

澤君六味地黃湯이 산화질소의존형 고혈압백서의 혈압과 신장기능에 미치는 영향

손은진 · 강대길 · 노숙연 · 이안숙 · 尹明浩 · 문미경 · 윤용갑¹ · 이호섭*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1: 한의과대학 한의학과

Effects of *Taekunyukmijwhang-tang* on Blood Pressure and Renal function in NO-dependent Hypertensive Rats

Eun Jin Sohn, Dae Gill Kang, Suk Yeon Noh, An Sook Lee, Ming Hao Yin, Mi Kyung Moon, Young Gab Yun¹, Ho Sub Lee*

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

The present study examined the effects of *Taekunyukmijwhang-tang* (TY) on blood pressure and renal function in nitric oxide (NO)-dependent hypertensive rats. A pharmacological inhibition of nitric oxide synthase (NOS) for 4-6 weeks produces renal vasoconstriction, renal dysfunction, and progressive severe hypertension. Treatment of rats with NG-Nitro-L-arginine methylester (L-NAME) (100 mg/L, 6 weeks), which is a nonspecific NOS inhibitor, cause a sustained increase in systolic blood pressure (SBP), along with the decrease in expression of eNOS in the kidney and thoracic aorta. The expression of Na, K-ATPase α 1 subunit in the kidney was also reduced in the L-NAME induced hypertensive rats group. The renal functional parameters including urine osmolality (Uosm), creatinine clearance (Ccr), which is an index of glomerular filtration (GFR) were decreased in rat with L-NAME induced hypertension. while solute-free water reabsorption (Tch₂O) was unchanged in all experimental group. However, the group combined treated with TY and L-NAME did not develop hypertension and expression of eNOS in the aorta was restored. The expression of Na⁺, K⁺-ATPase α 1 subunit in the kidney was markedly restored in L-NAME-induced hypertension rats by administration of TY along with the restoration of urinary volume (UV) and sodium excretion (UNaV), while Na⁺, K⁺-ATPase β 1 subunit was not altered. These results suggest that TY attenuates an increase in SBP in the L-NAME induced hypertension and restores partially renal function, which seems to be caused by up-regulation of expression of Na⁺, K⁺-ATPase α 1 subunit in the kidney and eNOS in thoracic aorta.

Key words : *Taekunyukmijwhang-tang*(澤君六味地黃湯), NG-Nitro-L-arginine methylester (L-NAME)

서 론

澤君六味地黃湯은 六味地黃湯의 조성에서 熟地黃 대신 澤瀉를 君藥으로 한 처방이다. 육미지황탕의 효능은 滋陰補腎, 大補實陰, 生精生血하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 구성 약재 중 산수유는 溫補肝腎, 滋精하고 산약은 建碑固腎, 益精하며, 택사는 利水滲濕, 腎中瀉火하며, 숙지황의 滋膩를 防止하고 목단피는 清熱涼肝, 瀉陰中之伏火하고, 복령은 산약을 助하여 補裨하고, 택사를

助하여 利水한다^{2,4)}. 육미지황탕에 대한 실험적 연구보고를 보면, 김 등⁵⁾은 지속적 혈압강하를, 허 등⁶⁾은 혈청 중 전해질인 Na, Cl 등의 감소를, 유⁷⁾는 신염 백서의 요중 단백질 함량이 감소함을 보고한 바 있다. 택사는 이뇨제 또는 당뇨병 등의 치료약으로 한 방 및 민간에서 널리 사용되어 왔으며⁸⁻¹⁰⁾, 성미를 甘寒 하여 利水滲濕하는 효능을 가지고 있어 痰飲停滯, 小便不利, 水腫泄瀉淋濁 등에 이용된다고 하였다^{11,12)}. 澤瀉의 메타놀 추출물 중 alisol은 angiotensin I, bradikinin에 의한 혈관 수축에 대한 억제작용이 있다고 알려져 있다¹³⁾.

고혈압의 주요 병리는 腎水不足, 肝陽亢盛이며, 치법으로 清熱祛風, 滋陰降火, 清火補陰, 清熱祛痰, 祛風活血, 理氣祛痰 등이

* 교신저자 : 이호섭, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
 · E-mail : host@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6841
 · 접수 : 2003/10/21 · 수정 : 2003/12/08 · 채택 : 2004/01/12

있다. 치료제로는 瀉火清熱을 목표로 하는 三黃瀉心湯, 清上瀉火湯, 防風通聖散, 黃連解毒湯, 十味導赤散이 있고 順氣祛風을 목표로 烏藥順氣散, 星香順氣散, 人蔘順氣散, 順氣和中湯 六味地黃湯 등이 있으며, 單味로 桑葉, 桑白皮, 防風, 羌活, 稀莖, 槐花, 枸杞子 등을 사용한다^{14,15}. 혈압은 혈류와 혈관 저항에 따라 결정되며 여기에는 다양한 인자들이 특히, 염과 수분의 균형에 영향을 주는 요인들의 상대적인 조절이 관여하고 있고, 혈관 수축이나 염과 수분의 저류와 같은 인자들의 불균형은 고혈압을 유발시킨다. 혈압이 높은 상태로 유지되면 그에 따른 부작용으로 심부전, 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 망막 출혈, 신부전, 동맥경화등 다른 장기에 심각한 손상을 입힐 수 있다¹⁶. 대표적인 혈관이완 물질인 산화질소(NO)가 발견 된 후 최근까지 혈관 내피세포에서 혈압을 조절하는 중요한 인자로서 인식되어 왔다. 혈관 내피세포 산화 질소는 국지적으로 작용하는 혈관 이완 인자일 뿐만아니라, 장 단기 혈압을 조절하는 주요 인자로 알려졌다¹⁷. 또한 산화 질소는 신장에 작용하여 신 혈류, 사구체 여과율, renin의 분비, 염의 배설 등을 조절 하는 것으로 알려졌다¹⁸. Arranz 등¹⁹은 고혈압 모델에서 산화 질소계가 억제되고 신장의 기능이 부분적으로 억제된다는 것을 보고했다. 그러므로 산화 질소 합성 효소 억제제인 NG-Nitro-L-Arginine methylesther (L-NAME)를 구강 내 투여하면 신 혈관 수축, 신 기능의 억제 등과 함께 고혈압이 발생하게 된다. 이 실험에서는 NO-의존형 고혈압 백서에서 태군육미지황탕의 혈압강하 효과를 관찰하고, 작용기전을 규명하기 위하여 혈압 조절에 중요한 역할을 하는 신장기능의 변동과 혈관이완 효과기전을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험 동물은 체중이 약 200-250 g인 웅성 Sprague-Dawley 백서 (샘타 코, 오산, 한국)를 물과 고형 사료를 충분히 공급하면서 7일동안 metabolic cage에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험은 5군으로 나누어 수행하였다. 약물을 투여하지 않은 정상군, 정상 백서에 태군육미지황 전탕액 200 mg/kg/day을 투여한 대조군, L-NAME 투여로 고혈압을 유발한 고혈압 백서군, L-NAME로 고혈압을 유발한 뒤 3주 부터 태군육미지황탕 100 mg/kg을 투여한 백서군 (L-NAME/TY-1 dose), 200 mg/kg을 투여한 백서군 (L-NAME/TY-2 dose)로 구성 하였다. 혈관내피 세포에서의 산화질소 생성을 억제하여 고혈압을 유발하는 L-NAME 100 mg을 물 1리터에 희석하여 12 mg/kg/day을 투여 하였다.

