

# 補中治濕湯의 백서 신장 수분채널, Na, K-ATPase, 산화질소 합성효소 발현에 미치는 영향

강대길 · 김종균 · 김복해 · 조동기 · 손은진 · 류도곤<sup>1</sup> · 이호섭\*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1:한의과대학

## Effects of *Bojungchiseup-tang* on Renal Expression of Water Channels, Na, K-ATPase and Nitric Oxide Synthase in Rats

Dae Gill Kang, Jong Giun Kim, Bok Hae Kim, Dong Ki Cho, Eun Jin Sohn, Do Gon Ryu<sup>1</sup>, Ho Sub Lee\*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, 1:College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The present study was examined the effects of *Bojungchiseup-tang* water extract on the renal expression of renal function regulatory proteins including aquaporin 2 (AQP 2), aquaporin 3 (AQP 3), Na,K-ATPase  $\alpha$ 1 subunit, endothelial nitric oxide synthase (ecNOS), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rats. The renal expression of AQP 3 was attenuated in rats administered with *Bojungchiseup-tang* water extract without altered expression of AQP 2, while ecNOS was up-regulated. Oral administration of *Bojungchiseup-tang* water extract (40  $\mu$ l/100 g) also attenuated the renal expression of Na,K-ATPase  $\alpha$ 1-subunit and iNOS protein. These results suggest that the diuretic and natriuretic effects of *Bojungchiseup-tang* maybe causely related with a decreased expression of AQP 3 and increased expression of ecNOS.

Key words : *Bojungchiseup-tang*(補中治濕湯), kidney, aquaporin (AQP), Na,K-ATPase, nitric oxide synthase.

### 서론

水分代謝 調節機能은 脾·肺·腎·三焦·膀胱 등에 의하여 이루어지며<sup>1)</sup>, 이는 肺氣의 宣化肅降·脾氣의 運化轉輸·腎氣의 溫化蒸動作用에 의해 完成된다<sup>1,2)</sup>. 이러한 機能을 通稱하여 三焦氣化라 하고, 補中·行濕·利小便의 治法으로 肺·脾·腎을 調理시킨다<sup>3)</sup>. 水分代謝異常으로 인한 胃內停水, 水腫, 鼓脹, 腹水, 水病, 腎臟炎에는 通治水病 補中 行濕 利水 등과 관련된 처방을 사용하는데 肺, 腎으로 인한 경우에는 四苓五皮散, 腎으로 인한 경우에는 五苓散, 脾土로 인한 경우에는 補中治濕湯 등이 치료제로 사용되어 왔다<sup>4)</sup>. 補中治濕湯은 醫林撮要<sup>5)</sup>에 기재되었으며, 東醫寶鑑 浮腫門에 수록된 처방으로, 補中行濕의 治法으로 水病을 通治한다. 人蔘, 白朮을 爲君으로 하여 補中하고, 蒼朮, 陳皮, 白茯苓을 臣으로 하여 行濕하고, 黃芩, 麥門冬을 使로 하여 木克土하는 木을 制하고 厚朴을 加하여 腹脹을 消하고 氣가 上下로 不通하므로 木通을 加하였고, 氣가 下陷되는 것을 막기 위하여 升麻

를 加하여 立方하였다<sup>5)</sup>. 補中行濕하여 通治水病하는 補中治濕湯에 대한 실험적 결과로는 김 등<sup>6)</sup>은 운동선수 체중 감량시 補中治濕湯을 복용시켜 체중 감량 효과를 보고하였으며, 조<sup>7)</sup>는 補中治濕湯 投與에 의한 간 및 腎機能의 회복 효과 보고하였다. 또한 최근 연구에서 김 등<sup>8)</sup>은 補中治濕湯이 백서의 신장에 작용하여 완만한 利尿 작용을 나타냈으며 이러한 작용은 유리 수분 배설량 및 뇨중 creatinine 증가와 관련이 있음을 보고한 바 있다.

