HaCaT Cell에서 황기 에탄올 추출물의 Aquaporin-3 발현 효과

박현철¹, 김희택², 하현용³, 이평재³, 윤경섭^{1*}

Ethanol Extract of *Astragalus membranaceus* Bunge Induces Aquaporin-3 Expression in HaCaT Cells

Hyun-Chul Park¹, Hee-Taek Kim², Hun-Young Ha³, Pyeong-Jae Lee³, and Kyung-Sup Yoon^{1*}

접수: 2013년 8월 7일 / 게재승인: 2013년 11월 11일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Astragalus membranaceus* Bunge is used in herbal medicine in Eastern Asian countries including Korea. In this study, we assessed the effects of *A. membranaceus* extract (AM) on the aquaporin-3 (AQP3) protein expression in HaCaT cells. AM did not affect viability of HaCaT cells. AQP3 expression and cell migration seem to be maximal at 100 µg/mL concentration. Epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitor, PD153035, blocked AM-induced AQP3 expression and cell migration. In addition, an 80% ethanol extracts of herbal prescription, SinhyoTakleesan (ST), which is composed of *A. membranaceus*, *Angelicae gigantis*, *Glycyrrhiza glabra* Linne, and *Lonicera japonica* Flos also induced AQP3 expression at 20 µg/mL in HaCaT cells. Collectively, these results suggest that AM induce AQP3 expression via EGFR pathway.

Keywords: *Astragalus membranaceus*, SinhyoTakleesan, Aquaporin-3, Keratinocyte, EGFR

1. 서론

생명체는 피부 및 다른 기관의 수분 보유율을 조절하는 aquaporin (AQP)이라는 단백질이 있다. AQP는 박테리아, 식물, 동물에서 광범위하게 발현되며 세포막을 통과하는 6개의 α -helix를 기본 구성 단위로 하는 사량체로 세포막에 존재하고 있다. 현재까지 포유류에서 13종류의 AQP 단백질들이 밝혀져 있다 [1]. 이들은 수송능력에 따라 물만 이동시키는 AQP 그룹 (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5), 물 분자뿐만 아니라 글리세롤 같은 작은 용질도 수송하는 aquaglyceroporin 그룹 (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10), 그리고 그 구체적인 기능에 대한 연구가 진행중인 unorthodox AQP 그룹 (AQP6, AQP8, AQP11, AQP12)의 세 그룹으로 나뉘어진다 [2]. AQP는 체액을 수송하는 상피세포와 내피세포에서 주로 발현한다. 여러 종류의 AQP 유전자결합 생쥐를 이용한 표현형 분석을 통해 AQP는 빠른 수분이동과 관련된 신체 기능인 소변 농축 기전 및 상피세포의 분비 등에 중요한 역할을 담당하고 있음이 증명되었을 뿐만 아니라 [3,4], 흥미롭게도 뇌부종, 신경신호전달, 세포이동, 세포증식, 지방대사 등 예측하지 못한 다양한 AQP의 역할이 새롭게 밝혀지면서 최근 AQP의 중요성이 더욱 강조되고 있다 [5-9]. 또한 AQP는 부종을 비롯한 인체 여러 질병의 병태생리와 밀접하게 관련되어 있어, AQP 유전자 및 단백질을 표적으로하는 새로운 치료 기술 및 약물 개발이 절실히 요구되고 있으며, 실제로 현재 활발하게 진행되고 있다 [7-9].

AQP3는 위의 신장에서 처음으로 유전자클로닝 되었으며 [10], 신장 집합관의 기저측막뿐 아니라 표피, 기도, 결장, 방광, 각막 등의 다양한 기관의 상피세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다 [10-15]. 뿐만 아니라 체액 수송과 상관이 없는

¹(주)사임당화장품 기술연구소
¹Saimdang Cosmetics Co., Ltd., R&D Center, Chungbuk 363-886, Korea
Tel: +82-43-218-4203, Fax: +82-43-218-4204
e-mail: ksyoonjh@hanmail.net

²세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실
²Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Semyung University Oriental Medical Hospital, Jecheon 390-711, Korea