2) 검액의 제조

삼각 플라스크에 태군육미지황탕 5첩 분량 260 g과 증류수 1250 ml를 냉각기가 설치된 삼각플라스크에 넣은 후 120분간 가열하였다. 800 ml 추출된 전탕액을 3000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 전탕액을 동결 건조하였다. 건조된 추출물을 35 mg/ml (1 dose), 70 mg/ml(2 dose)농도로 물에 녹인 후 매일 100 mg/kg (TY-1 dose), 200 mg/kg(TY-2 dose)씩 위장관에 직접 투여 하였다.

Table 1. Prescription of Taekyunyukmijwhang-tang

한 약 명	약 명	중 량(g)
택 사	<i>Alismatis Plantagoaquilicae Rhizoma</i>	16.0
숙지황	<i>Rehmanniae Glotinosae Conquiltae Radix</i>	8.0
산 약	<i>Dioscoreae Oppositae Radix</i>	8.0
산수유	<i>Cornus Officinalis</i>	8.0
백복령	<i>Poriea Cocos Sclerotium</i>	6.0
목단피	<i>Moutan Radicis Cortex</i>	6.0
총 량		52.0

3) 채뇨

백서를 자유롭게 물과 먹이에 접근할 수 있는 metabolic cage에 넣어 1 주간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 5일의 대조 기간 동안 24 시간 요를 채취하였으며, 먹이통, 물통, cage의 청소는 오전 10시-11시에 실시하였다.

4) 채혈

백서를 scaffold로 단두하여 1 mM의 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)가 포함된 tube에 전혈을 모았다. 혈액을 4 °C, 1,000 g에서 10분간 원심분리 하여 혈장을 분리 하였으며, 실험 시까지 냉동 보관하였다.

5) 시약 및 재료

실험에 사용 한 bovine serum albumin, tetramethylethylenediamine (TEMED), glycerol, β-mercaptoethanol, glycine, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 등은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을, polyacrylamide, bis-polyacrylamide, bromophenol blue, Tween-20 등은 Amresco (Solon, OH, USA) 제품을, Non-fat milk (NFM)는 Difco (Spark, MD, USA) 제품을, Bradford 시약은 Bio-Rad 제품을 사용하였다. 이 실험에 사용 한 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 α1과 β1 subunit 항체는 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) 제품을, ecNOS와 iNOS 항체는 Transduction Laboratories(Lexington, KY, USA) 제품을 사용하였다. Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated 2차 항체는 Amersham (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 요중 creatinine 및 전해질 농도의 측정

요와 혈장의 creatinine은 Phillips 등²⁰의 방법으로 분광광도계(Spectronic 601, Miltonroy, USA)를 이용해 정량 하였고, 전해질 농도는 전해질 분석기 (NOVA 4, Newton, MA, USA)를 이용해 분석하였다.

2) 용질-자유 수분 재흡수 (TcH₂O) 의 측정

혈장과 요의 삼투질 농도는 osmometer (Advanced Instruments, Model 3900, Norwood, MA, USA)를 이용해 측정 한 후 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$TcH_2O = (Uosmol/Posm) \cdot V \text{ 단, } V = \text{urine volume,}$$

$$Uosm = \text{urinary osmolality, Posm} = \text{plasma osmolality.}$$

3) 혈압의 측정

백서의 꼬리 동맥에서 혈압을 측정하였다. 즉 백서를 37°C에서 20분간 방치한 후 백서 고정대에 고정하고, 고리에 pneumatic

sensor를 부착하여 pneumatic pulse transducer에 연결하였으며, 이를 sphygmomanometer preamplifier에 연결하여 polygraph (Grass Model 7E, Quincy, MA, USA) 상에 기록하여 수축기 혈압을 측정하였다.

4) 단백질의 분리 및 정량

백서를 단두하여 신장과 흉부 대동맥을 분리한 후 액체 질소에서 얼린 뒤 사용할 때까지 72°C에 보관한다. 보관된 신장과 흉부 대동맥 각각을 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF가 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 조직 덩어리나, 핵 등은 제거하고 총 단백 추출물만 얻었다. 총 단백 추출물을 다시 100,000 g에서 1 시간 동안 고속 원심분리 하였다. 단백질을 분리하고 단백질의 농도는 소 혈청 알부민을 표준용액으로 한 Bradford 법²¹⁾으로 정량 하였다.

5) Western blot 분석

Western blot용 단백질은 신장에서 단백분리 하였고, Na⁺, K⁺-ATPase α1, β1 소단위체는 32 μg의 세포막 단백질을 이용하여 전기영동 하였다. 단백질 blotting을 위하여 단백질을 Na⁺, K⁺-ATPase α1-subunit에 대해서는 7%, β1-subunit은 10%, ecNOS와 iNOS는 7% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 비연속성 전기영동장치 (Mini-protean 3 cell, Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 전기영동 하여 크기대로 분류하였다. 분류된 단백질을 blot module을 이용하여 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이 membrane을 Tris로 완충한 식염수(TBS)에 씻고 2시간동안 TBS에 용해시킨 5% 무지방 건조 우유용액(NFM/TBS)에서 blocking 하였으며, 2% NFM/TBS로 생쥐에서 추출한 polyclonal anti-Na⁺, K⁺-ATPase α1, β1 subunit (1:5,000)와 anti-ecNOS와 anti-iNOS (1:2,500) 일차 항체 용액에서 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 membrane을 2% NFM/TBS에서 2시간동안 biotylated goat anti-mouse IgG (1:2,000)와 함께 incubation하였다. 결합된 항체를 enhanced chemiluminescence로 이용하여 암실에서 Hyperfilm으로 노출 시킨 후 현상하였다. 분석은 image analyser (Imager III, Bioneer, Korea)를 이용하여 상대적 발현의 정도를 측정하였다.

6) 통계 처리

실험군 간의 유의성은 실험 결과를 Student's t-test나 one-way ANOVA test를 통하여 p 값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였고, 실험치의 표현은 mean±SE 로 하였다.

실험결과

1. 혈압에 미치는 영향

정상군의 혈압은 1, 2, 3, 4, 5, 6주 후 각각 102.0±1.2, 116.0±1.9, 118.0±3.0, 119.0±1.9, 116.4±1.6, 118.8±1.3 mmHg로 혈압 변동이 없었다. 정상 백서에 태군육미지황탕을 단독 투여한 대조군의 혈압은 1, 2, 3, 4, 5, 6주 후 각각 107.0±1.2, 111.0±1.9,

112.0±1.2, 116.0±3.3, 111.0±3.3, 114.0±3.7로 혈압 변동이 없었다. L-NAME-유도 고혈압 백서군의 혈압은 1주 후 121.1±3.7 mmHg으로 대조군에 비해서 유의한 혈압 상승을 관찰할 수 있었고 (p<0.05), 2, 3, 4, 5, 6주 후 각각 140.0±5.2, 140.6±3.8, 146.0±2.9, 142.4±3.6, 142.0±3.4 mmHg로 혈압이 유의하게 상승하였다 (p<0.05). L-NAME-유도 고혈압 백서에 3주 후부터 태군육미지황탕 (100 mg/kg/day)을 투여한 L-NAME/TY-1 백서군은 4, 5, 6주 후 각각 132.5±2.7, 134.3±2.7, 132.0±2.4 mmHg로 L-NAME 단독 투여 고혈압 백서군에 비하여 유의하게 감소 하였다 (p<0.05). L-NAME-유도 고혈압 백서에 3주 후부터 태군육미지황탕 (200 mg/kg/day) L-NAME/TY-2 백서군은 4, 5, 6주 후 각각 135.0±1.6, 131.0±2.4, 133.2±1.2 mmHg로써 L-NAME 단독투여 고혈압 백서군에 비해서 유의하게 혈압 상승이 억제됨을 보였다 (Fig. 1, p<0.05).

