

Glycyrrhizin의 항산화 活性 및 Gentamicin 誘導 急性 腎不全 白鼠 腎臟의 Na,K-ATPase 발현에 미치는 영향

손은진 · 강대길 · 이안숙 · 이윤미 · 윤명호 · 염기복 · 노숙연 · 이호섭*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Antioxidant Activities of Glycyrrhizin and its Effect on Renal Expression of Na,K-ATPase in Gentamicin-induced Acute Renal Failure Rats

Eun Jin Sohn, Dae Gill Kang, An Sook Lee, Yun Mi Lee, Ming Hao Yin, Kee Bok Yeum, Suk Yun Noh, Ho Sub Lee*

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

The present study was aimed to investigate whether glycyrrhizin, which is the major component of *Glycyrrhiza uralensis*, has an antioxidant effect and regulatory effect on Na,K-ATPase in gentamicin-induced acute renal failure (ARF) rats. It is well known that reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion and hydroxyl radical, are main pathophysiological factor in gentamicin-induced ARF. Glycyrrhizin showed potent in vitro antioxidant activity, especially superoxide scavenging activity, in a dose-dependent manner. Plasma lipid peroxide level was restored to normal level by oral administration of glycyrrhizin (200 mg/kg) in the gentamicin-induced ARF rats. The expression of Na,K-ATPase α 1 subunit was restored in the gentamicin-induced ARF rats by administration of glycyrrhizin, whereas β 1 subunit was not restored. The renal functional parameters including urine volume, creatinine clearance, urine osmolality, solute-free water reabsorption were also partially restored in gentamicin-ARF rats by administration of glycyrrhizin. Taken together, the amelioration of renal functions and the expression of sodium pump by administration of glycyrrhizin in the gentamicin-induced ARF was appear to be mediated by the scavenging of ROS.

Key words : glycyrrhizin, Na,K-ATPase, gentamicin-ARF rats, reactive oxygen species

서 론

急性腎不全은 腎臟 기능의 급격한 기능 부전을 의미하는 것으로 유발 원인은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 그 중 하나는 虛血 및 재관류에 의한 急性腎不全과 다른 하나는 腎毒性 物質에 의한 急性腎不全으로, 신 독성에 의한 急性腎不全은 최근 사용이 늘고있는 aminoglycoside계열의 抗生劑, 抗癌劑, 放射線 造影劑 같은 外因性 신독소 물질의 장기간 복용 및 過量 투여로 초래된다. 이 중 gentamicin은 그람 음성균 박테리아에 의해 발병하는 感染性 疾患의 치료에 사용되고 있으나¹⁾, 장기간 복용 및 과량 투여시 腎臟의 효소활성과 막 투과성을 변화시키고 mitochondria의 기능 상실을 초래한다²⁾. 또한 세포내 신호전달

체계의 손상 등 중요한 세포내 기능 장애를 유발하게 하여 hydroxyl radical의 생성을 포함한 활성 산소종의 비정상적인 생성이 조직상해의 원인이 되어 腎臟내 세포막의 분해로 인한 細尿管의 細胞壞死가 진행되게 된다^{3,4)}. 최근 연구결과에 의하면 尿濃縮機轉에 있어서 aquaporin 같은 水分 채널^{5,6)} 뿐만 아니라 나트륨 이온 채널의 발현 및 활성은 중요하다. 실제 요중에 배설되는 鹽분이 사구체여과의 1% 미만임을 생각할 때 集合管에서의 마지막 鹽分 再吸收를 조정하는 것이 鹽分平衡 유지에 필수적이다. 거의 모든 細尿管 부위에서 Na⁺의 능동적 이동이 발생하고 이는 細尿管의 세포의 기저외측막에 위치한 Na,K-ATPase 활성과 밀접한 관련이 있다⁷⁾. 하지만, 腎毒性으로 인한 急性腎不全에서는 요 농축능의 결여에 따라 삼투적 수송의 장애가 있게 되며, 신기능의 감소를 일으키는 활성 산소종으로 인한 허혈성 腎不全時 腎臟의 Na transporter의 발현이 감소된다고 알려졌다⁸⁾. 최근 姜 등⁹⁾은 glycyrrhizin이 gentamicin 유도 급성 신부전 백서의 腎臟 기능을 개선한다고 보고한 바 있다.

* 교신저자 : 이호섭, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : host@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-5195

· 접수 : 2003/02/07 · 수정 : 2003/03/12 · 채택 : 2003/04/01

甘草 (Glycyrrhizae Radix)는 콩과에 속하는 다년생 식물로¹⁰⁾,甘草의 감미 성분중 glycyrrhizin은 glycyrrhizic acid 2분자에 glucuronic acid가 결합한 배당체로 무기질대사에 관여하는 mineralcorticoid작용이 있어 腎臟내 cortisol 대사에 관여하며¹⁰⁾요량 및 나트륨 배설을 감소시키고 칼륨배출을 증가시켜서 부신피질의 사구대를 위축시키기도 한다¹¹⁾. 또한 glycyrrhizin은 토끼 모델에서 selectin inhibitor로 작용하여 허혈-재관류시 신 손상을 감소시키고¹²⁾ 저산소증시 活性酸素種으로 인한 신기능 상해를 감소시킨다고 보고되었다¹³⁾.

그러므로 본 연구에서는 glycyrrhizin이 항산화 활성을 나타내는지를 시험관 내에서와 생체내에서 관찰하고, 腎臟 gentamicin에 의한 신부전시 腎臟 기능에 영향을 줄 것으로 생각되는 sodium pump (Na,K-ATPase)의 발현에 미치는 glycyrrhizin의 영향을 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 실험에 사용 한 glycyrrhizin, bovine serum albumin, tetramethylethylenediamine (TEMED), glycerol, β -mercaptoethanol, glycine, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 등은 Sigma 사 (St. Louis, MO, 미국)제품을, polyacrylamide, bis-polyacrylamide, bromophenol blue, Tween-20등은 Amresco 사 (Solon, OH, 미국)제품을, Non-fat milk (NFM)는 Difco 사 (Spark, MD, 미국)제품을, Bradford 시약은 Bio-Rad 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 일본 시약들을 사용하였다. 본 실험에 사용 한 Na,K-ATPase에 대한 α 1과 β 1 항체는 Upstate Biotechnology 사 (Lake Placid, NY, 미국) 제품을, horse radish peroxidase (HRP)-conjugated 2차 항체는 Amresham (Little Chalfont, Buckinghamshire, 영국) 제품을 사용하였다.

