



Original Article / 원저

## 편측성 요관폐색으로 유발된 신장 질환 백서 모델에서 오령산, 금궤신기환, 좌귀음의 보호효과

한병혁<sup>1,2</sup>, 유제국<sup>3</sup>, 장윤재<sup>1,2,3</sup>, 김혜음<sup>1,2</sup>, 윤정주<sup>1,2</sup>, 조남근<sup>3</sup>, 이호섭<sup>1,2,3</sup>, 강대길<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한방심신증후군연구센터, <sup>2</sup>원광대학교 한의과대학 생리학교실,  
<sup>3</sup>원광대학교 한의학전문대학원

## The Protective Effect of Oryeongsan, Geumgwe-sinkihwan, and Jwagwieum on Renal Injury in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction

Byung Hyuk Han<sup>1,2</sup>, Je Kuk Yu<sup>3</sup>, Youn Jae Jang<sup>1,2,3</sup>, Hye Yoom Kim<sup>1,2</sup>, Jung Joo Yoon<sup>1,2</sup>,  
Nam Geun Cho<sup>3</sup>, Ho Sub Lee<sup>1,2,3</sup>, Dae Gill Kang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University,

<sup>2</sup>Department of Physiology, College of Korean Medicine, Wonkwang  
University

<sup>3</sup>Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

### ABSTRACT

Ureteral obstruction can be causes of renal dysfunction and renal injury at late period of kidney pathology. The purpose of this study was to determine the protective effects of Oryeongsan (ORS), Geumgwe-sinkihwan (GSH), and Jwagwieum (JGE) in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). The animal models were divided into five groups randomly at the age of 5 weeks; Control group: SD male rats (n=10), UUO group: SD male rats with UUO surgery (n=10), ORS group: SD male rats with UUO surgery + ORS 200 mg/kg/day (n=10), GSH group: SD male rats with UUO surgery + GSH 200 mg/kg/day (n=10), JGE group: SD male rats with UUO surgery + JGE 200 mg/kg/day (n=10). Treatment with ORS, GSH, and JGE significantly ameliorate creatinine clearance(Ccr). The present results also showed that ORS, GSH, and JGE improved the morphological aspects of renal tissues. These prescriptions also reduced the expression levels of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. In Kidney, UUO increased the expression levels of

inflammasome markers such as NLRP3, ASC, and Caspase-1. However, ORS, GSH, and JGE suppressed these levels. Treatment with these prescriptions reduced kidney inflammation markers such as Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule -1 (KIM-1). Therefore, these findings suggest that ORS, GSH, and JGE has a protective effect on renal injury by alleviating renal inflammation and improving renal function in rats with UUO.

**Key words** : Oryeongsan (ORS), Geumgwe-sinkihwan (GSH), Jwagwieum (JGE), unilateral ureteral obstruction (UUO), inflammation, inflammasome.

## I. 서론

요관폐색은 만성 신장 질환의 가장 중요한 원인 중 하나이며 이로 인하여 발생하는 건강 질환이 사회적 문제로 대두되고 있다. 또한 요관폐색은 당뇨병, 사구체신염, 고혈압, 다낭성 신장질환과 함께 전 세계 만성신장 질환 환자의 90% 이상을 차지하고 있다<sup>1)</sup>. 신세뇨관의 위축으로 인한 사구체 손상은 신장의 질환에 있어서 가장 중요한 신장질환의 지표가 되며 특히 신장의 세뇨관 위축은 사구체 여과율 등의 신장의 기능 저하의 조직학적 변화의 원인이 된다<sup>2,3)</sup>. 요관폐색은 또한 신장의 섬유화 및 염증 등 심각한 결과를 초래하며, 결국 만성신장질환의 중요한 원인 중 하나인 폐색성 신병증으로 발전할 수 있다<sup>4,5)</sup>. 편측성 요관폐색 동물모델은 요관 폐색의 병리학적 변화를 관찰하기 위해 널리 사용되는 동물 모델이다<sup>4)</sup>. 이 동물모델에서, 아급성 신장 손상은 염증 반응을 통해 발생하며, 만성신장질환의 연구에 매우 중요한 모델이 된다<sup>6)</sup>.

신장 질환에 대한 병리학적 결과로 사구체의 여과율이 감소하게 되며<sup>7)</sup>, 이와 관련한 이상적인 지표로는 혈청 크레아티닌의 상승 등이 있다. 신장 기능이 저하된 환자에서 사구체 여과율의 감소는 결과적으로 크레아티닌 청소율(creatinine clearance, CCr) 저하가 나타났다<sup>8,9)</sup>. 또한 신장이 손상을 받게 되면 신장의 섬유화 및 병변이 발생하게 되며 신장의 기능장애 및 염증을 유발한다<sup>10)</sup>. 급성 및 만성 염증을 조절하는 핵심 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6는 사구체 질환을 일으키는 사구체 세포 증식과 세포외 기질 확장에 관여 한다<sup>11)</sup>. 염증반응은 병의 발생에 매우 중요한 역할을 하며, NOD-like receptor, pyrin domain containing-3(NLRP3) 염증소체(inflammasome)의 활성을 조절하는 것으로 알

려져 있다<sup>12)</sup>. NLRP3 염증소체는 NLRP3 단백질, ASC(CARD domain), Caspase-1로 이루어진 복합 단백질이다<sup>13-15)</sup>. NLRP3 염증소체는 염증성 사이토카인 유도에 중요한 역할을 하며<sup>12)</sup>, NLRP3 염증소체와 염증성 사이토카인은 신장 상피에 직접적인 영향을 미쳐 신장 기능 장애를 유발한다. KIM-1 (kidney injury molecule-1)은 신장 질환이 발병하였을 때, 혈액 내에서 증가하거나 소변으로 배설이 증가되는 대표적인 인자이며<sup>6)</sup>, 다양한 종류의 세포에서 발현되는 NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)은 악성 종양이나 감염과 같은 신장의 손상에 의하여 발현이 증가한다<sup>17,18)</sup>. 따라서 NGAL은 신장의 질환을 조기에 치료하고, 이에 대한 예방을 가능하게 하는 표지자 역할을 수행 한다<sup>19,20)</sup>.