³세명대학교 자연약재과학교실
³Dept. of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

피부 표피 기저막의 각질세포에서도 AQP3가 발견되었다 [16,17]. 이러한 AQP3에 대한 연구가 많이 이뤄져 왔으며, 특히 Ma 등은 AQP3가 결핍된 생쥐를 이용하여 집합관의 삼투에 의한 물 수송력이 3배 정도 감소되었다는 [18] 것을 밝혀 AQP3가 물 수송에 관여함을 확인하였고, Combet 등은 AQP3 녹아웃 마우스를 이용한 표현형 분석결과 AQP3 유전자 결여된 생쥐는 소변농축 기전의 결함으로 인한 다뇨증과 함께 피부건조 및 상처치유 지연을 보인다 [19-21]는 등 다양한 역할에 대하여 확인하였다. 또한 Cao 등에 의하여 AQP3 발현 기전이 EGF receptor에 의해 조절되는 것으로 밝혀졌다 [22].

신호타리산은 외과적 상처를 치료하고 기혈을 보하는 동시에 새살을 회복시키는 작용을 하는 한방 처방으로 황기, 당귀, 감초 및 인동초로 구성되어 있으며 이러한 약물들의 구성은 군신좌사처방 원리를 따른다 [23]. 처방 중에서 용량이 가장 많고, 처방 전체에서 종합작용의 중심약물로 작용하는 것을 군약이라고 하는데 신호타리산에서는 황기가 군약으로 사용되었다. 그리고 그 외 약물인 당귀, 감초 및 인동초 각각은 신약, 좌약, 사약으로 황기를 도와주는 보조 약제로 사용되었다 [24]. 특히 황기 (*Astragali Radix*)는 콩과 (*Legumiosae*)에 속하는 다년생 초본식물인 *Astragalus membranaceus* Bunge (*Leguminosae*)와 기타 *Astragalus* 속 식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로 생리활성 성분으로는 flavonoid 화합물인 astraisoflavans, calycosin, formononetin, 2',3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyisoflavone 등과 saponin으로 astragaloside, soya-saponin 등이, 그 외 γ -aminobutyric acid, lipid, β -sitosterol, polysaccharides 등이 알려져 있다 [25-28]. 생리활성으로 혈압강하, 이뇨작용, 강장작용, 혈당 강하작용, 면역증강 작용 등이 있다고 보고된 바 있다. 본초강목의 본경에서 '오래된 중기를 터뜨리고 고름을 배출시키고 통증을 줄이고 나병과 같은 피부병과 치질, 치루를 치료하며 허약한 것을 보충하여 소아의 병을 낮게 한다'라고 하여 예로부터 피부를 건강하게 해주어 기가 밖으로 빠져나가는 것을 막고 식은땀을 그치게 함으로서 피부의 항상성을 유지시켜 피부 수분 보유능력을 강화하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다 [23]. 또한 정 등에 의하면 인체보습 효능 평가에서 보습효과가 있는 것으로 보고 하였다 [29]. 따라서 본 연구에서는 황기 및 신호타리산에서 human keratinocyte인 HaCaT cell에서 수분조절에 관여하는 AQP3의 발현에 미치는 영향을 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료, 시약 및 기기

본 실험에 사용한 약재는 퓨어마인드제약 (경북, 영천)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Hyclone (Logan, USA), Sigma Aldrich (Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정은 BIO-TEK Instruments (Winooski, VT, USA)의 EL800 microplate reader를 사용하였

다. Western blot을 위해 Bio-rad (California, USA)의 western blot kit 및 semi-dry transfer system을 사용하였고 image analysis system (Bio-rad Lab., Inc. California, USA)으로 결과를 확인하였다. 항체는 Millipore (Temecula, CA, USA), Santa Cruz Biotech (CA, USA), Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

2.2. 황기 및 신호타리산 추출물의 제조

건조 황기 100 g과 인동초 대신에 금은화를 적용한 신호타리산 (황기 3: 당귀 2: 감초 1: 금은화 1) 840 g을 각각 80% 에탄올 용매에 담가 냉침하였다. 여과하여 bottle에 포집하였고 이 과정을 3회 반복하였다. 이 추출액을 여과하여 여액을 감압농축기로 농축한 이후에 동결건조 하였다. 상기 추출물을 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 100 mg/mL로 용해시켜 스톡 용액을 제조하여 이용하였다.

