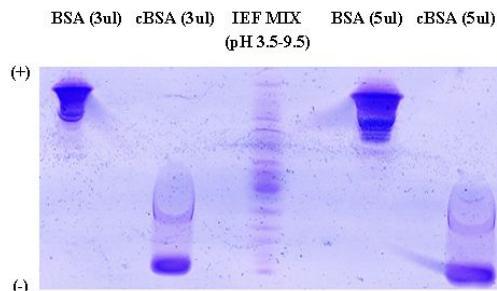


Fig. 1. The isoelectric point (pI) of the cBSA.

The pI of the was measured in a thin-layer polyacrylamid gel (5%), pH range 3.5-9.5. Using a Bio-Rad horizontal electrophoresis cell. The pH gradient was determined directly from the gel with a surface glass pH electrode and Corning pH meter.

2. 체중, 신장 무게의 변화

체중에 있어서 정상군은 21.6±0.5g, 대조군은 23.7±0.6g이었으며, MS-250군은 24.3±0.4g, MS-500군은 25.5±0.5g으로 대조군에 비하여 증가하였지만 유의성은 없었다. 신장의 무게에 있어서 정상군은 0.19±0.02g, 대조군은 0.22±0.01g이었으며, BG-250군은 0.22±0.02g, BG-500군은 0.24±0.03g으로 대조군에 비하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Body and Kidney Weight in Mice with MN induced by cBSA.

Group	Body (g)	Kidney (g)
NR	21.6±0.5 ^{a)}	0.19±0.02
CT	23.7±0.6	0.22±0.01
BG-250	24.3±0.4	0.22±0.02
BG-500	25.5±0.5	0.24±0.03

a) : Data represent means±S.E(N=5).

NR : Non-treatment group.

CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).

BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).

BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).

3. 24시간 요중 단백질의 변화

24시간 요중 단백질은 2주차와 4주차에서 정상군은 각각 0.2±0.2stick index, 0stick index이었고, 대조군은 각각 1.6±0.24stick index와 2.20±0.2stick index였다. BG-250군은 2주차에서 0.4±0.40stick index(p<0.01), 4주차에서 0.2±0.20stick index(p<0.001)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, BG-500군은 2주차에서 0.8±0.37stick index, 4주차에서 0.4±0.24 stick index(p<0.001)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

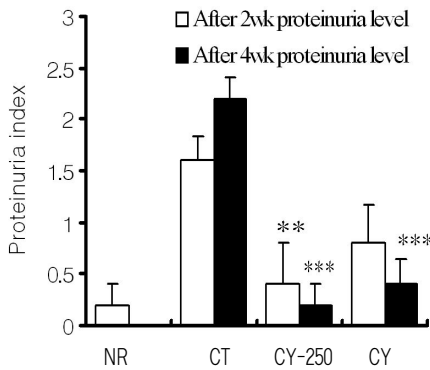


Fig. 2. The Changes of Proteinuria in Mice with MN induced by cBSA. Data represent M±S.E (N=5).

NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method (**p<0.01, ***p<0.001).

4. 혈청학적 변화

1) Albumin치의 변화

정상군은 2.60±0.04(mg/dl), 대조군은 2.50±0.04(mg/dl)이었고, BG-250군과 BG-500군은 각각 2.97±0.07(mg/dl), 2.93±0.09(mg/dl)로 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

2) Total cholesterol치의 변화

정상군은 121.57±5.80(mg/dl), 대조군은 137.60±9.25(mg/dl)이었고, BG-250군, BG-500군은 각각 123.27±4.74(mg/dl), 125.10±7.29(g/dl)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

3) Creatinine치의 변화

정상군은 0.193±0.005mg/dl, 대조군은 0.157±0.009(mg/dl)이었고, BG-250군, BG-500군은 각각 0.18±0.019(mg/dl), 0.153±0.009mg/dl로 대조군에 비하여 유의한 변화는 없었다(Fig. 5).

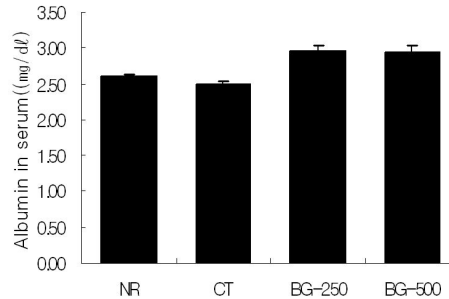


Fig. 3. The Changes of Serum Albumin in Mice with MN induced by cBSA. Data represent M±S.E(N=5).

NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method.

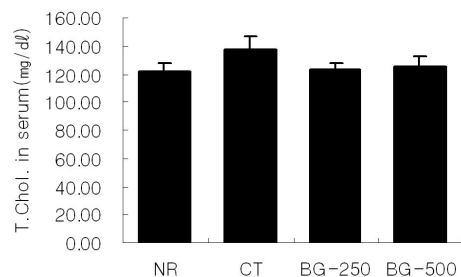


Fig. 4. The Changes of Serum Total Cholesterol in Mice with MN induced by cBSA.