오령산은 열이 속으로 들어가 머리가 아프고 갈증이 나면서 소변이 잘 나오지 않는 증상에 사용하는 처방으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 또한 급-만성 신염, 신장 질환, 급성 방광염 등에 쓰인다고 보고되고 있다<sup>22)</sup>. 금궤신기환(金櫃腎氣丸, GSH)은 방약합편(方藥合編, 1884)에 기록된 신기환 가미방(腎氣丸加味方, SKHGMB)의 세종류의 처방 중 하나로 총 8가지 한약재로 이루어진 방제이다. 특히 금궤신기환은 신장의 양(陽)과 신장의 기(氣)의 부족으로 인한 당뇨병과 사구체신증의 치료에 사용된다. 좌귀음(左歸飲, JGE)은 동의보감(東醫寶鑑)에 기록되어 있으며 특히 신음허(腎陰虛, kidney yin deficiency)를 다스리는데 효과가 있다고 기록되어 있다. 본 연구에서는 편측성 요관폐색 수술(unilateral ureteral obstruction, UUO)에 의한 신장 질환 및 신장 기능 저하를 유발시켜 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲을 투여한 후 신장의 병증 완화 및 기능 개선에 미치는 효과를 연구하고 그 결과를 보고하였다.

\*Corresponding author: Dae Gill Kang, Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, Republic of Korea  
Tel : +82-63-850-6933, E-mail : dgkang@wku.ac.kr

•Received : July 20, 2023 / Revised : August 2, 2023 / Accepted : August 11, 2023

## II. 재료 및 방법

### 1. 五苓散 시료

본 연구에서 사용된 五苓散은 5가지 한약재로 이루어진 방제이다(Table 1). 이 五苓散 추출물은 한풍제약(Hanpoong Pharm & Foods Co., Wanju, Korea)에서 일반의약품으로 판매되고 있는 제품으로써 본 연구를 위해 제공 받았다.

### 2. 金櫃腎氣丸 시료 제작

실험에 사용한 약재 중 金櫃腎氣丸(Table 2)은 (주)정웅제약에서 구입하였다(임실, 전라북도). 金櫃腎氣丸 추출물을 얻기 위하여 약재 10 종류(총 중량 = 1240g, 熟地黄:320g, 山藥, 山茱萸:160g 白茯苓, 澤瀉, 牡丹皮, 牛膝, 車前子:120g)를 혼합하여 100°C 증류수 3L에서 전기추출기(COSMOS-660, Kyungseo Machine Co., 인천, 한국)를 사용하여 2시간동안 추출하였다. 추출물은 4°C의 온도에서 10분 동안 3,000 rpm의 속도로 원심분리 하였다. 상층액은 진공 동결건조기(N-11, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)를 사용하여 동결 건조 시켜 주었다. 제생신기환의 물 추출물의 양은 101.59g(수율 8.192%)이었다.

### 3. 左歸飲 시료 제작

실험에 사용한 左歸飲(Table 3)의 구성 약재는 금오당(전주, 전라북도)에서 구입하였다. 6 종류(총 중량 = 420g, 熟地黄, 山藥, 山茱萸, 枸杞子:80g, 白茯苓:60g, 炙甘草:40g)를 혼합하여 100°C 증류수 2L에서 전기추출기(COSMOS-660, Kyungseo Machine Co., 인천, 한국)를 사용하여 2시간동안 추출하였다. 추출물은 4°C의 온도에서 10분 동안 3,000 rpm의 속도로 원심분리 하였다. 상층액은 진공 동결건조기(N-11, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)를 사용하여 동결 건조 시켜주었다. 제생신기환의 물 추출물의 양은 89.473g(수율 21.303%)이었다.

### 4. 실험 동물 및 식이

본 연구에서는 UUO를 이용하여 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲의 신장 질환 개선 효과를 확인하였다. 실험동물은 5주령 수컷 SD rat 50마리(약 180g)를 한일실험동물센터(완주, 대한민국)로부터 제공받아 3일간의 적응기를 거친 뒤 실험에 사용하였다. 실험은 총 3주간

실시하였으며 동물보호실에서 표준광(12시간 명/암), 온도(22±2°C) 및 습도(40±10%) 하에서 유지했다. 실험이 진행되는 동안 주 3일, 총 3회 metabolic cage에서 온도(23 ± 2 °C), 습도(50~60%), 그리고 12시간 동안 암기와 명기 주기를 유지해 주었다. 적응기 3일을 거친 후, 50마리의 실험동물을 각 10마리씩 다음과 같이 5군으로 나누었다. 1) Control, 2) UUO, 3) ORS (UUO + ORS 200 mg/kg/day), 4) GSH (UUO + GSH 200 mg/kg/day), 5) JGE (UUO + JGE 200 mg/kg/day). UUO 수술(편측성 요관폐색 수술)을 진행하기 위하여 실험쥐를 isopropanol 흡입마취를 통하여 마취 시킨 후 복강 절개 후 좌측신장 및 요관을 노출시킨 후 7-0 silk 를 이용하여 요관 폐쇄를 만들고 피부를 봉합하여 수분의 소실이 없도록 처리하였다. 본 실험 이전에 수행한 3일간의 적응기 기간 및 본 실험 진행 중 매일 측정된 실험 동물의 음수량에 근거하여 세 종류의 한의약 처방을 200mg/kg/day의 농도로 증류수에 녹여 조제한 후 일반 식이를 통하여 투여하였다. 투여 약물의 농도는 본 실험 이전의 선행연구 결과에 근거하여 설정하였다. 본 연구에 기술된 실험은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 심의를 받은 후 진행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다(승인번호, WKU23-40).

### 5. 혈액과 조직 샘플링

실험이 끝난 후, 신장조직은 10 % 파라포름알데하이드에 고정하였다. 실험동물을 희생시켜 나온 혈액은 1 mg/ml ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) 튜브에 수집하였다 수집한 혈액은 3000 rpm, 15분, 4 °C에서 원심분리하여 혈청만 분리해 -80 °C에 보관하였다.