2.3. 세포배양

세포주는 독일암연구센터의 Dr. Fusenig로부터 분양받은 HaCaT cell을 사용하였으며, 세포배양에 사용된 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)는 10% fetal bovine serum (HyClone Lab., Logan, USA), 1% antibiotic antimycotic (100 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin, Life Tech Inc., NY, USA)을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

본 실험에서 HaCaT cell에 대한 시료의 처리농도를 결정하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] assay를 Mosmann의 방법 [30]을 변형하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다. HaCaT cell을 5×10^3 cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24 h 동안 부착시킨 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 더 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 확인하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다.

2.5. 단백질 발현 조사 (Western Blot 분석)

HaCaT cell을 10% FBS를 첨가한 DMEM에 1×10^6 cells의 밀도로 100 mm dish에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24 h 동안 부착시킨 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음 시료를 처리하여 24 h 동안 더 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 세척하여 1.5 mL microtube에 옮기고 세포침전물을 Pro-prep protein extraction solution (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)을 첨가하여 세포를 파괴한 후 4°C에서 15,000 rpm으로 20

min 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 BCA 방법에 따라 정량한 후 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 다음, PVDF membrane에 transfer시켰다. Membrane을 5% skim milk solution으로 1 h 동안 blocking한 뒤 primary antibody로 상온에서 3~4 h 동안 반응시키고, horseradish peroxidase가 결합된 secondary antibody로 처리하였다. Chemiluminescence kit을 이용하여 발색된 밴드의 강도를 확인하였다. β -actin은 각각의 시료에 동량의 단백질이 들어있는지 확인하기 위한 대조군으로 사용하였다.

2.6. 세포의 이동 평가

HaCaT cell을 공 (Well) 당 2.5×10^5 농도로 분주하여 세포 단일층을 형성시킨 후, 혈청이 없는 배지로 37°C , 5% CO_2 조건 하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양한 세포를 p1000 피펫 팁으로 '긁힘-손상'을 유도하고 PBS로 세척하였다. '긁힘-손상'된 것에 무혈청 배지로 갈아준 다음 시료를 24 h 처리하여, 현미경 (Olympus Inc., Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였다. 그리고 세포 '긁힘-손상'의 거리는 이미지 분석 프로그램 (iSolution/Lite, iMTechnology, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다.

2.9. 통계처리

모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 오차 (mean $\pm$ SE)로 표기하였고 통계 처리는 Student's *t*-test로 검정하였고 대조군과 비교하여, $p < 0.05$ 인 경우 *, $p < 0.01$ 인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황기 추출물의 HaCaT cell 생존율에 미치는 영향

각질세포인 HaCaT cell에서 AM의 처리가 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다. Fig. 1에서 AM 처리군은 세포생존율이 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보여 AM이 HaCaT cell의 세포독성에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다. 따라서 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이하에서 단백질 발현 및 세포 이동 실험을 진행하였다.

3.2. AQP3 발현에 대한 황기 추출물의 효과

황기가 피부질환 치료에 사용되어왔으며 또한 보습에 효과가 있다고 보고된 바 있다 [24,29]. 그리고 다른 식물추출물에서도 AQP3 발현을 증가시킨다는 보고가 있었다 [31]. 따라서 AM에서도 피부세포에서 수분조절에 관여하는 AQP3의 단백질 발현에 미치는 정도를 알아보기 위해 HaCaT cell로부터 총단백질을 분리하여 western blotting을 시행하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 HaCaT cell에 AM을 1, 20, 50 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 24 h 처리했을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 AQP3의 발

Fig. 1. The effect of AM on the viability of HaCaT cells. Cells were treated with indicated concentration of AM or EGF for 24 h at 37°C . Cell viability was measured by MTT assay. Values are mean $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to untreated group.