2) 실험동물

실험 동물은 체중이 약 200-250 g인 음성 Sprague-Dawley 백서 (샘타코, 오산, 한국)를 물과 고형 사료를 충분히 공급하면서 5일 동안 metabolic cage에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 急性腎不全 모델은 gentamicin (100 mg/kg)을 매일 오전 9시에 1회 피하 주사하여 5일간 유발하였고, 대조군은 생리 食鹽水 동량을 피하 주사하였으며, glycyrrhizin을 투여한 군은 200 mg/kg의 glycyrrhizin을 급수기를 통하여 음용케 하였다.

2. 방법

1) Glycyrrhizin의 항산화 활성의 측정

(1) Superoxide radical 소거능 측정

Superoxide radical 소거능의 측정은 강 과 이¹⁴⁾의 방법에 의하여 phenazine methosulfate (PMS)-nicotineamide adenine dinucleotide (환원형 NADH)계에서 NADH 산화에 의하여 생성되고 nitroblue tetrazolium (NBT)의 산화에 의하여 측정하였다.

Microplate (96 well)에 여러 농도의 glycyrrhizin 20 μ l에, 30 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0) 100 μ l, 100 M의 PMS를 20 μ l를 차례로 넣고 microplate reader (Versa max, Sunnyvale, CA, 미국)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 읽었다 (A1). Microplate에 0.5 mM의 NADH를 40 μ l, 0.5 mM NBT를 20 μ l를 차례로 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다 (A2). 시료대신에 20 μ l의 ascorbic acid (최종농도 500 μ g/ml)를 positive control로 이용하였고, 20 μ l 증류수를 negative control (Ao)로 하여 다음 식을 이용하여 superoxide radical의 소거능을 측정하였다.

$$\text{Superoxide radical의 소거능(\%)} = (\text{Ao} - \text{A2} - \text{A1}) / (\text{Ao} - \text{A1}) * 100$$

(2) Hydroxyl radical 소거능 측정

실험관 내에서 hydroxyl radical은 L-ascorbic acid-CuSO₄계에서 생성되고 cytochrome C의 산화정도를 측정하여 소거능을 측정하였다¹⁴⁾. Microplate (96 well)에 여러농도의 glycyrrhizin을 20 μ l에, 30 mM Na-phosphate 완충용액 (pH 7.4)을 100 μ l, 증류수 30 μ l, 1 mM ascorbic acid 20 μ l, 1 mM CuSO₄를 차례로 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (A1). Microplate에 환원된 cytochrome C (A550=10)을 10 μ l 첨가하고 25 °C에서 90 분간 반응 시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다 (A2). 환원된 cytochrome C는 DL-dithiothreitol (DTT)를 과량으로 첨가하여 환원 시킨 후 sephadex G-15 겔여과 크로마토그래피 Pharmacia 제품 (Pharmacia Fine Chemical AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 DTT를 제거한 후 550 nm에서의 흡광도를 10으로 조정하여 사용하였다. Thiourea (최종농도 500 μ g/ml)을 positive control (At)로 이용하였고, 20 μ l 증류수를 negative control (Ao)로 하여 다음 식을 이용하여 hydroxyl radical의 소거능을 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical의 소거능 (\%)} = (\text{A2} - \text{Ao} - \text{A1}) / (\text{At} - \text{Ao} - \text{A1}) * 100$$

(3) 혈장 지질 과산화정도 측정

전반적인 혈장 과산화 지질 정도를 반영하여, 저밀도 지단백 (LDL)의 산화 민감성과의 강한 상관관계가 있는 것으로 알려진 혈청 TBARS (thiobarbituric acid reacting substance)농도를 측정하였다. 혈청 100 μ l를 사용하여 thiobarbituric acid와 반응하는 물질 (TBARS)에 n-butanol과 pyridine혼합물을 넣은 뒤 원심분리 후 상층액만을 취하여 spectrophotometer (Spectronic 601, Milton Roy, 미국)을 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 지질 과산화량을 계산하였으며, 이때 표준물질로는 tetramethoxypropane을 사용하였다¹⁵⁾.

2) 단백질의 분리

백서를 단두하여 腎臟을 분리한 후 액체 질소에서 얼린 후 사용할 때까지 72 °C에 보관한다. 보관된 腎臟은 피질, 외수질, 내수질로 다시 분리한 후 각각을 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 포함된 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)에 넣고 3.000 g에서 3회 균질화 하였다. 균질화된 조각은 1,000 g에서 5분, 10,000 g에서 10분간 연속 원심분리하여 큰 조직덩어리나, 핵 조각은 제

거하고 총단백 추출물만 얻었다. 총단백 추출물을 다시 100,000 g에서 1 시간 동안 원심분리하여 세포질 내의 가용성 단백질과 막 결합 단백질로 분리하고 단백질의 농도는 소 혈청 알부민을 표준용액으로 한 Bradford 법¹⁶⁾으로 정량화 하였다.

3) Western Blot 분석

Western Blot 용 단백질로 Na,K-ATPase $\alpha 1$, $\beta 1$ 소단위체는 30 g의 세포막 단백질을 이용하여 전기영동 하였다. 단백질 blotting을 위하여 단백질 시료를 Na,K-ATPase $\alpha 1$ -소단위체에 대해서는 7%, $\beta 1$ -소단위체는 10% 를 polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 비연속성계 전기영동장치 (Mini-protean 3 cell, Bio-Rad, California, 미국)를 이용하여 전기영동하여 크기대로 분류하였다. 분류된 단백질을 blot module을 이용하여 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이 membrane을 Tris로 완충한 식염수 (TBS)에 씻고 2시간동안 TBS에 용해시킨 5% 無脂肪 乾燥 우유용액 (NFM/TBS)에서 blocking 하였으며, 2% NFM/TBS로 생쥐에서 추출한 polyclonal anti-Na,K-ATPase $\alpha 1$, $\beta 1$ 소단위체 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, 미국, 1:5,000 희석)의 일차 항체 용액에서 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 membrane을 2% NFM/TBS에서 2시간동안 goat anti-rabbit IgG (1:1,500)와 함께 incubation하였다. 결합된 항체를 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Buckinghamshire, 영국)로 이용하여 암실에서 Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, 영국)으로 노출시킨 후 현상하였다. 분석은 image analyser (Imager III, Bioneer, 한국)를 이용하여 상대적 발현의 정도를 측정하였다.