### 6. 혈액 및 소변 생화학적 분석

혈청의 Blood urea nitrogen (BUN)과 소변과 혈청의 creatinine의 혈액생화학적 수치는 자동 생화학 측정기(automated clinical chemistry analyzer, FUZI DRI-CHEM NX700, FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. 신장 기능 지표로서 creatinine청소율(Ccr)을 확인하였으며 그 계산 방법은 아래와 같다.

$$\frac{UV(ml) * Ucr(mg/ml)}{Pcr(mg/ml) * BW(kg) * min}$$

### 7. H&E 염색

광학 현미경적 검사를 위해 신장을 10% 중성 포르말

린 용액으로 고정 후 절단하였다. 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매 과정을 거쳐 6  $\mu$ M의 연속 절편을 만든 후 슬라이드에 부착한 후 hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 시행하였다.

#### 8. 단백질 분리와 western blot 분석

적출한 신장 조직을 lysis buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6) 으로 용해 시켜 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였으며, 10% SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동 하여 분리하였다. 분리된 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 비 특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 BSA가 함유된 용액에 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. Blocking된 membrane을 1:1000 으로 희석한 각 단백질의 1차 항체(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NLRP3, ASC, Cas-1, KIM-1, NGAL,  $\beta$ -actin; Santa Cruz, TX, USA)를 처리한 다음 1:2000 으로 희석한 2차 항체(Goat anti-mouse IgG, Goat anti-rabbit IgG, Enzo, NY, USA)를 상온에서 1시간 반응시키고 ECL solution을 반응시켜 발현 정도를 Chemi-doc image analyzer (iBright FL100, ThermoFisher scientific, MA, USA)를 사용하여 측정 후 정량 하였다.

#### 9. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응 (Real time RT-qPCR)

신장으로부터 RNA 분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 RNA 농도는 흡광도 260 nm 에서 정량하였다. cDNA 합성을 위하여 500 ng mRNA과 20 ml 의 reverse transcription reaction incubated in the SimpliAmp Thermal Cycler (Life technology, Carlsbad, CA, USA)를 섞은 후 42 $^{\circ}$ C 에서 60 분, 94  $^{\circ}$ C 에서 5분 배양하여 합성된 cDNA 실험에 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 Real time RT-qPCR을 실시하였다. 사용된 primer의 염기 서열은 다음과 같다. TNF- $\alpha$  (forward: 5'-GCC TCT TCT CAT TCC TGC TTG-3', reverse: 5'-CTG ATG AGA GGG AGG CCA TT-3'), IL-1 $\beta$  (forward: 5'-AGG GCT GCT TCC AAA CCT TTG AC-3', reverse: 5'-ATA CTG CCT

GCC TGA AGC TCT TGT-3'), IL-6 (forward: 5'-ACG GCC TTC CCT ACT TCA CA-3', reverse: 5'-CAT TTC CAC GAT TTC CCA GA-3'), NLRP3 (forward: 5'-AGG AGA AAG AAG AAG AGA GGA-3', reverse: 5'-AGA GAC CAC GGC AGA AGC-3'), ASC (forward: 5'-CAG CCA TCC CGT GCC TCC AGA TCA C-3', reverse: 5'-CCA GAG AAA TGG AGT GGG CAT CAA G-3'), Cas-1 (forward: 5'-CGT CTT GCC CTC ATT ATC TG-3', reverse: 5'-TCA CCT CTT TCA CCA TCT CC-3'), KIM-1 (forward: 5'-GCA ACG GAC ATG CCA ACA TA-3', reverse: 5'-TGG CAC TGT GAC ATC CTC AGA-3'), NGAL (forward: 5'-TCA CGC TGG GCA ACA TTA-3', reverse: 5'-TTG GGA CAG GGA AGA CGA-3'), GAPDH (forward: 5'-CGA GAA TGG GAA GCT TGT CAT C-3', reverse: 5'-CGG CCT CAC CCC ATT TG-3'). 1 mL cDNA sample, 1 mL primer pairs, 8 mL ultra-pure distilled water, 그리고 10 ml SYBR Green PCR Master Mix를 섞어준 다음 Step-One<sup>TM</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 95 $^{\circ}$ C 에서 10 분 동안 denaturation step 을 거쳤다. 그 후 95  $^{\circ}$ C 에서 15 초 동안 총 40번을 반복하였으며, 60 $^{\circ}$ C 에서 60 초 진행하였다. 각각의 RNA sample 은 세번 반복 실험을 하였다. mRNA 측정 결과는 GAPDH mRNA 측정 결과에 의하여 표준화 하였다.

#### 10. 통계처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 SigmaPlot 10.0 프로그램을 이용하여 Students t-test 를 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

### III. 결과

#### 1. 약물 투여에 의한 신장무게, 몸무게 변화

실험이 진행 되는 동안 五苓散, 金樞腎氣丸, 左歸飲 투여 시 실험 종료 시 신장의 형태를 측정해본 결과 Cont군에 비하여 UUO 군에서 신장이 비대해지고 신장의 형태가 매우 손상된 것을 확인하였으며 약물 투여군에서 신장의 비대와 신장의 형태가 회복되는 효과를 확인하였다 (Fig. 1A). 또한 신장무게를 몸무게로 나눈 %

를 측정된 결과 UUO군에서 유의성 있는 증가가 있었으며 (\*\*p < 0.01), 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲을 투여한 군에서 감소하는 효과를 확인하였다 (##p < 0.01, Fig. 1B)

## 2. 약물 투여에 의한 신장 기능에 미치는 영향

UUO 수술 후 실험동물을 희생 하여 얻은 혈액에서 신장 기능 지표인 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine을 측정된 결과 UUO군은 Cont군과 비교하였을 때, 매우 유의성 있게 수치가 증가하는 것을 확인하였다. 이에 반해 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲을 투여한 군에서 혈액 내에서의 BUN과 creatinine 수치가 유의성 있게 감소하였다 (Table 4). 추가로 대사케이지 사육을 통하여 얻은 소변과 실험동물 희생 후 얻은 혈액을 이용하여 신장의 사구체 여과율의 지표인 creatinine clearance (CCr)을 측정된 결과 UUO에 의하여 CCr 수치가 유의성 있게 감소하였고 (\*\*p < 0.01) 각 약물을 투여한 군에서 모두 유의하게 CCr 수치가 증가하였다 (##p < 0.01, Fig. 2)