이 연구에서는 補中治濕湯의 利尿 작용 기전을 밝히기 위하여 수분 및 나트륨 배설과 관련이 있는 水分 채널 및 나트륨 채널, 그리고 산화질소 합성효소의 발현 변화를 관찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 동물

실험동물은 체중 200-250g 내외의 Sprague-Dawley 白鼠 (샌타코, 오산, 한국)를 사료와 물을 충분히 주어 2주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

##### 2) 전탕액의 제조

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 한의과대학 부속 한

\* 교신저자 이호섭, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

E-mail: host@mail.wonkwang.ac.kr, Tel: 063-850-6841

접수: 2001/07/03 · 수정: 2001/12/29 · 채택: 2002/01/24

방병원에서 구입하여 사용하였다. 補中治瀉湯 5점 분량 136.875 g에 증류수 1500 ml를 넣고 냉각기를 설치한 후 120분간 가열하였다. 추출된 1220 ml의 전탕액을 3000 rpm으로 30분간 원심분리하여 1190 ml의 補中治瀉湯 전탕액을 얻었으며 600 ml로 농축하여 실험에 사용하였다. 補中治瀉湯 1점 분량의 내용과 조성은 다음 표와 같다.

Table 1. Prescription of *Bojungchiseup-tang*

한약명	생약명	중량 (g)
人蔘	Ginseng Radix	3.75
白朮	Atractylodis Rhizoma	3.75
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	2.625
陳皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	2.625
赤茯苓	Hoelen Polia	2.625
麥門冬	Liriodis Tuber	2.625
木通	Mutong Caulis	2.625
當歸	Angelicae Sinensis Radix	2.625
黃芩	Phellodendri Cortex	1.875
厚朴	Machili Cortex	1.125
升麻	Cimicifuae Rhizoma	1.125
總量		27.375

### 3) 시약 및 항체

실험에 사용한 bovine serum albumin, TEMED, glycerol,  $\beta$ -mercaptoethanol, glycine, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 등은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을, polyacrylamide, bis-polyacrylamide, bromophenolblue, tween-20 등은 Amresco (Solon, OH, USA) 제품을, Non-fat milk (NFM)는 Difco (Spark, MD, USA) 제품을, Bradford 시약은 Bio-rad 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 일제 특급시약을 각각 사용하였다.

실험에 사용한 AQP 2와 3의 polyclonal 항체는 Alomone (Jerusalem, Israel) 제품을, iNOS 및 ecNOS에 대한 monoclonal 항체는 Transduction Lab. (San Diego, CA, USA)의 제품을, Na,K-ATPase에 대한  $\alpha$ 1과  $\beta$ 1 항체는 Upstate Biorechnology (Lake Placid, NY, USA) 제품을, Horse radish peroxide (HRP)-conjugated 2차 항체는 Amersham 제품 (Little Chalfont, Buckinghamshire, 영국)을 사용하였다.

## 2 방법

### 1) 채뇨와 약물 투여

白鼠를 자유롭게 물과 먹이에 접근할 수 있는 metabolic cage에 넣어 1주간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 1주의 대조 기간동안 24시간 尿를 채뇨하였다. 尿의 채뇨용기, 먹이통, 물통, cage의 청소는 오전 10-11시에 실시하였다. 약물은 급수기에 희석하여 투여하였다.

### 2) 단백질의 분리 및 정량

의식이 있는 상태에서 白鼠를 斷頭하여 腎臟을 재빨리 분리한 후 액체 窒素에서 얼린 후 사용 시까지  $-72^{\circ}\text{C}$ 에 보관한다. 보관된 신장은 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L ethylene-

diaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 포함된 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)에 넣고 3,000 rpm에서 1분간 3회 균질화한다. 균질화된 조직은 1,000 g에서 5분, 10,000 g에서 10분간 연속 원심분리하여 큰 조직 덩어리나, 핵 조각은 제거하고 總蛋白 추출물만 얻는다. 總蛋白 추출물을 다시 100,000 g에서 1시간 동안 원심분리하여 세포질 내의 可溶性 (세포질) 단백질과 膜 결합 단백질로 분리하고 단백질의 농도는 소 혈청 알부민을 標準液으로 한 Bradford 법<sup>14)</sup>으로 정량화 하였다.

