

## 왕불유행, 목통, 통초가 산후 생쥐의 유즙분비량과 유즙분비 관련 인자에 미치는 영향

<sup>1</sup>우석대학교 한의과대학 방제학교실, <sup>2</sup>우석대학교 한의과대학 부인과학교실,  
<sup>3</sup>우석대학교 한의과대학 해부학교실  
이가위<sup>1</sup>, 이은희<sup>2</sup>, 이창현<sup>3</sup>, 김홍준<sup>1</sup>

### ABSTRACT

#### Effect of Melandrii Herba, Akebia Quinata Decaisne, and Tetrapanax Papyriferus on Milk Secretion and Lactation Related Factors in Postpartum Mice

Chia-Wei Lee<sup>1</sup>, Eun-Hee Lee<sup>2</sup>, Chang-Hyun Lee<sup>3</sup>, Hong-Jun Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Woo-Suk University

<sup>2</sup>Dept. of Obstetrics & Gynecology, College of Korean Medicine, Woo-Suk University

<sup>3</sup>Dept. of Anatomy, College of Korean Medicine, Woo-Suk University

**Objectives:** The purpose of this study is to investigate the effect of Melandrii Herba (MH), Akebia Quinata Decaisne (AQ), and Tetrapanax Papyriferus (TP) on milk secretion and aquaporin (AQP) expression in lactating mice.

**Methods:** For the experiment, the mice were divided into three groups, which were orally administered MH (2.720 mg/kg), TP (400 mg/kg) and AQ (2.800 mg/kg) extracts respectively for 3 weeks from Day 1 after the birth, compared with the control group (C group), which was administered distilled water. A group consisted of six infantile mice per postpartum mouse. For comparison with the C group, non-pregnant SKH-1 mice were used as the virgin group.

#### Results:

1. When it comes to the immunohistochemical staining for prolactin receptors in the mammary glands, the AQ and MH groups showed a strong immune response to the secretory epithelial cells constituting the mammary alveoli, while the TP group represented a weaker immune response.

2. In the immunohistochemical staining for AQP in the mammary glands, AQP1 showed a strong immune response in the walls of capillaries and venules around the mammary alveoli, and AQP3 in the epithelial cells constituting the mammary alveoli, and AQP5 in some tissues between the mammary alveoli. AQP1 was expressed in the order of TP group>AQ group=C group>MH group, and AQP3 was MH group and AQ group>TP group=C group, and AQP5 was MH group>C group>AQ group and TP group.

3. In the Western blot, AQP1 was expressed in the order of TP group>AQ group>C group>MH group, and AQP3 was MH group>AQ group>C group>TP group, and AQP5 was MH group>TP group>C group>AQ group. All of AQP1, 3, 5 expression were significantly higher in the C group than in the Virgin group.

**Conclusions:** The administration of Akebia Quinata Decaisne, Tetrapanax Papyriferus and Melandrii Herba have the effect of improving prolactin levels in postpartum mice and increasing the expression of prolactin receptor and AQPs in the mammary glands, suggesting that lactation might be enhanced by the development of the mammary glands.

**Key Words:** Akebia Quinata Decaisne, Tetrapanax Papyriferus, Melandrii Herba, Aquaporin, Breast-feeding, Lactogenic Agent

## I. 서 론

최근 산부인과를 비롯한 개원가의 임부 급기 의약품 돔페리돈의 모유축진 목적 오남용 문제가 제기 되어, 2016년 11월경 식약처는 돔페리돈 또는 돔페리돈말레산염을 함유한 55품목에 대하여 약을 복용하는 기간 동안 수유하지 않도록 하는 것을 주요내용으로 사용상의 주의사항을 변경하였다.

