

黃連이 Cationic Bovine Serum Albumin 투여로 유발된 Membranous Nephropathy Mouse Model에 미치는 영향

채은영, 조충식*, 김철중

대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

Effects of the Coptidis Rhizoma Extract on the Membranous Nephropathy induced by Cationic Bovine Serum Albumin in Mice

Eun-young Chae, Chung-Sik Cho*, Cheol-Jung Kim

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

ABSTRACT

Objectives : The current treatment regimens for patients with nephrotic syndrome due to membranous nephropathy(MN) are based on steroids or immunosuppressive therapy with the aim of reducing proteinuria and improving outcome. Although these treatments attenuate the deterioration of renal function in MN patients, it has been suggested that all are burdened by significant toxicity. Therefore, more specific and less toxic therapies are needed. This study was to evaluate the effects of Coptidis Rhizoma Extract(CRE) on the MN induced by cBSA in mice.

Methods : Mice were divided into 4 groups. One group named for 'Normal' was injected with a saline solution not to be immunized. The rest groups were treated as follows; After mice were immunized with 0.2 mg of cBSA and Freund's complete adjuvant one time every two weeks for 6 weeks, they received intra-peritoneal injection of 10 mg/kg of cBSA daily for 4 weeks. Also, they were divided into 3 groups. The first named for 'Control' was not given CRE. The second for 'CRE-250' was given oral administration of 250 mg/kg of CRE daily for 4 weeks. The third for 'CRE-500' was given 500 mg/kg of CRE. All of mice were sacrificed 4 weeks after the first immunization. We measured a body weight and 24hrs proteinuria as well as serological analysis. The morphologic changes of renal glomeruli were also observed with a light microscope and an electron microscope.

Results : The levels of 24 hrs proteinuria, triglyceride, IgG, IL-6 were significantly decreased in both CRE groups. And the level of IgM was significantly decreased in CRE-250 group. In histological findings of kidney tissue, thickening of GBM and deposition of electron-density were considerably decreased in both CRE groups.

Conclusions : The present study suggests that CRE is highly effective when treating mice with MN induced

* 교신저자 : 조충식, 충남 천안시 두정동 621번지 대전대학교 부속천안한방병원 신계내과
· Tel : 041-521-7531 · E-mail : choo1o2@chol.com
· 접수 : 2009년 2월 16일 · 수정 : 2009년 3월 20일 · 채택 : 2009년 3월 20일

by cBSA. More clinical data and studies are to be done for efficient application.

Key words : Coptis chinensis Extract(CRE), membranous nephropathy(MN), cationic bovine serum albumin(cBSA)

서론

막성 신증(membranous nephropathy, MN)은 사구체 상피세포하의 면역복합체의 침착으로 상피세포의 죽돌기가 융합되고 기저막이 비후되는 질환으로¹⁾, 성인 신증후군의 30-40%를 차지하며, 말기 신부전의 중요한 원인이 된다²⁻⁴⁾.

MN의 80%는 원발성 사구체 신염으로 아직 정확한 병인은 알려져 있지 않으나, 유전적 소인과 밀접한 관련이 있는 것으로 추측되며, 면역형광현미경상에서 주로 IgG가 사구체 기저막을 따라 과립상으로 침착되고, IgA, IgM 등도 다양한 빈도로 나타난다^{5,6)}.

MN의 증상은 임상경과에 따라 다양하게 나타나며, 일반적으로 80% 이상의 환자에서 부종, 저알부민혈증, 고지혈증, 단백뇨 등의 신증후군 증상이 보이고, 나머지는 단순성 단백뇨로 발현된다^{1,5)}.

MN은 전체적으로 20-30% 정도 자연관해되어 장기예후가 좋은 편이므로 보존적 치료가 권장되고 있으나^{4,5)}, 증상이 있는 신증후군 환자 및 진행성 신부전의 위험인자가 있는 환자에게는 면역억제요법을 사용한다^{7,8)}. 그러나 상당수의 약제 부작용이 동반되거나 장기적인 추적관찰이 필요하므로⁹⁻¹³⁾, 기존의 부작용이 적으면서 효과적인 약제개발이 요구되고 있는 실정이다.

MN은 한의학적으로 ‘水腫’, ‘虛勞’, ‘浮腫’, ‘尿濁’ 등의 범주에 속하고^{1,14)}, 脾, 肺, 腎 三臟의 機能失調와 관련이 있으며^{15,16)}, 病程과 症狀에 따라 다양한 治法이 활용되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 특히 병리조직학적 소견상 기저막 상피세포하 면역복합체의 침착은 濕熱이 膠着되어 瘀血이 된 단계로 보고 活血化瘀, 清熱解毒法이 중시되고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 또한 최근 실험연구에서 清熱解毒, 活血利濕의 효능이 있는 複腎湯²⁰⁾이 신혈류량을 증가시키고, 면역반응을 개선시켜 신사구체 상피세포에 면역복합물 침착을 억제시킨다고 보고되었으며, 膜性腎炎方²¹⁾에 清熱解毒의 效能이 있는 柴胡, 半枝蓮, 芙蓉葉을 가하여 MN에 유의한 효과가 있었다는 보고²²⁾ 등이 있었다. 이에 清熱解毒의 작용이 있는 黃連이 MN에 대하여 유효한 약물이 될 것이라고 생각되어 황련을 대상으로 본 실험을 시행하였다.

黃連(Coptidis Rhizoma)^{23,24)}은 清熱燥濕, 瀉火解毒하는 대표적인 약물로서 실험적으로 항균작용^{25,26)}, 항염작용²⁷⁾, 항암작용^{28,29)} 및 혈당과 혈청콜레스테롤의 감소효과³⁰⁾ 등이 있는 것으로 밝혀졌지만 MN에 대한 연구는 접하지 못하였다.

이에 저자는 黃連이 MN에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 cationic bovine serum albumin (cBSA) 투여로 MN이 유발된 mouse에 황련추출물을 투여하여 체중, 24시간 단백뇨, 혈청학적 변화와 면역학적 기전 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 동물

실험에 사용된 mouse는 (주)중앙실험동물에서 8주령의 평균 31±1.4 g의 ICR계 female을 구입하여, 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 본 실험에 사용하였다. 물과 사료는 충분히 자유롭게 먹도록 하였으며, 사료성분은 조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제가 첨가되지 않은 고품사료(삼양사 Co.)를 사용하였다. 실험동물은 온도가 22±2°C로 일정하게 유지되고, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명되며, 12시간은 조명이 차단되는 conventional system으로 조절되는 환경에서 사육하였다.