### 3) Western blot 분석

Western blot 용 단백질은 AQP 2, 3는 세포막 단백질을 각각 15  $\mu\text{g}$ 을 전기 영동하였고, Na, K-ATPase  $\alpha$ 1 소단위체는 30  $\mu\text{g}$ 의 세포막 단백질을, ecNOS는 60  $\mu\text{g}$ 의 세포막 단백질을, iNOS는 60  $\mu\text{g}$ 의 세포질 단백질을 이용하여 전기영동 하였다. Western blot을 위하여 단백질 시료를 7.5% polyacrylamide resolving gel (ecNOS와 iNOS; aquaporin 2와 3는 12.5%, Na,K-ATPase의  $\alpha$ 1-subunit는 8%,  $\beta$ 1-subunit는 각각 10%)과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 非連續性系 (X cell II Mini-Cell, Novex)를 이용하여 전기영동하여 크기대로 분리하였다. 단백질은 blot module을 이용하여 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이 membrane을 Tris로 완충한 食鹽水 (TBS)에 씻고 2시간 동안 TBS에 용해시킨 5% 無脂肪乾燥牛乳液 (NFM/TBS)에서 blocking하고, 2% NFM/TBS로 생쥐에서 추출한 monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratories; 1:2000 稀釋) 토끼에서 추출한 polyclonal anti-ecNOS (Transduction Laboratories; 1:2000 稀釋), polyclonal anti-AQP 2 (Alomone, Israel; 1:750 稀釋)나 polyclonal anti-AQP 3 (Alomone, Jerusalem, Israel; 1:200 稀釋), polyclonal anti-Na,K-ATPase  $\alpha$ 1 subunit (UBI; 1:5000 稀釋) 등의 일차 抗體 용액에서 常溫에서 1시간 동안 반응시켰다.

Membrane을 2% NFM/TBS에서 horse-reddish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG (1:2000)나 goat anti-rabbit IgG (1:1,500)와 함께 1시간 동안 incubation하였다. 결합된 항체를 enhanced chemiluminescence 液 (ECL, Amersham, Buckinghamshire, 영국)을 이용하여 암실에서 hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, 영국)에 露出 시킨 후 현상하였다. 결과의 분석은 image analyser (Imager III, Bioneer, 한국)을 이용하여 발현의 정도를 측정하였다.

### 3. 통계 처리

실험결과는 Student's t-test와 One-way ANOVA test를 이용하여 통계 처리하였으며 p-value가 최소한 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였고, 실험치의 표현은  $\text{mean} \pm \text{SE}$ 로 하였다.

## 결 과

### 1. AQP 2 및 AQP 3 발현에 미치는 영향

白鼠 對照群, 補中治瀉湯 (20  $\mu\text{l}/100\text{g}$ ) 投與群, 補中治瀉湯 (40  $\mu\text{l}/100\text{g}$ ) 投與群의 3주 후 腎臟 AQP 2의 상대적 발현 정도

는 각각  $1.00 \pm 0.02$ ,  $1.12 \pm 0.14$ ,  $1.10 \pm 0.12$ 으로 발현 변화에 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

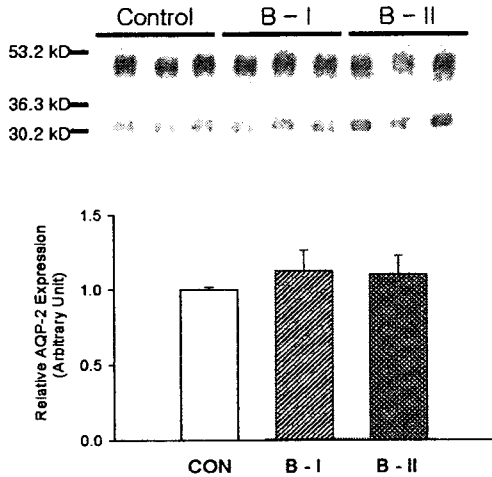


Fig 1. Representative Western blot of AQP 2 in the kidney and its densitometric analysis in control (CON), *Bojungchiseub-tang* (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-I), and *Bojungchiseub-tang* (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-II) administered rats. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \* $p < 0.05$ , compared with control.

白鼠 對照群, 補中治濕湯 (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群, 補中治濕湯 (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 투여군의 3주 후 腎臟 AQP 3의 상대적 발현 정도는 각각  $1.00 \pm 0.02$ ,  $0.27 \pm 0.08$ ,  $0.07 \pm 0.06$ 으로 補中治濕湯을 증량하여 투여 시 AQP 3의 발현 정도가 억제되었다(Fig. 2).

