

5/6 NTX로 유발된 만성 신부전 랫트에 대한 荊防地黃湯의 효과

하진호 · 최애련

대구한의대학교 한의과대학 사상체질과

Abstract

Efficacy of Hyeongbangjihwhang-tang on the 5/6 Nephrectomy(NTX) induced Chronic Renal Failure(CRF) Rats

Jin-Ho Ha, Ae-Ryun Choi

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany Univ.

Objectives

The object of this study was to observe the effects of Hyeongbangjihwhang-tang (HB; Soyangin prescription) on the 5/6 NTX induced CRF rats.

Methods

Each of Hyeongbangjihwhang-tang aqueous extracts 200mg/kg were orally administered once a day for 35 days from 4 weeks after 5/6 NTX surgery. Four groups, each of 8 rats per group were used in this study, were sham group, CRF group, α -Tocoperol group and HB group. Changes on the left remnant kidney weights, serum BUN, creatinine levels, caspase-3, PARP immunoreactivities were observed to nephroprotective effects, and relative immunomodulatory effects were monitored based on the changes of lymphatic organ weights and splenic cytokine contents. In addition, the changes on the kidney MDA, GSH contents and SOD, CAT activities were also calculated for antioxidant effects, and the effects on the CRF related cachexia were demonstrated based on the changes of body and epididymal fat pad weights, serum TG, TC, LDL and HDL levels.

Results and Conclusions

- 1) HB was significantly decreased the left remnant kidney weights, serum BUN, creatinine levels and caspase-3, PARP immunoreactivities.
- 2) HB was significantly increased lymphatic organ weights and splenic cytokine contents.
- 3) HB was significantly increased body and epididymal fat pad weights, and was significantly decreased serum TG, TC, LDL and HDL levels.
- 4) HB was significantly decreased MDA contents, and was significantly increased GSH contents and SOD, CAT activities.

The results obtained in this study suggest that HB significantly retarded immunosuppressions and cachexia related to the 5/6 NTX induced CRF through modulations of oxidative defense systems. Especially HB showed the highest favorable effects more than those of α -tocoperol.

Key Words: Hyeongbangjihwhang-tang, CRF, 5/6 NTX, Sasang Constitutional Medicine

I. 緒論

만성 신부전(chronic renal failure; CRF)이란 신장의 기능이 25% 이상 소실된 상태가 3개월 이상 지속적으로 유지되고, 원인을 제거하여도 회복되지 않아 비가역적으로 신장의 기능이 감소되어 나타나는 일련의 증상과 대사장애 등 종합적인 임상증상을 의미하며¹, 사구체의 기능적 이상 및 사구체 경화, 신장 간질의 섬유화, 신장 조직내 염증세포의 침윤 등 형태학적 이상을 동반하는 것으로 알려져 있어, 현재 가장 대표적인 만성 소모성 질환으로 인식되고 있다². 생활 습관의 변화와 수명 연장으로 당뇨병성 신증, 고혈압성 사구체 경화증, 만성 세구체 신염 등을 원인으로 하는 CRF 환자 수는 우리나라의 경우 2010년에는 2000년에 비해 약 2배 이상 증가하였다³.

CRF는 한의학적으로는 浮腫, 關格, 虛勞, 腎風, 六極, 虛損 등의 範疇에 속하며, 신장이 손상되어 氣化되지 못하므로 氣機不利하여 유발되는 병증이다².

한편 사상의학은 臟局의 기능 太少에 따라 太陽人, 少陽人, 太陰人, 少陰人으로 나누어 생리, 병리, 치료 및 예방을 달리 접근하는 체질의학으로, 『東醫壽世保元』⁴에서 이제마는 少陽人, 太陰人, 少陰人 편에서 모두 浮腫에 대해 언급하였다. 少陽人의 경우 浮腫이 처음 생겼을 때에 木通大安湯이나 혹은 荊防地黃湯에 木通을 加味해서 하루에 두 첩씩 쓰면 6~7일이내에 浮腫이 반드시 풀리며, 浮腫이 풀린 뒤 백일 이내에 반드시 荊防地黃湯에 木通을 가하여 조리할 것을 강조하였다^{4,6}.

荊防地黃湯은 少陽人 亡陰證에 쓰이는 대표적인 처방으로 『東醫壽世保元』⁴에 의하면 少陽人 表證의 身寒, 泄瀉, 亡陰證, 浮腫의 初結症, 頭腹痛, 凡虛弱者에 다양하게 활용되는 처방이라 하였다. 현재까지 荊防地黃湯에 대한 실험적 연구로는 이 등⁷의 노화쥐의 신장, 비장, 방광세포의 항산화에 대한 연구, 박 등⁸의 노화동물의 치매치료에 대한 연구, 정 등⁹의 사염화탄소 장기투여로 유발된 백서의

간경변 예방에 대한 연구, 이 등¹⁰의 글리세롤로 유발된 흰쥐의 급성신부전에 대한 연구 및 성 등¹¹의 형방지황탕으로부터 분리된 HTI의 항진균활성에 대한 연구가 알려져 있으며, 5/6 신절제(nephrectomy; NTX)로 CRF를 유발시킨 동물에 사상체질처방을 투여하여 연구를 한 보고는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 본 연구에서는 사상의학에서 浮腫, 虛勞 등의 CRF와 유사한 병증에 사용된 荊防地黃湯의 CRF에 대한 효과를 5/6 NTX로 유발된 CRF 랫트를 이용하여 평가하고자 하였다. 실험결과는 대표적인 항산화제로 5/6 NTX로 유발된 CRF에 유효한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는 α -tocopherol¹² 투여군과 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

본 실험에 사용된 모든 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animal¹³ 및 대구한의대학교 실험동물윤리위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

1) 荊防地黃湯 물 추출물(이하HB)

본 실험에 사용된 약제는 약업사(제천한방약초, 제천, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용 하였으며, 본 실험에 사용된 荊防地黃湯은 동의수세보원에 근거하여 각 1첩 분량의 조성은 Table 1과 같다. 각각 선정된 2첩 분량의 약제를 취하여 정제수 2L로, 80°C에서 9시간 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 감압농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 동결 건조시켜, 각각 수율 23.40%의 HB 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 추출한 동결 건조물은 -20°C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 40 mg/ml의 농도까지 갈색 또는 연갈색의 용액으로 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of *Hyeongbangjihwang-tang* Used in This Study