Fig. 2. The effect of AM on expression of AQP3 in HaCaT cells. The cells were treated with indicated concentration of AM or EGF (50 ng/mL) for 24 h at 37°C . The AQP3 and β -actin were assayed by western blot analysis as described in Materials and Methods (a). In bar graph, the relative intensity of AQP3 was expressed as a ratio of AQP3/ β -actin and compared to the untreated group (b). Each value represents mean $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to untreated group.

현이 가장 증가되는 것을 확인하였다. AM의 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 AQP3 발현의 증가하는 것을 볼 수 있는 데 이것은 식물 추출물에서 볼 수 있는 양면효과 (biphasic effect)인 것으로 사료된다.

3.3. 황기 추출물의 세포이동 효과

AQP3의 발현의 증가는 세포의 이동과 관련이 있다고 알려져 있다 [32]. 그리고 황기의 성분인 formononetin의 경우 상처치유 효과가 있다고 보고된 바가 있다 [33]. 따라서 AM의 HaCaT cell의 이동에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 “�힘-손상”을 만든 세포층에 AM을 1, 20, 50 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였다. 그리고 24 h 후에 긁힘 상처가 회복되는 정도를 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 대조군의 경우에는 시간의 경과에 따른 긁힘 면적이 거의 감소되지 않은 반면, AM 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 24 h 처리한 세포에서는 “긁힘 손상”부위로 세포의 이동이 20% 정도로 나타났다.

3.4. 황기 추출물의 EGFR를 매개한 AQP3 발현과 세포이동

Cao 등에 의하면 AQP3의 발현은 EGFR를 매개한다고 하였다 [22]. 따라서 AM의 AQP3의 발현이 EGFR를 매개하여 발현하는지를 알아보기 위해 EGFR kinase inhibitor로 알려진 PD153035 10 μM 과 AM 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 함께 24 h 처리하여 western blotting을 실시하였다. Fig. 4(a)에서 AM만 단독으로 처리하였을 때는 AQP3의 발현이 대조군에 비해 증가하였으나 PD153035와 함께 처리하였을 때는 AQP3의 발현이 감소하게 나타났다. 따라서 AM의 AQP3 발현은 EGFR과 관련이 있다고 사료된다.

Fig. 3. The effect of AM on cell migration in HaCaT cells. Confluent HaCaT cells were scratch wounded, washed and allowed to migration in serum-free medium with or without AM for 24 h at 37°C. HaCaT cells in vitro migration are shown in (a) which were expressed as average gap in (b). Values are mean $\pm$ SE. * p <0.05 and ** p <0.01 compared to untreated group.

또한 세포의 이동은 AQP3 발현에 의존적이기 때문에 AM을 HaCaT cell처리하였을 때도 EGFR을 경유하여 세포의 이

Fig. 4. AM-induced AQP3 expression and cell migration are blocked by PD153035. Cells were treated with AM (100 $\mu\text{g/mL}$) with or without EGFR kinase inhibitor PD153035 (10 μM) for 24 h at 37°C. The AQP3 and β -actin were assayed by western blot analysis as described in Materials and methods (a). In bar graph, the relative intensity of AQP3 was expressed as a ratio of AQP3/ β -actin and compared to the untreated group (b). Cell migration was detected by scratch wounded assay as described in the Materials and methods section and photographed in (c) and quantified in (d). Values are mean $\pm$ SE. * p <0.05 and ** p <0.01 compared to untreated group.

동이 일어나는지 확인하였다. EGFR kinase inhibitor PD153035 10 μ M과 AM 100 μ g/mL을 24 h 함께 HaCaT cell에 처리했을 때 세포 이동변화를 측정하였다. Fig. 4(b)에서 AM 100 μ g/mL을 단독으로 24 h 처리하였을 때 “굵힘 손상”부위로 세포의 이동이 30% 정도 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 EGFR kinase 억제제와 함께 처리 하였을 때는 세포의 이동이 대조군과 비슷하게 나타났다. 따라서 세포의 이동에 있었어도 EGFR가 관여하는 것으로 사료된다.