2) 약물

본 실험에 사용된 黃連(Coptidis Rhizoma : CR)은 대한약전 9개정에 부합하는 것으로 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

실험에 사용된 시약은 bovine serum albumin

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

(2) 기기

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-Rad (USA)사의 수평 전기영동장치를 사용하였고, cBSA의 크기를 알아보기 위하여 Bio-Rad (USA)사의 5% SDS-PAGE 수직 전기영동장치를 사용하였다. 또한 단백뇨(proteinuria)의 측정은 Bayer (Germany)사의 Albustix[®], cytometer는 FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), ELISA 판독기는 Molecular Devices (Minnesota, USA)사 제품을 사용하였다. 실험동물의 신장조직 시료는 Serotec (USA)사의 cooling microtome (Washington DC, USA)을 사용하였으며, metabolic cage는 Techniplast(Varese, Italy)사의 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

黃連 400 g을 증류수 2,000 ml에 가해 열탕 추출기로 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압증류장치(rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결건조기(freeze dryer)로 완전 건조하여 24 g (수거율 : 6%)의 황련추출물(Coptidis rhizoma extract, 이하 CRE)을 얻어 냉동 보관하고 적당 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) Antigen, cationic BSA의 준비

Cationic BSA(cBSA, Sigma Chemical Co, USA)는 Border의 방법³¹⁾을 수정하여 BSA를 화학적으로 양이온화하여 제조하였다. 20 g의 BSA를 증류수 12 ml에 녹이고, 다른 한편으로 20 ml의 증류수에 2.68

ml의 EDA를 섞고 HCl을 가해 pH 4.75의 anhydrous EDA를 만들어 25℃로 식혔다. 이 EDA solution을 앞서 준비한 BSA solution에 넣어 섞고, 곧이어 EDC 150 mg을 넣고 4시간 동안 계속 저어주었다. 만들어진 용액은 1 ml EconoPac High S cationic ion-exchange column (Bio-Rad, CA)에 가하고 pH 6.8 phosphate buffer (40 mM)로 washing하여 양이온화되지 않은 BSA를 제거한 후 pH 10.6의 phosphate buffer (40 mM)로 elution하였다. 5% thin-layer polyacrylamide gel에 제조된 cBSA와 control BSA를 loading하여 수평 전기영동장치(Bio-Rad, USA)에서 cBSA의 isoelectric point (pI)를 측정하였다. 최종 단백질 농도는 BCATM protein assay kit (Pierce, USA)로 spectrophotometer 540 nm에서 optical density (OD)를 측정하여 계산하였다.

3) MN model 유발 및 검액 투여

8주령의 female ICR계 mouse를 각 군당 10마리씩 하여 정상군(non-treated group, Normal), 대조군(MN-induced by cBSA group, Control), CRE-250군(MN-induced by cBSA and CRE-low dose treated group, CRE-250), CRE-500군(MN-induced by cBSA and CRE-high dose treated group, CRE-500) 등의 4군으로 나누어, 정상군을 제외한 3군에 Freund's complete adjuvant와 섞은 0.2 mg의 cBSA를 6주간 총 3회(1회/2주)에 걸쳐 복강투여(intra-peritoneal injection)하였다. 정상군은 antigen대신에 saline을 같은 방법으로 주사하여 면역화시키지 않았다. 면역화 6주 후부터 4주간 10 mg/kg의 cBSA를 정상군을 제외한 3군에 매일 복강 투여하여 지속적으로 MN을 유발하는 동시에, CRE-250군에는 黃連 250 mg/kg를, CRE-500군에는 黃連 500 mg/kg를 매일 경구 투여하여 MN에 대한 黃連의 치료 효과를 관찰하였다. 4주간의 투여 후 모든 실험동물들을 metabolic cage에 두어 24시간 동안 물 공급을 자유롭게 하면서 절식하여 소변을 채취하였다. 소변채취 후 희생시켜 blood, kidney, spleen sample 등을 수거하여 분석에 사용하였다.

4) 체중측정

실험시작 전 평균체중을 구하고 그 후 면역화시키는 6주 동안은 3주마다, 그 후의 4주 동안에는 2주마다 체중을 측정하여 체중변화를 관찰하였다.

5) 24시간 단백뇨(24hrs proteinuria) 측정

Mouse의 urine은 6주간의 면역화 과정과 4주간의 약물투여 과정을 거친 후 각 실험군별로 최종의 urine을 수거하여 단백뇨(proteinuria)의 배출상황을 관찰하였다.尿는 24시간 동안 metabolic cage에서 수거하여 -20°C 에서 보관하였으며 후에 Albustix[®] (Bayer, Germany)을 이용하여 TBPB의 변색점 변화에 의해 단백뇨 수치를 측정하였다.

6) 채혈 및 혈청분석

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

7) 신장조직의 적출 및 보관

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

8) Enzyme-linked immuno-sorbent assay

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

9) 광학현미경 관찰

Embedding solution에서 freezing시켜 놓은 조직을 rotary microtome을 이용하여 20 μm 두께로 dissection하여 슬라이드를 만들고 -80°C 에 보관하였다. 준비된 슬라이드를 물에 넣어 rehydration 시킨 후, hematoxylin에 1분간 담가 nuclear를 염색시키고, 흐르는 물에 몇

분 동안 washing 한 후, eosin에 1분간 담가 cytoplasm을 염색시킨 다음, 다시 흐르는 물에 몇 분 동안 washing 하였다. 이어 70%, 95%, 100%의 ethanol series에 연차적으로 담가 dehydration 시키고, xylene에 1분간 반응시켜 안정화시킨 후, mounting solution을 올리고 cover glass로 슬라이드를 봉입하고 광학현미경 (Labophot-2, Nikon, Japan)으로 400배의 배율에서 조직 상태를 관찰하였다.