Korean name	Herbs	Scientific name	Amounts(g)
熟地黄	Rehmanniae Radix et Rhizoma Preparata	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	8
山茱萸	Cornus Fructus	<i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zucc	8
白茯苓	Hoelen White	<i>Poria cocos</i> Wolf	8
澤瀉	Alismatis Rhizoma	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	8
車前子	Plantaginis Semen	<i>Plantago asiatica</i> L	4
羌活	Angelicae Koreanae Radix	<i>Angelica Koreanum</i> (Max.) Kitagawa	4
獨活	Araliae Continentalis Radix	<i>Aralia continentalis</i> Kitagawa	4
荊芥	Schizonepetae Spica	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briquet	4
防風	Saposhnikoviae Radix	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	4
Total			56

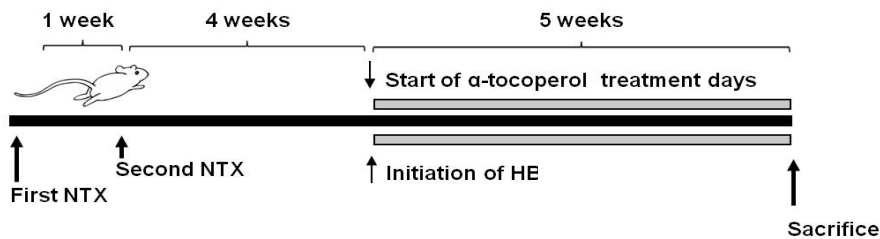


Figure 1. Experimental design used in this study

2) 실험동물 및 사양관리

96마리의 수컷 Sprague-Dawley Rat(6-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 60일간의 순화과정을 거쳐, 18시간 절식 후의 체중이 360 g 이상 될 때 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도(20-25℃)와 습도(45-50%)가 조절된 사육실에서 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 이중 80마리는 5/6 NTX를 실시하여 CRF를 유발하였으며, 나머지 16마리는 위수술(Sham-operated) 정상 대조군으로 사용하였다. NTX 또는 sham 수술 4주 후 체중(sham 대조군: 438-475 g, CRF 유발군: 341-386 g)과 혈중 BUN(sham 대조군: 15-21 g, CRF 유발군: 38-53 mg/dl) 및 creatinine(sham 대조군: 0.5~0.8 g, CRF 유발군: 0.8~1.3 mg/dl) 함량이 일정한 대략 반수의 실험동물만 선정하여 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 NTX 수술일, 투여시작일 및 최종 부검일에 각각 18시간 절식을 실시하였다(이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다).

2. 방법

2) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 8마리씩 4그룹으로 구분하였다. 즉, NTX 수술 대신 sham 수술을 실시한 위수술 대조군(sham control), NTX 수술 4주후부터 멸균증류수를 투여한 대조군(CRF control), NTX 수술 후 α-tocopherol(Sigma, MO, USA) 200 IU/kg 투여군(α-tocopherol), NTX 수술 후 각각 HB 200 mg/kg 투여군(HB)의 4군으로 구분하여 실험하였다. HB은 각각 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg 당 5 ml의 용량으로 NTX 수술 완료 4주후부터 매일 1회씩 35일간 강제 경구투여 하였으며, 액상인 α-tocopherol은 멸균 증류수에 희석하여 동일한 용량으로 경구투여 하였다. 또한 sham 및 CRF 대조군에서는 HB 또는 α-tocopherol 대신 각각 동일한 용량의 멸균증류수만 동일한 기간 동안 경구투여 하였다. 본 실험에 사용한 α-tocopherol 투여용량은 이전에 5/6 NTX로 유발된 CRF에 확실한 효과를 나타낸 200 IU/kg¹²을 선정하였으며, HB의 투여용량인 200 mg/kg은 이전의 동물실험의 자료¹⁰를 각각 기초로 하여 선정

하였다 (Figure 1).

2) CRF의 유발

CRF를 유발하기 위하여, 우상복부를 척추와 평행하게 절개하여 우측 신장을 노출시킨 후, 신장의 피막을 제거하고, 신동맥, 신정맥, 우측 요관을 봉합사로 묶은 다음 우측 신장을 절제하였다(Fist NTX). 우측 신장 절제 1주일 후, 전신마취 하에서 Rat의 좌상복부를 동일한 방법으로 절개하여 좌측 신장을 노출시킨 다음, 신장의 피막을 제거하고, 좌측 신동맥, 신정맥, 요관 및 신우를 보존하면서 신장의 양극에서 3-0 silk 봉합사를 이용하여 결찰한 후, 좌측 신장의 2/3를 선택적으로 절제하였다(Second 2/3 partial NTX). 위수술 대조군의 경우, 2회의 개복수술시 마취하에서 복부를 절개하여 신장을 노출시킨 후, capsule만 제거하고, 절제나 손상 없이 다시 봉합하였다.

3) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 first 및 second NTX 수술 일, 약물 투여 시작일, 약물 투여 7, 14, 21 28 및 35 일후에 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 streptozotocin 투여일, 투여시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식시켰고, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 CRF 유발기간인 4주간의 체중변화와 약물 투여 후 5주간의 체중 변화량인 증체량(body weight gains)을 각각 측정하였다.

4) 장기중량의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물의 좌측 신장, 비장, 가슴샘, 좌측 악하 임파절 및 좌측 부고환 주위 지방을 적출하여, 주변 결합조직과 분리한 다음 각각의 중량을 측정하여, 절대 중량으로 하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 각각의 장기 절대중량의 비율인 상대 중량을 산출하였다.

5) 혈액생화학적 분석

Second NTX 4주 후 모든 실험동물은 18시간 이상 절식한 다음 안와정맥총에서 vacuum tube(Becton Dickinson, USA)에 약 0.3 ml의 혈액을 채취한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이후 자동혈액분석장치(Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈중 BUN 및 creatinine 함량을 각각 mg/dl 단위로 측정하였으며, 최종 희생일에 복대정맥에서 5 ml의 혈액을 채취하여, 혈청을 분리한 다음 자동혈액분석장치를 이용하여 혈중 BUN, creatinine, TG(triglyceride), TC(total cholesterol), LDL(low density lipoprotein) 및 HDL(high density lipoprotein) 함량을 각각 mg/dl 단위로 측정하였다. 또한 HDL의 변화량을 좀 더 명확히 하기 위하여 HDL/LDL의 비율을 각각 산출하였다.