Gabay 등<sup>1)</sup>의 연구에 따르면 모유축진 목적으로 메토클로프라마이드, 돔페리돈과 같은 약의 장시간 사용은 안전성에 대한 고찰이 이루어지지 않아 사용이 매우 제한적이다. 따라서 산모들이 산후 관리의 목적이나 수유 관련 질환 치료 목적으로 한약과 허브티 등의 보완대체의학을 활용하고 있으며, 세계적으로 천연 모유축진제에 대한 수요가 증가하고 이에 대한 수유모들의 태도는 매우 긍정적이다<sup>2)</sup>.

2016년 국내에서 실시된 조사에서 완전 모유수유율은 18.3%에 불과하며 이는 WHO에서 조사한 수치의 절반에도 못 미치는 실정으로, 현재 모유수유를 하고 있지 않은 산모들의 주된 모유수유 중단사유는 모유량 부족이 43.3%로 가장 많았다<sup>3)</sup>.

우리나라는 전통적으로 모유부족 해결을 위해 수유부들에게 한약치료가 많이 시행되어왔으며 한약 투여 효과에 대한 실험실 연구가 지속되어 왔다. 1990년대에 涌泉散<sup>4)</sup>, 加味四物湯<sup>5)</sup> 등 한약처방의 모유축진 관련 실험실 연구가 이루어졌고, 2008년 이후 補虛湯加減<sup>6)</sup>, 八物湯<sup>7)</sup> 등의 한약처방에 대한 실험실연구가 이루어졌으며, 주요 결과지표는 유선조직관찰, 유즙분비 관련 인자의 mRNA발현, 혈중 prolactin과 oxytocin 등

의 농도변화였다. 의미 있는 결과 지표의 추가 선정 및 한의학적 기전의 현대의학적 재해석을 위하여 추가 연구의 필요성을 제시함에 따라 2016년 포유중인 생쥐에게 보허탕가감 투여 후 유선조직에서 aquaporin(AQP) 발현을 관찰한 연구<sup>8)</sup>가 발표되었다.

1990년대에 AQP 수분통로가 발견된 이후로 이 분야에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며<sup>9)</sup>, 최근에는 설치류와 소의 정상 유선조직에서 AQP1, AQP3, AQP5의 발현이 증명되었고<sup>10,11)</sup>, 모유량과 이들 AQP의 상관관계와 그 기전에 대한 연구가 진행되고 있다<sup>12,13)</sup>.

특히 임상에서 활용되고 있는 모유축진 한약처방의 AQP 발현 연구는 2015년 Liu 등<sup>13)</sup>의 연구와 2016년 이 등<sup>8)</sup>의 연구가 유일하며, 두 연구에서 투여된 처방의 공통 약재는 왕불유행, 통초, 황기였다. 특히 왕불유행과 통초는 利水와 通乳의 효능이 있어 산후에 다용되는 본초이다. AQP는 세포막의 수분투과성을 증가시키는데 중요한 역할을 하는 통합막단백질<sup>14)</sup>으로 利水와 通乳의 작용이 있는 본초와의 연관성이 높을 것이라 판단하였으며, 왕불유행, 통초 이외에 利水와 通乳작용이 있는 목통을 추가로 선정하였다.

따라서, 이 연구는 한의학의 오랜 역사에서 관찰되어 왔던, 왕불유행, 목통, 통초 개별 본초의 利水작용을 통한 通乳작용을 검증하고자 하였다. 분만 후 생쥐에게 개별본초의 에탄올추출물을 복용시킨 뒤 새끼 생쥐의 무게와 수유량 측정, 유선조직 관찰 및 유선조직에서 유즙분비와 관련된 AQP1, 3, 5<sup>10-3,15)</sup>를 관찰하였으며 개별 본초의 유즙분비촉진 작용에 대해

여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 25 g 내외의 hairless 생쥐 (SKH-1)를 자체 번식하여 항온항습(20±2°C, 55±5% RH) 하에서 사육하였고, 고품사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 교미를 시킨 후, 임신된 암컷을 총 4마리씩 4군으로 나누어 분만하기 전에 1마리씩 격리하였다. 본 실험에서는 정상적으로 수유가 가능한 어미와 새끼들만을 실험에 사용하였으며, 동물실험은 우석대학교 동물실험윤리위원회의 승인(WS2016-005)을 받아 실시하였다.