10) 전자현미경 관찰

3% glutaldehyde에 fixing된 kidney tissue를 Carson-Milonig's solution으로 washing 한 후, 1% aqueous osmium tetroxide로 2차 고정시킨 다음, alcohol series로 dehydration시키고, Epon resing에 담가 굳히고, diamond knives로 ultrathin section을 한 후, uranyl acetate와 lead citrate로 double staining을 시도하였다. 준비된 tissue는 전자현미경(JEM-1010, Jeol, Japan)에서 관찰되었다.

11) 통계분석

실험 결과들은 mean \pm standard deviation으로 기록하였고, Student's T-test를 이용하여 유의성을 검증하였다. 양방 검정 유의도(Two-tail p value)는 $p < 0.05$ 수준으로 하였다.

성적

1. 체중에 미치는 영향

대조군에서는 정상군에 비하여 급격한 체중 증가를 보였으며, CRE-250군, CRE-500군에서는 모두 대조군에 비하여 체중이 감소하였으나 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

2. 24시간 단백뇨에 미치는 영향

단백뇨 수준의 변화를 살펴보면, 정상군의 24시간 단백뇨 지수(index of 24hrs proteinuria)는 0.2 ± 0.3 , 대조군은 3.3 ± 1.1 이었으며, 黃連을 투여한 CRE-250군은 0.4 ± 0.7 ($p < 0.001$), CRE-500군은 0.2 ± 0.3 ($p < 0.001$)으로 모두 단백뇨 지수가 level 1.0 이하 수준으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

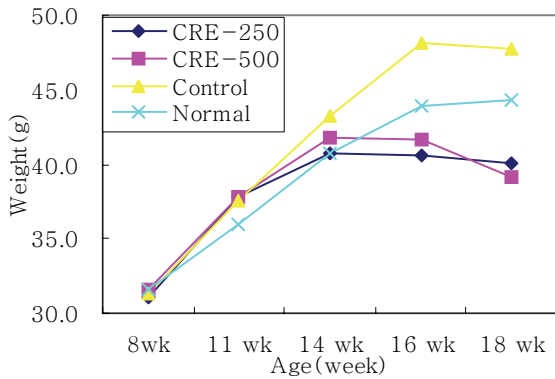


Fig. 1. Effects of CRE on the body weight in cBSA-induced membranous nephropathy mouse
Data represent mean±standard deviation.
Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
CRE-500 : treated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

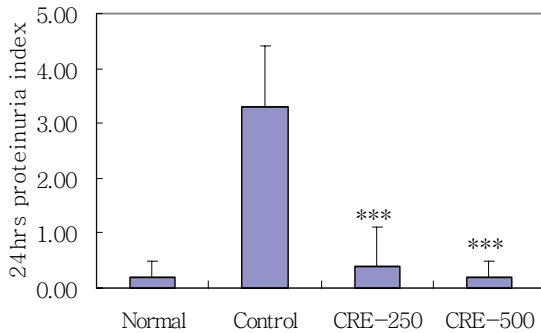


Fig. 2. Effects of CRE on index of 24hrs proteinuria in cBSA-induced membranous nephropathy mouse
0 : Trace or negative.
1 : 0.30 g/L or 30 mg/dl.
2 : 1.0 g/L or 100 mg/dl.
3 : 3.0 g/L or 300 mg/dl.
4 : ≥ 20.0 g/L or ≥ 200 mg/dl.
Data represent mean±standard deviation.
Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract(250 mg/kg, p.o) group.
CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract(500 mg/kg, p.o) group.
Statistical significance *** : $p < 0.001$ vs. Control.

3. 혈청학적 변화에 미치는 영향

혈청 중 albumin 농도는 정상군에서는 2.90±0.12 g/dl였고, 대조군에서는 2.26±0.60 g/dl로 정상군에 비하

여 감소하였고, CRE-250군에서는 2.61±0.63 g/dl, CRE-500군이 2.98±0.76 g/dl로 모두 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

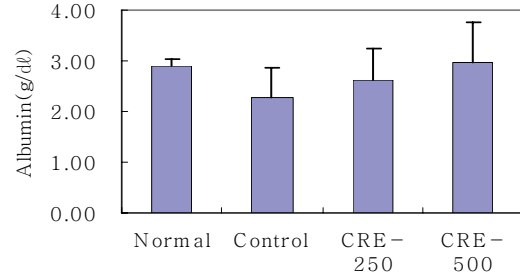


Fig. 3. Effects of CRE on serum albumin level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse
Data represent mean±standard deviation.
Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.

혈청 중 total cholesterol 농도는 정상군에서는 98.14±11.28 mg/dl였고, 대조군에서는 124.83±27.04 mg/dl로 정상군에 비하여 증가하였으며, CRE-250군에서는 95.60±20.66 mg/dl, CRE-500군에서는 89.00±22.68 mg/dl로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

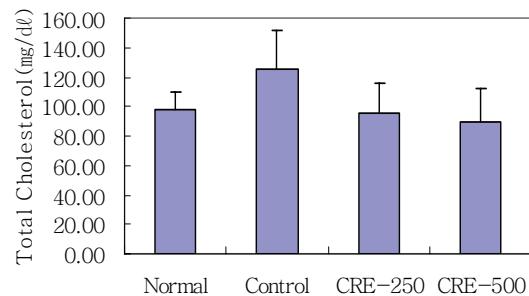


Fig. 4. Effects of CRE on serum cholesterol level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse
Data represent mean±standard deviation.
Normal : non-treated group.
Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.

혈청 중 triglyceride 농도는 정상군에서는 37.43±9.68 mg/dl였고, 대조군에서는 73.80±10.89 mg/dl로 정상군에 비하여 증가하였고, CRE-250군에서는 36.80±

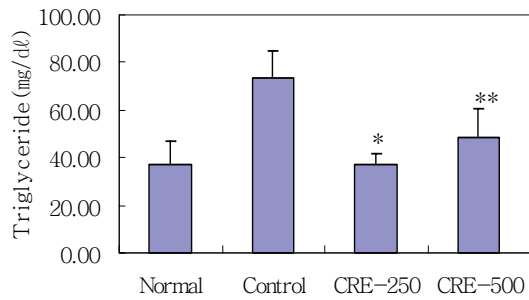


Fig. 5. Effects of CRE on serum TG level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse

Data represent mean±standard deviation.
 Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
 CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
 CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.
 Statistical significance * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs. Control.