6) 비장내 cytokine 함량의 측정

약물 투여 35일 및 second NTX 수술 10주 후, 최종 희생일에 비장 조직의 일부(대략 10-15 mg/head)를 1 ml의 lysis 완충액(2 mm의 PMSF와 1 mg/ml의 aprotinin), leupeptin(Sigma, MO, USA) 및 pepstatin A(Sigma, MO, USA)가 포함된 인산완충액, PBS을 이용하여 homogenize하였다. 조직내 단백질 함량은 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 비장내 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL(interleukin)-1 β 및 IL-10 함량을 각각 Rat TNF- α ELISA kit(BD Biosciences/Pharmingen, CA, USA), Rat IL-1 β ELISA kit(Genzyme, MA, USA) 및 Rat IL-10 ELISA kit(Genzyme, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석은 lysis buffer에 희석한 100 ml의 standard 또는 10, 50, 또는 100 ml의 조직 homogenate에서 실시하였으며, 각 sample을 두 번 반복적으로 측정하였고, 각 sample의 일정부분은 단백질 함량 측정에 이용하였다. 모든 수치는 단백질 mg당 pg(pg/mg of protein)으로 측정하였다. 각 cytokine에 대한 표준곡선(standard curve)은 흡광도를 이용하여 작성하였으며, 변이율(average coefficient of variance)은 10% 이하로 산출되었다.

7) 신장 항산화 인자의 측정

최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식 후 개복하여, 좌측 신장의 일부(대략 10~15 mg/head)를 적출한 다음, 멸균 생리 식염수로 세척하고 주변 지방 조직을 제거하였다. 이후 in 9 vols ice-cold 0.15 M/L KCl 및 1.9 mM/L ethylenediaminetetraacetic acid(Sigma, MO, USA)가 함유된 용액에서 homogenize하고, 상층액을 분리하여 MDA(malondialdehyde) 및 GSH(glutathione) 함량을 각각 측정하였으며, SOD(superoxide dismutase) 및 CAT(catalase) 활성 역시 각각 측정하였다. 조직내 단백질 함량은 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도(lipid peroxidation)는 2-thiobarbituric acid를 이용하여 MDA (nM)/g protein 단위로 측정하였다. 또한 항산화 정도를 판단하기 위해 microplate reader에 적응시킨 enzymatic recycling procedure를 이용하여 GSH (μM)/g protein 단위로 측정하였다. SOD 활성은 100 nM EDTA(Sigma, MO, USA) 및 13 mM l-methionine(Sigma, MO, USA), 750 μM nitroblue tetrazolium chloride(NBT Sigma, MO, USA) 및 2 μM riboflavin (Sigma, MO, USA) 이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 신장 조직을 homogenize 하여 반응시키고, 4°C 조건하에서 10분간 3,600 rpm으로 원심 분리한 15분 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다. SOD 1 unit는 1분 동안 NBT의 환원을 50% 억제하는 농도로 정의하여, U/mg protein 단위로 측정하였고, CAT의 존재 하에서 과산화수소(H_2O_2)의 분해를 240 nm에서 흡광도를 측정하여, CAT의 활성을 측정하였다. CAT 활성을 pH 7.8, 온도 25°C하에서 1 nM의 과산화수소를 분당 분해하는데 필요한 효소의 양으로 정의하고, U/mg protein 단위로 평가하였다.

8) 면역조직화학적 관찰

준비한 파라핀 포매 신장 조직 절편을 이용하여, Avidine-Biotin-Peroxidase Complex(ABC)방법으로, caspase-3 및 PARP(polymerase) 면역반응 세포의 변화를

각각 관찰하였다. 즉, citrate buffer antigen(epitope) retrieval pretreatment를 실시한 다음, 0.1% 과산화수소가 포함된 methanol에 30분간 반응시켜 비특이적 peroxidase 반응을 차단하고, normal goat serum에 1시간 동안 반응시켜 내인성 peroxidase를 제거하였다. 이후 avidin/biotin blocking reagent(Sigma, MO, USA)에 25분간 반응시켜, 신장 조직내 내인성 avidin과 biotin의 활성을 차단하고, caspase-3(Anti-cleaved caspase-3(Asp 175) polyclonal antibody; Cell Signaling Technology Inc, Beverly, MA, USA Dilution, 1:400) 및 PARP(Anti-cleaved PARP(Asp214) rat specific antibody Cell Signaling Technology Inc, Beverly, MA, USA; Dilution, 1:100) 일차항체에 4°C에 18시간이상 반응시키고, biotin-ylatedsecondary antibody(Vector Lab. Inc., CA, USA. Dilution 1:50)에 1시간 상온에서 반응시킨 다음, avidin-biotin complex reagents에 1시간 상온에서 반응시키고, peroxidase substrate kit(Vector Lab. Inc., CA, USA)를 이용하여 발색시켰다. 발색 이후 Mayer's Hematoxylin으로 대조염색을 실시하고, 광학현미경하에서 관찰하였다. 본 실험에서 10% 이상의 발색반응을 나타내는 세포를 양성 면역반응세포로 간주하고, 단위면적(mm^2)당 사구체내 caspase-3 및 PARP 양성 면역반응 세포의 수를 각각 자동영상분석장치를 이용하여 산출하였다.

3. 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중 비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences(LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U(MW) test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경

Table 2. Changes on the Body Weight Gains in CRF Rats

Groups	Body weights at			Body weight gains during	
	Second NTX [A]	28 days after second NTX [B]	Sacrifice [C]	CRF induction periods [B-A]	Test article dosing periods [C-B]
Sham	395.13±14.07	426.13±14.13	481.88±13.98	41.00±5.55	55.75±6.56
CRF	396.50±18.01	347.25±18.18 ^{‡‡}	324.75±15.28 ^{**}	-39.75±3.28 ^{**}	-22.50±8.14 ^{**}
α-Tocopherol	395.00±8.38	347.88±5.99 ^{‡‡}	360.63±12.51 ^{**††}	-37.50±4.11 ^{**}	12.75±11.54 ^{**††}
HB	397.50±16.03	347.63±15.37 ^{‡‡}	370.88±17.22 ^{**††}	-38.75±3.69 ^{**}	23.25±11.87 ^{**††}

Values are expressed Mean ± SD of eight rats

** p<0.01 as compared with sham control by LSD test

†† p<0.01 as compared with CRF control by LSD test

‡‡ p<0.01 as compared with sham control by MW test

Table 3. Changes on the Kidney, Spleen, Thymus and Submandibular Lymph Node Weights in CRF Rats