Data represent M±S.E(N=5).
 NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method.

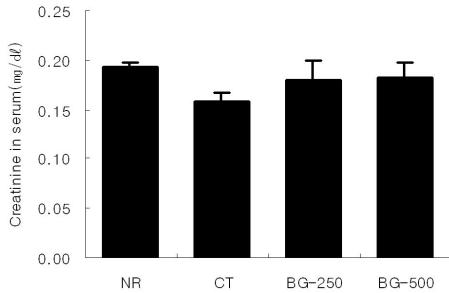


Fig. 5. The Changes of Serum Creatinine in Mice with MN induced by cBSA.

Data represent M±S.E(N=5).
 NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method.

4) BUN치의 변화

정상군은 16.4±0.9(mg/dl), 대조군은 28.2±1.3(mg/dl)이었고, BG-250군, BG-500군은 각각 27.7±1.3(mg/dl)(p<0.05), 25.8±1.9(mg/dl)(p<0.05)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

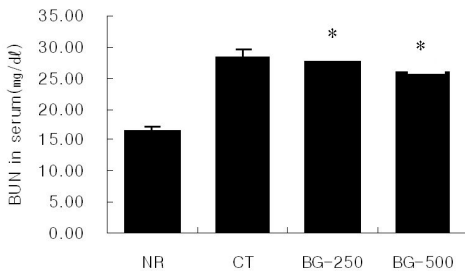


Fig. 6. The Changes of Serum BUN in Mice with MN induced by cBSA.

Data represent M±S.E(N=5).
 NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).

Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*p<0.05).

5. 말초혈액, 비장 및 신장 세포의 형광 유세포 분석

1) 말초혈액의 림프구에 미치는 영향

CD3e+ T cell/CD19+ B cell의 비율은 정상군이 54/46, 대조군이 80/20, BG-250군이 55/45, BG-500군이 55/45이였으며, CD4+ T helper cell/CD8+ cytotoxic T cell의 비율은 정상군이 68/32, 대조군이 51/49, BG-250군이 57/43, BG-500군이 51/49이었다(Fig. 7). 그러므로 BG군은 대조군에 비해 CD19와 CD4+세포의 비율이 높게 나타났다.

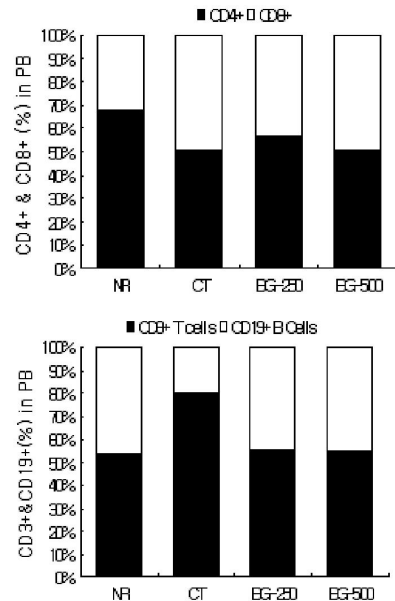


Fig. 7. Effects of BGMSB Extract on the percentage of CD3e/CD19 and CD4/CD8-gated cells in PBMC of Mice with MN induced by cBSA.

NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).

2) 비장세포의 림프구에 미치는 영향

CD3e⁺ T cell/CD19⁺ B cell은 정상군이 51/49, 대조군이 48/52, BG-250군이 46/54, BG-500군이 40/60이었으며, CD4⁺ T helper cell/CD8⁺ cytotoxic T cell은 정상군이 51/49, 대조군이 46/54, BG-250군은 41/59, BG-500군은 42/58이었다. CD3e⁺ T 세포/CD19 B세포의 비율은 대조군에 비하여 BG군에서 유의성 있는 변화는 보이지 않았지만, CD4⁺/CD8 세포의 비율은 대조군에 비하여 BG군에서 CD4⁺ T helper 세포가 감소되는 경향을 보였다 (Fig. 8).

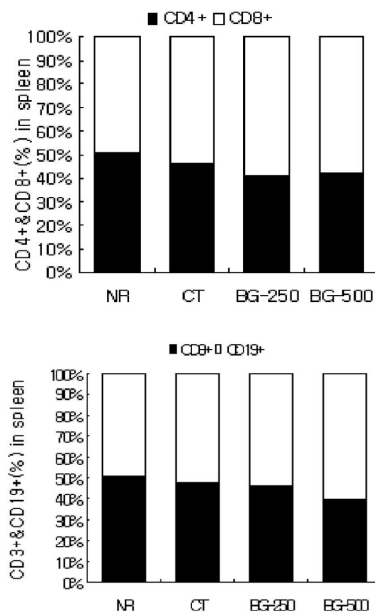


Fig. 8. Effects of BGMSB Extract on the percentage of CD3e/CD19 and CD4/CD8-gated cells in Spleen of Mice with MN by induced cBSA.

NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).