## 3. 신장의 조직 병리학적 변화 분석

UUO에 의하여 유발된 신장 병증 모델에서 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲의 신장의 조직 병리학적 변화를 측정하기 위하여 H&E 염색을 시행하였다. 그 결과, Cont군에서 관찰되지 않았던 기저막(basement membrane)과 메산지움 기질(mesangial matrix)을 포함한 세포외기질(extracellularmatrix: ECM)의 형태학적인 손상을 포함하여, 신장의 사구체 (glomerulus)의 심각한 손상을 확인하였다. 五苓散을 투여한 군에서는 사구체 손상을 포함한 신장의 일부 손상이 관찰되었으나, UUO군에 비하여 회복된 것을 관찰하였다. 특히 金櫃腎氣丸과 左歸飲을 투여한 군에서는 Cont군과 유사한 수준으로 신장의 손상이 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

## 4. UUO에 의하여 유도된 신장 염증 인자 발현에 대한 약물의 효과

UUO모델에서 각 약물이 신장 염증 발현 지표인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. 그 결과 UUO에 의하여 유발된 염증 cytokine의 단백질 발현이 Cont군에 비하여 현저하게 증가된 것을 확인하였으며 (\*p < 0.01), 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲을 투여한 군에서는

유의한 감소를 확인하였다 (##p < 0.01, Fig. 4A). 또한 UUO에 의하여 증가된 염증 인자의 mRNA 발현 역시 약물 투여군 에서 유의한 감소를 확인하였다 (\*p < 0.05, ##p < 0.01, Fig. 4B).

## 5. UUO에 의하여 유도된 신장 내 inflammasome 발현에 대한 약물의 효과

NLRP3 inflammasome의 단백질 발현에 대한 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲의 효과를 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다 (Fig. 5A). NLRP3 inflammasome 기전 경로는 신장의 염증에 매우 중요한 역할을 한다. 따라서 NLRP3 기전 경로의 중요한 신호 전달 인자인 NLRP3, ASC, Cas-1의 단백질 발현을 측정된 결과 Cont군에 비하여 UUO 군에서 매우 유의성 있는 증가를 확인하였다 (\*\*p < 0.01). 하지만 inflammasome 단백질 발현은 각 약물에 의하여 매우 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다 (##p < 0.01). 이와 유사하게, NLRP3 inflammasome의 mRNA 발현이 UUO 군에서 증가하는 것을 확인하였으며, 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲 투여에 의하여 mRNA의 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 5B).

## 6. UUO에 의하여 유도된 신장 병증 (nephropathy)에 대한 약물의 효과

신장 기능과 신장질환 지표인 KIM-1, NGAL 발현에 미치는 약물의 효과를 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. 그 결과 五苓散 투여군 에서는 UUO에 의하여 유도된 KIM-1의 발현 증가가 유의성 있게 감소되는 것을 확인하였으나, NGAL의 발현 변화는 관찰되지 않았다. 하지만 金櫃腎氣丸, 左歸飲 투여군 에서는 UUO군에 비하여 KIM-1과 NGAL의 단백질 발현양 모두 현저하게 감소한 것을 확인하였다 (##p < 0.01, Fig. 6A). 또한 UUO에 의하여 증가된 mRNA 발현양을 관찰한 결과 각 약물의 단백질 발현의 억제 효과와 유사한 결과를 확인하였다 (Fig. 6B).

## IV. 고찰

오령산(五苓散, ORS)은 저령(猪苓), 택사(澤瀉), 백출(白朮), 백복령(白茯苓), 육계(肉桂)로 구성되어졌으며 주로 다양한 종류의 신장 질환에 처방되어져 왔다<sup>22)</sup>. 금櫃신기환(金櫃腎氣丸, GSH)은 숙지황(熟地黃), 산약

(山藥), 산수유(山茱萸), 백복령(白茯苓), 택사(澤瀉), 목단피(牡丹皮), 우슬(牛膝), 차전자(車前子)로 구성된 방제이며 주로 신장의 양(陽)과 신장의 기(氣)의 부족으로 인한 질환에 사용된 처방이다. 또한 최근의 연구를 통하여 급성 신부전증에 효과가 있음이 보고되었다<sup>23)</sup>. 좌귀음은 숙지황(熟地黃), 산약(山藥), 산수유(山茱萸), 백복령(白茯苓), 구기자(枸杞子), 자감초(炙甘草)로 구성되었으며 신음허(腎陰虛, kidney yin deficiency)를 다스리는데 효과가 있다고 기록되어 있다. 특히 최근의 연구를 통하여 급성 신부전증에 대하여 신장기능 및 병변에 대한 개선 효과가 있음이 보고되었다<sup>24)</sup>. 연구는 신장의 병증에 주로 처방되어진 五苓散, 金匱腎氣丸, 좌귀음이 편측성 요관폐색 동물 모델에서의 신장 기능 개선과 신 손상 회복에 효과가 있음을 확인하고 그 효과에 대한 비교를 통하여 가장 효과적인 만성 신장 질환 약물을 통한 치료제 및 보조제 개발을 위한 근거를 제시하고자 본 실험을 진행하였다.