Groups	Sham	CRF	α-Tocopherol	HB	
Remnant left	Absolute (g)	1.324±0.082	1.591±0.087 ^{**}	0.248±0.042 ^{**}	1.623±0.106 ^{**}
1/3 kidney	Relative(% of body weights)	0.275±0.016	0.491±0.044 ^{**}	0.439±0.032 ^{**††}	0.439±0.041 ^{**††}
Spleen	Absolute (g)	0.894±0.073	0.517±0.040 ^{**}	0.664±0.041 ^{**}	0.849±0.049 ^{**}
	Relative(% of body weights)	0.186±0.016	0.159±0.011 ^{**}	0.184±0.014 ^{††}	0.230±0.019 ^{**††}
Thymus	Absolute (g)	0.367±0.046	0.115±0.029 ^{**}	0.248±0.042 ^{**††}	0.289±0.070 ^{**††}
	Relative (% of body weights)	0.076±0.010	0.035±0.008 ^{**}	0.069±0.013 ^{††}	0.078±0.018 ^{††}
Submandibular lymph node	Absolute (g)	0.089±0.013	0.025±0.011 ^{**}	0.053±0.008 ^{**††}	0.070±0.015 ^{**††}
	Relative(% of body weights)	0.018±0.003	0.008±0.003 ^{**}	0.015±0.003 ^{††}	0.019±0.004 ^{††}
Epididymal fat pad	Absolute (g)	4.210±0.638	0.605±0.236 ^{‡‡}	1.595±0.199 ^{‡‡§§}	2.176±0.284 ^{‡‡§§}
	Relative(% of body weights)	0.873±0.134	0.187±0.071 ^{**}	0.443±0.060 ^{**††}	0.585±0.059 ^{**††}

Values are expressed Mean ± SD of eight rats

** p<0.01 and * p<0.05 as compared with sham control by LSD test

†† p<0.01 and † p<0.05 as compared with CRF control by LSD test

‡‡ p<0.01 as compared with sham control by MW test

§§ p<0.01 as compared with CRF control by MW test

우 통계적 유의성을 인정하였다.

증가가 투여 21일후부터 관찰되었으며, 약물투여 기간 동안의 증체량 역시 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 각각 나타내었다 (Table 2).

III. 結 果

1. 체중의 변화

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 현저한 체중의 감소가 second NTX 4주 후, 즉 투여 시작 1일전부터 나타났고, 결과적으로 CRF 유발기간 및 약물투여 기간 동안의 증체량 역시 각각 sham 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 현저한 감소를 나타내었다. 한편 α-tocopherol 및 HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 체중의

2. 장기 중량의 변화

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 잔존 신장의 절대 및 상대 중량의 증가가 각각 인정되었으나, α-tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 신장 상대 중량의 감소가 인정되었다. 한편 α-tocopherol, HB 투여군에서 CRF 대조군에 비해 의미 있는 신장 절대 중량의 변화는 인정되지 않았다 (Table 3).

또한 sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의

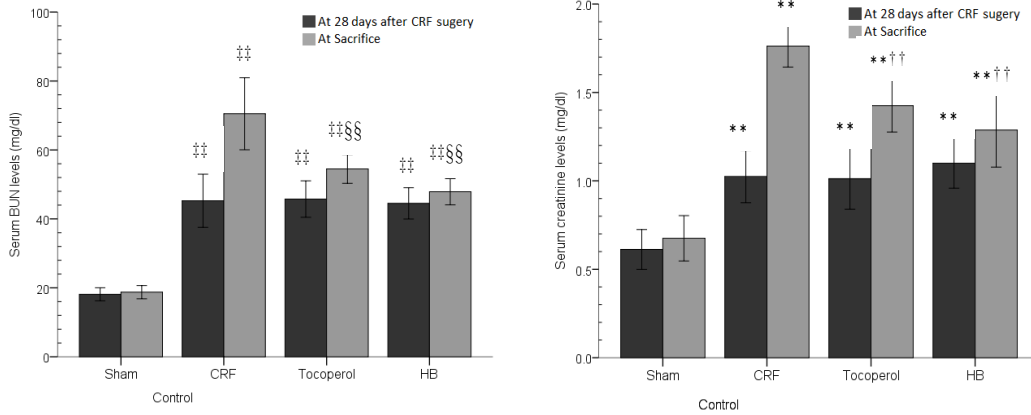


Figure 2. Serum BUN and creatinine level in CRF rats
 Values are expressed Mean ± SD of eight rats
 * p<0.01 as compared with sham control by LSD test
 † † p<0.01 as compared with CRF control by LSD test
 ‡ ‡ p<0.01 as compared with sham control by MW test
 §§ p<0.01 as compared with CRF control by MW test

성 있는(p<0.01, p<0.01, p<0.01, p<0.01) 현저한 비장, 가슴샘, 악하 임파절, 부고환 주위 지방의 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었으나, α-tocoperol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01, p<0.01, p<0.05, p<0.01) 비장 상대 중량, 가슴샘, 악하 임파절, 부고환 주위 지방의 절대 및 상대 중량의 증가가 관찰되었다 (Table 3).

3. 혈액 생화학적 변화

1) 혈중 BUN과 creatinine의 함량

Second NTX 4주 후 혈중 BUN 함량이 유사한 실험 동물을 선정하여 사용하였으므로, sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 BUN 함량의 증가가 second NTX 4주 후, 즉 투여 시작일 및 투여 35일 후의 최종 부검일에 각각 인정되었다. 한편 α-tocoperol, HB 투여군에서 second NTX 4주 후 CRF 대조군과 비교하여 의미 있는 혈중 BUN 함량의 변화는 인정되지 않았으나, 최종 희생일에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 BUN 함량의 감소가 관찰되었다 (Figure 2).

Second NTX 4주 후 sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 creatinine 함량의 증가가 second NTX 수술 4주 후, 즉 투여 시작일 및 투여 35일 후의 최종 부검일에 각각 관찰되었다. 한편 α-tocoperol, HB 투여군에서 second NTX 4주 후 CRF 대조군과 비교하여 의미 있는 혈중 creatinine 함량의 변화는 관찰되지 않았으나, 최종 희생일에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 creatinine 함량의 감소가 관찰되었다 (Figure 2).

2) 혈중 TG, TC, LDL 및 HDL의 함량

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 TG 함량의 증가가 인정되었고, α-tocoperol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 TG 함량의 감소가 관찰되었다 (Table 4).