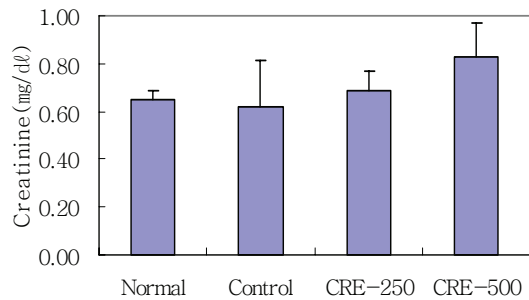


Fig. 6. Effects of CRE on serum creatinine level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse

Data represent mean±standard deviation.
 Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
 CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
 CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.

4.90 mg/dl ($p < 0.05$), CRE-500군이 48.67±11.86 mg/dl ($p < 0.01$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

혈청 중 creatinine 농도는 정상군에서는 0.65±0.04 mg/dl였고, 대조군에서는 0.62±0.19 mg/dl로 정상군에 비하여 감소하였으며, CRE-250군에서는 0.69±0.08 mg/dl, CRE-500군에서는 0.83±0.14 mg/dl로 모두 대조군과 비교하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

혈청 중 BUN 농도는 정상군에서는 29.33±3.41 mg/dl였고, 대조군에서는 36.73±5.63 mg/dl로 정상군에 비하여 증가하였으며, CRE-250군에서는 25.74±4.88 mg/dl,

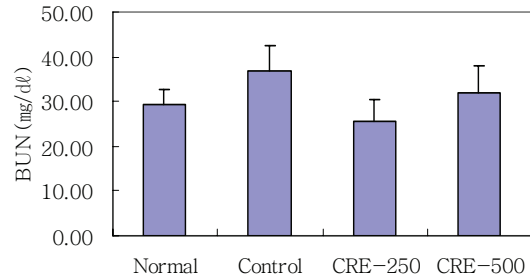


Fig. 7. Effects of CRE on serum BUN level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse

Data represent mean±standard deviation.
 Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
 CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
 CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.

CRE-500군에서는 31.98±5.86 mg/dl로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

4. 혈청 IgG, IgM, IgA에 미치는 영향

혈청 중 IgG 농도는 정상군에서는 163.4±23.4 $\mu\text{g/dl}$ 였고, 대조군에서는 201.4±9.9 $\mu\text{g/dl}$ 로 정상군에 비하여 증가하였으며, CRE-250군에서는 165±7.2 $\mu\text{g/dl}$ ($p < 0.001$), CRE-500군에서는 165.5±13.3 $\mu\text{g/dl}$ ($p < 0.001$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

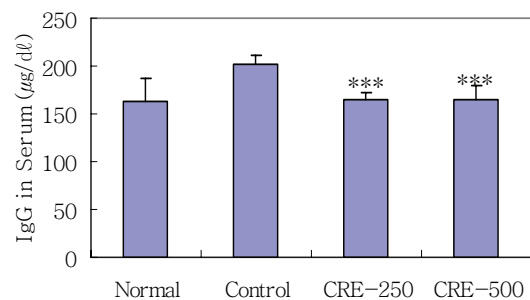


Fig. 8. Effects of CRE on serum IgG level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse

Data represent mean±standard deviation.
 Normal : non-treated group.
 Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group.
 CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group.
 CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.
 Statistical significance *** : $p < 0.001$ vs. Control.

혈청 중 IgM 농도는 정상군에서는 102.2±37.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 였고, 대조군에서는 254.5±65.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 정상군에 비하여 증가하였고, CRE-250군에서는 151.9±67.6 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ($p < 0.05$)로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, CRE-500군에서는 219.4±70.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

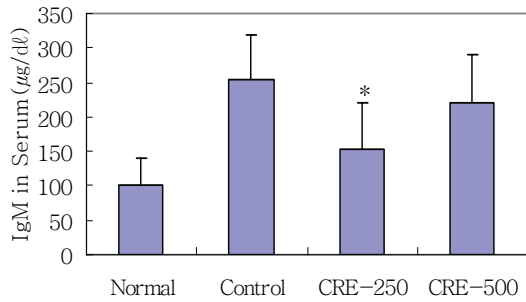


Fig. 9. Effects of CRE on serum IgM level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. Data represent mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group. CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group. CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group. Statistical significance * : $p < 0.05$ vs. Control.

혈청 중 IgA 농도는 정상군에서는 628.5±178.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 였고, 대조군에서는 742.7±308.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 정상군에 비하여 증가하였으며, CRE-250군에서는 516.2±168.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$, CRE-500군에서는 511±116.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

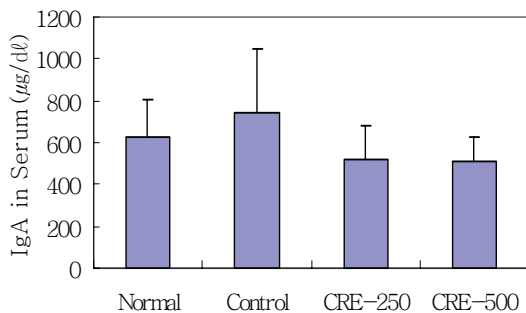


Fig. 10. Effects of CRE on serum IgA level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. Data represent mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group. CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group. CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.

5. 혈청 TNF- α , IL-6에 미치는 영향

혈청 중 TNF- α 의 농도는 정상군에서는 99.1±25.3 pg/ml였고, 대조군에서는 112.4±24.0 pg/ml로 정상군에 비하여 증가하였으며, CRE-250군에서는 100.5± 23.4 pg/ml, CRE-500군에서는 109.4±42.4 pg/ml로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

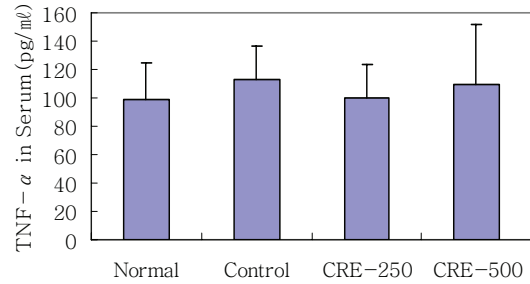


Fig. 11. Effects of CRE on serum TNF- α level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. Data represent mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group. CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group. CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group.