4) 통계 처리

실험 결과는 Student's t-test나 One-way ANOVA test를 이용하여 유의성 검사를 실시하였고, $p < 0.05$ 일때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였다.

결 과

1. Glycyrrhizin의 superoxide and hydroxyl radical 消去能

시험관내에서 glycyrrhizin의 superoxide radical에 대한 소거능을 측정한 결과 glycyrrhizin의 농도에 의존적으로 superoxide radical 소거능이 증가하였으나 (Fig. 1A), glycyrrhizin에 의한 hydroxyl radical의 소거능은 관찰되지 않았다 (Fig. 1B).

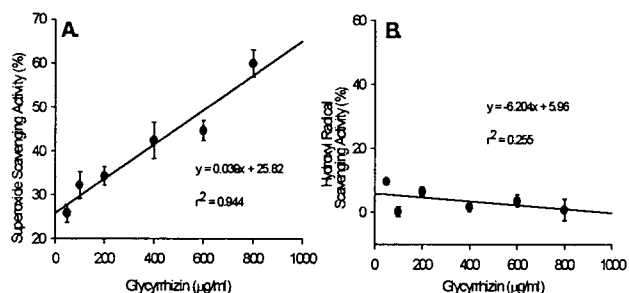


Fig. 1. In vitro superoxide (A) and hydroxyl radical (B) scavenging activities by dose-dependent glycyrrhizin. Each data represents mean \pm SE (n = 3, respectively).

2. Glycyrrhizin의 혈장 脂質 過酸化에 미치는 영향

Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 실험 5일 후 혈장 내 지질 과산화 정도를 측정된 결과 대조군에 비해서 gentamicin을 투여한 군에서 지질 과산화 정도가 증가하였으나 ($p < 0.05$, 대조군과 비교하여), gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서는 혈장 지질 과산화가 억제되었다 ($p < 0.05$, gentamicin 투여군과 비교하여).

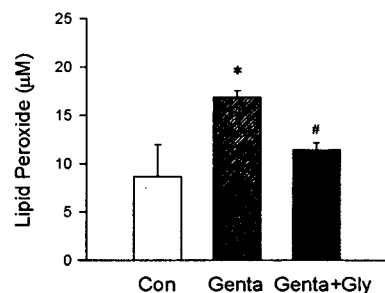


Fig. 2. The plasma lipid peroxide production in rats with control (Con), gentamicin-induced ARF (Gen), and gentamicin-induced ARF administered with glycyrrhizin (Gen/Gly). Each column represents mean \pm SE of 7 experiments. $p < 0.05$ compared with control; $p < 0.05$ compared with gentamicin-treated rats.

3. Na,K-ATPase $\alpha 1$, $\beta 1$ 소단위체 발현에 미치는 영향

Na,K-ATPase $\alpha 1$ -소단위체의 상대적 단백질 발현 변화량을 보면, 대조군과 gentamicin을 투여한 군은 각각 1.00 ± 0.05 , 0.20 ± 0.07 로 유의성 있게 감소하였으며, gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서 각각 1.21 ± 0.09 로 정상 수준으로 회복되었다 ($p < 0.05$, gentamicin 투여군과 비교하여, Fig. 3). 반면에, $\beta 1$ -소단위체의 상대적 발현 정도는 대조군, gentamicin을 투여한 군에서 각각 1.00 ± 0.09 , 0.81 ± 0.26 로 신부전군에서 감소하는 경향을 보였지만 통계적인 유의성은 없었고, gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서도 gentamicin을 단독 투여한 군보다는 감소하였지만 통계적인 유의성은 없는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).

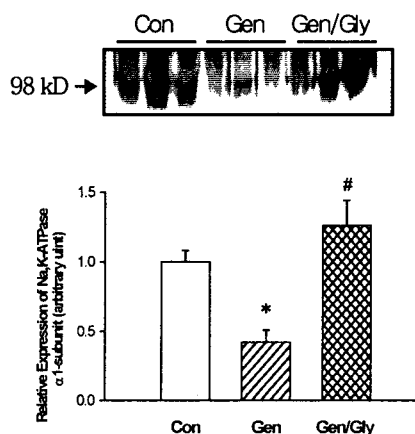


Fig. 3. Representative Western blot and densitometric analysis of Na,K-ATPase $\alpha 1$ subunit in rats with control (Con), gentamicin-induced ARF (Gen), and gentamicin-induced ARF administered with glycyrrhizin (Gen/Gly). Each data represents mean \pm SE of 7 experiments. $p < 0.05$ compared with control; $p < 0.05$ compared with gentamicin-treated rats.

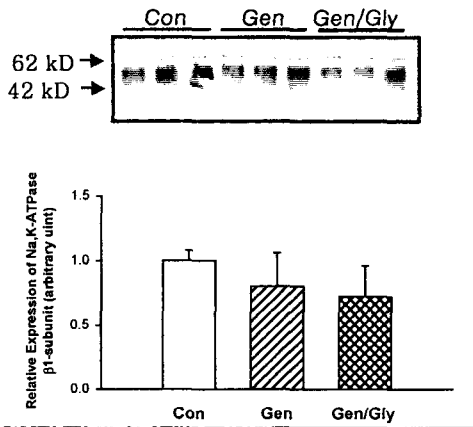


Fig. 4. Representative Western blot and densitometric analysis of Na,K-ATPase β 1 subunit in rats with control (Con), gentamicin-induced ARF (Gen), and gentamicin-induced ARF administered with glycyrrhizin (Gen/Gly). Each data represents mean \pm SE of 7 experiments