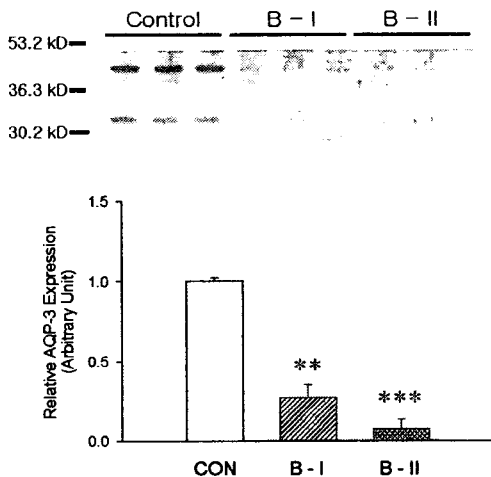


Fig 2. Representative Western blot of AQP3 in the kidney and its densitometric analysis in control (CON), *Bojungchiseub-tang* (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-I), and *Bojungchiseub-tang* (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-II) administered rats. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control.

## 2. Na,K-ATPase $\alpha 1$ -소단위체의 발현에 미치는 영향

白鼠 對照群, 補中治濕湯을 (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群, 補中治濕湯을 (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群의 3주 후 腎臟 Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -소단위체의 발현 정도는 각각  $1.00 \pm 0.06$ ,  $0.98 \pm 0.08$ ,  $0.66 \pm 0.02$ 으로

로 補中治濕湯 40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$  투여군에서만 Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -소단위체의 발현 정도가 억제되었다 (Fig. 3).

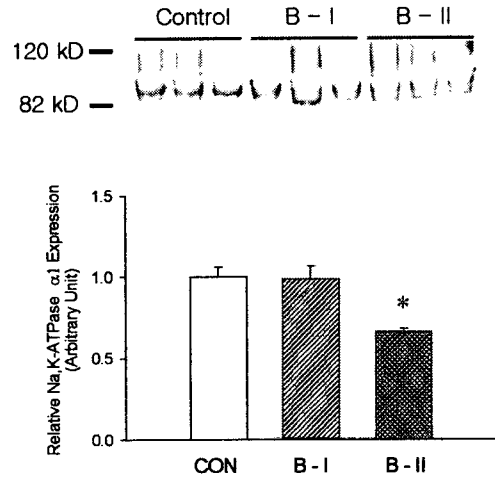


Fig 3. Representative Western blot of Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -subunit in the kidney and its densitometric analysis in control (CON), *Bojungchiseub-tang* (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-I), and *Bojungchiseub-tang* (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-II) administered rats. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \* $p < 0.05$ , compared with control.

## 3. ecNOS 및 iNOS 의 발현에 미치는 영향

白鼠 對照群, 補中治濕湯 (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群, 補中治濕湯 (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群의 3주 후 腎臟 ecNOS 발현 정도는 각각  $1.00 \pm 0.31$ ,  $4.53 \pm 0.24$ ,  $6.33 \pm 0.51$ 으로 補中治濕湯 증량 투여 시 ecNOS의 발현 정도가 증가하였다 (Fig. 4).

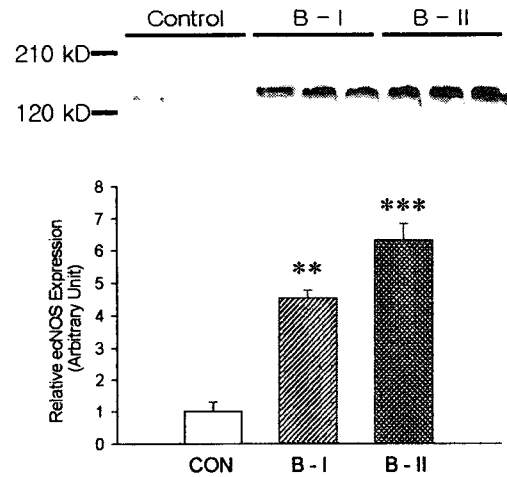


Fig 4. Representative Western blot of ec-NOS in the kidney and its densitometric analysis in control (CON), *Bojungchiseub-tang* (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-I), and *Bojungchiseub-tang* (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ , B-II) administered rats. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compared with control.

반면에 白鼠 對照群, 補中治濕湯 (20  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群, 補中治濕湯 (40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$ ) 投與群의 3주 후 iNOS의 발현은 각각  $1.00 \pm 0.20$ ,  $0.97 \pm 0.04$ ,  $0.61 \pm 0.07$ 으로 補中治濕湯 40  $\mu\text{l}/100\text{ g}$  투여군에서만 iNOS의 발현 정도가 억제되었다(Fig. 5).