3) 신장에 침윤된 림프구에 미치는 영향

CD3e⁺ T cell/CD19⁺ B cell은 정상군이 88/12, 대조군이 85/15, BG-250군이 88/12, BG-500군이 84/16이었고, CD4⁺ T helper cell/CD8⁺ cytotoxic T cell은 정상군이 65/35, 대조군이 80/20, BG-250군이 73/27, BG-500군이 65/35이었다. 그러므로 CD3e⁺ T 세포/CD19 B세포의 비율은 대조군에 비하여 BG군에서 유의성 있는 변화는 보이지 않았지만, CD4⁺/CD8 세포의 비율은 BG군에서 대조군에 비하여 CD4⁺ T helper 세포가 감소되는 경향을 보였다 (Fig. 9).

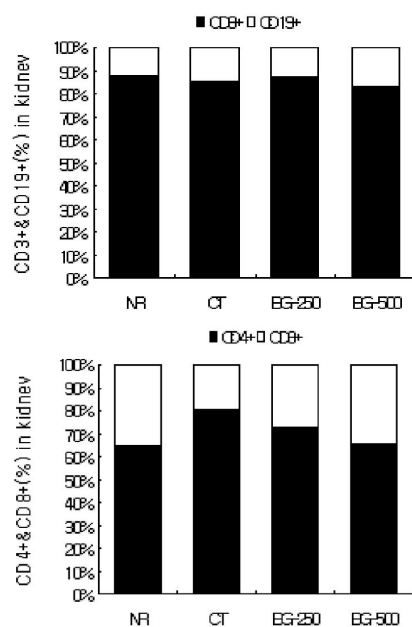


Fig. 9. Effects of BGMSB Extract on the percentage of infiltrated CD3e/CD19, and CD4/CD8-gated Cells in Kidney of Mice with MN by induced cBSA.

NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).

6. 혈청 cytokines 및 IgG, IgM 농도에 미치는 영향

1) Cytokine 농도의 변화

(1) Pro-inflammatory IL-1 β 와 TNF- α 농도의 변화

IL-1 β 농도는 정상군이 1.5 \pm 0.7pg/ml, 대조군이 58.6 \pm 5.2pg/ml 이고, BG-250군과 BG-500군은 각각 41.3 \pm 5.5pg/ml (p<0.05), 36.7 \pm 6.7pg/ml (p<0.01)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. TNF- α 농도는 정상군이 7.9 \pm 0.6pg/ml, 대조군이 89.6 \pm 11.6pg/ml 이고, BG-250군과 BG-500군은 각각 67.8 \pm 5.8pg/ml, 68.4 \pm 18.0pg/ml로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

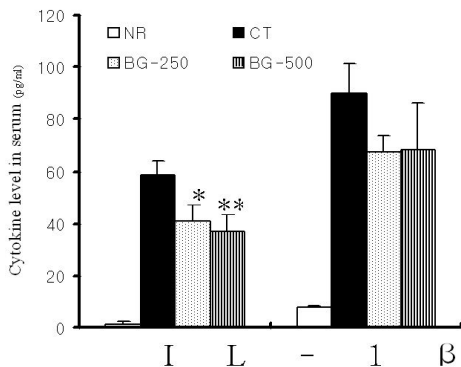


Fig. 10. The Changes of Serum IL-1 β , and TNF- α levels in Mice with MN induced by cBSA.

Data represent M \pm S.E(N=5).
 NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(*p<0.05, **p<0.01).

(2) IL-6와 IFN- γ 농도의 변화

IL-6 농도는 정상군이 4.6 \pm 1.4pg/ml, 대조군이 335 \pm 27.4pg/ml 이었고, BG-250군은 301.4 \pm 24.6pg/ml, BG-500군은 208.6 \pm 19.7pg/ml (P<0.01)로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 또한 IFN- γ 농도

는 정상군이 158.4 \pm 16.0pg/ml, 대조군이 134.6 \pm 12.4pg/ml 이었고, BG-250군과 BG-500군은 각각 145.6 \pm 11.5pg/ml 148.6 \pm 14.2pg/ml로 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

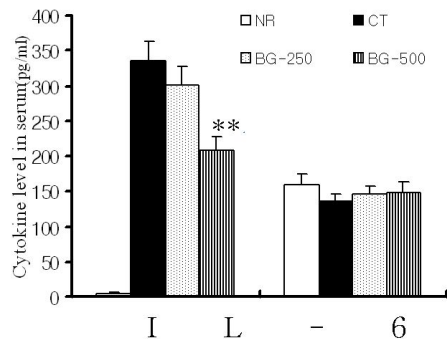


Fig. 11. The Changes of Serum IL-6 and IFN- γ levels in Mice with MN induced by cBSA.

Data represent M \pm S.E(N=5).
 NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(**p<0.01).