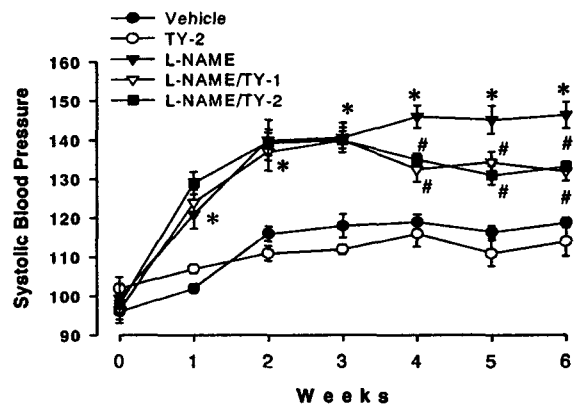


Fig. 1. Effect of the Tazekunyukmigiwhang-tang (TY) on systolic blood pressure in different experimental groups in rats. Control, control group; TY-2, TY administrated in the normal rats; L-NAME, L-NAME-treated group; L-NAME/TY-1 (1-dose, 100 mg/kg/day) and L-NAME/TY-2 (2-dose, 200 mg/kg/day), TY was supplemented with L-NAME during the last 3 weeks; *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with L-NAME-treated group (n=6, each experiments).

2. 체중 및 신장 기능에 미치는 영향

1) 체중에 미치는 영향

실험 기간 동안 모든 실험 백서군의 체중변화는 시간에 따른 증가로, 각 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

2) 요량과 삼투질에 미치는 영향

실험 기간 6주 동안 L-NAME 단독 투여 고혈압 백서군의 요량 (UV)은 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다 (p<0.05). 태군육미지황탕 단독 투여 대조군은 정상군과 요량의 차이가 없었으며, L-NAME 투여 고혈압 백서에 3주후 태군육미지황탕을 동시 투여한 L-NAME/TY-1 백서군과 L-NAME/TY-2 백서군의 요량은 L-NAME 단독 투여군 보다 유의한 증가를 보였다 (Fig. 2).

요중 삼투질 농도는 정상군과 태군육미지황탕 단독 투여 대조군 비교시 차이가 없었다. L-NAME 단독 투여 고혈압 백서군에서 삼투질 농도가 유의하게 감소되는 경향을 보였고, L-NAME/TY-1 백서군과 L-NAME/TY-2 백서군에서는 유의하게 부분적으로 회복 되었다 (p<0.05, Fig. 2).

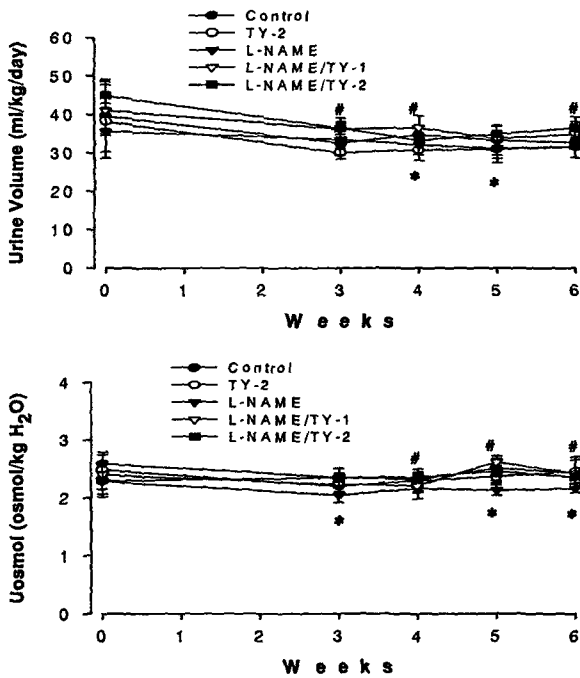


Fig. 2. Effect of the Taekyunyukmigiwhang-tang (TY) on urine volume and osmolality in different experimental groups in rats. * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with L-NAME-treated group ($n = 6$, each experiments). Other legends are the same as in Fig. 1.

3) 요중 전해질 배설량에 미치는 영향

실험기간 동안 정상군의 요중 Na 배설량 (UNaV)은 변동이 없었으며, 태군육미지황탕을 단독 투여한 대조군과 비교시 차이가 없었다. L-NAME 투여 고혈압백서군은 정상군보다 요중 Na 배설량 (UNaV)이 감소 되었고, L-NAME/TY-1 백서군과 L-NAME/TY-2 백서군에서는 다시 유의하게 회복 됨을 보였다 ($p < 0.05$, Fig. 3). 요중 K 배설량 (UKV)과 Cl 배설량 (UCIV)은 각 군간 유의한 차이가 없었다 (Fig. 3).

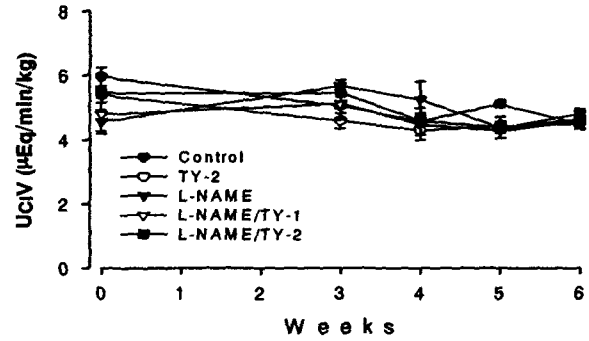
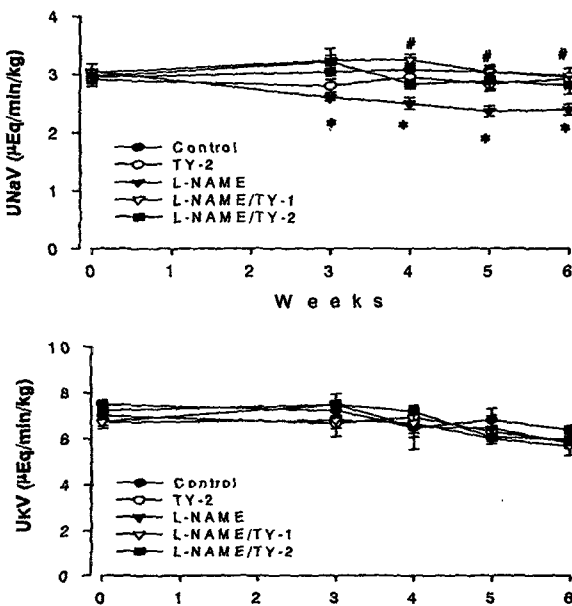


Fig. 3. Effect of the Taekyunyukmigiwhang-tang (TY) on urinary sodium, potassium and chloride excretion in different experimental groups in rats. * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with L-NAME-treated group ($n = 6$, each experiments). Other legends are the same as in Fig. 1.

4) Creatinine 청소율 및 용질-자유 수분 재흡수에 미치는 영향

각 군의 백서에서 creatinine 청소율을 측정하여 본 결과, L-NAME 투여 고혈압군은 정상군과 태군육미지황탕 단독 투여한 대조군과 비교해서 유의하게 감소하였다. L-NAME 단독 투여 고혈압 백서군에 태군육미지황탕을 동시 투여한 백서군은 L-NAME/TY-1 백서군과 L-NAME/TY-2 백서군에서는 L-NAME 투여 고혈압 백서군과 비교시 유의하게 회복 되었다. (Fig. 4). 용질-자유수분 재흡수율(TcH₂O)을 측정하여 본 결과 각 군간 차이가 없었다 (Fig. 4).