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 TC 함량의 증가가 인정되었고, α-tocoperol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 TC 함량의 감소가 관찰되었

Table 4. Changes on the Serum Lipid Levels in CRF Rats

Groups	Serum levels (mg/dl)				
	TG	TC	LDL	HDL	HDL/LDL
Sham	65.13±13.79	75.63±11.76	15.75±3.28	37.00±9.89	2.41±0.70
CRF	155.13 ±18.68**	229.25 ±20.71**	105.38 ±9.80*‡	111.13 ±9.61**	1.06±0.07*‡
α-Tocopherol	118.00 ±16.76***†	174.25 ±18.01***†	75.50 ±12.27*‡§§	94.50 ±14.48***†	1.26±0.12*‡§§
HB	103.88 ±20.76***†	130.75 ±17.74***†	43.75 ±12.04*‡§§	73.88 ±8.25***†	1.82±0.57*‡§§

Values are expressed Mean ± SD of eight rats

** p<0.01 as compared with sham control by LSD test

† † p<0.01 as compared with CRF control by LSD test

‡ ‡ p<0.01 as compared with sham control by MW test

§§ p<0.01 as compared with CRF control by MW test

Table 5. Changes on the Splenic Cytokine Contents in CRF Rat

Groups	Splenic contents (pg/mg protein)		
	TNF-α	IL-1β	IL-10
Sham	129.63±15.32	50.25±11.73	124.63±16.86
CRF	68.50±11.40*†	13.38±2.97*‡	57.75±11.62*†
α-Tocopherol	92.00±10.11***†	19.00±2.14*‡§§	79.75±15.48***†
HB	103.25±14.44***†	26.00±2.93*‡§§	102.75±8.48***†

Values are expressed Mean ± SD of eight rats

** p<0.01 as compared with sham control by LSD test

† † p<0.01 as compared with CRF control by LSD test

‡ ‡ p<0.01 as compared with sham control by MW test

§§ p<0.01 as compared with CRF control by MW test

다 (Table 4).

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 LDL 함량의 증가가 인정되었고, α-tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 LDL 함량의 감소가 관찰되었다 (Table 4).

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 HDL 함량의 증가가 인정되었고, α-tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 HDL 함량의 감소가 관찰되었다 (Table 4).

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01) 혈중 HDL/LDL 비율의 감소가 인정되었고, α-tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 HDL/LDL비율의 감소가 관찰되었다 (Table 4).

4. 비장내 cytokine 함량의 변화

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01, p<0.01, p<0.01) 비장 조직내 TNF-α, IL-1β, IL-10 함량의 감소가 관찰되었고, α-tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01, p<0.01, p<0.01) 비장내 TNF-α, IL-1β, IL-10 함량의 증가가 관찰되었다 (Table 5).

5. 신장 내 항산화 인자의 변화

Sham 대조군에 비해 CRF 대조군에서는 유의성 있는(p<0.01, p<0.01, p<0.01, p<0.01) 신장 조직내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량, SOD 활성, CAT활성의 감소가 관찰되었고, α-tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01, p<0.01, p<0.01, p<0.01 또는 p<0.05) 신장내 MDA 함량의 감소와 GSH 함량, SOD 활성, CAT활성의 증가가 관찰

Table 6. Changes on the Kidney Antioxidant Defense Systems in CRF Rats

Groups	Kidney antioxidant defense systems			
	MDA(nM/g protein)	GSH(μ M/g protein)	SOD(U/mg protein)	CAT(U/mg protein)
Sham	87.13 \pm 16.02	142.50 \pm 16.14	195.50 \pm 31.88	342.50 \pm 77.55
CRF	201.25 \pm 24.46**	36.00 \pm 10.49**	103.38 \pm 16.80**	161.50 \pm 33.62*‡
α -Tocopherol	144.00 \pm 31.96*†‡	59.88 \pm 13.81*†‡	137.88 \pm 14.02*†‡	222.50 \pm 28.33*‡§§
HB	109.88 \pm 15.94*†‡	75.13 \pm 11.75*†‡	159.50 \pm 17.34*†‡	256.38 \pm 28.09*‡§§

Values are expressed Mean \pm SD of eight rats
 ** p<0.01 as compared with sham control by LSD test
 † † p<0.01 as compared with CRF control by LSD test
 ‡ ‡ p<0.01 and ‡ p<0.05 as compared with sham control by MW test
 §§ p<0.01 as compared with CRF control by MW test

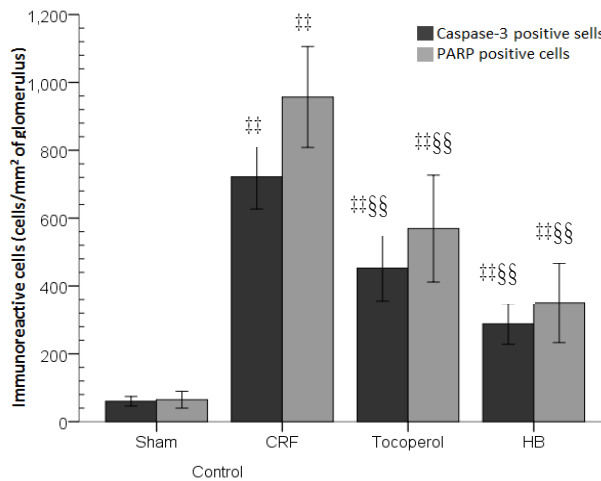


Figure 3. Numbers of caspase 3 and PARP immunoreactive cell on the glomerular regions of the kidney in CRF rats

Values are expressed Mean \pm SD of eight rats
 ‡ ‡ p<0.01 as compared with sham control by MW test
 §§ p<0.01 as compared with CRF control by MW test

되었다 (Table 6).

6. 면역조직화학적 변화

CRF 대조군에서는 sham 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01, p<0.01) 신장 사구체내에서 caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 증가가 관찰되었으며, α -tocopherol, HB 투여군에서는 각각 CRF 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01, p<0.01) caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 수적 감소가 관찰되었다 (Figure 3).

IV. 考 察

CRF는 지속적인 신장 기능 부전상태를 의미하며¹, 현재까지 CRF에 대한 다양한 발병기전이 제기되어 왔으나, 근래에 들어 항산화 방어 시스템의 장애에 의한 활성산소류의 형성 역시 CRF의 진행에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있으며¹⁴, 신장 질환을 가지고 있는 환자에서 항산화 방어시스템의 감소와 활성산소류(Reactive oxygen species; ROS)의 증가가 이미 보고되어 있고¹⁵, 다양한 천연물의 항산화 방어 기전을 통한 CRF에 대한 유효한 효과가 이미 잘 보고되어 있다^{16,17}.

또한 CRF 발생 시 현저한 면역억제가 수반되며¹⁸, 대사장애에 의한 체중 감소 등과 같은 다양한 만성 소모성 악액질 현상이 수반된다¹⁹.