2) IgG 및 IgM 농도의 변화

IgG 농도는 정상군이 2.0 \pm 0.69U/ml, 대조군이 20.5 \pm 1.04U/ml 이고, BG-250군과 BG-500군은 각각 5.2 \pm 1.31U/ml (p<0.001), 2.9 \pm 0.44U/ml (p<0.001)로 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. IgM 농도는 정상군이 97.9 \pm 9.95U/ml, 대조군이 146.5 \pm 2.65U/ml 이고, BG-250군과 BG-500군은 각각 121.3 \pm 8.35U/ml (p<0.01), 109 \pm 1.63U/ml (p<0.001)로 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

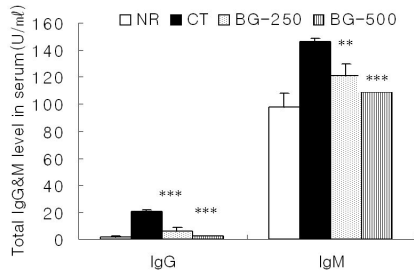


Fig. 12. The Changes of Total IgG, and IgM levels in Mice with MN induced by cBSA.

Data represent $M \pm S.E (N=5)$.
 NR : Non-treatment group.
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p).
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o).
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o).
 Statistically significant value compared with control group by ANOVA test and Duncan's method(**p<0.01,***p<0.001).

7. Histological Analysis of Kidney Tissue

정상군은 기저막의 손상이 없는 것이 관찰되었고(Fig. 13A), 대조군은 cBSA와 면역 복합체의 침착으로 기저막의 비후를 관찰되었으며(Fig. 13B), BG-250군은 대조군에 비하여 기저막의 두꺼워지는 정도가 완화되었고(Fig. 13C), BG-500군은 대조군에 비하여 기저막의 두꺼워지는 정도가 보이지 않았다(Fig. 13D).

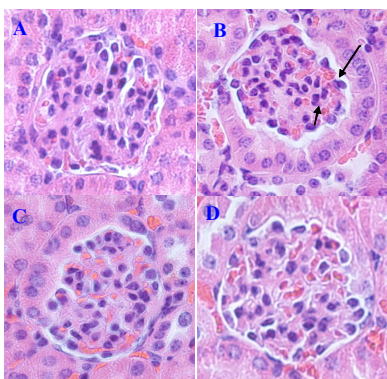


Fig. 13. Representative Renal Histological Findings in the BALB/c Mice with MN

NR : Non-treatment group. (A),
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p). (B)
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o). (C)
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o). (D)
 (B) A glomerulus shows diffuse basement membrane (GBM) thickening (arrow) and normal mesangial cell distribution (small arrow) (H&E staining; original magnification $\times 400$).

8. Immunohistochemical Analysis of Kidney Tissue

정상군에서 CD4 T cell의 침윤은 거의 없었고(Fig. 14A), 대조군에서는 집중된 침윤이 관찰되었으며(Fig. 14B), BG군은 모두 대조군에 비하여 침윤이 감소하였고(Fig. 14C,D), CD8 T cell은 정상군에서 침윤은 없었고(Fig. 15A), 대조군에서는 집중된 침윤이 관찰되었으며(Fig. 15B), BG군에서는 모두 침윤이 감소하였다(Fig. 15C,D).

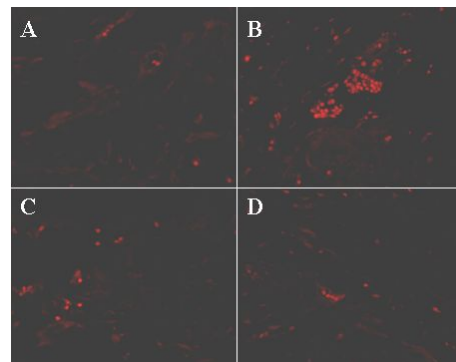


Fig. 14. Immunohistochemical Staining (CD4) of Kidney in Mice with MN induced by cBSA.

NR : Non-treatment group. (A),
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p). (B)
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o). (C)
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o). (D)

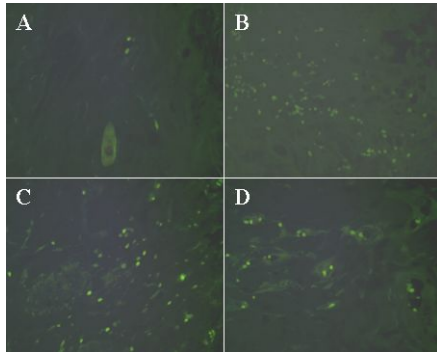


Fig. 15. Immunohistochemical Staining (CD8) of Kidney in Mice with MN induced by cBSA.

NR : Non-treatment group. (A),
 CT : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p). (B)
 BG-250 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(250mg/kg, p.o). (C)
 BG-500 : Group treated with cBSA(7mg/kg i.p) and BGMSB(500mg/kg, p.o). (D)

IV. 고찰

MN은 신증후군의 일종으로 기저막 외피하 부위에 면역복합체가 침착하여 발생하는 면역매개성 질환이며² 모세혈관 기저막의 미만성 증가를 특징으로 한다³. 원인에 따라 일차성과 이차성으로 나뉘며, 이차성의 원인질환으로 신이식후의 발병, 혼합 결체조직 질환, 자가 면역성 질환, 악성종양, 감염성 질환 등이 있다^{15,16}. 원인과 진행의 기전은 명확히 밝혀지지 않았지만, 미리 형성된 면역복합체가 결합하여 GBM에 침착하고 보체계를 자극하여서 유발하거나, GBM의 외부저밀도층에 분포하는 내인성 항원에 대한 항체의 반응이거나, 정상적으로 외인성 사구체에 대한 항원항체반응의 결과로써 발달된 것으로 추정 된다¹⁷.