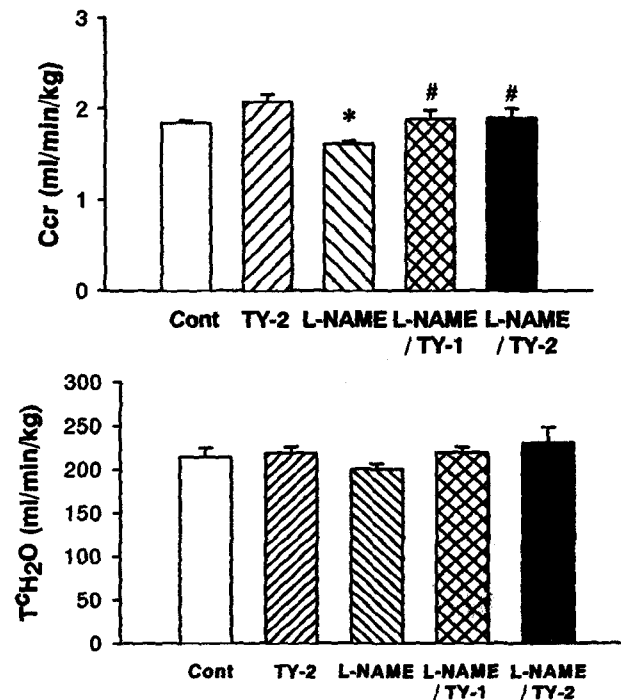


Fig. 4. Effect of the Taekyunyukmigiwhang-tang (TY) on creatinine clearance and free water reabsorption in different experimental groups in rats. * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with L-NAME-treated group ($n = 6$, each experiments). Other legends are the same as in Fig. 1.

3. 산화질소 합성 효소 발현에 미치는 영향

흉부 대동맥에서 eNOS 단백질 발현은 L-NAME 투여 고혈압 백서군에서 유의하게 감소하는 경향을 보였고, L-NAME/TY-1

백서군과 L-NAME/TY-2 백서군에서는 정상군 만큼 유의하게 회복하였다 (Fig. 5). iNOS 발현 각 군간의 차이는 유의하지 않았다 (Fig. 5).

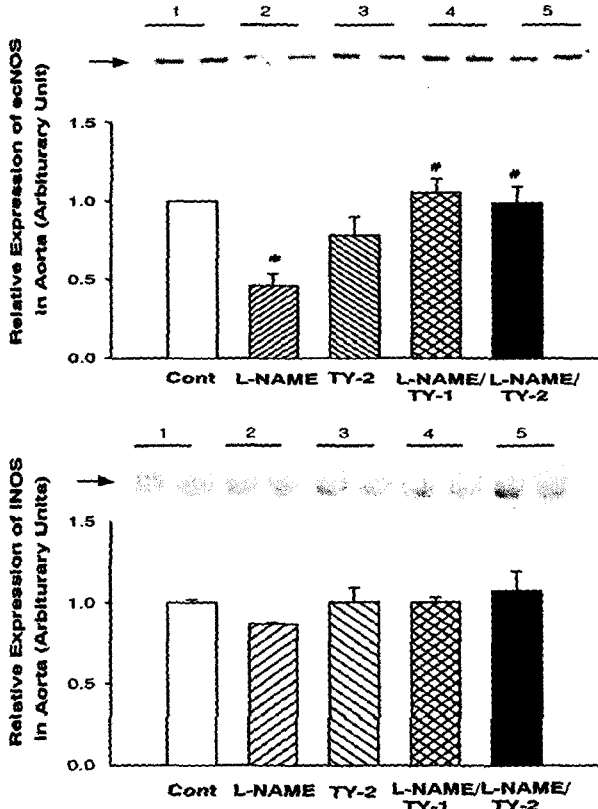


Fig. 5. Representative Western blots and densitometric analyses showing ecNOS and iNOS expression in the thoracic aorta of different experiment groups. Upper panel: 1, 2, 3, 4, 5 denote Control, L-NAME, TY-2, L-NAME/TY-1, L-NAME/TY-2 sequentially. Lower graph: Control, control group; L-NAME, L-NAME treated group; TY-2, TY-2 dose (200 mg/kg) administered group; L-NAME/TY-1, TY 1 dose (100 mg/kg) was supplemented with L-NAME during the last 3 weeks; L-NAME/TY-2, TY II dose (200 mg/kg) was supplemented with L-NAME during the last 3 weeks. * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with L-NAME-treated group (n=6, each experiments).

신장에서 ecNOS의 단백 발현 변화는 L-NAME를 투여한 고혈압 백서군에서 감소하였고, L-NAME/TY-1 백서군과 L-NAME/TY-2 백서군에서는 유의하게 회복하였다 (Fig. 6). 신장 내 iNOS 단백질발현은 유의한 차이가 없었다 (Fig. 6).

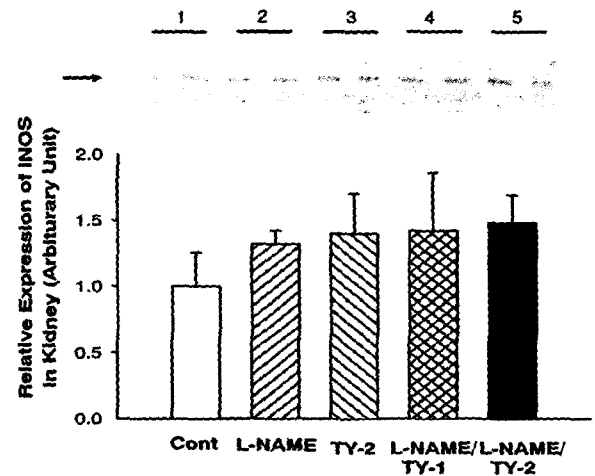
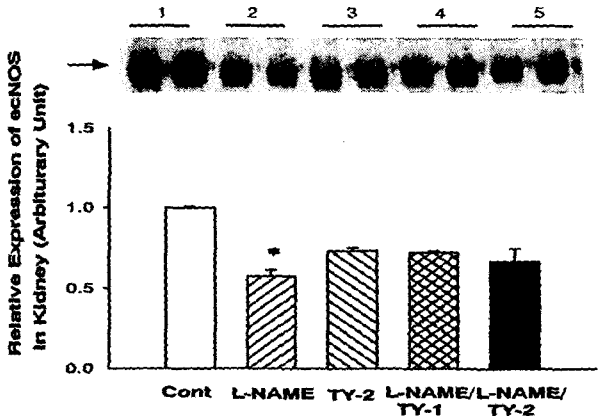


Fig. 6. Representative Western blots and densitometric analyses showing ecNOS and iNOS expression in the kidney of different experiment groups. Other legends are the same as in Fig. 5. (n=6, each experiments). * $p < 0.05$ compared with control.