사상의학은 각 체질에 따른 장부허실을 기준으로 肺大肝小한 太陽人, 脾大腎小한 少陽人, 肝大肺小한 太陰人 및 腎大脾小한 少陰人의 4가지 체질로 구분한다⁴. 少陽人은 大腸에서 水穀의 陰寒之氣를 내보냄이 부족하며 胃에서 水穀의 陽熱之氣를 받아들임이 성하여, 소화기 계통에서 나타나는 위장 기능의 이상이나 비뇨생식기 계통에서 나타나는 신장, 방광, 자궁 기능의 이상이 많다고 하였다⁶. 또한 少陽人의 浮腫은 表病의 질병군에서 가장 降陰이 안되어 脾局과 腎局의 連接不能 상태로 발생한다. 원인은 脾局의 陽熱之氣의 過亢으로 인하여 降陰이 안될 경우와 脾腎局의 陰氣 부족으로 降陰이 안될 경우로 나눌 수 있다^{4,6}. 이번 연구에서는 CRF를 한의학적으로 浮腫, 虛勞의 範疇로 보고 소양인에서 浮腫, 虛勞를 치료하는 대표적인 처방인 荊防地黃湯의 CRF에 대한 효과를 알아보고자 하였다.

荊防地黃湯은 『東醫壽世保元』의 「脾受寒表寒病論」⁴에 기재된 처방으로 身寒腹痛泄瀉(亡陰證), 浮腫, 모든 虛勞症에 사용되며^{4,6}, 『東醫四象新編』²⁰에서 亡陰, 身寒泄瀉, 浮腫, 初結急調理의 주치가 기록되어 있고 風(中風, 中腑, 中腑中藏, 蝸斜, 癱瘓, 虛症, 通治), 寒(太陰(腹痛自利不調心不煩), 痞氣), 內傷(倒飽, 不思飲食), 虛勞(通治), 咳嗽(通治) 積聚(水積, 脹滿, 氣脹), 黃疸(通治), 氣(短氣), 神(健忘, 癡癩, 癡狂, 吐血), 聲音(色傷失音, 產後失音), 小便(五淋, 交腸), 頭(頭痛), 面(面汗), 眼, 耳(耳聾, 耳鳴), 腹(痛), 腰(腰痛), 足(通治), 前陰(疝, 囊腫) 臍癰(內癰), 婦人(胎動), 小兒(顛陷, 齒不生)에 다양하게 활용한다고 기재되어 있다²⁰.

구성약재의 효능을 살펴보면, 熟地黃은 少陽人의 生陰之劑로 補腎和腎을 하며, 山茱萸는 陰氣를 수렴하여 精을 견고하게 하며 陰氣를 끌어올려 火亢을 막음으로써 健腎直腎한다. 車前子는 淸火

하고 降陰益精케 하며, 荊芥, 防風, 羌活, 獨活, 茯苓, 澤瀉는 少陽人의 소변을 잘 나오게 하는 약제 이면서 脾腎陰氣의 補陰과 降陰을 최대로 발휘될 수 있게 한다^{4,6,21}.

본 연구에서는 HB을 각각 NTX 4주 후부터 매일 200mg/kg의 농도로 35일간 경구투여하고, 신장보호 효과는 신장 중량의 변화, 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 변화, 사구체내 caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 수적 변화를 기초로 평가하였으며, 관련 면역억제에 미치는 영향은 비장 및 악하 임파절 중량의 변화, 비장 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 변화, 가슴샘, 비장 및 악하 임파절의 조직학적 변화를 기준으로 평가하였고, 체중, 부고환 주위 지방 중량의 변화, 혈중 TG, TC, LDL 및 HDL 함량의 변화를 관찰하여 CRF 관련 악액질에 대한 효과를 평가하였다. 또한 항산화 효과를 관찰하기 위하여, 신장 내 GSH의 함량 및 SOD, CAT 활성을, 지질과산화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MDA 함량을 각각 측정하였다. 실험 결과는 5/6 NTX로 유발된 CRF에 유효한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는 항산화제인 α -tocopherol¹² 투여군과 비교하였다.

α -tocopherol은 흡수 및 체내 분포가 매우 우수한 대표적인 vitamin E로서, 이미 항산화 효과를 통한 CRF에 매우 유효한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며²², 특히 200 IU/kg 정도에서 5/6 NTX 모델에서도 매우 우수한 신장 보호효과가 이미 잘 알려져 있다¹².

한편 5/6 NTX 모델은 잔존 신장의 부담을 증가시켜, 사람의 진행성 CRF와 유사한 병태현상을 나타내는 대표적인 실험 동물 모델로, 잔존 신장의 중량 증가와 함께 조직병리학적으로 사구체 비후와 반월체 경화증이 동반되며, 간질 조직에서 현저한 염증세포 침윤과 함께 세뇨관의 위축 및 섬유화가 동반된다^{12,23}. 본 연구 결과에서도, CRF 대조군에서 현저한 잔존 신장 중량의 증가가 관찰되었으나, HB, α -tocopherol 투여군에서는 감소되었다.

또한 혈중 BUN의 상승은 일반적으로 신장 질환의

존재를 의미하고, creatinine 혈중 증가는 사구체 여과율의 감소와 같은 신장 질환을 의미한다²⁴. 본 연구 결과, 5/6 NTX 4주 후 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가를 기준으로 CRF 유발 정도를 확인하였으며, CRF 수술 10주후 최종 부검시 sham 대조군에 비해 현저한 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가가 CRF 대조군에서 관찰되었으나, HB, α -tocopherol 투여군에서는 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가가 억제되었다. 이는 이 등¹⁰의 연구에서 글리세롤로 급성 신부전이 유발된 흰쥐에서 형방지황탕이 십이미관증탕보다 혈중 BUN 및 creatinine 함량의 증가 억제효과가 뛰어나다는 연구와 일치하는 결과이다.