신사구체의 미세혈관은 면역 복합체가 가장 잘 침착되는 부위로, 혈관벽의 면역 복합체 침착이 보체 및 Fc수용체 매개성 염증을 야기시켜 혈관과 주위조직을 손상시키고¹⁷, 사구체기능이 손상되어 단백뇨 등이 야기되며², 신사구체 내장 상피 세포

가 자극을 받아 기저막 단백질의 mRNA 발현이 증가하고 단백질이 과도하게 합성, 분비되어 GBM의 미만성 비후가 일어난다^{18,19}.

MN은 광학현미경상 초기에는 사구체가 정상으로 보이나, 진행할수록 사구체 모세혈관벽이 광범위하게 비후되며, 전자현미경상 이러한 비후는 기저막과 상피세포사이에 불규칙한 고밀도 침착물에 의한 것이며 상피세포의 죽돌기는 소실되어 있고, 침착물 사이로 기저막물질의 돌기가 형성되는데 점점 이런 돌기들이 면역 침착물을 둘러싸며 두꺼워진 기저막내에 면역침착물이 쌓이게 되며, 질병이 진행될수록 사구체 메산지움은 경화되고 사구체는 구상으로 유리질화 된다²⁰. 그러므로 신생검이 진단, 치료방침의 결정, 예후판정에 중요하고 단백뇨, 저알부민혈증이 임상상의 지표가 되며 말기에 나타날 수 있는 만성신부전은 혈청 creatinine이 지표가 된다¹⁸.

일반적인 서양의학 치료법은 주로 steroid 투여로⁴, 장기 투여시 예후는 향상되지만 많은 부작용이 나타난다¹³. 또한, 보존적인 치료만으로 좋은 예후를 보이는 연구결과도 있지만^{5,6}, 보존적 치료만으로는 상당수의 환자들이 결국 신기능의 저하를 일으킨다^{7,8}는 보고도 있다.

한의학에서 MN은 ‘浮腫’, ‘虛勞’, ‘尿濁’ 등의 範疇에 屬하는 것⁹으로, 肺, 脾, 腎, 三焦의 水液代謝機能의 失調와 관련이 있으며²¹, 脾氣虛弱 水濕貯留, 氣陰兩虛, 濕瘀阻絡, 肝腎陰虛, 濕熱蘊結 등으로 辨證하여 益氣健脾, 活血和濕, 益氣養陰, 活血化瘀, 滋陰柔肝, 清利濕熱, 清熱解毒 등의 다양한 治法을 활용하고 있다⁷.

최근 연구에 있어 陳^{22,23}은 氣虛하면 水停하고 血滯하여 血瘀가 생기고 血流가 완만해지면서 水腫이 생기고 결국에는 陽虛로 진행되고, 李²⁴는 사구체신염 환자에서 血流力學的 변화지표가 정상인에 비하여 의미있게 증가된다고 보고하였다.

이에 著者는 膜性腎炎基本方에 補脾益氣의 效能이 있는 人蔘을 蒸熟한 紅蔘¹⁴을 加味한 BGMSB를

규명하기 위하여 본 실험을 시행하였다. BGMSB의 개별 약물에 대한 본초학 및 약리학적 효능을 살펴보면, 黃芪는 補氣升陽, 益衛固表, 托瘡生肌, 利水消腫, 黨蔘은 補中益肺氣, 生津生血, 白花蛇舌草는 清熱利濕, 解毒, 薏苡仁은 健脾滲濕, 除痺止瀉, 清熱排膿, 當歸는 補血, 活血調經, 潤腸通便, 淫羊藿은 補腎壯陽, 祛風除濕, 紅蔘은 大補元氣, 固脫生津 安神益智의 효능이 있다¹⁴. 人蔘에 대한 연구로, 쥐의 NK세포를 활성화시켜 면역기능을 전체적으로 증강시키고, 콜레스테롤 배설을 촉진하는 작용이 있으며^{14,25}, 또한 cBSA로 유발된 MN Rat에 신손상 개선, 단백뇨 감소 등이 보고가 있다.

MN의 동물 모델 병태에는 크게 두 종류가 있는데, 그 중 하나는 Heymann's nephritis로 쥐를 이용하여 사구체에 내인한 항원이 있다는 것을 가설로 한 모델이고²⁶, 다른 하나는 양이온을 띠는 항원을 동물에 주사하여 GBM의 음이온을 띠는 부위와 결합시킨 후 항체를 주사하거나 또는 항체가 능동적으로 만들어지도록 하여 면역복합체성 신사구체 신염이 만드는 것으로²⁰ cBSA의 반복적인 투여로 개²⁷, 고양이²⁸, 쥐²⁹, 토끼³⁰를 이용한 실험모델이 있다.