신장의 기능에 이상이 생기게 되면 체내의 여과가 제대로 이루어지지 않게 되어 신체 내에 질소 노폐물이 축적되며 이로 인하여 결과적으로는 혈액 내에 고질소혈증이 일어나고, 체액 및 전해질 균형에 이상이 생긴다고 알려져 있다<sup>25)</sup>. 특히 만성 신부전증은 가장 흔한 만성 질환 중 하나로 발병률이 증가하고 있다<sup>26)</sup>. 다양한 만성 신장 질환의 말기에 신부전으로 이어지는 기전은 매우 다양하며, 조직병리학적으로는 신장 섬유증을 초래하는 등 예후가 매우 좋지 않다<sup>27,28)</sup>. 만성 신부전증 동물 모델에서 크레아티닌은 신부전의 심각성을 추정하는 지표가 된다<sup>29)</sup>. 혈액 내 creatinine은 신장의 사구체에서 여과 되는 동안 재흡수 되지 않고 전부 요중에 배설된다. 따라서 creatinine의 요 중 배설량은 체내의 creatinine 생성량과 동일하며, 혈중 creatinine 수치는 신장 기능의 평가에 매우 중요하게 사용되는 지표이다<sup>30)</sup>. Blood urea nitrogen(BUN)은 체내에서 단백질의 이화작용으로 생긴 대사산물로써 90% 이상이 신장으로 배설된다. 따라서 BUN 수치는 신장 배설 기능을 알아볼 수 있는 지표이다<sup>31)</sup>. 본 실험에서는 실험동물로부터 얻은 혈액을 이용하여 BUN과 크레아티닌 수치를 측정하였으며 이를 바탕으로 크레아티닌청소율 (CCr)을 계산하였다. 그 결과 편측성 요관폐색 수술군에서 혈중 BUN수치와 크레아티닌 수치가 증가하였으며 五苓散, 金匱腎氣丸, 左歸飲 투여 군에서 그 수치가 유의성 있게 감소하는 결과를 확인하였다. 또한 각 처방은 편측

성 요관폐색 수술에 의하여 감소한 크레아티닌 청소율을 현저하게 증가시켰다. 따라서 五苓散, 金匱腎氣丸, 左歸飲은 신장의 여과 기능과 재흡수 기능을 동시에 개선시키며 신장 기능을 회복시켜주는 것으로 사료된다.

신장 손상이 일어나게 되면 사구체 간질의 확장, 사구체 기저막과 내피세포, 외피세포의 비대화 등이 일어나게 된다<sup>32)</sup>. 본 실험에서는 신장의 부상을 확인하고 五苓散, 金匱腎氣丸, 左歸飲에 의한 신장 손상의 회복 효과를 H&E 염색을 통하여 확인하였으며, 그 결과 편측성 요관폐색에 의하여 생긴 사구체의 손상이 약물 투여에 의하여 형태학적 손상이 저하되고, 회복되는 효과를 확인하였다. 또한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6과 같은 사이토카인은 다양한 조직 손상에서 염증의 주요 매개체 역할을 수행한다. NLRP3 염증소체는 다양한 질병에서 다른 역할을 수행하며 주로 신장의 염증과 기능 장애를 유발한다. NLRP3 염증소체의 활성화 과정을 억제하면 신장의 손상을 조절할 수 있다<sup>33)</sup>. 본 연구에서는 五苓散, 金匱腎氣丸, 左歸飲을 통한 염증 사이토카인과 NLRP3 염증소체의 발현을 분석하였다. 편측성 요관폐색 수술을 통하여 만성 신부전증이 유발된 군에서는 염증 사이토카인과 NLRP3 염증소체의 발현이 매우 유의성 있게 증가하였으며, 약물의 투여에 의하여 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 五苓散, 金匱腎氣丸, 左歸飲이 염증의 발현을 억제하는데 효과를 갖는다는 것을 의미한다. 신장의 손상과 신장의 기능저하의 대표적인 지표로는 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)과 kidney injury molecule-1 (KIM-1) 등이 있다. NGAL과 KIM-1은 신장 기능의 급격한 변화 이후에 매우 빠르게 상승하는 수치이다<sup>34)</sup>. KIM-1은 특히 신장의 근위관 부상 정도를 나타내주는 단백질이며, NGAL은 급성신장손상에서도 증가하는 유전자로 알려져 있다<sup>35,36)</sup>. 따라서 KIM-1과 NGAL은 신장의 질환에 관련된 매우 중요한 평가 지표이다. 본 연구에서는 편측성 요관폐색을 통하여 신장 손상 지표인 KIM-1과 NGAL의 단백질 발현과 mRNA 발현이 유의성 있게 증가한 것을 확인하였으며, 五苓散 투여군에서는 감소효과를 확인하지 못하였으나, 金匱腎氣丸, 左歸飲의 약물 투여 군에서 이 발현이 매우 유의성 있게 감소하는 효과를 확인하였다. 이러한 결과는 五苓散, 金匱腎氣丸, 左歸飲이 신장의 손상을 개선시키는데 효과가 있다는 것을 나타낸다.



## V. 결론

본 연구 결과를 통하여 五苓散, 金櫃腎氣丸, 左歸飲을 통한 신장 손상에 대한 개선 효과 및 신장 기능 개선 효과를 확인하였으며, 특히 본 연구의 결과에 근거하여 金櫃腎氣丸, 左歸飲이 편측성 요관폐색 동물 모델의 신장 손상을 억제함으로써 매우 효과적인 만성 신부전 질환의 억제제로 사료된다. 따라서 이에 대한 추가 연구 및 심도 있는 기전 연구를 통하여 본 연구에 사용된 한의학 처방이 만성 신장 질환의 치료에 매우 우수한 보조제로 개발될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문의 연구는 원광대학교 (2022)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine (19th ed.). New York: Mc Graw Hill Education, 2015.
2. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis.* 1992;20:1-17.
3. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int.* 1999;56:571-580.
4. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009;75:1145-1152.
5. Better OS, Arief AI, Massry SG, Kleeman CR, Maxwell MH. Studies on renal function after relief of complete unilateral ureteral obstruction of three months' duration in man. *Am J Med.* 1973;54:234-240.
6. Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol.* 2014;46:765-776.
7. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Inhibition of NF- $\kappa$ B ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298:F196-F204.
8. Branten AJ, Vervoort G, Wetzels JF. Serum creatinine is a poor marker of GFR in nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:707-711.
9. Carrie BJ, Golbetz HV, Michaels AS, Myers BD. Creatinine: an inadequate filtration marker in glomerular diseases. *Am J Med.* 1980;69:177-182.
10. Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis.* 1993;251-259.
11. Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis.* 1993;251-259.
12. Yang X, Wu Y, Li Q, et al. CD36 Promotes Podocyte Apoptosis by Activating the Pyrin Domain-Containing-3 (NLRP3) Inflammasome in Primary Nephrotic Syndrome. *Med Sci Monit.* 2018;24:6832-6839.
13. Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007;82:259-264.
14. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140:821-832.
15. Yan J, Li Y, Yang H, et al. Interleukin-17A participates in podocyte injury by inducing IL-1 $\beta$  secretion through ROS-NLRP3 inflammasome-caspase-1 pathway. *Scand J Immunol.* 2018;87:e12645.
16. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62(1):237-244.
17. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin--an emerging troponin for kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;3737-3743.
18. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR,