4. Na^+ , K^+ -ATPase의 발현에 미치는 영향

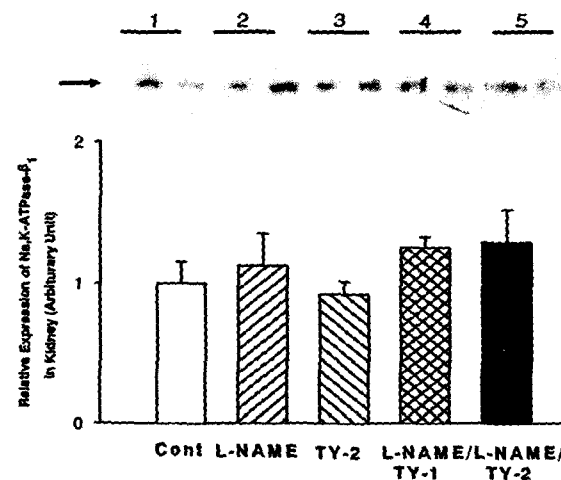
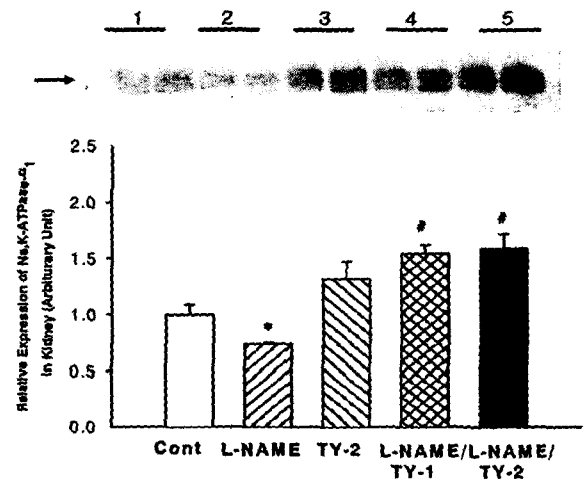


Fig. 7. Representative Western blots and densitometric analyses showing Na^+ , K^+ -ATPase α_1 -subunit and β_1 -subunit expression in the kidney of different experiment groups. Other legends are the same as in Fig. 5. * $p < 0.05$ compared with control group; # $p < 0.05$ compared with L-NAME-treated group (n=6, each experiments).

신장 내 나트륨 펌프 Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1$ 소단위체와 $\beta 1$ 소단위체의 단백 발현 변화를 측정한 결과, Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1$ 소단위체의 단백 발현 변화는 L-NAME를 투여한 고혈압 백서군에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 7). L-NAME/TY-1 백서군과 L-NAME/TY-2 백서군에서 다시 회복하는 경향이 유의하게 나타났다(Fig. 7). Na^+ , K^+ -ATPase $\beta 1$ 소단위체의 변화는 각 군간의 유의한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 7).

고찰

생활 수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인간의 수명이 연장되어 노년층 인구가 증가됨에 따라 노년기 치매와 기타 퇴행성 질환, 및 생활양식의 변화로 인한 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 등 과 같은 성인병의 증가 추세에 있어 사회적으로 이러한 질병에 관한 관심이 집중되고 있다²²⁻²⁴. 특히, 고혈압은 비교적 자각 증상이 적고 고혈압 자체로서는 사망에 이르지 않지만 심부전, 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 망막 출혈, 신부전, 동맥경화 등 다른 장기에 심각한 손상을 입힐수 있다¹⁴. 이러한 이유로 고혈압은 현대에 들어와서는 노년층 뿐만 아니라 장년층의 젊은 세대에 까지 많은 성인병 중의 하나로 꼽히고 있다. 이러한 위험성 때문에 고혈압 치료가 선행되어야 할 필요성이 크다. 혈압의 조절은 유전적, 환경적인 인자를 포함하고 있기 때문에 매우 복잡하며, 그 조절 기전은 여러 가지 다른 인자가 존재한다고 알려져 있다¹⁴. 주로 혈압은 혈류와 혈관 저항에 따라 결정되며 최근에 생체 내에서 생성되는 작은 분자인 산화질소(NO)는 내피세포 의존 혈관 이완 인자(EDRF)로써 혈압 강하 효과가 큰 것으로 밝혀졌다. 산화질소는 L-arginine으로부터 산화질소 합성 효소(NOS)에 의하여 합성 되고 산화 질소 합성효소로 3가지의 동위 효소가 존재한다^{25,26}. 그 중 혈관 내피세포에 주로 분포하면서 혈관을 이완 시키는데 작용하는 혈관 내피세포형 산화질소 합성 효소(ecNOS, eNOS, NOS III)는 acetylcholine에 의해 활성화되어 혈관을 이완 시킨다고 알려져 있다²⁷. 또 한가지 산화질소 합성 효소로는 유도형 산화질소 합성 효소로(iNOS, NOS II) 주로 면역계에 작용하는 것으로 알려져 있고 혈압에 관여인자로 작용한다고 보고 되었다²⁸, 이러한 산화질소는 세포질의 guanylate cyclase를 활성화 시켜 cGMP의 생성을 증가시켜 신호 전달체계를 통해 혈관을 이완 시키게 된다²⁹. 산화질소는 또한 혈관 뿐 아니라 신장의 기능을 조절하는 매우 중요한 인자가 되기도 한다. Lahera 등³⁰은 산화질소 합성효소의 비 선택적 억제제인 L-NAME에 의해 산화질소 합성 효소를 억제하였을 때 단기적으로 요량이 감소하고 요중 염 배출과 사구체 여과율이 감소한다고 보고하였다. 염-의존형 고혈압 모델에서도 산화질소 생성의 감소는 결정적인 병태 생리적 원인으로 작용하게 된다^{31,32}. 따라서 이 실험에서 이용한 모델은 이러한 산화질소 합성을 비선택적으로 차단하는 L-NAME를 처리함으로써 고혈압 생성을 유도하였다.

澤君六味地黃湯은 六味地黃湯의 조성과 같으며, 熟地黃 대신 澤瀉를 君藥으로한 처방이다. 먼저 육미지황탕은 滋補肝腎, 清虛熱, 利濕劑로써 張仲景의 金匱要略에³³ 虛勞腰痛, 小腹拘急,

小便不利者, 八味腎氣丸主之라 설명되어 있으나 宋代 錢乙의 小兒藥集直訣³⁴에 이르러 地黃圖으로 처음 수록되면서 腎怯失音 形開不合, 目中白睛多 등을 治療한다 하였기 때문에 역대 醫家들은 眩暈, 健忘, 失明, 記憶力減退 등을 비롯한 不寐, 耳鳴耳龍, 盜汗通精, 骨蒸潮熱, 消渴病症에 활용하여 왔다³⁵⁻⁴⁰. 육미지황탕 중 속지황은 滋陰 補腎, 大補實陰, 生精生血하고 산수유는 溫補肝腎, 澁精하고 산약은 健脾固腎, 益精하며, 택사는 利水滲濕, 腎中瀉火하며, 속지황의 滋膩를 防止하고 목단피는 清熱涼肝, 瀉陰之伏火하고, 복령은 산약을 助하여 補脾하고, 택사를 助하여 利水한다⁴¹. 육미지황탕의 연구보고를 살펴보면, 김 등⁹은 지속적 혈압강하를, 허 등⁶은 혈청중 전해질인 Na, Cl등의 감소를, 유 등⁷은 신염 백서의 요중 단백질 함량이 감소함을 보고한 바 있다. 澤瀉는 이뇨제 또는 당뇨병 등의 한방 및 민간에서 널리 쓰여온 생약이며, 메타놀 추출물인 alisol은 angiotensin I, bradikinin에 의한 수축 억제작용 효과가 있다고 알려져 있다¹³. 또한 甘寒 하여 利水滲濕하는 효능을 가지고 있어 痰飲停滯, 小便不利, 水腫泄瀉淋濁下等에 이용된다고 하였다^{11,12}.