혈청 중 IL-6 농도는 정상군에서는 62.4±35.8 pg/ml였고, 대조군에서는 138.8±13.6 pg/ml로 정상군에 비하여 증가하였으며, CRE-250군에서는 89.1±18.6 pg/ml ($p < 0.01$), CRE-500군에서는 78.1±22.6 pg/ml ($p < 0.01$)로 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

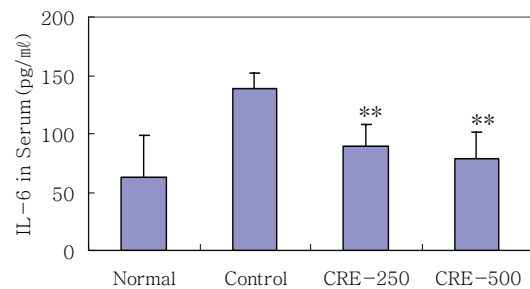


Fig. 12. Effects of CRE on serum IL-6 level in cBSA-induced membranous nephropathy mouse. Data represent mean±standard deviation. Normal : non-treated group. Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group. CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group. CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group. Statistical significance ** : $p < 0.01$ vs. Control.

6. 조직병리학적 변화에 미치는 영향

1) 광학현미경적 소견

정상군은 사구체 기저막의 비후가 나타나지 않았고, 대조군은 cBSA와 면역 복합체의 침착으로 추정되는 사구체 기저막의 비후가 관찰되었으며, CRE-250군과 CRE-500군은 대조군에 비하여 사구체 기저막의 비후가 감소되어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 13).

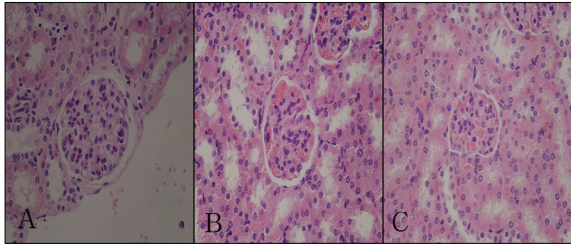


Fig. 13. H&E staining of renal glomeruli in cBSA-induced membranous nephropathy mouse

A. Control : treated with cBSA (10mg/kg, i.p) group.
B. CRE-250 : treated with cBSA (10mg/kg, i.p) and CR extract (250mg/kg, p.o) group.
C. CRE-500 : treated with cBSA (10mg/kg, i.p) and CR extract (500mg/kg, p.o) group.

Control shows diffuse thickening of glomerular basement membrane.

H&E staining : original magnification $\times 400$.

2) 전자현미경적 소견

정상군에서는 사구체 기저막에서의 전자 치밀 침착이 나타나지 않았고, 대조군에서는 기저막을 따라 침착된 전자가 관찰되었으며, CRE-250군과 CRE-500군은 모두 대조군에 비하여 전자 치밀 침착이 감소하였다(Fig. 14).

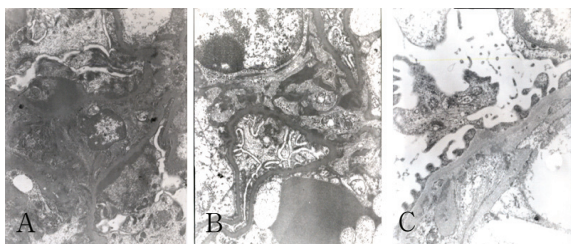


Fig. 14. Representative renal histopathological finding in cBSA-induced membranous nephropathy mouse

A. Control : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) group ($\times 17,000$).
B. CRE-250 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (250 mg/kg, p.o) group ($\times 17,000$).
C. CRE-500 : treated with cBSA (10 mg/kg, i.p) and CR extract (500 mg/kg, p.o) group ($\times 25,500$).

Electron micrograph of control shows electron-dense deposits of the glomerular basement membrane (GBM).

고찰

MN은 면역 복합체 질환의 하나로, 면역 복합체가 사구체 기저막의 상피하(subepithelial space)에 침착되어 광학현미경상 기저막의 비후를 보이는 것이 특징이다¹⁾. 이러한 침착은 IgG, IgA, IgM과 C₃, C5b-9 등의 면역글로불린과 보체로 구성된 침착물이 관찰되기 때문에 만성 항원-항체 매개성 질환으로 알려져 있다^{2,5)}.

MN은 성인 신증후군의 30-40%, 소아 신증후군의 약 5%를 차지하며, 주로 40대에 가장 많이 발생하고, 남녀비가 2:1로 남자에서 호발한다²⁻⁵⁾.

MN의 약 80%는 선행되는 질환이나 요인없이 특발성으로 발생하며, 나머지는 전신성 홍반성 낭창, 일부의 만성감염, 고형암, 중금속의 노출, 약제 등에 속발하여 이차성으로 발생한다^{1,2,5,8)}.

사구체의 병변은 신염이 진행되는 정도에 따라 다르며, 초기에는 광학현미경상에서 정상으로 보이나 점차 진행됨에 따라 모세혈관이 두꺼워지고, 기저막 물질이 침착된 면역 복합체사이로 자라서 들어가거나 둘러싸서 생기는 뿔모양(spike)이나 구멍(hole)이 관찰된다^{4,5)}.

MN의 병인론은 다양하게 제시되고 있으나 HLA 연구에서 유전적 소인과 밀접한 관계가 있는 것으로 추측되며^{2,6)}, 그 기전은 내재된 사구체 항원에 대한 순환 항체가 결합하여 자체적으로 면역 복합체가 생성되거나, 혈중 순환 면역 복합체가 사구체에 국한되어 침착되는 것으로 추정되고 있다^{2,6,32)}. 또한 이러한 면역 침착물은 신사구체 상피세포를 자극하여 세포외 기질 단백질의 mRNA 발현을 증가시키고, 단백을 과도하게 합성, 분비시킴으로써 기저막을 비후시키는 것으로 보고되고 있다³³⁾.

MN의 증상으로는 경미한 소변이상부터 신증후군까지 다양하게 발현하고, 임상경과도 신증후군의 자연관해와 재발 및 만성신부전으로 진행되는 등 매우 다양한 경과를 보인다³⁴⁾.