예비실험에서 본래 pH값이 4.5-5.1 정도인 Bovine serum albumin (BSA)를 양이온화(cationic)하여 pH가 9.5이상으로 변화시켜 cBSA를 만들었고³¹, 이 cBSA가 음이온화 되어있는 GBM에 침착하게 한 뒤 cBSA를 항원으로 작용하여 MN을 유발하였다. 항원의 질적인 순도와 역치 값은 MN 유도에 필수적으로³², cBSA의 적은 농도에서(1mg/kg) BALB/c 생쥐모델에 일시적으로 투여를 중단하면 단백뇨 수치가 정상군으로 복귀되었는데, 사람의 MN에서도 환자의 20~40% 정도는 처방 없이도 지속적인 완화과정과 완전한 회복을 보이기도 하여^{3,6}, 이 실험모델이 사람의 MN과 유사한 형태임을 알 수 있다. 이처럼 cBSA를 이용한 생쥐 모델이 MN 유발실험에 용이하고 적당한 약물치료의 실험을 하기에 좋은 장점이 있으므로³³ 본 실험은 cBSA를 이용하여 MN을 유발한 생쥐모델을 사

용하였다.

본 연구에서 Cationized Bovine Serum Albumin으로 유발된 Mouse의 MN에 補氣膜性方을 투여하여 나타난 성적을 정리해 보면 다음과 같다.

BG군은 대조군에 비하여 체중, 신장의 무게에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

신증후군에서 단백뇨의 방어기전은 charge-selective barrier와 size-selective barrier 설 등이 있는데, 사구체가 손상을 받으면 음이온인 albumin이 쉽게 빠져나갈 수 있게 되며, 구멍의 크기가 커짐으로써 단백질과 같은 큰 분자량의 물질이 빠져나가게 된다^{2,34}. 본 실험에서 BG군은 대조군에 비하여 유의성 있게 단백뇨를 감소시켰다. 또한 혈청 albumin치는 BG군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 이는 BGMSB가 손상된 단백질 방어기전을 회복하여 저알부민혈증이 개선된 것으로 생각된다.

신증후군에서 나타나는 고지혈증은 저알부민혈증의 정도와 비례하여 나타나는데¹, 본 실험에서 혈청 중 cholesterol치는 BG군에서 대조군 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다. 신장의 기능을 평가하는 혈청 creatinine과 BUN 중 BUN 치에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다.

사구체 손상의 원인은 크게 면역성과 비면역성이 있으며, 면역성 기전으로는 in situ immune complex deposition, circulating immun complex deposition, cell-mediated immune injury 등이 있고, 비면역성 기전으로는 혈액동성 인자, 혈액응고 인자, 식이인자, 구조적인 신사구체의 비후로 인한 손상 등이 관련있다²⁰. T cell은 세포표면의 CD3 복합체를 통하여 사구체 내피세포, 간질세포, 상피세포의 주요조직 적합 복합체내에 발현된 항체와 반응하며 이런 과정은 세포-세포결합과 자극 분자에 의해 촉진된다. CD4+ Th cell은 대식세포의 중요한 모집원이며 자가 활성 B cell의 클론성을 촉진한다. 이들은 또한 CD8+ cytotoxic T cell과 NK cell의 항원 의존성 세포독성을 통한 사구체 세포 손상을 촉진한다^{17,35}.

일반적으로 MN은 면역복합체에 의해 발생하며, 면역시스템 중 Th2 type과 연관된 체액성 면역 반응과 관련된다³³. 그러므로 본 실험에서도 치료효과를 살펴보기 위하여 T림프구와 B림프구의 상대적 비율을 말초혈액과 비장, 신장에서 측정 하였다. 먼저, 비장과 신장 내 CD3e⁺ T 세포와 CD19 B세포의 비율을 측정한 결과, 대조군에 비해 BG군에서 유의성 있는 차이는 없었지만, CD4⁺/CD8 세포의 비율에서는 BG군이 대조군에 비하여 CD4⁺ T helper 세포를 감소시키는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 BG군이 cBSA로 유발된 MN에서 체액성 면역반응을 억제하는 것으로 생각된다. 또, 말초 혈액에서 CD3e⁺/CD19 세포의 비율과 CD4⁺/CD8 세포의 비율을 분석한 결과, 대조군에 비해 BG군이 체액성 면역과 관련된 CD19와 CD4⁺세포의 비율이 높게 측정되었다. 이는 비장과 신장에서 관찰된 결과와 차이가 있으므로 이에 대한 향후 반복적인 실험적 분석이 필요하리라 생각 된다.