본 실험의 혈압 결과를 보면, L-NAME를 정상 백서에 100 mg/kg/day 씩 계속해서 응용하게 하였더니 일주일 후 고혈압이 유도된 후 고혈압을 유지 하였다. 하지만, 정상 백서에 L-NAME를 처리하지 않고 택군육미지황탕만 (2 dose, 200 mg/kg/day)을 투여한 대조군에서는 혈압변화가 없었으며, 정상군의 혈압과 유사하게 유지하였다. L-NAME 투여로 고혈압을 유발한 고혈압 백서에 3주후 택군육미지황탕을 1 dose (100 mg/kg/day)와 2 dose (200 mg/kg/day)를 구강 투여한 군에서는 저농도보다 고농도에서 혈압강하 현상이 뚜렷히 나타났다. 이와같이 혈관 산화질소의 생성을 증가 시켜 혈관이완 효과가 보고 된 한약이나 생약은 최근에 몇 가지 보고된 바 있다. Kuramochi 등⁴¹은 조구등 전탕액이 산화질소 의존적으로 혈관이완을 증가시킨다는 보고를 한 바 있고, 이어서 Goto 등^{42,43}은 연속되는 실험 결과에서 조구등 전탕액이 자연발생 고혈압의 혈압을 강하 시키고 methanol 추출물이 산화질소 의존적으로 흥부 대동맥의 혈관을 이완 시킨다고 보고 하였다. 최근 Tanner 등⁴⁴은 덩굴차 추출물이 혈관의 산화질소의 생성을 증가 시킨다는 직접적인 실험 결과를 제시하였고, Pedraza-Chaveriri 등⁴⁵은 마늘 추출물이 L-NAME 고혈압의 생성을 억제 할 뿐만 아니라 이미 생성된 L-NAME 고혈압에 대해서도 혈압강하가 있다고 보고한 바 있다. 이와 같은 결과로 택군육미지황탕이 산화질소의존형 고혈압에서 혈압강하 효과가 나타난 것으로 보고 혈압변동에 영향을 미치는 단백 발현의 변화와 신장 기능을 관찰하였다. 혈압 강하 효과에 대한 기전을 밝히기 위하여 혈관 산화질소 합성효소의 발현을 흥부 대동맥을 이용하여 측정 하였다. 혈관 내피세포형 산화질소 합성 효소(ecNOS)는 L-NAME를 6주간 투여한 결과, ecNOS가 감소 되었다가 L-NAME 투여로 고혈압을 유발한 백서에 3주 후 택군육미지황탕을 동시에 먹인 백서군에서 유의하게 회복 됨을 볼 수 있었다. 택군육미지황탕을 1 dose (100 mg/kg) 투여한 군과 2 dose (200 mg/kg) 투여한 백서군간의 신장 ecNOS 단백질발현 차이는 없었고, 택군육미지황탕만을 먹

인 대조군과 정상 백서군과 비교시에도 유의한 차이는 없었다. 반면, 면역계에 의해 유도 되는 산화질소 합성 효소 (iNOS)는 모두 발현의 변화가 없었다. 신장에서의 ecNOS는 혈관 실험과 유사한 결과로 L-NAME 유도 고혈압 군에서는 단백 발현이 감소하였고, L-NAME를 투여한 후 3주 후에 태군육미지황탕을 동시에 먹인 백서군은 L-NAME 유도 고혈압 군에서 감소된 ecNOS가 유의하게 회복 됨을 볼 수 있었다. 신장 또한 iNOS 발현양 간 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과는 L-NAME 유도 고혈압은 혈관 내피세포형 산화질소 합성효소의 발현이 감소됨으로써 산화질소 합성이 감소하게 된다. 따라서 혈관 이완시키는 물질인 산화질소 생성이 억제됨과 동시에 혈압을 상승 시킨다. 이에 태군육미지황탕은 산화질소 합성효소 활성을 증가시켜 혈관 수축을 억제하여 혈압을 정상으로 회복시키는 것으로 사료된다.

다음으로 신장 기능의 변동을 관찰하였다. 실험 기간 동안의 백서들의 몸무게 변동은 증가하는 추세로 실험군들의 몸무게 차이는 없었다. 신장 기능을 대표하는 기능 중에서 요중 삼투질 배설량 (Uosm)은 정상 백서군과 태군육미지황탕만을 투여한 대조군의 삼투질 차이는 없었다. 반면, L-NAME 투여한 산화질소의존형 고혈압 백서군은 요중 삼투질 배설량이 정상 백서군과 비교시 3, 5, 6주에 유의하게 감소하였으며, L-NAME를 투여한 후 3주 후에 태군육미지황탕을 동시에 먹인 백서군은 L-NAME 투여 고혈압 백서군보다 유의하게 상승되는 경향을 보였다. 요중 전해질 농도 중 요중 칼륨 (UKV), 요중 염소이온 (UCIV) 배설량은 모든 군에서 차이를 보이지 않았다. 하지만 요중 나트륨 배설량 (UNaV)은 L-NAME 투여한 고혈압 백서군과 정상군을 비교시 4, 5, 6주에 유의하게 감소하였다가, L-NAME와 태군 육미지황탕을 3주 후 동시투여한 백서군에서는 다시 유의하게 회복되는 경향을 보였다. 요량 (UV)은 L-NAME 고혈압군에서 일시적으로 감소 하는 경향을 보였고, 이는 L-NAME를 투여한 후 3주 후에 태군육미지황탕을 동시에 먹인 백서군에서 다시 회복되었다. 고혈압 모델 중에서 산화질소의 생성 억제가 고혈압의 생성 및 유지에 병태생리적인 원인이 되는 경우가 있다. 김 등⁴⁶⁾은 신성 고혈압 (2K1C)과 DOCA-Salt 고혈압 모델의 흥부 대동맥에서 산화질소 합성 효소의 발현 및 산화질소 생성량이 감소함을 측정하였고, 산화질소의 생성 감소가 신성-고혈압과 나트륨, 즉 염-의존형 고혈압의 생성 및 유지에 있어서 하나의 중요한 병태생리적 원인이 됨을 보고 하였다. Yang 등⁴⁷⁾도 신성 고혈압 (2K1C)과 DOCA-Salt 고혈압의 신장에서 산화질소계가 억제되어 있음을 보고 하였다. Lahera 등⁴⁸⁾은 L-NAME에 의해 산화질소 합성 효소를 억제 하였을때 단기적으로 요량이 감소하고 요중 나트륨 배출과 사구체 여과율이 감소한다고 보고 하였다. 특히 산화질소가 나트륨의 배설에 있어서 중요한 역할을 한다는 연구결과는 다양하게 보고 되었는데, 개에서 L-NAME를 투여하면 신동맥의 증가와 함께 나트륨의 배출이 감소하고⁴⁹⁾, 압력-이뇨 (pressure-natriuresis)가 감소하여 혈압의 증가에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려졌다⁵¹⁻⁵²⁾. 신장은 세뇨관의 염분 이동을 통해 체내 염분 평형을 조절 함으로써 정상적인 체액량과 체내의 항상성을 유지한다. 이 조절 기능은 세뇨관 내강으로부터 재흡수