Caspase-3 및 PARP 는 대표적인 apoptosis 마커로, 신장, 특히 사구체내에서 caspase-3 및 PARP의 발현 증가는 apoptosis에 의한 신장 사구체 손상 또는 사구체 신염을 의미하며, CRF에서도 현저한 사구체내 caspase-3 및 PARP의 발현 증가가 잘 알려져 있다²⁵. 본 연구에서도 CRF 대조군에서 현저한 caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 수적 증가가 사구체내에서 관찰되었으나, HB, α -tocopherol 투여군에서는 사구체내 caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 감소가 관찰되었다. 사구체내 caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 감소는 荊防地黃湯이 apoptosis 조절을 통해 신장 기능 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

CRF은 현저한 면역억제가 초래되며, 특히 세포성 면역에 심각한 문제가 초래되는 것으로 알려져 있어, 임파장기의 중량 감소가 나타난다¹⁸. TNF- α 는 비장세포를 포함한 여러 종류의 세포에서 생산되는 대표적인 cytokine의 일종으로 T-임파구의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁶. TNF- α 는 일반적으로 세포성 면역을 활성화 시키며, 항체 생산을 촉진하는 것으로 알려진 IL-2의 기능을 증가시킨다²⁷. 또한 IL-1은 대식세포, 수지상 세포, 임파구, 내피세포, 섬유세포 및 각질세포 등 다양한 세포에서 분비되는 또 다른 종류의 cytokine으로 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁸. IL-10은 전형적인 면역억제 cytokine으로 Th2 세포, 일부 B 림프구 및 활성화된 대식

세포에서 분비되고, 주로 활성화된 대식세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁹. 본 연구에서도 CRF에 의한 면역억제의 일환으로, CRF 대조군에서는 가슴샘, 비장 및 악하 임파절의 중량이 감소되었으며, 비장내 TNF- α , L-1 β 및 IL-10 함량이 현저히 감소된 것으로 생각된다. 반면 임파장기 중량 및 비장내 TNF- α , L-1 β 및 IL-10의 함량의 변화가 HB, α -tocopherol 투여군에서는 억제되는 것으로 관찰되었다.

CRF의 진행과 함께 체중과 축적 지방 중량의 감소, 혈중 TG, TC, LDL 함량의 증가와 함께 HDL/LDL 비율의 감소가 초래되어, 전형적인 소모성 악액질 현상이 동반된다³⁰. 따라서 이들 만성 소모성 악액질의 제어는 CRF에서 초래되는 신장변성에 대한 보호만큼이나 중요한 문제로 대두되고 있는 실정이다³¹. 일반적으로 고지혈증 시 LDL, TG 및 TC 함량 증가와 함께 HDL 감소가 문제시 되고 있다³². 본 연구 결과에서도 CRF 대조군에서 현저한 체중감소, 부고환 지방 중량의 감소가 초래되었으며, 혈중 TG, TC, LDL함량의 증가와 함께 HDL/LDL 비율의 감소가 초래되었다. 이는 전형적인 소모성 악액질 현상이 이전의 연구들^{24,28-30}과 동일한 것으로 나타났다. 한편 이러한 만성 소모성 악액질 현상이 HB, α -tocopherol 투여군에서는 억제되었다.

이는 荊防地黃湯이 임파장기 중량, 비장내 TNF- α , L-1 β 및 IL-10 함량의 감소 억제를 통하여 면역활성 효과가 있으며, 체중과 축적 지방 중량의 감소, 혈중 TG, TC, LDL 함량의 증가 억제를 통하여 만성 소모성 악액질 제어 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이것으로 형방지황탕은 만성 신부전뿐만 아니라 각종 면역 질환과 대사질환에도 다양하게 활용될 수 있으리라 사료된다.

근래에 들어 항산화 방어 시스템의 장애에 의한 ROS의 형성이 CRF의 진행에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 신장 질환을 가지고 있는 환자에서 항산화 방어시스템의 감소와 ROS의 증가가 이미 보고되어 있다^{14,15}. 그리고 다양한 천연물의 항산화 방어 기전을 통한 CRF에 대한 유효한 효과가 이미 잘 보고되어 있다^{16,17}. 본 연구 결과에서도 5/6 NTX 로 유발된

CRF 대조군에서 지질 과산화에 의해 신장의 MDA³³ 함량의 증가와 GSH³⁴ 함량의 감소가 내인성 항산화 효소인 SOD³⁵ 및 CAT 활성³⁶의 감소와 함께 초래되었다. 한편 이러한 조직 내 MDA 함량의 증가와 GSH 함량의 감소, SOD 및 CAT 활성의 감소가 HB, α -tocopherol 투여군에서는 억제되었다. 이는 이 등⁷의 연구에서 荊防地黃湯이 68주령 백서의 신장, 방광, 비장세포의 SOD activity와 GSH 농도를 유의하게 증가시켰고, MDA 농도를 유의하게 감소시킨 결과와 유사한 것을 확인하였다. 따라서 荊防地黃湯의 5/6 NTX로 유발된 CRF 및 관련 면역억제 및 악액질에 대한 효과가 주로 항산화 효과에 의해 초래되는 것으로 판단되나, 정확한 기전 연구가 좀더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

한편 본 연구 결과, HB은 대조약물로 사용한 α -tocopherol 투여군보다 현저히 우수한 신장 보호, 면역활성, 악액질 제어, 항산화 효과를 나타내었다.

앞으로 荊防地黃湯은 각각 수많은 생리활성 물질을 함유하고 있어, 개별 구성 약제 각각에 대한 효능 및 생리활성을 나타내는 화학성분의 검색과 더불어 다양한 방면으로 기전적인 연구를 수행해야 할 것으로 판단되며, 荊防地黃湯에 대한 용량 변화에 따른 결과 비교 연구 역시 세밀히 검토하여야 할 것으로 판단된다.

V. 結 論

본 연구에서는 사상의학에서 浮腫과 虛勞에 사용할 수 있는 대표적인 소양인의 약물인 荊防地黃湯의 CRF에 대한 효과를 5/6 NTX로 유발된 CRF Rat를 이용하여 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 신장보호 효과. 혈중 BUN 및 creatinine 함량, 사구체내 capsae-3 및 PARP 면역반응세포의 수적 변화를 평가하여 荊防地黃湯이 우수한 신장보호 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.
2. 면역활성 효과. 가슴샘, 비장 및 악하임과절 증량

의 변화, 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 변화를 평가하여 荊防地黃湯이 우수한 면역활성 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

3. 악액질에 대한 효과. 체중, 부고환 주위 지방 중량의 변화, 혈중 TG, TC, LDL 및 HDL 함량의 변화를 평가하여 荊防地黃湯이 우수한 악액질 제어 효과를 나타내었다.
4. 항산화 효과. 신장 내 GSH, SOD 및 CAT 함량 또는 활성을 측정하였고, 지질과산화에 미치는 영향을 관찰하기 위해, MDA 함량을 각각 측정하여 평가하여 荊防地黃湯이 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