IL-1는 TNF와 생물학적 효과가 비슷한데, 소량 분비될 때는 국소염증반응을 매개하고, 다량 분비될 때는 전신적인 발열, 대사적 소모를 일으킨다. TNF는 감염부위로 호중구와 단핵구의 보충을 자극하여 이 세포들로 하여금 미생물을 제거하게 한다. 특히 IL-1과 TNF는 내피세포의 염증, 응고와 관련이 있어 사구체의 내피세포의 염증과 연관있다. 본 실험에서 IL-1 β 농도는 BG군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, TNF- α 농도는 BG군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다. 이는 BGMSB은 염증 반응과정에서 만들어지는 염증성 cytokine의 발현을 억제하는 것으로 생각된다.

또한 체액성과 세포성 면역반응과의 연관성을 알아보기 위해 IL-6와 IFN- γ , 혈청 IgG, IgM의 발현을 측정하였다. IL-6는 면역세포의 활성화 외에도, B cell 항체 생성의 최종단계에서 중요한 역할을 수행하는데, 본 실험에서 IL-6는 BG군에서

대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이는 BGMSB가 활성화된 림프구에 영향을 주어 염증성 cytokine을 억제하는 것으로 생각된다. IFN- γ 는 다양한 기능을 갖는 면역조절체로서 T세포와 NK세포에서 생산되고, MHC class II 발현과 B세포증식 분화, IL-2및 IL-4의 생산을 억제하는데 관여하며 대식세포 활성화물질로 가장 잘 알려진 cytokine 중 하나이다¹⁷. 본 실험에서 IFN- γ 는 BG군에서 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다. IgG는 주로 면역반응이 일어난 후 늦게 대량으로 출현하고, IgM은 면역반응 후 빠르게 증가하여 보체 활성화 능력이 강한 면역글로불린이다¹⁷. IgG와 IgM 농도는 BG군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이는 BGMSB 투여에 의해 T cell 및 B cell의 감소와 cytokine 발현 조절에 따른 효과라고 생각된다. 이상의 체액성과 세포성 면역과의 연관성을 알아보기 위한 실험결과에서 BGMSB이 세포성면역과 관련된 IFN- γ 는 증가를 시키고, 체액성 면역과 관련된 IL-6, 혈청 IgG, IgM을 감소시킴으로써 cBSA로 유발된 MN에서 일정한 치료효과가 있는 것으로 생각된다.

조직학적인 소견으로 cBSA를 주사하여 MN을 유발시킨 생쥐 모델에서 적출한 신장에 H&E 염색을 하여 관찰한 결과, 면역복합체가 상피 하에 침착하여 기저막 주위에 작은 틈니 모양이 존재하므로 기저막이 두꺼워지며, BG-250군은 대조군에 비하여 GBM의 두께가 줄어들어 완화된 소견을 보이고 BG-500군은 대조군에 비하여 GBM의 두께가 두꺼워지는 정도가 보이지 않아 치료가 된 것으로 관찰되었다. 또한 BG 투여군 모두 CD4과 CD8 T cell의 침윤은 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 그러므로 BGMSB의 투여로 GBM의 비후가 줄어들고, CD4와 CD8 T cell의 침윤이 감소된 것은 본 실험에서 나타난 단백뇨 감소결과와 부합한다 할 수 있다.

이상으로 BGMSB투여로 단백뇨가 감소되어 저알부민혈증이 개선되고, 신사구체 GBM의 비후를

억제한 것은 IL-1 β , TNF- α 및 IL-6와 같은 염증 관련 cytokines의 발현을 조절하고 IgG과 IgM의 생성을 억제하는 기전과 관련이 있을 것으로 사료된다. 그러므로 MN의 치료약물로 활용가능성이 높다고 생각되며, 앞으로 BGMSB의 작용기전에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

補氣膜性方의 效能을 실험적으로 糾明하고자, cBSA을 투여하여 MN이 유발된 모델 쥐에 나타나는 혈액학적 변화와 면역학, 조직병리학적 형태의 변화를 관찰한 결과 다음과 결론을 얻었다.

1. 단백뇨는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었고, 혈청 albumin치는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다.
2. 총 cholesterol치는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.
3. 혈청 BUN치는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소 되었다.
4. 말초혈액 중의 CD3e+/CD19세포 비율은 대조군에 비하여 감소되는 경향을 보였다.
5. 비장과 신장에서 CD3e+/CD19 및 CD4+/CD8 세포의 비율에서 유의한 변화는 유도되지 않았다.
6. IL-1 β , TNF- α 및 IL-6은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었으며, IFN- γ 는 증가되었지만 유의성은 없었다.
7. IgG와 IgM의 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.
8. 조직학적 소견상 사구체기저막은 대조군에 비하여 비후가 감소되었다.
9. 신장의 면역형광 염색소견상 CD4와 CD8 T cell의 침윤은 대조군에 비하여 감소하였다.