고찰

急性腎不全의 원인은 虛血 및 腎毒性 물질에 의한 細尿管 손상이 가장 많은 부분을 차지하며 病理적으로는 細尿管 괴사를 특징으로 한다¹⁷. 허혈에 의한 急性腎不全은 저혈압, 심한 탈수, 심장 기능 부전, 패혈증, 외상 등으로 인하여 일시적인 신 관류압 및 신 혈류가 감소되어 발생하게 된다¹⁸. 반면에, 신 독소에 의한 急性腎不全은 중금속, hydrocarbon 등 여러 가지 신 독성물질과 함께 최근 사용이 늘고 있는 aminoglycoside계 항생제¹⁹, 방사선 조영제, 항암제²⁰, 비스테로이드성 항염증제 등과 같은 외인성 신 독소와 헤모글로빈, 마이오글로빈, 칼슘 등과 같은 내인성 신 독소의 과다로 일어난다¹⁸. 腎毒性 물질에 의한 急性腎不全은 腎毒性 물질이 세포내에 축적됨으로써 세포의 기능적, 생화학적, 구조적 이상이 초래되어 발생한다²¹. Gentamicin은 aminoglycoside계 항생제로 대개 그람 음성균 박테리아에 의해 발병하는 감염성 질환의 치료에 주로 이용되고 있다²². 그러나 gentamicin을 과량 투여하거나 장기간 투여할 때에는 腎毒性을 나타내는 데 腎臟의 효소활성과 막 투과성을 변화시키고 mitochondria의 기능 상실을 초래하여 急性腎不全을 유발한다^{2,23}. Aminoglycoside계 항생제에 의한 腎毒性 기전은 비교적 잘 밝혀져 있는데 양이온을 띠는 aminoglycoside계 항생제가 음이온인 인지질 막 수용체의 하나인 PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate)에 잘 결합하는 것으로 알려져 있다^{24,25}. 따라서 aminoglycoside계 항생제의 양이온은 아미노기와 세포막을 구성하는 인지질중 음이온 인 사이의 정전기적 상호작용이 존재하게 됨으로써 세포막의 투과도를 저하시키고 생체막의 유동성도 저하시키게 되는 것이다. 그러므로 세포내의 mitochondria 호흡 및 마이크로솜의 단백질 합성 장애, PIP2 연쇄반응을 통한 세포내 신호전달 체계의 손상 등 중요한 세포내 기능 장애가 유발된다. Hydroxyl radical이나 superoxide radical과 같은 活性酸素種의 과량 생성 또한 gentamicin에 의한 急性腎不全의 유발에 중요한 병인으로 작용하는 것으로 알려졌다. 活性酸素種은 과량 생성은 세포막의 과산화물을 유발하고 이로 인해 腎臟내 세포막이 분해되

어 細尿管의 세포괴사가 진행되게 된다^{21,26,27}.

본 실험에서 사용된 甘草 (Glycyrrhiza uralensis)의 甘味 성분인 glycyrrhizin은 glycyrrhizic acid 2분자에 glucuronic acid가 결합한 配糖體로 요량 및 나트륨 배출을 감소시키고 칼륨 배출을 증가시켜서 부신피질의 사구대를 위축시키며^{12,28,29}, 또한 항산화 활성이 큰 것으로 알려져 있다³⁰. 시험관내에서 glycyrrhizin의 superoxide radical 소거능과 hydroxyl radical 소거능을 측정 한 결과 glycyrrhizin은 hydroxyl radical의 소거능은 보이지 않았지만 superoxide radical 소거능을 보였고 이는 glycyrrhizin이 活性酸素種의 소거 효과를 통하여 急性腎不全으로 인한 세포내 기능 장애 억제에 어느 정도 기여할 수 있다고 판단되었다. 急性腎不全을 유도하기 위해 gentamicin (100 mg/kg)을 단독으로 투여한 군의 혈장내 지질 과산화도를 측정 한 결과 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 이는 선행 연구 결과³¹와 일치하였다. 이와 같은 gentamicin에 의해 유도된 急性腎不全 백서에서의 혈장내 지질 과산화물의 증가는 glycyrrhizin 투여에 의해서 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 glycyrrhizin이 실험과 내에서도 항산화 활성을 갖고 실제 생체내에서도 항산화 활성을 갖는다는 것을 의미한다. Gentamicin에 의한 急性腎不全시 다뇨를 동반한다는 사실은 잘 알려져 있다^{32,33}. 姜 등⁹의 실험결과에서도 100 mg/kg의 gentamicin을 5 일 동안 피하 주사하였을 때 요량이 현저하게 증가하였다. 이러한 多尿 현상은 glycyrrhizin 투여에 의해서는 부분적으로 억제되었다. 요중 삼투질 농도 또한 gentamicin 투여군에서는 크게 낮아졌지만 gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서는 유의하게 회복되었다. 요중 나트륨 배설량도 gentamicin 투여군에서는 억제되었으나 glycyrrhizin 투여에 의하여 정상값으로 회복되었다. 요중 칼륨 배설량은 각 군간에 유의한 차이가 없었지만 creatinine 청소율과 용질-자유수분 재흡수량은 gentamicin 투여군에서 억제되었지만 glycyrrhizin 투여에 의하여 부분적으로 회복되었다. Gentamicin 유도 急性腎不全 백서에서의 요중 Na⁺ 배설량은 감소하였으나 K⁺ 배설량에는 유의한 변화가 나타나지 않았고 glycyrrhizin 또한 K⁺ 배설량에 유의성 있는 영향을 미치지 못하였다. Gentamicin에 의해 요와 혈장 크레아티닌 농도는 증가한 반면 요중 삼투질 농도는 현저하게 감소하였다. 이와 같은 결과는 gentamicin 유도 急性腎不全 백서 腎臟의 사구체 여과율의 감소와 요 농축력의 감소를 시사한다. Gentamicin과 glycyrrhizin을 같이 투여한 군에서는 요중 삼투질 농도의 감소가 부분적으로 억제되었고, creatinine 청소율과 용질-자유수분 재흡수의 감소가 현저하게 억제되었는데 이러한 작용은 gentamicin에 의해 억제된 腎臟의 여과 기능과 재흡수 기능이 glycyrrhizin에 의해 부분적으로 회복된 것으로 사료된다. 鹽分の 이동은 여러가지 체내 자극에 의해 細尿管 각 부위에서 조절됨으로써 체내 항상성 유지에 기여하며 이 조절 기능은 細尿管 내강으로부터 재흡수 되는 나트륨의 이동에 의해서 이루어진다. 몇 곳을 제외한 모든 細尿管 부위에서 Nac의 능동적 이동이 발생하며, 이는 細尿管 세포의 기저 外側膜에 위치한 Na,K-ATPase활성과 밀접한 관련이 있다^{10,34}. 細尿管 내강쪽 세포막에서 나트륨의 이동을 매개하는 운반체들의 존재와 역할이