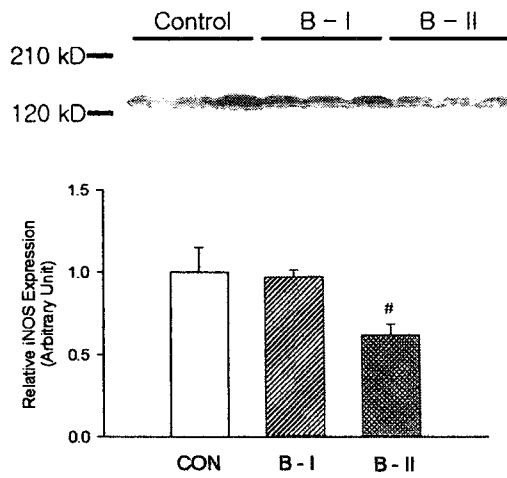


Fig 5. Representative Western blot of ec-NOS in the kidney and its densitometric analysis in control (CON), *Bojungchiseub-tang* (20  $\mu$ l/100 g, B-I), and *Bojungchiseub-tang* (40  $\mu$ l/100 g, B-II) administered rats. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. <sup>#</sup>p<0.05, compared with B-II.

## 고찰

腎臟에서 尿의 형성은 사구체 여과, 세뇨관 再吸收, 그리고 세뇨관 분비의 3과정을 통하여 이루어진다<sup>10</sup>. 김 등<sup>8</sup>에 의한 연구 결과에 의하면 補中治濕湯을 投與한 白鼠는 尿量, creatinine 배설량, 자유 수분 排泄量등이 증가하였다. 일반적으로 양의학적 으로 浮腫 치료제에는 다양한 이뇨제를 이용한다. 이러한 이뇨제 들은 주로 나트륨 이온의 재 흡수를 억제하여 물과 함께 배설시 키는 작용을 하고 있다<sup>10</sup>. 따라서 이뇨효과는 수분 채널과 나트 른 채널의 발현 및 활성과 밀접한 관련이 있다. 나트륨 이온의 排泄은 주로 세뇨관 세뇨관강의 Na<sup>+</sup> 채널 (Na<sup>+</sup>-glucose transporter, Na<sup>+</sup>-HCO<sup>3-</sup> transporter, Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> transporter, etc.), 세뇨관과 집합관의 Na<sup>+</sup> 채널 (epithelial Na<sup>+</sup> channel), 세뇨관과 집합관의 基底膜의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump (Na, K-ATPase)등의 調節에 의하여 결정된다<sup>11-13</sup>. 그 중에서 Na, K-ATPase는 腎臟에서 Na<sup>+</sup> 재흡수에 있어서 중추적인 역할을 하 는 Na<sup>+</sup>-pump이다<sup>14,15</sup>. Na,K-ATPase는 活性 部位인  $\alpha$ 1 小單位體와 글리코실화된  $\beta$ 1 小單位體, 그리고  $\gamma$  小單位體 등 3개의 小單位體로 構成되어 있는데<sup>16</sup>,  $\alpha$ 1과  $\beta$ 1이 腎臟에서 Na<sup>+</sup>를 再 吸收하는 중요한 小單位體이다<sup>17</sup>. Na, K-ATPase 활성도가 腎臟 의 Na<sup>+</sup> 재흡수에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에 Na, K-ATPase의  $\alpha$ 1 및  $\beta$ 1 小單位體의 蛋白質 발현의 변화는 高血 壓을 비롯한 여러 가지 병태생리에 있어서 중요한 역할을 한다. 즉 Na, K-ATPase의 발현이나 활성의 증가는 Na<sup>+</sup>의 재 흡수를 증가시켜 Na<sup>+</sup>의 배설을 억제시킨다. 김 등<sup>8</sup>의 연구 결과에 의하 면 대조군과 20  $\mu$ l/100 g의 補中治濕湯을 투여한 群에서는 3주 후 Na<sup>+</sup>의 배설이 증가하였지만 40  $\mu$ l/100 g의 補中治濕湯을 투 여한 群에서는 Na<sup>+</sup>의 배설의 증가가 나타나지 않았다. 본 연구 결과에 의하면 Na, K-ATPase  $\alpha$ 1-소단위체의 발현은 40  $\mu$ l/100 g의 補中治濕湯을 투여한 群에서만 감소하였다. 이와 같은 결과 로 볼 때 補中治濕湯에 의한 Na<sup>+</sup>의 배설에는 Na, K-ATPase의