- Foster K, Yang J. Endocytic delivery of lipocalin- siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005;115(3):610-621.
19. Merika L, Rasić S, Serdarević N. Importance of determination of urine neutrophil gelatinase associated lipocalin in early detection of acute kidney injury. *Coll Antropol.* 2014;38(1):161-166.
20. Kidher E, Harling L, Ashrafiyan H, Naase H, Chukwuemeka A, Anderson J. Pulse wave velocity and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as predictors of acute kidney injury following aortic valve replacement. *J Cardiothorac Surg.* 2014;9:89.
21. Liu W, Tang F, Deng Y, Li X, Lan T, Zhang X. Berberine reduces fibronectin and collagen accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition. *Mol Cell Biochem.* 2009;325:99.
22. He L, Rong X, Jiang J, M Liu, P Q, Li L. Amelioration of anti-cancer agent adriamycin-induced nephritic syndrome in rats by Wulingsan (Gorei-San), a blended traditional Chinese herbal medicine. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1452.
23. Han BH, Lee HK, Jang SH, Tai AL, Jang YJ, Yoon JJ, Kim HY, Lee HS, Lee YJ, Kang DG. Effect of Geungwe-sinkihwan on Renal Dysfunction in Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Renal Failure Mouse. *Nutrients.* 2021;13(11):3859.
24. Na SW, Jang YJ, Hong MH, Yoon JJ, Lee HS, Kim HY, Kang DG. Protective Effect of Joa-Gui Em through the Improvement of the NLRP3 and TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling by Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Renal Failure Rats. *eCAM.* 2021; 7178868.
25. Zhong TY, Tang J, Liu YW, Li ZJ, Chen DY, Zhao MZ, et al. High mobility group box-1 stimulates proinflammatory cytokine production in endothelial cells via MAP kinases. *Europe PMC.* 2009;29(8):1517-1520.
26. Zhao YY, Cheng XL, Cui JH, Yan XR, Wei F, Bai X, Lin RC. Effect of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (ergone) on adenine-induced chronic renal failure rat: A serum metabonomic study based on ultra performance liquid chromatography/high-sensitivity mass spectrometry coupled with MassLynx i-FIT algorithm. *Clinica Chimica Acta.* 2012;413(19-20):1438-1445.
27. Yu HY. Progression of chronic renal failure. *Arch Intern Med.* 2003;163:1417-1429.
28. Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med.* 2004;43:9-17.
29. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD. A review *Am J Nephrol.* 2010;31:471-481.
30. Spector DA, Yang Q, Wade JB. High urea and creatinine concentrations and urea transporter B in mammalian urinary tract tissues. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):467-474.
31. McCullough PA, Wolyn R, Rocher LL, Levin RN, O'Neill WW. Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. *Am J Med.* 1997; 103(5):368-375.
32. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007;27:195-207.
33. Xiang H, Zhu F, Xu ZF, Xiong J. Role of inflammasomes in kidney diseases via both canonical and non-canonical pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:106.
34. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life.* 2008;60:199-203.
35. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.* 1998;273(7):4135-4142.
36. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven PS. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab.* 2003;80(4):365-376.





Table 1. Composition of Oryeongsan (ORS)

| 한약명(韓藥名) | 생약명(生藥名)                         | 학명 (學名)                                   |
|----------|----------------------------------|---|
| 저령(猪苓)   | <i>Polyporus</i>                 | <i>Polyporus umbellatus (Pers.) Fries</i> |
| 택사(澤瀉)   | <i>Alismatis Rhizoma</i>         | <i>Alisma orientalis (Sam) Juzep</i>      |
| 백출(白朮)   | <i>Atractylodis Rhizoma Alba</i> | <i>Atractylodes macrocephala Koidz</i>    |
| 백복령(白茯苓) | <i>Poria(Hoelen)</i>             | <i>Poria cocos (Schw.) Wolf</i>           |
| 육계(肉桂)   | <i>Cinnamomi Cortex Spissus</i>  | <i>Cinnamomum cassia Blume</i>            |

Table 2. Composition of Geumgwe-sinkihwan (GSH)

| 한약명(韓藥名) | 생약명(生藥名)                                 | 학명 (學名)                                       |
|----------|--|---|
| 숙지황(熟地黃) | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i>         | <i>Rehmannia glutinosa (Gaertner) Libosch</i> |
| 산약(山藥)   | <i>Dioscoreae Rhizoma</i>                | <i>Dioscorea batatas Decne</i>                |
| 산수유(山茱萸) | <i>Cornus officinalis Sieb. et Zucc.</i> | <i>Cornus officinalis Sieb</i>                |
| 백복령(白茯苓) | <i>Poria(Hoelen)</i>                     | <i>Poria cocos (Schw.) Wolf</i>               |
| 택사(澤瀉)   | <i>Cinnamomi Cortex Spissus</i>          | <i>Cinnamomum cassia Blume</i>                |
| 목단피(牡丹皮) | <i>Moutan Cortex</i>                     | <i>Paeonia suffruticosa Andrews</i>           |
| 우슬(牛膝)   | <i>Achyranthis Radix</i>                 | <i>Achyranthes bidentata Bl</i>               |
| 차전자(車前子) | <i>Plantaginis Semen</i>                 | <i>Plantago asiatica L</i>                    |