전통적인 腎臟 생리 연구방법에 의해 제시되어 오다가 최근들어 도입된 分子生物學의 연구기법의 도움으로 각 細尿管의 세포와 분자 수준에서 규명되고 있다. 또한, 수분채널과 나트륨 이온채널의 발현 및 활성은 요 농축기전에 중요하다. 실제로 요중에서 배설되는 鹽分이 사구체 여과의 1% 미만임을 생각할 때 집합관에서의 鹽分 재흡수를 조정한다는 것이 鹽分 평형에 중요하다고 사료된다. 하지만, 腎 毒性으로 인한 急性腎不全에서는 요 농축능의 결여에 따라 삼투적 수송의 障礙가 발생하며, 나트륨 수송채널의 발현이 감소된다고 알려졌다¹¹⁾. 나트륨 이온의 배설은 주로 細尿管강의 Na⁺채널 (Na⁺-glucose transporter, Na,HCO₃ transpoter, Na,Cl co-transpoter, Na,K₂Cl-transporter, 등), 細尿管과 집합관의 Na⁺ 채널 (epithelial Na⁺ channel), 細尿管과 집합관의 기저막의 Na⁺K⁺pump (Na,K-ATPase)등의 조절에 의하여 이루어진다^{35,36)}. 그 중에서 Na,K-ATPase는 腎臟에서 Na⁺ 재흡수에 있어서 중추적인 역할을 하는 Na⁺-pump이다^{37,38)}. Na,K-ATPase는 활성 부위의 α1 소단위체와 글리코실화된 β1 소단위체, 그리고 소단위체등 세 개의 소단위체로 구성되어 있는데³⁹⁾ α1과 β1이 腎臟의 Na 재흡수에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에⁴⁰⁾ α1과 β1 소단위체의 단백질 발현 변화는 병태생리에 있어서 중요하다고 생각된다. 본 실험의 결과에 의하면, gentamicin을 단독으로 투여한 군은 대조군에 비해 α1 소단위체의 단백질발현이 유의성 있게 감소하였으며, gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군은 대조군에 비해 유의성 있게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, gentamicin 단독투여 및 gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군은 대조군에 비해 β1 소단위체의 단백질발현이 감소되었지만 유의성이 있지는 않았다. Gentamicin을 투여한 백서에서 요중 Na⁺ 배설이 낮았으나 gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서는 유의성 있게 요중 Na⁺ 배설이 회복된것으로 보아, 요중 Na⁺배설이 Na,K-ATPase α1 소단위체의 단백질발현과 관련이 있는 것으로 사료된다. Sandhya와 그 동료들은⁴¹⁾ gentamicin처리한 동물실험군의 신조직 관찰 후 近位細尿管에서는 같은 성분인 작은 낭들이 보였으며, 간질에서는 炎症性的 水溶液이 관찰되었고 이러한 변화는 항산화제인 α-lipoic acid를 처리함으로 줄어들었는데 이는 腎毒性에 의한 지질 과산화와 관련이 있다고 보고했다. 본 실험에서는 gentamicin으로 유도된 조직손상이 지질 과산화와 관련이 있으며 이는 glycyrrhizin을 처리함으로 活性 酸素種을 매개하는 과정을 억제하여 부분적으로 회복된 것으로 사료된다. 요약하면, gentamicin으로 유도된 急性腎不全 백서의 腎臟에서는 Na,K-ATPase의 α1 소단위체의 발현 억제와 관련되어 腎臟 기능이 억제되었고 glycyrrhizin은 항산화 효과와 나트륨 채널의 단백질 발현을 증가시킴으로써 腎臟 기능을 부분적으로 회복시키는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 甘草의 주성분인 glycyrrhizin이 항산화 활성을 갖는지와 gentamicin에 의한 急性腎不全시 나타나는 腎臟 기

능 저하를 억제시키는지를 알아보고자 하였다. Glycyrrhizin을 시험관내에서 항산화 활성을 측정한 결과 농도 의존적으로 superoxide radical 소거능을 보였고, gentamicin 투여에 의하여 증가 되었던 혈장내 지질 과산화도는 glycyrrhizin 투여에 의하여 거의 정상 수준으로 회복되었다. 정상백서에 5일동안 gentamicin을 피하 주사한 군에서 요량이 증가하였고, 삼투질 농도, Na⁺ 배설량, 크레아티닌 청소율, 용질 자유 수분 재흡수가 감소되었으나 glycyrrhizin 투여에 의하여 부분적으로 회복되었다. 腎臟의 중요한 Na⁺ 채널인 Na,K-ATPase α1 소단위체의 단백질 발현은 gentamicin 투여 신부전 백서에서 감소하였지만 glycyrrhizin에 의하여 회복되었다. 하지만 Na,K-ATPase β1 소단위체의 단백질 발현은 각 군간에 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때, gentamicin투여로 유도된 急性腎不全에서의 신기능의 저하는 Na,K-ATPase α1 소단위체의 단백질 발현 억제와 부분적으로 관련이 있고, 이는 glycyrrhizin에 의하여 부분적으로 회복되었는데, 이와 같은 결과는 glycyrrhizin의 항산화효과와 관련이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2002년도 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. Ali B.H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 26, 1477-1487, 1995.
2. Weinberg, M.J. Humes, D.H. Mechanisms of gentamicin induced dysfunction of renal cortical mitochondria. I. Effects on mitochondrial respiration. *Arch Biophys* 205, 222-231, 1980.
3. Baliga, R., Veda, N., Walker, P.D., Shah, S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 31(4), 971-977, 1999.
4. Giudet, B.R., Shah, S.V. In vitro gentamicin of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 256, F158-F164, 1986.
5. Lee, J.U., Yoo, K.S., Kang, D.G., Kim, S.W. Choi, K.C. Gentamicin decrease the abundance of Aquaporin water channel in rat kidney. *Jpn J Pharmacol* 85, 392-398, 2001.
6. Kim, S.W., Lee, J.U., Nah, M.Y., Kang, D.G., Ahn, K.Y., Lee, H.S., Choi, K.C. Cisplatin decrease the abundance of AQP water channel in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 12, 875-882, 2001.
7. Kashdarian, M., Biemesderfer, D., Caplan, M., Forbush, B. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: Immunocyto-

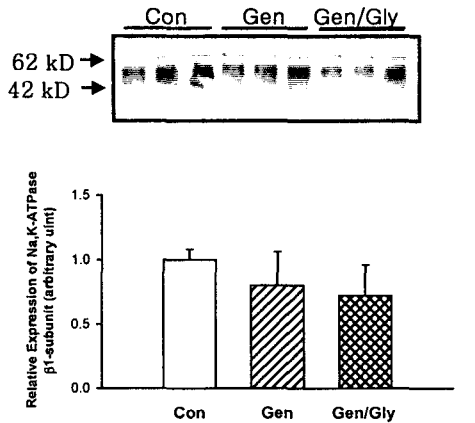


Fig. 4. Representative Western blot and densitometric analysis of Na,K ATPase β 1 subunit in rats with control (Con), gentamicin-induced ARF (Gen), and gentamicin-induced ARF administered with glycyrrhizin (Gen/Gly). Each data represents mean \pm SE of 7 experiments