되는 나트륨의 이동에 의해서 이루어진다⁵³⁻⁵⁴⁾. 몇 곳을 제외한 모든 세뇨관의 부위에서 Na의 능동적 이동이 발생하며, 이는 세뇨관 세포의 기저 외측막에 위치한 Na^+, K^+ -ATPase활성과 밀접한 관련이 있다. 나트륨 이온의 배설은 주로 세뇨관강의 Na^+ 채널 (Na^+ glucose transporter, Na, HCO_3 transporter, Na, Cl co-transporter, $\text{Na}, \text{K}_2\text{Cl}$ transporter, etc.), 세뇨관과 집합관의 Na^+ 채널(epithelial Na^+ channel), 세뇨관과 집합관의 기저막의 Na^+, K^+ -Pump (Na^+, K^+ -ATPase)등의 조절에 의하여 이루어진다. 그 중에서 Na^+, K^+ -ATPase는 신장에서 Na^+ 재흡수에 있어서 중추적인 역할을 하는 Na^+ Pump이다⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Na^+, K^+ -ATPase는 활성 부위인 $\alpha 1$ 소단위체와 글리코실화된 $\beta 1$ 소단위체, 그리고 ν 소단위체 등 세 개의 소단위체로 구성되어 있는데⁵⁸⁾ $\alpha 1$ 과 $\beta 1$ 이 신장의 Na^+ 재흡수에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에⁵⁹⁾ $\alpha 1$ 과 $\beta 1$ 소단위체의 단백질 발현 변화는 병태 생리에 있어서 중요하다 생각된다. 이에 본 실험에서는 나트륨의 배설에 따른 혈압 변화를 알아보려고 여러 나트륨 이온 채널중 Na^+, K^+ -ATPase의 단백 발현을 신장에서 보았다. 먼저 신장에서의 나트륨 채널인 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ subunit단백 발현량의 차이는 정상 백서군과 비교하여 태군육미지황탕만을 투여한 대조군에서 차이가 약간 보이긴 하였으나 유의하지는 않았다. L-NAME 투여한 고혈압 백서군을 정상군과 비교시 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ 단백질 발현량이 유의하게 감소하였으며, L-NAME 투여 3주 후에 태군육미지황탕을 동시 투여한 실험군에서는 L-NAME 단독 투여군보다 단백질 발현 양이 유의하게 상승되었다. 이는 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ 단백질 발현이 나트륨 배설에 중요한 인자 중에 하나이며, 단백질 발현의 감소가 나트륨의 배설감소의 원인이 됨을 보여 준다. 본 실험에서 이용한 태군육미지황탕이 L-NAME 유도 고혈압 군에서 감소된 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ 발현을 증가 시킴으로써 나트륨의 배설량의 증가를 억제하여 혈압을 감하시킨 것으로 사료된다. 따라서 나트륨-의존형 고혈압의 생성에 있어서 산화 질소 생성의 감소는 중추적인 병태 생리적 원인으로 작용하며 이에 태군육미지황탕이 체내 평형을 조절 해 줌으로써 정상적인 혈압을 유지하려는 항상성에 기여한다고 사료된다. 신장 사구체 여과율의 대표적인 크레아틴 청소율을 보면, L-NAME 투여 고혈압군에서 유의한 감소를 보였다가 L-NAME를 투여한 후 3주 후에 태군육미지황탕을 동시에 먹인 백서군에서 유의하게 회복되는 것을 볼 수 있었다. 이는 신장의 사구체 여과율이 산화질소 생성의 억제에 의해서 감소되었다가 태군 육미지황탕 투여로 인해 다시 회복되었음을 의미한다. 이상의 결과로 보아 L-NAME에 의해 산화질소 합성 효소억제를 유도하면 흥부 대동맥과 신장에서는 산화질소 합성 효소가 억제되어 혈관이완이 감소함으로써 혈압이 증가하게 된다. 또한 신장에서는 사구체 여과율 등의 신기능이 감소와 함께 나트륨의 배설을 감소시키게 되어 고혈압이 발생하는 것으로 사료된다. 따라서 산화질소 의존형 고혈압 백서에 태군육미지황탕을 투용하면 대동맥과 신장에서 ecNOS의 효소 활성 억제를 방지함으로써 혈압을 감소시키고 신장에서 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ 발현 증가와 함께 나트륨 배출, 사구체 여과율 등의 신기능을 회복 시켜 혈압 강하효과를 나타내는 것으로 사료된다

결 론

태군육미지황탕이 산화질소 의존형 고혈압에 대하여 강하 효과가 있는지를 알아보고, 그 기전을 밝히기 위하여 L-NAME 고혈압 백서에 태군육미지황탕을 투여 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

L-NAME를 단독 투여한 군에서는 혈압이 유의하게 증가하여 고혈압이 생성되었지만, L-NAME 투여로 고혈압이 유발된 백서에 3 주 부터 태군육미지황탕을 투여한 군들에서는 유의하게 혈압이 저하 되었고 처음부터 태군육미지황탕만을 단독 투여한 대조군에서는 혈압 변화가 없었다. L-NAME 투여 고혈압 백서군의 흥부 대동맥과 신장에서 ec NOS 의 발현 정도는 정상군과 비교시 유의하게 감소 되었으며, L-NAM투여 고혈압 백서에 3주 부터 태군육미지황탕을 동시 투여한 백서군들에서는 ecNOS 발현이 유의하게 회복 되었다 L-NAME 고혈압 백서군 신장에서 Na pump인 Na^+,K^+ -ATPase $\alpha 1$ subunit 의 발현 정도는 정상군의 Na^+,K^+ -ATPase $\alpha 1$ subunit 발현정도 비교시 유의하게 감소 되었으며, L-NAME 투여 고혈압 백서에 3주부터 태군육미지황탕을 동시 투여한 백서군에서의 Na^+,K^+ -ATPase $\alpha 1$ subunit 발현이 유의하게 회복 되었다. L-NAME 투여 고혈압 백서군에서의 크레아티닌 청소율 (Ccr)이 감소 되었으며, L-NAME 유도 고혈압 백서에 3주 동안 태군육미지황탕을 먹인 백서군에서는 유의하게 회복 되었다. 요중 나트륨 배설량은 L-NAME 투여 고혈압 백서군에서 유의하게 감소되었으나 L-NAME 고혈압 백서에 3주 후 태군육미지황탕을 동시에 먹인군에서는 요중 나트륨 배설량이 부분적으로 유의하게 회복 하였다.

이상의 결과로 보아 L-NAME 에 의해 산화질소 합성 효소 억제를 유도하여 흥부 대동맥과 신장에서는 산화질소 합성 효소가 억제 되어 혈관 이완이 감소함으로써 혈압이 증가하고, 신장에서는 사구체 여과율과 나트륨의 배출 기능이 감소하여 고혈압이 발생 하는 것으로 사료된다. 따라서 산화질소 의존형 고혈압 백서에 태군육미지황탕을 투여하면 대동맥과 신장에서 ecNOS 의 효소활성 억제를 방지함으로써 혈압상승을 방어하고 신장에서는 Na^+,K^+ -ATPase $\alpha 1$ 발현 증가와 함께 나트륨 배출, 사구체 여과율 등의 신기능을 회복 시켜 혈압 회복 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2003년도 두뇌 한국 21(BK-21) 사업의 지원과 21세기 프론티어 연구개발 사업인 자생식품사업단의 연구비지원(PF03201-01-00)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 汪詡庵. 醫方集解, 서울, 행림출판사 pp. 1-4, 1977.
2. 梁頌名. 中藥方濟學, 廣東, 廣東科技出版社 pp. 679-681, 637-639, 1991.