발현 변화는 중요한 역할을 하지 않고 다른 Na<sup>+</sup> 채널들이 관여 할 것으로 사료된다. 腎臟에서 利尿는 水分性 利尿와 滲透性 利尿로 구분할 수 있는데, 그 중에서 水分性 利尿는 抗利尿호르몬 (antidiuretic hormone; ADH, arginine vasopressin; AVP)에 의 하여 주로 調節을 받고 물 分子를 통과시키는 通路를 aquaporin (AQP)이라 한다<sup>18,19</sup>.

최근 aquaporin 수분 통로의 발견은 腎臟에서 수분 이동의 이해를 가능하게 해 주었다. AQP는 신 수질 고장성 유지 및 집 합관 수분 透過力を 조절하여 尿濃縮力을 조절한다. 腎臟에는 적 어도 6가지 aquaporin 同位酵素 (AQP 1, 2, 3, 4, 6, 7)가 신 세뇨 관과 血管에 分佈하고 있는 것으로 알려져 있고 최근에는 AQP 8, 10이 추가로 밝혀졌지만 아직 分佈 및 그 기능을 알려져 있지 않다. 그 중에서 AQP 2와 3는 ADH에 의하여 직접 조절을 받고 체액 조절에 있어서 중추적인 역할을 한다. 따라서 AQP 2와 3의 발현 변화는 다양한 질병의 원인이 되는데, 중추성 요붕증, 腎症 候群, 糖尿病性 腎症, 鬱血性 心不全, 腎不全, 요로 폐색, 노화 등 의 원인에 의하여 AQP 2와 3의 發現이 變化한다<sup>18-23</sup>. 본 연구에서 補中治濕湯 투여가 AQP의 發現에 變化를 주어 利尿 효과를 나타낸 것인지를 觀察하기 위하여 AQP 2와 3의 蛋白質 발현 변 화를 측정 한 結果 AQP 2의 발현은 변화하지 않았지만 AQP 3의 發現이 抑制되었다. 따라서 補中治濕湯에 의한 利尿 효과는 어느 정도 AQP 3 水分 通路의 發現 抑制에 의하여 나타난 결과로 사 료된다. 酸化窒素 (NO)는 L-arginine으로부터 酸化窒素 합성 효 소 (NOS)에 의하여 合成되어 지고 腎臟에는 酸化窒素 合成 효 소 가 3가지의 同位 효 소가 存在한다<sup>24</sup>. 첫 번째 類型은 腦型 酸化 窒素 合成 효 소 (bNOS, nNOS, NOS I)로 腦 組織에서 처음 발견 이 되었고 주로 神經 傳達 物質로서의 酸化窒素를 합성하는 役 割을 하고 있다. 두 번째 同位 효 소는 誘導型 酸化窒素 合成 효 소 (iNOS, NOS II)로써 주로 면역계에 작용하는 酸化窒素를 合 成하고 있다. 세 번째 同位 효 소는 혈관 內皮細胞에 주로 分佈하 면서 血管을 弛緩시키는데 作用하는 血管 內皮細胞型 酸化窒素 合成 효 소 (ecNOS, eNOS, NOS III)로써 acetylcholine에 의해 活性化되어 혈관을 이완시킨다<sup>24,26</sup>. 酸化窒素는 또한 腎臟의 기 능을 조절하는 매우 중요한 인자이다. Lahera 등<sup>27</sup>은 L-NAME에 의해 酸化窒素 합성 효소를 抑制하였을 때 단기적으로 요량이 減少하고 尿中 鹽 排出과 絲球體 濾過率이 감소한다고 보고하였 다. 특히 酸化窒素가 鹽의 排泄에 있어서 중요한 역할을 한다는 연구 결과는 다양하게 보고되었는데, 의식이 있는 개에게 L-NAME를 투여하면 腎 動脈壓의 증가와 함께 나트륨의 배출이 감소하고<sup>28</sup>, 壓力-利尿 (pressure-natriuresis)가 감소하고 혈압의 增加에 決定的인 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>29,30</sup>. 따라서 鹽-依 存型 高血壓의 生成에 있어서 산화질소 생성의 감소는 決定的인 병태 생리적 원인으로 작용한다<sup>31,33</sup>. 본 연구에서 補中治濕湯 투 여 후 腎臟에서의 ecNOS와 iNOS의 발현을 측정 한 結果 對照群 과 비교하여 ecNOS의 발현은 크게 증가하였으나 iNOS의 발현 은 약간 억제되었다. ecNOS와 iNOS는 腎臟의 염-배설 기전과 밀 접한 관련이 있다. 또한 산화질소 합성효소 동위효소들은 어느 정도 상호간의 조절 기능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>34,35</sup>. 따라서 補中治濕湯 投與에 의한 ecNOS의 발현 증가는 염의 배설의 증가