고찰

急性腎不全의 원인은 虛血 및 腎毒性 물질에 의한 細尿管 손상이 가장 많은 부분을 차지하며 病理的으로는 細尿管 과사를 특징으로 한다¹⁷⁾. 허혈에 의한 急性腎不全은 저혈압, 심한 탈수, 심장 기능 부전, 패혈증, 외상 등으로 인하여 일시적인 신 관류압 및 신 혈류가 감소되어 발생하게 된다¹⁸⁾. 반면에, 신 독소에 의한 急性腎不全은 중금속, hydrocarbon 등 여러 가지 신 독성물질과 함께 최근 사용이 늘고 있는 aminoglycoside계 항생제¹⁹⁾, 방사선 조영제, 항암제²⁰⁾, 비스테로이드성 항염증제 등과 같은 외인성 신 독소와 헤모글로빈, 마이오글로빈, 칼슘 등과 같은 내인성 신 독소의 과다로 일어난다¹⁸⁾. 腎毒性 물질에 의한 急性腎不全은 腎毒性 물질이 세포내에 축적됨으로써 세포의 기능적, 생화학적, 구조적 이상이 초래되어 발생한다²¹⁾. Gentamicin은 aminoglycoside계 항생제로 대개 그람 음성균 박테리아에 의해 발병하는 감염성 질환의 치료에 주로 이용되고 있다²²⁾. 그러나 gentamicin을 과량 투여하거나 장기간 투여할 때에는 腎毒性을 나타내는 데 腎臟의 효소활성과 막 투과성을 변화시키고 mitochondria의 기능 상실을 초래하여 急性腎不全을 유발한다^{2,23)}. Aminoglycoside계 항생제에 의한 腎毒性 기전은 비교적 잘 밝혀져 있는데 양이온을 띠는 aminoglycoside계 항생제가 음이온인 인지질 막 수용체의 하나인 PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate)에 잘 결합하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. 따라서 aminoglycoside계 항생제의 양이온 아미노기와 세포막을 구성하는 인지질중 음이온 인 사이의 정전기적 상호작용이 존재하게 됨으로써 세포막의 투과도를 저하시키고 생체막의 유동성도 저하시키게 되는 것이다. 그러므로 세포내의 mitochondria 호흡 및 마이크로솜의 단백질합성 장애, PIP2 연쇄반응을 통한 세포내 신호전달 체계의 손상 등 중요한 세포내 기능 장애가 유발된다. Hydroxyl radical이나 superoxide radical과 같은 活性酸素種의 과량 생성 또한 gentamicin에 의한 急性腎不全의 유발에 중요한 병인으로 작용하는 것으로 알려졌다. 活性酸素種의 과량 생성은 세포막의 과산화를 유발하고 이로 인해 腎臟내 세포막이 분해되

어 細尿管의 세포괴사가 진행되게 된다^{21,26,27)}.

본 실험에서 사용된 甘草 (Glycyrrhiza uralensis)의 甘味 성분인 glycyrrhizin은 glycyrrhizic acid 2분자에 glucuronic acid가 결합한 配糖體로 요량 및 나트륨 배출을 감소시키고 칼륨 배출을 증가시켜서 부신피질의 사구대를 위축시키며^{12,28,29)}, 또한 항산화 활성이 큰 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 시험관내에서 glycyrrhizin의 superoxide radical 소거능과 hydroxyl radical 소거능을 측정 한 결과 glycyrrhizin은 hydroxyl radical의 소거능은 보이지 않았지만 superoxide radical 소거능을 보였고 이는 glycyrrhizin이 活性酸素種의 소거 효과를 통하여 急性腎不全으로 인한 세포내 기능 장애 억제에 어느 정도 기여할수 있다고 판단되었다. 急性腎不全을 유도하기 위해 gentamicin (100 mg/kg)을 단독으로 투여한 군의 혈장내 지질 과산화도를 측정 한 결과 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 이는 선행 연구 결과³¹⁾와 일치하였다. 이와 같은 gentamicin에 의해 유도된 急性腎不全 백서에서의 혈장내 지질 과산화물의 증가는 glycyrrhizin 투여에 의해서 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 glycyrrhizin이 실험과 내에서도 항산화 활성을 갖고 실제 생체내 에서도 항산화 활성을 갖는 다는 것을 의미한다. Gentamicin에 의한 急性腎不全시 다뇨를 동반한다는 사실은 잘 알려져 있다^{32,33)}. 姜 등⁹⁾의 실험결과에서도 100 mg/kg의 gentamicin을 5 일동안 피하 주사하였을 때 요량이 현저하게 증가하였다. 이러한 多尿 현상은 glycyrrhizin 투여에 의해서는 부분적으로 억제되었다. 요중 삼투질 농도 또한 gentamicin 투여 군에서는 크게 낮아졌지만 gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서는 유의하게 회복되었다. 요중 나트륨 배설량도 gentamicin 투여군에서는 억제되었으나 glycyrrhizin 투여에 의하여 정상값으로 회복되었다. 요중 칼륨 배설량은 각 군간에 유의한 차이가 없었지만 creatinine 청소율과 용질-자유수분 재흡수량은 gentamicin 투여군에서 억제되었지만 glycyrrhizin 투여에 의하여 부분적으로 회복되었다. Gentamicin 유도 急性腎不全 백서에서의 요중 Na⁺ 배설량은 감소하였으나 K⁺ 배설량에는 유의한 변화가 나타나지 않았고 glycyrrhizin 또한 K⁺ 배설량에 유의성있는 영향을 미치지 못하였다. Gentamicin에 의해 요와 혈장 크레아티닌 농도는 증가한 반면 요중 삼투질 농도는 현저하게 감소하였다. 이와 같은 결과는 gentamicin 유도 急性腎不全 백서 腎臟의 사구체 여과율의 감소와 요 농축력의 감소를 시사한다. Gentamicin과 glycyrrhizin을 같이 투여한 군에서는 요중 삼투질 농도의 감소가 부분적으로 억제 되었고, creatinine 청소율과 용질-자유 수분 재흡수의 감소가 현저하게 억제 되었는데 이러한 작용은 gentamicin에 의해 억제된 腎臟의 여과 기능과 재흡수 기능이 glycyrrhizin에 의해 부분적으로 회복된 것으로 사료된다. 鹽分の 이동은 여러가지 체내 자극에 의해 細尿管 각 부위에서 조절됨으로써 체내 항상성 유지에 기여하며 이 조절 기능은 細尿管 내강으로부터 재흡수 되는 나트륨의 이동에 의해서 이루어진다. 몇 곳을 제외한 모든 細尿管 부위에서 Na의 능동적 이동이 발생하며, 이는 細尿管 세포의 기저 外側膜에 위치한 Na,K-ATPase활성과 밀접한 관련이 있다^{10,34)}. 細尿管 내강쪽 세포막에서 나트륨의 이동을 매개하는 운반체들의 존재와 역할이