3. 王錦之. 方劑學, 貴州, 貴州科技出版社 pp. 238-241, 1991.
4. 張恩勤, 鄭貴力. 方劑學, 中國, 科學出版社 pp. 206-209, 1992
5. 김우식, 이동희. 육미지황탕 전탕액이 가토 혈압 및 백서 간의 TBA에 미치는 영향에 대한 연구, 경희한의대 논문집 2: 145-152, 1979.
6. 허종희, 유가원. 육미지황탕이 백서의 혈당량에 미치는 영향, 경희대 한의대논문집 7: 135-152, 1984.
7. 유지윤. 육미지황탕이 항개량형 마빈신염에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 논문집 3: 541-564, 1986.
8. 허 준. 동의보감, 국문번역판, 풍년사 p. 1182, 1966
9. "Herbal phamacology in the people's Republic of China" Atrip report of the American Herbal phamacology delegation. National Academy of Science. p. 95, 1985.
10. Sato J. "Onthe chinese medicinal plants" Japan Society for the promotion of Science. Tokyo, p. 329, 1959.
11. 申侑求. 申氏本草學(總論), 서울, 수문사 1986.
12. 李商仁. 本草學, 서울, 서울의약사 pp. 55, 282, 1975.
13. 윤계숙, 정성현, 김영숙. 택사의 Alisol 성분들이 몇가지 Agonist에 대한 적출장관 수축에 미치는 영향. 생약학회지 12(4): 200-202, 1981.
14. 이경섭 등. 동의심계내과화(上), 서울, 서원당 pp.400-447, 1995.
15. 김영석. 고혈압에 대한 임상적 고찰, 대한한의학회지 5(11): 5-15, 1984.
16. Harrison. Harrison's 내과화(II), 서울, 정담 pp.2234-40, 1997.
17. Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. Am J Physiol 284(6): 1355-69, 2003.
18. Gouvea SA, Moyses MR, Bissoli NS, Pires JG, Cabral AM, Abreu GR. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. Braz J Med Biol Res 36(7): 943-9, 2003.
19. Arranz C, Tomat A, Fellet A, Garcia J, Balaszczuk AM, Costa M. Renal and vascular nitric oxide system in reduced renal mass saline hypertension. Nephron Physiol 95(2): 36-42, 2003.
20. Phillips RA. In Quantitative Clinical Chemistry Methods. Vol. 2, Edited by Peter JP and Vanslyke DD, Williams and Wilkins, 1944.
21. Bradford MM. 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.
22. 이근후. 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사 pp.138, 216-28, 1988.
23. 지재근. 치매의 병리, 대한신경과학회지 3(1): 5-9, 1985.
24. 나영설, 윤상협, 민병일. 최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰. 경희의학 7: 208-86, 1991.
25. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van

- Goor HJ. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *Pathol* 99(1): 8-17, 2003.
26. MacNaul KL, Hutchinson NI. 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):1330-34, 1993.
27. Meng W, Ma J, Ayata C, Hara H, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA. ACh dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms. *Am J Physiol* 271(3 Pt 2): 1145-50, 1996.
28. Tan DY, Cheng SB, Chen XL, Zhang SM, Yang HZ, Peng X, Tang CS, Zhang C, Meng XZ. Involvement of pressure-related mechanism in activation of inducible nitric oxide synthase. *Sheng Li Xue Bao* 53(2): 117-22, 2001.
29. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci* 74(8): 3203-07, 1977.
30. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 261(6 Pt 2): F1033-F37, 1991.
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): 1229-35, 1995.
32. Bech JN, Nielsen CB, Ivarsen P, Jensen KT, Pedersen EB. Dietary sodium affects systemic and renal hemodynamic response to NO inhibition in healthy humans. *Am J Physiol* 274(5 Pt 2): 914-23, 1998.
33. 中國中醫 研究員. 正統 金匱要略, 서울, 의학연구소 pp.148, 1987.
34. 錢 乙. 小兒藥證直訣 江蘇, 江蘇技術科學出版社 pp. 5-6, 47-48, 1985.
35. 康舜殊. 바른 方劑學, 서울, 대성출판사 pp. 138-139, 1996.
36. 龔政賢. 證補 萬病回春, 서울, 일증사 pp. 229-230, 1994.
37. 方 賢. 奇效良方(三冊), 香港, 商務印書館 pp. 880-887, 1977.
38. 汪仁庵. 醫方集解, 臺北, 文光圖書有限公司 pp. 1-5, 1986.
39. 李 挺. 醫學入門, 서울, 대성문화사 pp. 180-182, 1984.
40. 鎮士易. 石室秘錄, 서울, 대성문화사 pp. 148-149, 1993.
41. Kuramochi T, Chu J, Suga T. Gou-Teng (From *Uncaria rhynchophylla* Miquel)-induced endothelium-dependent and independent relaxations in the isolated rat aorta. *Life Sci* 54(26): 2061-69, 1994.
42. Goto H, Shimada Y, Tanigawa K, Sekiya N, Shintani T, Terasawa K. Effect of *Uncariae ramulus et Uncus* on endothelium in spontaneously hypertensive rats. *Am J Chin Med* 27(3-4): 339-45, 1999.
43. Goto H, Sakakibara I, Shimada Y, Kasahara Y, Terasawa K. Vasodilator effect of extract prepared from *Uncariae ramulus* on isolated rat aorta. *Am J Chin Med* 28(2): 197-203, 2000.
44. Tanner MA, Bu X, Steimle JA, Myers PR. The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb *Gynostemma pentaphyllum*. *Nitric Oxide* 3(5): 359-65, 1999.
45. Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina-Campos ON, de los Angeles Granados M, Franco M. Galic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 62(6): 71-77, 1998.
46. 김인광, 강대길, 이종은, 오봉석. 고혈압에서 혈관 산화질소 합성 등위효소 발현변화, *대한흉부외과학회지* 32(2):138-143, 1999.
47. Yang ES, Lee JU, Kang DG. Altered renal nitric oxide system in experimental hypertensive rats. *Kor J Physiol Pharmacol* 2: 455-60, 1998.
48. Lahera V, Salom MG, Steimle JA, Myers PR. The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb *Gynostemma pentaphyllum*. *Biol Chem* 3(5):359-65, 1991.
49. Majid DS, Godfrey M, Grisham MB, Navar LG. Relation between pressure natriuresis and urinary excretion of nitrate/nitrite in anesthetized dogs. *Hypertens* 25(4 pt2):860-65, 1995.
50. Manning RD Jr, Hu L. Nitric oxide regulates renal hemodynamics and urinary sodium excretion in dogs. *Hypertens* 23(5): 619-25, 1994.
51. Tolins J.P, Shultz P.J. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Internat* 46(1): 230-36, 1994.
52. Garg LC, Knepper MA, Burg MB. Mineralocorticoid effects on Na,K-ATPase in individual nephron segments. *Am J Physiol* 240(6): 536-44, 1981.
53. 김종규. 생리학, 서울, 정문각 pp. 271-280, 1998.
54. 김광진, 김창주, 김형진, 박사훈. 인체 생리학, 서울, 정문각 pp. 171-189, 1998.
55. 서울대학교 의과대학. 전정관 신장학, 서울대학교 출판부 pp. 87-110, 1993.
56. Kinne R, Schmitz JE, Kinne-Saffran E. The localization of the Na⁺,K⁺-ATPase in the cells of rat kidney cortex. A study on isolated plasma membranes. *Pflugers Arch* 329(3): 191-206, 1971.
57. Schmidt U, Dubach UC. Induction of Na,K-ATPase in the proximal and distal convolution of the rat nephron after uninephrectomy. *Pflugers Arch* 349(1): 39-48, 1974.
58. Lingrel JB and Kuntzweiler T. Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 269(31): 19659-62, 1994.
59. Orłowski J, Lingrel JB. 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.