와 관련이 있을 것으로 사료된다. 요약하면, 補中治濕湯의 利尿作用은 AQP 3 수분 채널의 발현 억제와 ecNOS의 발현 증가가 수분 및 염의 배설에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## 결 론

補中行濕 利小便을 목표로 입방된 補中治濕湯이 腎臟機能에 미치는 영향을 구명하기 위하여 白鼠에 투여 후 腎臟 기능의 조절과 밀접한 관련이 있는 腎臟내 AQP 2, 3, Na,K-ATPase  $\alpha$ 1-소단위체, ecNOS, iNOS 등의 蛋白質의 발현에 미치는 영향을 측정 한 결과, 補中治濕湯의 投與에 의하여 AQP 2 수분 채널의 발현은 변화가 없었으나 AQP 3 수분 채널의 발현은 억제되었다. 補中治濕湯의 40  $\mu$ l/100 g 투여에 의하여 Na,K-ATPase의 活性 부위인  $\alpha$ 1-소단위체의 발현은 억제되었다. 補中治濕湯 投與에 의하여 ecNOS의 발현은 증가되었지만 iNOS의 발현은 40  $\mu$ l/100 g을 투여한 경우 감소되었다.

이상의 결과는 補中治濕湯의 利尿作用은 사구체 여과율의 증가와 관련이 있으며, AQP 3 수분 채널의 발현 감소와 ecNOS의 발현 증가가 水分과 鹽의 배설에 있어서 중요한 役割을 수행 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 연구는 2001년도 두뇌 한국 21(BK-21) 사업의 지원과 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원 (HMP-00-CO-03-0003) 및 원광대학교 의약자원 연구센터 (MRRC)의 지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. 김완희, 최달영. 장부변증논치, 서울, 의성당, pp. 236-238, 1993.
2. 류도곤, 이호섭, 강순수, 정우열. 신기능에 대한 동서의학적 고찰, 대한한의학회지, 8(1), 102-122, 1987.
3. 성현제. 수기병에 관한 문헌적 연구, 서울, 경희대학교논문집, 11, 127-133, 1978.
4. 金世坤. 醫林撮要, 서울, 黑朝社, p. 128, 1968.
5. 윤용갑. 동의방제와 처방해설, 의성당, p. 219, 1998.
6. 김범철, 금동호, 이명종. 태권도 선수의 체중감량시 신체조성 및 혈청지질 성분변화에 補中治濕湯이 미치는 영향, 한방재활의학회지, 8(1), 106-114, 1988.
7. 조창섭. 補中治濕湯이 간 및 腎臟의 손상에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1980.
8. 김종균, 김유겸, 유장현, 이호섭. 補中治濕湯의 백서 신장 기능에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 15(2), 296-299, 2001.
9. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-54, 1976.
10. 서울대학교 의과대학. 腎臟學, 서울, 서울대학교 출판부, pp. 7, 30-43, 1989.
11. 김종균. 生理學, 서울, 정문각, pp. 271-280, 1998.
12. 김광진, 김창주, 김형진, 박사훈. 人體生理學, 서울, 정문각, pp. 171-229, 1998.
13. 서울대학교 의과대학. 전정관 腎臟學, 서울, 서울대학교 出版部, pp. 87-110, 1993.
14. Kinne, R., Schmitz, J. E., Kinne, S. E. The localization of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the cells of rat kidney cortex. A study on isolated plasma membranes. Pflugers Arch. 329, 191-206, 1971.
15. Schmidt, U., Dubach, U. C. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the rat nephron related to sodium transport: results with quantitative histochemistry. Part II. Curr. Probl. Clin. Biochem. 3, 320-44, 1971.
16. Lingrel, J. B., Kuntzweiler, T. Na,K-ATPase. J Biol Chem 269, 19659-19662, 1994.
17. Orłowski, J., Lingrel, J. B. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha iso form and beta subunit mRNAs. J. Biol. Chem. 263, 10436-10442, 1988.
18. Kim, S. W., Jeon, Y. S., Lee, J. U., Kang, D. G., Kook, H., Ahn, K. Y., Kim, S. Z., Cho, K. W. Kim, N. H. Han, J. S., Choi, K.C. Diminished adenylate cyclase activity and aquaporin 2 expression in acute renal failure rats. Kidney Int. 57(4), 1643-1650, 2000.
19. Xu, D. L., Martin, P. Y., Ohara, M., St John, J., Pattison, T., Meng, X., Morris, K., Kim, J. K., Schrier, R. W. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. J. Clin. Invest. 99(7), 1500-1505, 1997.
20. Fernandez-Llama, P., Andrews, P., Nielsen, S., Ecelbarger, C. A., Knepper, M. A. Impaired aquaporin and urea transporter expression in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. Kidney Int. 53, 1244-1253, 1998.
21. Mulders, S. M., Bichet, D. G., Rijss, J. P., Kamsteeg, E. J., Arthus, M. F., Lonergan, M., Fujiwara, M., Morgan, K., Leijendekker, R., van der Sluijs, P., van Os, C. H., Deen, P. M. An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. J. Clin. Invest. 102(1), 57-66, 1998.
22. Kwon, T. H., Frokiaer, J., Fernandez-Llama, P., Knepper, M.A., Nielsen, S. Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by alpha-MSH. Am. J. Physiol. 277(3 Pt 2), F413-27, 1999.
23. Lee, J. U., Kang, D. G., Kim, Y. J. Increased expression and shuttling of aquaporin-2 water channels in the kidney in DOCA-salt hypertensive rats. Clin. Exp. Hypertens. 22(5), 531-541, 2000.
24. Morrissey, J. J., McCracken, R., Kaneto, H., Vehaskari, M., Montani, D., Klahr, S. Location of an inducible nitric oxide

- synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int.* 45(4), 998-1005, 1994.
25. Wang, X., Lu, M., Gao, Y., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C., Wang, W. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in principal cell of collecting duct. *Am. J. Physiol.* 275 (3 Pt 2), F395-399, 1998.
  26. Sessa, W. C., Harrison, J. K., Luthin, D. R., Pollock, J. S., Lynch, K. R. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* 21 (6 Pt 2), 934-938, 1993.
  27. Lahera, V., Salom, M. G., Miranda-Guardiola, F., Moncada, S., Romero, J. C. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am. J. Physiol.* 261 (6 pt 2), F1033-F1037, 1991.
  28. Manning, R. D., Hu, J. L. Nitric oxide regulates renal hemodynamics and urinary sodium excretion in dogs. *Hypertension* 23(5), 619-625, 1994.
  29. Tolins, J. P., Shultz, P. J. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int.* 46, 230-236, 1994.
  30. Majid, D. S. A., Godfrey, M., Grisham, M. B., Navar, L. G. Relation between pressure natriuresis and urinary excretion of nitrate/nitrite in anesthetized dogs. *Hypertension* 25(4), 860-865, 1995.
  31. Hirata, Y., Hayakawa, H., Suzuki, E., Kimura, K., Kikuchi, K., Nagano, T., Hirobe, M., Omata, M., Direct measurements of endothelium-derived nitric oxide release by stimulation of endothelin receptors in rat kidney and its alteration in salt-induced hypertension. *Circulation* 91(4), 1229-1235, 1995.
  32. Lahera, V., Salazar, J., Salom, M. G., Romero, J. C. Deficient production of nitric oxide induces volume-dependent hypertension. *Hypertension* 10(7), S173-S177, 1992.
  33. Bech, J. N., Nielsen, C. B., Ivarsen, P., Jensen, K. T., Pedersen, E. B. Dietary sodium affects systemic and renal hemodynamic response to NO inhibition in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 274 (5 Pt 2), F914-F923, 1998.
  34. MacNaul, K. L., Hutchinson, N. I. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196(3), 1330-1334, 1993.
  35. Schwartz, D., Mendonca, M., Schwartz, I., Xia, Y., Satriano, J., Wilson, C. B., Blantz, R. C. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J. Clin. Invest.* 100(2), 439-48, 1997.