전통적인 腎臟 생리 연구방법에 의해 제시되어 오다가 최근들어 도입된 分子生物學의 연구기법의 도움으로 각 細尿管의 세포와 분자 수준에서 규명되고 있다. 또한, 수분채널과 나트륨 이온채널의 발현 및 활성은 요 농축기전에 중요하다. 실제로 요중에서 배설되는 鹽分이 사구체 여과의 1% 미만임을 생각할 때 집합관에서의 鹽分 재흡수를 조정한다는 것이 鹽分 평형에 중요하다고 사료된다. 하지만, 腎 毒性으로 인한 急性腎不全에서는 요 농축능의 결여에 따라 삼투적 수송의 障礙가 발생하며, 나트륨 수송 채널의 발현이 감소된다고 알려졌다¹¹⁾. 나트륨 이온의 배설은 주로 細尿管강의 Na⁺채널 (Na⁺-glucose transporter, Na,HCO₃ transpoter, Na,Cl co-transpoter, Na,K₂Cl-transporter, 등), 細尿管과 집합관의 Na⁺ 채널 (epithelial Na⁺ channel), 細尿管과 집합관의 기저막의 NaK pump (Na,K ATPase) 등의 조절에 의하여 이루어진다^{35,36)}. 그 중에서 Na,K ATPase는 腎臟에서 Na⁺ 재흡수에 있어서 중추적인 역할을 하는 Na⁺-pump이다^{37,38)}. Na,K-ATPase는 활성 부위인 α 1 소단위체와 글리코실화된 β 1 소단위체, 그리고 소단위체등 세 개의 소단위체로 구성되어 있는데³⁹⁾ α 1과 β 1이 腎臟의 Na 재흡수에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에⁴⁰⁾ α 1과 β 1 소단위체의 단백질 발현 변화는 병태생리에 있어서 중요하다고 생각된다. 본 실험의 결과에 의하면, gentamicin을 단독으로 투여한 군은 대조군에 비해 α 1 소단위체의 단백질발현이 유의성 있게 감소하였으며, gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군은 대조군에 비해 유의성 있게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, gentamicin 단독투여 및 gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군은 대조군에 비해 β 1 소단위체의 단백질발현이 감소되었지만 유의성이 있지는 않았다. Gentamicin을 투여한 백서에서 요중 Na⁺ 배설이 낮았으나 gentamicin과 glycyrrhizin을 동시에 투여한 군에서는 유의성 있게 요중 Na⁺ 배설이 회복된 것으로 보아, 요중 Na⁺ 배설이 Na,K-ATPase α 1 소단위체의 단백질발현과 관련이 있는 것으로 사료된다. Sandhya와 그 동료들은⁴¹⁾ gentamicin처리한 동물실험군의 신조직 관찰 후 近位細尿管에서는 같은 성분인 작은 낭들이 보였으며, 간질에서는 炎症性的 水瘳液이 관찰되었고 이러한 변화는 항산화제인 α -lipoic acid를 처리함으로 줄어들었는데 이는 腎毒性에 의한 지질 과산화와 관련이 있다고 보고했다. 본 실험에서는 gentamicin으로 유도된 조직손상이 지질 과산화와 관련이 있으며 이는 glycyrrhizin을 처리함으로 活性 酸素種을 매개하는 과정을 억제하여 부분적으로 회복된 것으로 사료된다.

요약하면, gentamicin으로 유도된 急性腎不全 백서의 腎臟에서는 Na,K-ATPase의 α 1 소단위체의 발현 억제와 관련되어 腎臟 기능이 억제되었고 glycyrrhizin은 항산화 효과와 나트륨 채널의 단백질 발현을 증가시킴으로써 腎臟 기능을 부분적으로 회복시키는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 甘草의 주성분인 glycyrrhizin이 항산화 활성을 갖는지와 gentamicin에 의한 急性腎不全시 나타나는 腎臟 기

능 저하를 억제시키는지를 알아보고자 하였다. Glycyrrhizin을 시험관내에서 항산화 활성을 측정된 결과 농도 의존적으로 superoxide radical 소거능을 보였고, gentamicin 투여에 의하여 증가되었던 혈장내 지질 과산화도는 glycyrrhizin 투여에 의하여 거의 정상 수준으로 회복되었다. 정상백서에 5일동안 gentamicin을 피하 주사한 군에서 요량이 증가하였고, 삼투질 농도, Na⁺ 배설량, 크레아티닌 청소율, 용질 자유 수분 재흡수가 감소되었으나 glycyrrhizin 투여에 의하여 부분적으로 회복되었다. 腎臟의 중요한 Na⁺ 채널인 Na,K-ATPase α 1 소단위체의 단백질 발현은 gentamicin 투여 신부전 백서에서 감소하였지만 glycyrrhizin에 의하여 회복되었다. 하지만 Na,K-ATPase β 1 소단위체의 단백질 발현은 각 군간에 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때, gentamicin투여로 유도된 急性腎不全에서의 신기능의 저하는 Na,K-ATPase α 1 소단위체의 단백질 발현 억제와 부분적으로 관련이 있고, 이는 glycyrrhizin에 의하여 부분적으로 회복되었는데, 이와 같은 결과는 glycyrrhizin의 항산화효과와 관련이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2002년도 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. Ali B.H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 26, 1477-1487, 1995.
2. Weinberg, M.J. Humes, D.H. Mechanisms of gentamicin induced dysfunction of renal cortical mitochondria. I. Effects on mitochondrial respiration. *Arch Biophys* 205, 222-231, 1980.
3. Baliga, R., Veda, N., Walker, P.D., Shah, S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 31(4), 971-977, 1999.
4. Giudet, B.R., Shah, S.V. In vitro gentamicin of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 256, F158-F164, 1986.
5. Lee, J.U., Yoo, K.S., Kang, D.G., Kim, S.W. Choi, K.C. Gentamicin decrease the abundance of Aquaporin water channel in rat kidney. *Jpn J Pharmacol* 85, 392-398, 2001.
6. Kim, S.W., Lee, J.U., Nah, M.Y., Kang, D.G., Ahn, K.Y., Lee, H.S., Choi, K.C. Cisplatin decrease the abundance of AQP water channel in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 12, 875-882, 2001.
7. Kashdarian, M., Biemesderfer, D., Caplan, M., Forbush, B. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: Immunocyto-

- chemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 28, 899-913, 1985.
8. Kwon, T.H., Frokiaer, J., Han, J.S., Knepper, M.A and Nielsen, S. Decreased abundance of major Na⁺ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 278, F925-F939, 2000.
 9. 강대길, 손은진, 홍성각, 정현택, 이호섭. Glycyrrhizin이 gentamicin 유도 급성 신부전 백서의 腎臟 기능에 미치는 영향. *동의생리 병리학회지*, 15(5), 783-787, 2001.
 10. 안덕균, 이경순, 신민교, 김창민. *중약 대사전*, 정답, pp. 66-70, 1999.
 11. Kageyama, T., Suzuki, H., Saruta, T. Glycyrrhizin induced mineralocorticoid activity through alterations in cortisol metabolism in the human kidney. *Endocrinol* 135, 147-152, 1992.
 12. Sumramanian. S., Bowyer, M.W., Egan, J.C., Knolmayer, T.J. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury with selectin inhibition in a rabbit model. *Am J Surg* 178(6), 573-576, 1999.
 13. Yokozawa, T., Liu, Z.W., Chen, C.P. Protective effects of Glycyrrhizae radix extract and its compounds in a renal hypoxia (ischemia)-reoxygenation (reperfusion) model. *Phytomedicine* 6(6), 439-445, 2000.
 14. 강대길, 이호섭. 생약 추출물에 의한 superoxide와 hydroxyl radical 소거능 검색 방법 개선. *생약학회지*, 32(3):253-256, 2001.
 15. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2), 351-358, 1979
 16. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, 1976.
 17. Thadhini, R., Pascual, M., Bonventre J.V.M. Acute renal failure. *N Eng J Med* 5(30), 1448-1460, 1996.
 18. Kon, V., Ichikawa, I. Physiologist of acute reanal failure, *J Pediat* 105, 351, 1984.
 19. Moore, R.D., Smith, C.R., Lipsky, J.J., Mellits, E.D., Lietman, P.S. Risk factors for nephrotoxicity in patients treated with aminoglycosides. *Ann Intern Med* 100(3), 352-7, 1984.
 20. Heyman, S.N., Rosen, S., Silva, P., Spokes, K., Egorin, M.J., Epstein, F.H. Protective action of glycine in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 40(2), 273-9, 1991.
 21. *腎臟학, 연세대 腎臟질환연구소 편저, 의학문화사, p.619, 1999.*
 22. Sanhya, P., and Varalskshmi, P. : Effect of lipoic acid administratiom on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *Appl Toxicol* 17(6), 405-428, 1997.
 23. Weinberg, J.M., Harding, P.G., Humes, H.D. Mechanisms of gentamicin-induced dysfunction of renal cortical mitochondria. II. Effects on mitochondrial monovalent cation transport. *Arch Biochem Biophys* 205(1), 232-9, 1980.
 24. Ramsammy, L.S., Josepovitz, C., and Kaloyanides, G.J. Gentamicin inhibits agonist stimulation of the phosphatidylinositol cascade in primary cultures of rabbit proximal tubular cells and in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 247(3), 989-96, 1988.
 25. Sundin, D.P., Sandoval, R., Molitoris, B.A. Gentamicin inhibits renal protein and phospholipid metabolism in rats: implications involving intracellular trafficking. *J Am Soc Nephrol* 12(1), 114-23, 2001.
 26. Nakajima T., Hischida A., Kato A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 266:F425-F431, 1994.
 27. Walker, P.D., Shah, S.V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 81, 334-341, 1988.
 28. Gomez-Sanchez, E. P., and Gomez-Sanchez, C. E. Central hypertensinogenic effects of glycyrrhizic acid and carbenoxolone. *Am J Physiol* 263(6), E1125-30, 1992.
 29. Kato, H., Kanaoka, M., Yano, S., and Kobayashi, M. 3-Monoglucuronyl-glycyrrhetic acid is a major metabolite that caused licorice-induced pseoaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 80(6), 1929-33, 1995.
 30. Vaya, J., Belinky, P.A., Aviram, M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol* 23(2), 302-13, 1997.
 31. Sandhya, P., and Varalakshmi, P. : Effect of lipoic acid administration on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *J Appl Toxicol* 17(6), 405-8, 1997.
 32. Walker, R.J., Duggin, G.G. Drug nephrotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28, 331-45, 1988.
 33. Gordon, J. A., Dillingham, M. A., Guggenheim, S. J., Grossfeld, P.D., Anderson, R.J. The renal concentrating defect after gentamicin administration in the rat. *J Lab Clin Med* 101(6), 903-10, 1983.
 34. Garg, L.C., Knepper, M.A., Burg, M.B. Mineralocorticoid effects on Na,K-ATPase in individual nephron segments. *Am J Physiol* 240(6), F536-44, 1981.
 35. 김광진, 김창주, 김형진, 박사훈. *인체생리학*, 서울, 정문각, pp. 171-189, 1998.
 36. 서울대학교 의과대학. *전정관 腎臟學*, 서울대학교 출판부, pp. 87-110, 1993.
 37. Kinne, R., Schmitz, J.E., Kinne-Saffran, E. The localization of the Na,K-ATPase in the cells of rat kidney cortex. A study on isolated plasma membranes. *Pflugers Arc* 329(3), 191-206, 1971.
 38. Schmidt, U., Dubach, U.C. Induction of Na,K-ATPase in

- the proximal and distal convolution of the rat nephron after uninephrectomy. *Pflugers Arch* 349(1), 39-48, 1974.
39. Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T. Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 269(31), 19659-62, 1994.
40. Orłowski, J., Lingrel, J.B. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263(21), 10436-42, 1988.
41. Sandhya, P., Mohandass, S., Varalakshmi, P. Role of DL alpha-lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity. *Mol Cell Biochem* 145(1), 11-7, 1995.