3.5. AQP3 발현에 신호타리산 추출물의 효과

AM이 AQP3 발현을 증가시키고 상처치료 즉 세포이동 효과가 있다는 것을 확인하였다. 따라서 한방처방의 원인인 군신 좌사에서, ST의 군약으로 적용하는 AM이 AQP3 발현 양상에 미치는 영향을 알아보았다. 먼저 각질세포인 HaCaT cell에서 ST에 대한 세포생존율을 알아보기 위해 1, 20, 50 그리고 100 μ g/mL 농도로 24 h간 동안 처리하여 MTT assay를 하였다. 그 결과 각각 100.7, 111.9, 93.5 그리고 41%의 세포생존율이 나타났다 (data not shown). 따라서 독성이 나타나지 않는 1, 20, 그리고 50 μ g/mL의 ST를 HaCaT cell에 24시간 처리하여 AQP3의 발현을 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 20 μ g/mL에서 AQP3의 발현이 대조군보다 증가하는 것을 확인하였다.

Fig. 5. The effect of ST on expression of AQP3 in HaCaT cells. The cells were treated with indicated concentration of ST or EGF (50 ng/mL) for 24 h at 37°C. The AQP3 and β -actin were assayed by western blot analysis as described in Materials and Methods (a). In bar graph, the relative intensity of AQP3 was expressed as a ratio of AQP3/ β -actin and compared to the untreated group (b). Each value represents mean $\pm$ S.E. * p <0.05 and ** p <0.01 compared to untreated group.

4. 결론

본 연구에서는 AM 및 ST를 각질세포인 HaCaT cell에 처리하여 AQP3의 발현을 측정하였으며, 특히 AM에 의한 AQP3에 대한 작용기전을 확인하였다. AM을 HaCaT cell에 처리하였을 때 AQP3의 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, 세포의 굵힘-손상에서도 농도 의존적으로 세포 이동이 증가하였다. EGFR kinase inhibitor PD153035와 AM을 함께 처리하였을 때 AQP3 발현이 억제되었다. 그리고 세포의 이동은 대조군과 비슷하게 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 HaCaT 세포에서 AM의 AQP3 발현은 EGFR을 매개하여 조절되는 것으로 사료된다. 또한 부가적으로 군약으로 작용하는 AM이 포함된 ST에서도 AQP3 발현을 확인하였다. 따라서 황기 및 신호타리산은 AQP3 발현을 통한 피부 보습 소재로서의 활용가치가 큰 것으로 판단된다. 향후, 황기추출물이 AQP3에 의하여 각질세포내로 glycerol이 흡수되는 정도와 EGFR의 down stream에 대한 세포 기전 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

감사

본 연구는 2012년 보건복지부 한의약산업육성제품화지원사업 (F110018)의 연구비 일부에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Agre, P., L. S. King, M. Yasui, W. B. Guggino, O. P. Ottersen, Y. Fujiyoshi, A. Engel, and S. Nielsen (2002) Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542: 3-16.
- Rojek, A., J. Praetorius, J. Frøkiaer, S. Nielsen, and R. A. Fenton (2008) A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Ann. Rev. Physiol.* 70: 301-327.
- Verkman, A. S., B. Yang, Y. Song, G. T. Manley, and T. Ma (2000) Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice. *Exp. Physiol.* 85: 233-241.
- Verkman, A. S. (2006) Roles of aquaporins in kidney revealed by transgenic mice. *Semin. Nephrol.* 26: 200-208.
- Manley G. T., M. Fujimura, T. Ma, N. Noshita, F. Filiz, A. W. Bollen, P. Chan, and A. S. Verkman (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* 6: 159-163.
- Saadoun, S., M. C. Papadopoulos, M. Hara-Chikuma, and A. S. Verkman (2005) Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 434: 786-792.
- Verkman, A. S. (2008) Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert. Rev. Mol. Med.* 10: 1-18.
- Verkman, A. S., M. Hara-Chikuma, and M. C. Papadopoulos