MN은 장기예후가 좋은 편이어서 일반적으로 보존적 치료가 권장되고 있으나, 증상이 있는 신증후군 환자 및 진행성 신부전의 위험인자가 있는 환자(높은 혈청creatinine치, 10 g 이상의 단백뇨, 고지혈증, 증가된 microglobulin 수치, 세뇨관간질의 병변 등)의 경우 스테로이드제제 및 cyclophosphamide (CYC), cyclosporineA, mycophenolatemofetil (MMF) 등의 면역억제요법을 사용하기도 한다^{7,8,13)}. 그러나 스테로

이드의 장기간 투여시 감염, 대퇴골두 무형성괴사 등의 부작용이 발생하고^{9,10)}, CYC의 투여에 의해 불임, 골수억제, 이차성 악성 종양의 발생위험성이 증가되므로^{11,12)} 기존의 부작용이 적으면서 효과적인 약제 개발이 요구되고 있는 실정이다.

MN은 임상증상을 고려하면, 한의학에서 水腫, 虛勞, 浮腫, 尿濁 등¹⁴⁾의 범주에 속하고, 脾, 肺, 腎 三臟의 기능실조와 관련이 있으며¹⁵⁾, 王 등¹⁶⁾은 濕熱이 MN의 주요 병인이 된다고 보았다. 病程과 症狀에 따라서는 脾虛濕熱, 脾氣虛弱, 水濕逗留, 脾腎陽虛, 水濕泛濫, 氣陰兩虛, 濕瘀阻絡, 肝腎陰虛, 濕熱留變 등으로 辨證하고, 建脾益氣, 利水滲濕, 溫腎健脾, 通陽利水, 益氣養陰, 活血清利, 滋補肝腎, 清利濕熱 등의 다양한 治法이 활용되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 특히 陳은 기저막 상피세포 하 면역 복합체의 침착을 濕熱이 膠着되어 瘀血이 된 상태로 보고 活血化癥藥과 清熱解毒藥을 중시하였으며¹⁷⁾, 張 등^{18,19)}의 연구에서도 化癥解毒, 清熱解毒法이 신기능을 개선시킨다고 보고하였다.

본 실험에 사용한 黃連(Coptidis Rhizoma)은 性이 寒 無毒하고 味는 苦하며 berberine, coptisine, worenine 등의 alkaloid 성분을 다량 함유하고 있다^{23,24)}. 또한 心, 肝, 膽, 脾, 胃, 大腸으로 歸經하여 清熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있고^{23,24)}, 실험적 연구를 통해 항균작용^{25,26)}, 항염작용²⁷⁾, 항암작용^{28,29)} 및 혈당과 혈청콜레스테롤의 감소³⁰⁾ 등이 보고되었다.

이에 저자는 陳 등¹⁷⁻¹⁹⁾의 이론에 근거하여 清熱解毒작용이 있는 黃連이 MN에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 본 실험을 시행하였다.

일반적으로 MN 실험동물 모델 제작 방법의 하나로 양이온을 띠는 항원을 주사하여 사구체 기저막의 음이온을 띠는 부위와 결합시킨 후 항체를 주사하거나 또는 항체가 능동적으로 만들어지도록 하여 면역 복합체성 사구체 신염을 만든다^{2,35)}. 이러한 방법으로 cationic bovine serum albumin(cBSA)을 반복적으로 투여하여 실험동물을 제작한다³⁶⁾.

이에 본 연구에서는 예비실험에서 본래 pH값이 4.5-5.1 정도인 bovine serum albumin (BSA)을 양이온화(cationic)하여 pH 9.5이상으로 변화시켜 cBSA를 만들었고, 이 cBSA를 음이온화 되어있는 사구체 기저막에 침착하게 한 뒤 cBSA를 항원으로 작용하게 하여 MN을 유발하였다. 이러한 cBSA를 이용한 mouse 모델은 MN 유발실험에 용이하고 약물치료실험을 하기에 좋은 장점이 있으므로³⁷⁾, 본 실험은 cBSA를 이용하여 MN을 유발한 mouse 모델을 사용하였다.

이상과 같은 방법으로 cBSA로 유발된 MN의 동물 모델에 CRE를 투여하여 나타난 성적을 고찰해 본 결과는 다음과 같다.

체중의 변화를 살펴보면 cBSA로 유발된 MN의 동물 모델에서 대조군은 정상군에 비하여 체중 증가를 보였으며 CRE 투여군은 정상군과 대조군에 비하여 체중이 감소하였으나 유의성은 없었다.

신증후군에서 단백뇨의 발생은 단백질에 대한 사구체 모세혈관의 투과성이 증가되기 때문이며, 그 기전은 두 가지로 나누어 charge-selective barrier결과 size-selective barrier 설이 있다^{32,38)}. 전자는 사구체 모세혈관이 음이온을 띠고 있어서 음이온을 가지는 혈청 albumin이 사구체 기저막을 통과하기 어렵다는 것으로 사구체 기저막의 음이온이 없으면 단백질이 나타나게 된다³⁸⁾. 후자는 어느 정도 이상 크기의 물질은 사구체 기저막을 통과하지 못한다는 것으로 상피세포가 벗겨지거나, 기저막에 틈이 생기거나, 세포 사이에 면역 복합체의 침착으로 세포 사이가 벌어진 경우 단백질이 나타날 수 있다³⁸⁾. 이러한 사구체 기저막의 charge-selective barrier 또는 size-selective barrier의 기능에 이상이 초래되거나, 혹은 두 기능 모두 이상이 있는 경우에 사구체성 단백뇨가 나타난다.

24시간 단백뇨는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이는 CRE가 면역복합체의 침착으로 인한 사구체의 투과성 손상을 회복시켜 소변으로의 단백질 배설을 감소시킨 것으로 생각한다.

신증후군에서 저albumin 혈증의 병태 생리를 보면 첫째 소변을 통한 다량의 단백손실이다. 둘째는 단백질의 이화작용의 증가이며 셋째는 간에서 albumin의 생산은 증가되는데 단백질의 섭취가 충분치 못한 경우이며, 장관을 통한 단백질 흡수부족도 이에 관여할 가능성이 있다^{32,38)}.

혈청 albumin 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다. 이는 CRE가 사구체의 투과성을 개선시켜 소변을 통한 단백질 손실을 억제함으로써 저albumin 혈증을 개선시킨 것으로 사료된다.