이상으로 BGMSB투여로 단백뇨가 감소되어 저

알부민혈증이 개선되고, 신사구체 GBM의 비후를 억제한 것은 IL-1 β , TNF- α 및 IL-6와 같은 염증 관련 cytokines의 발현을 조절하고 IgG과 IgM의 생성을 억제하는 기전과 관련이 있을 것으로 사료된다. 그러므로 MN의 치료약물로 활용가능성이 높다고 생각되며, 앞으로 BGMSB의 작용기전에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. 강성귀. 신장학. 서울: 고려의학; 1994, p. 169-78.
2. 두호경. 임상신계학연구. 서울: 성보사; 1995, p. 12, 244-8, 252, 280-1.
3. 대한신장학회. 임상신장학. 서울: 광문출판사; 2001, p. 231, 246, 244-8
4. 안규리 번역. 머크임상의학진단 및 치료. 서울: 한우리; 2002, p. 2008-9.
5. Schieppatti A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, Temmuzi G. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. N Engl J Med. 1993;329:85-9.
6. Honkanen E, Tomroth T, Gronhagen-Riska C. Natural history, clinical course and morphological evolution of membranous nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 1992;7:35-41.
7. 이강욱, 빈기태, 김성숙, 신영태. 성인 막성 신병증에서 면역 억제 치료. 대한신장학회지. 1995;14:293-302.
8. Glasscock RJ. The therapy of idiopathic membranous glomerulonephritis. Semin Nephrol. 1991;11:138.
9. 안세영 역. 동의임상내과학 II. 서울: 法仁文化社; 1999, p. 414-28.
10. 董興剛. 膜性腎病基本方. 中國中西醫結合腎病雜誌. 2003;4(3):134.
11. 김재형, 조충식, 김철중. 膜性腎炎方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의

- Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2007;24(4):163-180.
12. 최인구, 조충식, 김철중. 淸熱膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):104-16.
 13. 김두희, 조충식, 김철중. 活血膜性方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2008;29(4):68-82.
 14. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 영림사; 1991, p223, 306, 531, 533-4, 578.
 15. 김현정, 백주은, 하혜정, 양중일, 함중렬, 장세호 등. 그레이브스 병에 병발한 막성 신병증 1예. 대한내과학회지. 2003;64:130-6.
 16. Bhimma R, Coovadia HM. Hepatitis B virus-associated nephropathy. Am J Nephrol 2004;24:198-211.
 17. 강재성 외. 세포분자면역학. 서울: 범문사; 2004, p. 480, 487, 497.
 18. 김정연, 김태숙, 홍혜경, 이현순. 사람의 기저막성 신증에서 신사구체 기저막의 비후 기전에 관한 연구. 대한신장학회지. 2000;19(5):857-67.
 19. Hirokazu Imai. Medical decision-making in membranous nephropathy, Japanese Society of Nephrology. 2005;9:206-11.
 20. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 2004, p. 670.
 21. 時振聲. 時氏中醫腎臟病學. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1997, p. 146-7.
 22. 王鋼, 陳以平, 鄒燕勤. 現代中醫腎臟病學. 北京: 人民衛生出版社; 2003, p. 300-9.
 23. 高志卿, 鄒躍毅, 王琳. 陳以平教授分期論治膜性腎病. 上海中醫雜誌. 2004;38(2):35-6.
 24. 李國賢 外. 164例腎炎患者血液流變學指標及與血瘀證的關係. 中國中西醫結合雜誌. 1993;13:528-30.
 25. 한중현, 김기영. 한방약리학. 서울: 의성당; 2004, p. 466, 470-3.
 26. Falk RJ, Jennett JC, Nachman PH, Brenner BM. Philadelphia: membranous nephropathy In The Kidney; WB Saundeers. 2000, p. 1284-92.
 27. Wright NG, Mohammed NA, Eckersall DD, Nash AS. Experimental immune complex glomerulonephritis in dogs receiving cationized bovine serum albumin. Res Vet Sci. 1985;38:322-8.
 28. Nash AS, Mohammed NA, Wright NG. Experimental immune complex glomerulonephritis and the nephritic syndrome in cats immunized with cationized bovine serum albumin. Res Vet Sci. 1990;49:370-2.
 29. Soares VA, Fan CD, WEard H. Mesangial overload in experimental membranous nephropathy. Brazilian J Med Biol Res. 1992;25:477-86.
 30. Bass PS, Wang Y, al Nawab M, Evans B, Thomas H, Davies DR. The effect of cyclosporin A on cationized bovine serum albumin induced nephropathy in NZW rabbits. J Pathol. 1992;167:41-7.
 31. Rafati AA, Gharibi H, Iloukhani H. conformational stability of bovine serum albumin by cationic surfactant treatments. Physics and Chemistry of Liquids. 2003;41:509-17.
 32. Breyse P, Couser WG, Alpers CE, Nelson K, Gaur L, Johnson RJ. membranous nephropathy and formaldehyde exposure. Ann Intern Med. 1994;120:396-7.
 33. Chen JS, Chen A, Chang LC, Wayne Chang WS, Lee HS, Lin SH, Lin YF. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin: antigen dose~response relations and strain differences.

- Nephrol Dial Transplant. 2004;19:2721-8.
34. Barbara Y. John W. H. 기능적 관점에서 본 조직학. 서울: 범문사; 2004, p. 216, 294.
35. 대한내과학회. Harrison's 내과학 Vol 2. 서울: 도서출판MIP; 2003, p. 162.