Table 3. Composition of Jwagwieum (JGE)

| 한약명(韓藥名) | 생약명(生藥名)                                 | 학명 (學名)                                       |
|----------|--|---|
| 숙지황(熟地黃) | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i>         | <i>Rehmannia glutinosa (Gaertner) Libosch</i> |
| 산약(山藥)   | <i>Dioscoreae Rhizoma</i>                | <i>Dioscorea batatas Decne</i>                |
| 산수유(山茱萸) | <i>Cornus officinalis Sieb. et Zucc.</i> | <i>Corni Fructus</i>                          |
| 백복령(白茯苓) | <i>Poria(Hoelen)</i>                     | <i>Poria cocos (Schw.) Wolf</i>               |
| 구기자(枸杞子) | <i>Lycii Fructus</i>                     | <i>Lycium chinense Mill</i>                   |
| 자감초(炙甘草) | <i>Glycyrrhizae Radix Praeparata</i>     | <i>Glycyrrhiza uralensis Fisch</i>            |

Table 4. Effect of ORS, GSH, and JGE on plasma BUN and creatinine

| Group | BUN (mg/dl)    | Cr (mg/dl)     |
|-------|----------------|----------------|
| Cont  | 15.64 ± 0.88   | 0.216 ± 0.03   |
| UUO   | 42.94 ± 0.82## | 0.351 ± 0.01## |
| ORS   | 18.84 ± 0.51** | 0.312 ± 0.05** |
| GSH   | 21.18 ± 0.36** | 0.298 ± 0.01** |
| JGE   | 18.51 ± 1.35** | 0.316 ± 0.01** |

JSH, jesaeng-sinkihwan; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine. Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). \*\*p < 0.01 vs. Cont; ##p < 0.01, ##p < 0.01 vs. UUO.

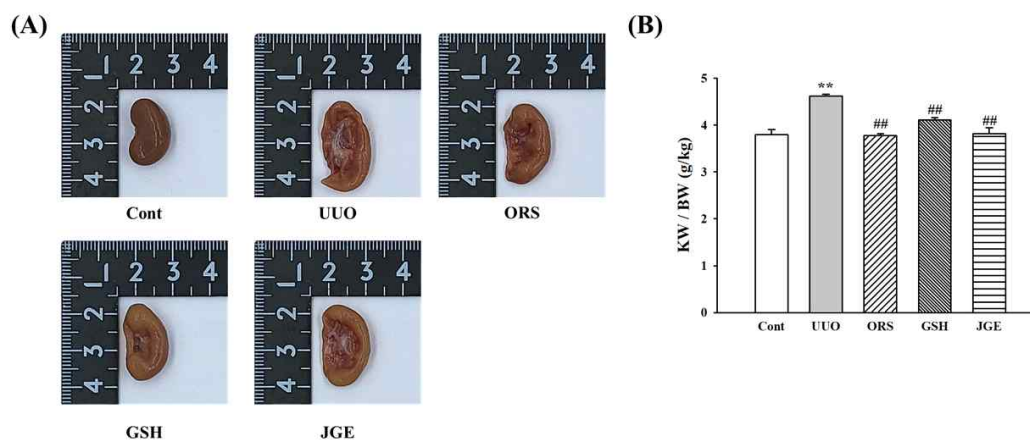


Fig. 1. Effect of ORS, GSH, and JGE on kidney size and kidney weight % of body weight. Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). \*\*p < 0.01 vs. Cont; ##p < 0.01 vs. UUO.

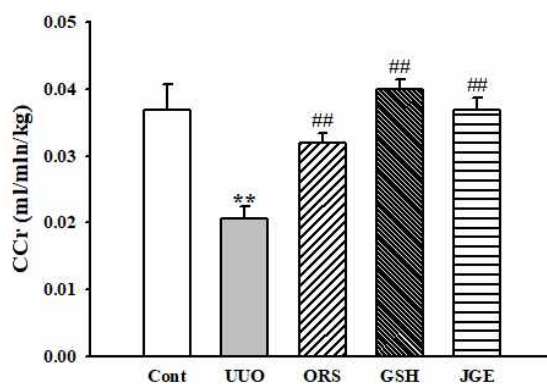


Fig. 2. Effect of ORS, GSH, and JGE on creatinine clearance. Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). \*\*p < 0.01 vs. Cont; ##p < 0.01 vs. UUO.

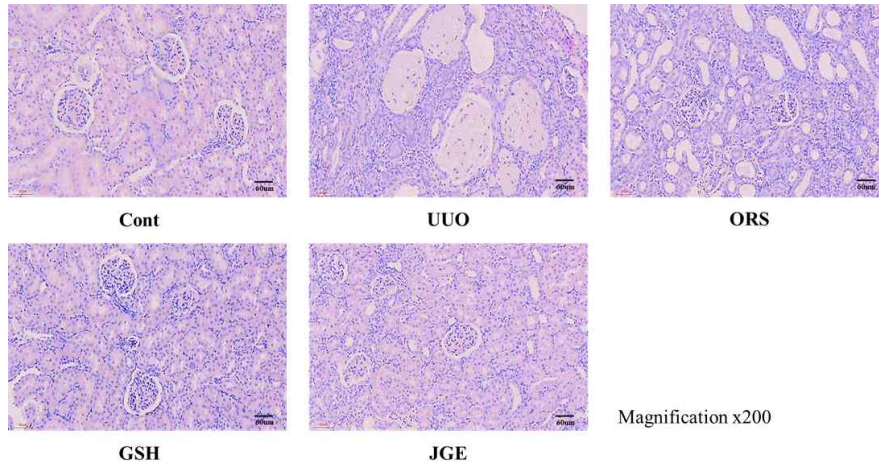


Fig. 3. Representative images of H&E staining of kidney in Cont, UUO, ORS, GSH, and JGE rats. Histologic abnormalities were not observed in the glomerulus in UUO group. Administration of ORS, GSH, and JGE improved tissue damage induced by UUO (original magnification: X200).