- (2008) Aquaporins-new players in cancer biology. *J. Mol. Med.* 86: 523-529.
9. Hara-Chikuma, M., E. Sohara, T. Rai, M. Ikawa, M. Okabe, S. Sasaki, S. Uchida, and A. S. Verkman (2005) Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J. Biol. Chem.* 280: 15493-15496.
 10. Ishibashi, K., S. Sasaki, K. Fushimi, S. Uchida, M. Kuwahara, H. Saito, T. Furukawa, K. Nakajima, Y. Yamaguchi, and T. Gojobori (1994) Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6269-6273.
 11. Echevarria, M., E. E. Windhager, S. S. Tate, and G. Frindt (1994) Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10997-11001.
 12. Nielsen, S., L. S. King, B. M. Christensen, and P. Agre (1999) Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am. J. Physiol.* 273: 1549-1561.
 13. Ma, T. and A. S. Verkman (1999) Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J. Physiol.* 517: 317-326.
 14. Spectro, D. A., J. B. Wade, R. Dillow, D. A. Steplock, and E. J. Weinman (2002) Expression, localization, and regulation of aquaporin-1 to -3 in rat urothelia. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 282: 1034-1042.
 15. Verkman, A. S. (2003) Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp. Eye Res.* 76: 137-143.
 16. Verkman, A. S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118: 3225-3232.
 17. Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman (2005) Aquaporin-3 function as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol. Cell* 97: 479-486.
 18. Ma, T., Y. Song, B. Yang, A. Gillespie, E. J. Carlson, C. J. Epstein, and A. S. Verkman (2000) Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4386-4391.
 19. Combet, S., M. Van Landschoot, P. Moulin, A. Piech, J. M. Verbatz, E. Goffin, J. L. Balligand, N. Lameire, and O. Devuyst (1999) Regulation of aquaporin-1 and nitric oxide synthase isoforms in a rat model of acute peritonitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2185-2196.
 20. Hara, M., T. Ma, and A. S. Verkman (2002) Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J. Biol. Chem.* 277: 46616-46621.
 21. Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman (2008) Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 128: 2145-2151.
 22. Cao, C., Y. Sun, S. Healey, B. Zhigang, W. Shu, K. Nicola, C. Wenming and W. Yinsheng (2006) EGFR-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. *Biochem. J.* 400: 225-234.
 23. Sin, J. M. (1988) *Bangyak Habyeon explanation* pp. 81 Sung Bo Sa. Kor.
 24. Jin Sa mun (1975) *Prescriptions of the Bureau of Taiping Peoples Welfare* pp. 11. Pharmacy Sunpung Press. Taipei.
 25. Hirotsu, M., Y. Zhou, H. Rui, and T. Furuya (1994) Cycloartane triterpene glycosides from the hairy root cultures of *astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* 37: 1403-1407.
 26. Zhou, Y., M. Hirotsu, H. Rui, and T. Furuya (1995) Two Triglycosidic Triterpene Astragalosides from the Hairy Root Cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* 38: 1407-1410.
 27. Kitagawa, I., H. K. Wang, M. Saito, and M. Yoshikawa (1983) Saponin and sapogenol. XXXVI. chemical constituents of *astragali radix*, the Root of *astragalus membranaceus* Bunge (3). astragalosides III, V, and VI. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 709-715.
 28. Kitagawa, I., H. K. Wang, M. Yoshikawa (1983) Saponin and sapogenol. XXXVII. chemical constituents of *astragali radix*, the root of *astragalus membranaceus bunge* (4). astragalosides VII and VIII. *Chem Pharm Bull.* 31: 716-722.
 29. Jung, T. K., Kim, M. J., Lim, K. R., and K. S. Yoon (2006) Moisturing and anti-oxidation effect of *astragalus membranaceus*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 32: 193-200.
 30. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* 65: 55-63.
 31. Shan, S. J., Xiao, T., Chen, J., Geng, S. L., Li, C. P., Xu, X., Hong, Y., Ji, C., Guo, Y., Wei, H., Liu, W., Li, D., and H. D. Chen (2012) Kanglaite attenuates UVB-induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. *Int. J. Mol. Med.* 29: 625-629.
 32. Levin, M. H. and A. S. Verkman (2006) Aquaporin-3-dependent cell migration and proliferation during corneal re-epithelialization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 4365-4372.
 33. Huh, J. E., Nam, D. W., Bae, Y. H., Kang, J. W., Park, D. S., Choi, D. Y., and J. D. Lee (2011) Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.* 11: 46-54.