신증후군에서의 고지혈증은 cholesterol, phospholipid 및 triglyceride 등의 증가에 기인하며, 그 기전은 명확하게 알려져 있지 않지만, 저albumin 혈증이 간에서의 albumin 합성을 촉진할 때 lipoprotein, 특히 triglyceride를 많이 포함한 very low density lipoprotein (VLDL)의 합성도 항진시킨 결과라는 설

이 유력하다^{6,38}). 또 다른 가설로는 lipoprotein의 합성과 소모를 조절하는 lipoprotein lipase (LPL)이 소변으로 소실되어 말초에서의 지방분해가 장애를 얻어 VLDL이 증가한다는 것으로 그 정도는 저albumin 혈증의 정도와 비례한다^{6,38}).

혈청 total cholesterol 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 하지만 혈청 triglyceride 농도가 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소된 것은 CRE가 단백뇨의 감소와 저albumin 혈증의 개선에 도움을 줌으로써 이에 비례하는 고지혈증이 발생하는 기전에 영향을 미친 것으로 추측된다.

일반적으로 사구체 신질환의 병태생리를 살펴보면 사구체여과율의 감소를 보인다. 주로 사구체 모세혈관의 여과 표면적의 감소 및 내인성 수압 전도성의 변화, 즉 유효 여과압의 감소에 기인하며, 임상적으로는 혈청 BUN, 혈청 creatinine 농도를 측정함으로써 확인할 수 있다^{1,39}).

혈청 creatinine 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 혈청 BUN 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.

일반적으로 MN은 면역복합체에 의해 발생하며, 면역시스템 중 Th2 type과 연관된 체액성 면역 반응과 관련 된다³⁷). MN에서는 항체 중 IgG의 침착이 주된 소견이며 또한 IgM, IgA도 다양한 빈도로 동반된다^{6,32}).

IgG는 혈중 모든 Ig의 약 75% 정도를 차지하고, 면역반응의 초기보다는 1차적인 면역반응이 일어난 후 2차적인 면역반응 때 생산되어 활성화된다^{39,40}).

혈청 IgG 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이는 cBSA에 의해 MN이 유발됨으로써 IgG 농도의 증가가 나타났으나 CRE의 투여로 IgG 수치가 감소된 것으로 추정된다.

IgM은 분자량이 큰 거대글로불린으로 총 혈청 Ig의 5-10%를 차지하고 혈중에서의 농도는 낮으나 면역반응의 초기에 빠르게 증가하며 보체활성화능력이 강하다^{39,40}). IgA는 혈청 내 총 Ig의 10-15% 정도만을 차지하며 혈청 외의 눈, 코, 구강, 기도, 소화관 등의 분비물에 높은 농도로 포함되어 있는 대표적인 Ig이다^{39,40}).

혈청 IgM, IgA 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 감소하였으며, 특히 CRE-250군에서 IgM 농도가 유의성 있게 감소하였다. 이는 cBSA의 복강투여를 통해 면역화 되는 과정에서 증가한 IgA와 IgM이 CRE의 투여로 감소된 것으로 추정된다.

TNF- α , IL-6는 세포에서 분비되는 cytokines의 일종으로, 염증반응에 관여하는 단백활성 물질이다^{39,40}). TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 체내에서 생성되며 감염부위로 호중구와 단핵구의 보충을 자극하여 이 세포들로 하여금 미생물을 제거하게 하며 특히 사구체의 내피세포 염증을 작용을 한다⁴⁰). B-cell differentional factor로 알려진 혈청 IL-6는 주로 Th2가 방출하는 cytokine으로서 면역세포를 활성화시키고 항체생산을 촉진하는 작용을 하며 염증 정도를 나타내는 marker로 이용된다^{39,40}).

본 실험에서 TNF- α , IL-6 농도는 CRE 투여군에서 모두 대조군에 비하여 감소하였으며, 특히 IL-6를 유의성 있게 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 IL-6, TNF- α 농도의 감소는 CRE가 활성화된 림프구와 대식세포 등에 영향을 주어 염증반응 과정에서 만들어지는 염증성 cytokines의 발현을 억제하는 작용을 한 것으로 생각된다.

MN에서 신장의 조직병리학적 소견을 살펴보면, 광학현미경상에서는 세포성분의 증식없이 기저막이 비후되고, 전자현미경상에서는 전자 밀도 침착(electron dense deposit)이 보이고 상피세포 족돌기의 소실이 특징이다^{4,38}). 본 실험에서 대조군은 이러한 사구체 기저막의 비후와 면역 복합체의 침윤 및 전자 밀도 침착이 관찰되었으며, CRE 투여군에서는 이러한 형태학적 변화가 대조군에 비하여 감소되어 나타났다. 이는 CRE가 면역 복합체의 침착을 억제하여 사구체 기저막이 비후되지 않도록 작용한 것으로 추정된다.

이상의 결과로부터 黃連추출물은 cBSA로 유발된 MN mouse에서 단백뇨의 감소, 혈청 albumin의 증가, 혈청 total cholesterol과 triglyceride 수치의 감소, 혈청 BUN 수치의 감소와 체액성 면역반응의 억제, IL-1 β , TNF- α 및 IL-6와 같은 염증관련 cytokines mRNA 발현 억제, 신장 조직의 병리적 비후 감소 등의 효능이 있었으며, MN의 임상 관해에 있어서 도움이 될 것으로 추정된다. 따라서 앞으로 임상치료에 있어서 MN에 대한 보다 많은 활용이 기대되고, 아울러 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론

cBSA로 유발된 MN mouse에 黃連추출물을 투여하여 체중, 24시간 단백뇨 및 혈액학적 변화와 면역 및 조직 병리학적 형태에 미치는 영향을 관찰한 결과

다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃連추출물은 모두 대조군에 비하여 24시간 단백질, 혈청 triglyceride 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
2. 黃連추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 IgG 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 黃連추출물은 250 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 IgM 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
4. 黃連추출물은 모두 대조군에 비하여 혈청 IL-6 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
5. 黃連추출물은 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 혈청 IL-1 β 의 mRNA 발현을 감소시켰다.
6. 黃連추출물은 모두 대조군에 비하여 광학현미경 소견에서 사구체 기저막의 비후를 감소시켰고, 전자현미경 소견에서도 전자 밀도 침착을 감소시켰다.