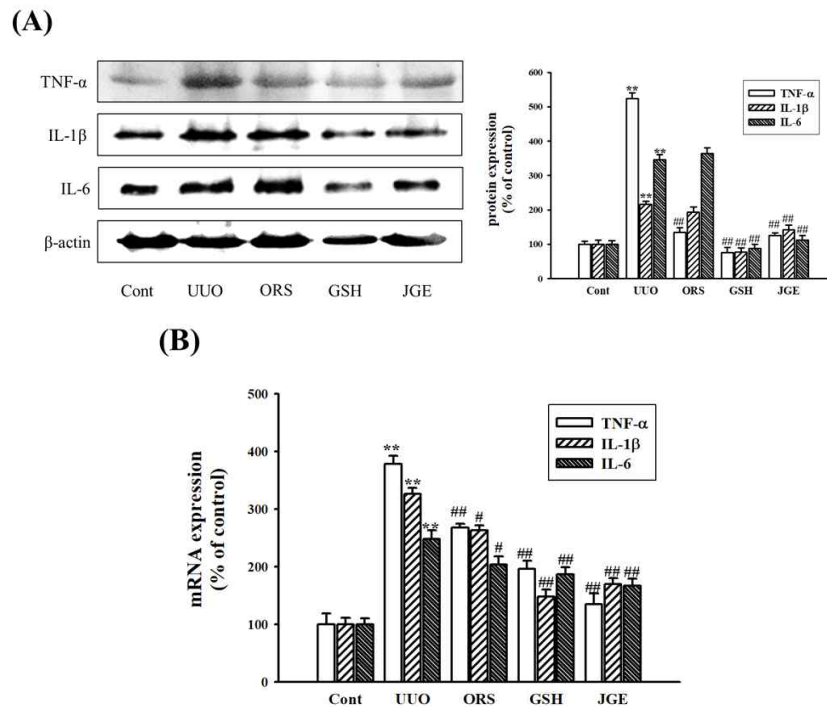


Fig. 4. Effect of ORS, GSH, and JGE on pro-inflammatory cytokines expression in kidney. Protein expressions of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in kidney were analyzed by Western blot analysis (A). Relative mRNA expression in kidney was analyzed by real-time RT-qPCR (B). Data are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). \*\*p < 0.01 vs. Cont; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. UUO.

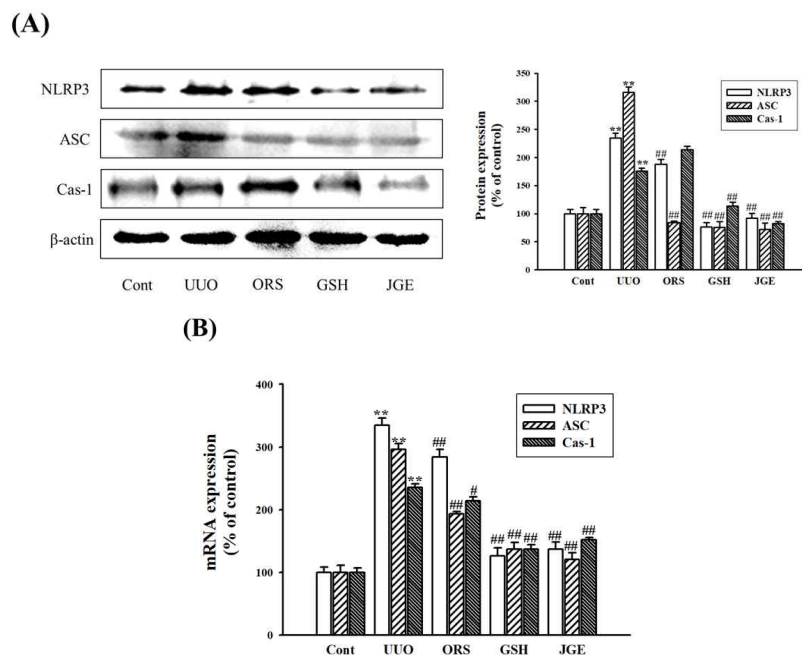


Fig. 5. Effect of ORS, GSH, and JGE on NLRP3 inflammasomes in kidney. Protein expressions of inflammasomes, such as NLRP3, ASC, and Cas-1 in kidney were analyzed by Western blot analysis (A). Relative mRNA expression in kidney was analyzed by real-time RT-qPCR (B). Data are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). \*\*p < 0.01 vs. Cont; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. UUO.

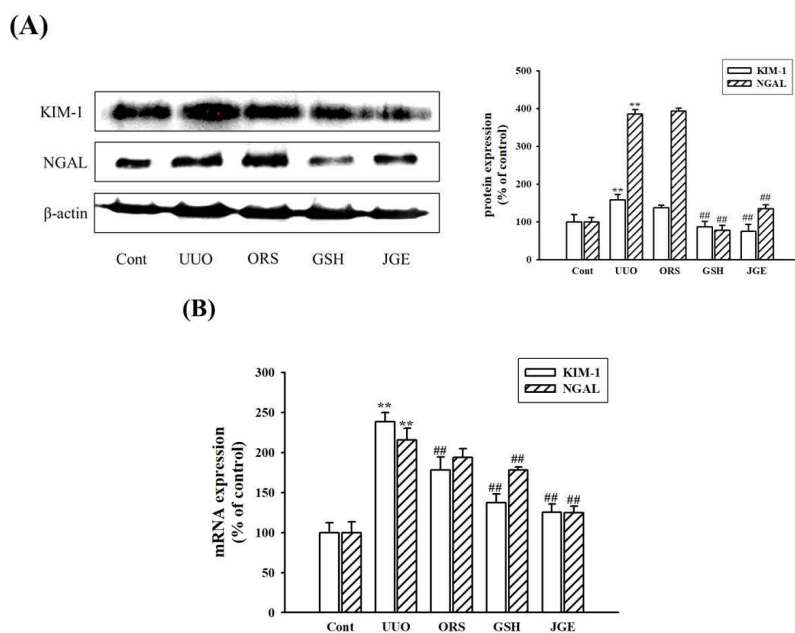


Fig. 6. Effect of ORS, GSH, and JGE on KIM-1 and NGAL levels in kidney. (A) Western blots analysis on KIM-1 and NGAL protein expressions. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. (B) Real-time RT-qPCR analysis of KIM-1 and NGAL mRNA expressions. Data are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). \*\*p < 0.01 vs. Cont; ##p < 0.01 vs. UUO.