VI. 參考文獻

1. THE KOREAN SOCIETY OF NEPHROLOGY. CLINICAL NEPHROLOGY. Seoul: Gwangmoon publisher. 2001:593-725. (Korean)
2. Du HK. Nephrology of Oriental Medicine. Seoul: Institute of Oriental Medicine. 1992:527-35, 540-41. (Korean)
3. Jin DC, Ha IS, Kim NH, Lee SW, Lee JS, Yoon SR, et al. Renal replacement therapy in Korea, 2010. The Korean journal of nephrology. 2012;31(1):62-71. (Korean)
4. Lee JM. Dongeuisooseowon. Seoul: eulyoo. 2002: 112-3, 145-201. (Korean)
5. Dep. of Sasang Constitutional Medicine. All colleges of Korean med. in Korea(compilation). The revised and enlarged Sasang Constitutional Medicine. Seoul: Jipmoondang. 2012:251-80, 681-705. (Korean)
6. Dept. of Sasang Constitutional Medicine, college of Korean medicine, Kyung-Hee Univ. The Clinical Guide Book for Sasang Constitutional Medicine-The Literature on Sasang Constitutional Medicine. 2nd Ed. Seoul: Hanmi medical publishing. 2010:64-70, 144-68. (Korean)
7. Lee HE, Ahn TW. Anti-Oxidant Effect of

- Hyeongbangjihwang-tang Decoction in Kidney, Bladder and Spleen Cell of SD Rats. *J Sasang Constitut Med*. 2008;20(2):85-97. (Korean)
8. Park SK, Lee HJ, Kim HT, Whang WW. An experimental study of drial medicine on cure for dementia : the effect of Jowiseungcheongtang and Hyungbangjihwangtang on cure for aged rats. *J of Oriental Neuropsychiatry*. 1998;9(2):19-35. (Korean)
 9. Chung SY, Kim SM, Lim MH, Lee JH, Park JH. The Prevention Effect of HyeongBangJiHwang Tang Extracts on the Liver Cirrhosis of Fisher 344 Rats Inbuced By Long Term Tetrachloride Injection. *Kor. J. Herbology*. 2003;18(4):193-210. (Korean)
 10. Lee HS, Kim IH, Kim HS. The Effects of Hyeongbangjihwang-tang and Sibimikwanjung-tang in Glycerol-Induced Renal Failure in Rats. *J Sasang Constitut Med*. 2005;17(3):103-12. (Korean)
 11. Sung WS, Seu YB, Lee DG. In Vitro Antifungal Activity of HTI Isolated from Oriental Medicine, Hyungbangjihwang-tang. *Kor. J. Microbiol, Biotechnol*. 2009;37(3):273-9. (Korean)
 12. Hahn S, Kuemmerle NB, Chan W, Hisano S, Saborio P, Krieg RJ Jr, et al. Glomerulosclerosis in the remnant kidney rat is modulated by dietaryalpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(11):2089-95.
 13. Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, D.C.:The national academics press. 1985: 162-6.
 14. Wihearls CG. Chronic Renal Failure in Oxford Textbook of Medicine. 4th ed. Oxford:Oxford University Press. 2003:2302-26.
 15. Kuroda M, Asaka S, Tofuku Y, Takeda R. Serum anti-oxidant activity in uremic patients. *Nephron*. 1985; 41(3):293-8.
 16. Deniz M, Şener G, Ercan F, Yeğen BÇ. Garlic extract ameliorates renal and cardiopulmonary injury in the rats with chronic renal failure. *Ren Fail*. 2011;33(7):718-25.
 17. Wang J, Wang F, Yun H, Zhang H, Zhang Q. Effect and mechanism of fucoidan derivatives from *Laminaria japonica* in experimental adenine-induced chronic kidney disease. *J Ethnopharmacol*. 2012;139(3):807-13.
 18. Tzanno-Martins C, Azevedo LS, Orii N, Futata E, Jorgetti V, Marcondes M, et al. The role of experimental chronic renal failure and aluminium intoxication in cellular immune response. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11(3):474-80.
 19. Cicoira M, Anker SD, Ronco C. Cardio-renal cachexia syndromes (CRCS): pathophysiological foundations of a vicious pathological circle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(3):135-42.
 20. Kim JY. *Donguisasangshinpyun*. Seoul:Jungdam. 2002:82, 137, 189. (Korean)
 21. Cho HS. THE principle and prescription of Sasang Constitutional Medicine. Seoul: Jipmoondang. 2011: 336-40. (Korean)
 22. Reed A, Cho YJ, Coombes JS, Fassett RG. Time course and dose response of alpha tocopherol on oxidative stress in haemodialysis patients. *BMC Nephrol*. 2009;10:32.
 23. Hisano S, Latta K, Krieg Ri Jr, Chan JCM. Growth hormone aggravates glomerular sclerosis in the remnant kidney of 5/6 nephrectomized uremic rats. *Clin Exp Nephrol*. 1997;1(2):92-8.
 24. Sodikoff CH. Laboratory profiles of small animal diseases. A guide to laboratory diagnosis. 2nd ed., Mosby:St. Louise. 1995:1-36.
 25. Sen K, Lindenmeyer MT, Gaspert A, Eichinger F, Neusser MA, Kretzler M, et al. Periostin is induced in glomerular injury and expressed de novo in interstitial renal fibrosis. *Am J Pathol*. 2011;179(4):1756-67.
 26. Samira S, Ferrand C, Peled A, Nagler A, Tovbin Y, Ben-Hur H, et al. Tumor necrosis factor promotes human T-cell development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells*. 2004; 22(6):1085-100.

27. Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: Immunology an introduction (Tizard IR editor). 4th edition. Saunders: Philadelphia. 1995:155-69.
28. Unanue ER. The Mononuclear-Phagocytic System. In: Immunology an introduction (Tizard IR editor). 4th edition. Saunders: Philadelphia, 1995:61-74.
29. Molnar MZ, Streja E, Kovesdy CP, Budoff MJ, Nissenson AR, Krishnan M, et al. High platelet count as a link between renal cachexia and cardiovascular mortality in end-stage renal disease patients. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(3):945-54.
30. Kim HJ, Vaziri ND, Norris K, An WS, Quiroz Y, Rodriguez-Iturbe B. High-calorie diet with moderate protein restriction prevents cachexia and ameliorates oxidative stress, inflammation and proteinuria in experimental chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2010;14(6):536-47.
31. Edefonti A, Mastrangelo A, Paglialonga F. Assessment and monitoring of nutrition status in pediatric peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*. 2009;29(2):S176-9.
32. Forrester JS, Makkar R, Shah PK. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians. *Circulation*. 2005;111(14):1847-54.
33. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
34. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25(1):192-205.
35. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press Inc., 1974:673-86.
36. Sun Y, Larry WO, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34(3):497-500.