참고문헌

1. 두호경. 동의신계학. 서울 : 동양의학연구원 출판부. 1993 : 89, 238-42, 301, 305, 369-78, 393-6, 842, 852, 855, 915.
2. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 2004 : 676-78.
3. 이은주, 이상화, 원종진, 유정남, 안상준, 정제혁, 나서희, 안원석, 김성은, 김기현. 이차성 막성신병증의 원인 및 임상경과. 대한내과학회지. 2005 ; 68(4) : 408-16.
4. 김현철, 박성배, 박원균, 안기성, 임학. 통합강의를 위한 신장학. 서울 : 이퍼블릭. 2006 : 285-6, 299-300.
5. 해리슨번역판찬위원회. HARRISON'S내과학. 서울 : 도서출판 정담. 1997 : 1404.
6. 라신탭. 신장학. 서울 : 의학문화사. 1999 : 488-94.
7. 정운찬. 신장요로학. 서울 : 서울대학교 출판부. 2005 : 299-301.
8. Deegens JK, Wetzels JF. Membranous nephropathy in the older adult: epidemiology, diagnosis and management. *Drugs Aging*. 2007 ; 24(9) : 717-32.
9. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med*. 1993 ; 119(12) : 1198-208.
10. Buchman AL. Side effects of corticosteroid

- therapy. *J Clin Gastroenterol*. 2001 ; 33(4) : 289-94.
11. Flanc RS, Roberts MA, Strippoli GF, Chadban SJ, Kerr PG, Atkins RC. Treatment of diffuse proliferative lupus nephritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis*. 2004 ; 43(2) : 197-208.
12. Du Buf-Vereijken PW, Branten AJ, Wetzels JF. Cytotoxic therapy for membranous nephropathy and renal insufficiency: improved renal survival but high relapse rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 ; 19(5) : 1142-8.
13. 장은희, 도연실, 최소연, 김범, 김정아, 김민옥 등. 중증 막성 신병증과 미만성 증식성 루푸스 신염에서 Mycophenolate Mofetil 치료 경험. 대한신장학회지. 2005 ; 24(5) : 764-71.
14. 陽曉. 原發性膜性腎病的治療. 中國中西醫結合腎病雜誌. 2002 ; 3(10) : 614-16.
15. 沈慶法, 執行. 中醫臨床腎臟病學. 上海 : 上海科學技術文獻出版社. 1997 : 186-90.
16. 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 ; 300-9.
17. 陳以平. 腎病的辨證與辨病治療. 北京 : 人民衛生出版社. 2003 : 232-45.
18. 張鋒. 黃九香教授治療特發性膜性腎病的經驗. 中國中西醫結合腎病雜誌. 2002 ; 3(12) : 689-90.
19. 楊慧玲. 中醫藥治療膜性腎炎體會. 山東中醫雜誌. 2006 ; 25(7) : 492-3.
20. 何爲民, 張文霞. 複腎湯對家兔膜性腎病的實驗觀察. 天津醫科大學學報. 1999 ; 5(4) : 70-2.
21. 김재형, 조충식, 김철중. 膜性腎炎方이 Cationized Bovine Serum Albumin투여로 유발된 Mouse의 Membranous Nephropathy에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2007 ; 24(4) : 163-80.
22. 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.
23. 전국한의학대학교 본초학 교수. 本草學. 서울 : 永林社. 2000 : 180-1.
24. 대전대학교 한의과대학 9기졸업준비위원회 공역. 國譯 湯液本草. 서울 : 대성문화사. 1996 : 165-7.
25. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, Cha JD, Kim HK, Lee YE, Choi NY, You YO. Antimicrobial

- activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Food*. 2005 ; 8(4) : 454-61.
26. 신정인, 서운교. 黃連의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 효과. *대한한방내과학회지*. 2003 ; 24(2) : 269-82.
27. 이연아, 홍승재, 이상훈, 박은경, 김경수, 한정수, 유명철, 양형인. 黃連추출물의 항염효과. *경희의학*. 2007 ; 23(1) : 21-9.
28. Kettmann V, Kosfálová D, Jantová S, Cernáková M, Drímal J. *In vitro* cytotoxicity of berberine against HeLa and L1210 cancer cell lines. *Pharmazie*. 2004 ; 59(7) : 548-51.
29. Wang GP, Tang FQ, Zhou JP. Effect of *Coptis Chinensis* compound on the gene expression in transplanted tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma cell line of CNE1 by cDNA microarray. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2003 ; 28(4) : 347-52.
30. Yuan L, Tu D, Ye X, Wu J. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of *Coptidis Rhizoma* inflorescence. *Plant Foods Hum Nutr*. 2006 ; 61(3) : 139-44.
31. Border WA, Ward HJ, Kamil ES, Cohen AH. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. *J Clin Invest*. 1982 ; 69(2) : 451-61.
32. 대한신장학회. 임상신장학. 서울 : 광문출판사. 2001 : 246.
33. 김정연, 김태숙, 홍혜경, 이현순. 사람의 기저막성 신증에서 신사구체 기저막의 비후 기전에 관한 연구. *대한신장학회지*. 2000 ; 19(5) : 857-66.
34. 윤설영, 이은주, 허정훈, 손영기, 한경근, 안원석 등. 특발성 막성 신병증의 임상경과. *대한내과학회지*. 2004 ; 66(2) : 175-85.
35. Song Y, Ma J, Li CL. Mechanical research on effects of yishenqing on membranous nephropathy. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2002 ; 27(7) : 537-40.
36. Cybulsky AV, Quigg RJ, Salant DJ. Experimental membranous nephropathy redux. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 ; 289(4) : F660-71.
37. Chen JS, Chen A, Chang LC, Chang WS, Lee HS, Lin SH, Lin YF. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine albumin: antigen dose-response relations and strain differences. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 ; 19(11) : 2721-8.
38. 서울대학교 의과대학. 신장학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1998 : 158-91.
39. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 서울 : 의학문화사. 2003 : 305-6, 716-20.
40. 강제성 역. 세포분자면역학. 서울 : 범문사. 2004 : 480, 487, 497.