### 2. 실험재료

본 실험에 사용한 시약 및 재료는 Anti-mouse AQP-1, AQP-3, AQP-5,  $\beta$ -actin 항체, Goat anti-rabbit IgG-HRP 항체는 Santa Cruz biotechnology(CA, USA)에서 구입하였으며, Bradford 용액, 30% Acrylamide/Bis-acrylamide solution(29:1)과 goat anti-mouse IgG-HRP 항체는 Bio-Rad laboratory 제품을, Nonidet P-40(NP-40)는 Amresco Inc.(USA), Halt™ protease inhibitor cocktail, EDTA-free(AEBSF 1 mM, Aprotinin 800 nM, Bestatin 50  $\mu$ M, E64 15  $\mu$ M, Leupeptin 20  $\mu$ M, Pepstatin A 10  $\mu$ M, sodium orthovanadate 1 mM)은 Thermo scientific(USA), 기타 시약은 Sigma-Aldrich Inc.(USA), PVDF membrane(0.22  $\mu$ m, Millipore), Filter paper(NO.2, Whatman)에서 구입하여 사용하였으며, 사용기기는

IKA 조직분쇄기(T10 basic, IKA, China), UV-분광광도계(OPTIZEN, Mecasys, Korea), SDS-PAGE system(Mini-PROTEIN 3 CELL, Bio-Rad), Transfer system(Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad), 화상 이미지 분석 시스템(Fusion-Solo, Vilber Lourmat, France)을 사용하였다.

### 3. 약재 추출 및 추출량

본 실험에 사용한 약재는 울산 광명당 제약에서 구입하여 사용하였으며 각 시료는 우석대학교 한의학과 방제학교실에서 동정하여 개별약재의 기원을 확인하고 보관하였다. 각각의 한약재 500 g을 분쇄하여 10배의 30% EtOH 5 L에 넣고 3시간 초음파 추출후 24시간 상온추출을 실시하였다. 추출액은 110 mm filter paper(Advantec, No. 2)를 이용하여 여과한 후 60°C에서 감압 농축하였다. 농축된 추출물은 7일 동안 동결 건조하여 분말 상태로 만들어 냉동보관 하면서 사용하였다. 추출물은 왕불유행 34 g, 통초 5 g, 목통 34 g을 회수하였다.

### 4. 실험군 설정

출산 후 1일째부터 3주간 증류수를 경구투여한 군을 Control군(C group)으로 설정하였고, 실험군은 각각 왕불유행(MH, 2,720 mg/kg), 통초(TP, 400 mg/kg), 목통(AQ, 2,800 mg/kg) 추출물을 경구투여한 군으로 분류하여, 분만 직후 어미 생쥐 1마리 당 새끼 생쥐 6마리로 실험을 진행하였다. 투여량은 우석대학교 한방병원의 원내처방의 각 약재의 양을 기준으로 산출하였다. Control군과 비교하기 위하여 임신을 하지 않은 SKH-1 생

쥐를 virgin군으로 사용하였다. 각 군당 어미 생쥐는 4마리씩 배정하였다.

### 5. 새끼생쥐의 체중 측정

분만 후 3일째부터 21일까지 오전에 6마리의 새끼생쥐의 체중을 매일 측정하여 비교하였다.

### 6. 수유량 측정

수유량의 측정은 Liu 등<sup>13)</sup>의 방법을 변형하여 수유 전후 새끼생쥐의 무게를 측정하여 수유량으로 계산하였다. 분만 후 3일째부터 12일간 오전 9시경 어미생쥐를 새끼생쥐로부터 3시간 분리시켜 새끼생쥐를 굶긴 후에 수유 전 체중을 측정하였다. 그 후 3시간 동안 분리한 어미생쥐를 각각의 새끼생쥐 케이지에 넣어 1시간 동안 수유시킨 후 즉시 새끼생쥐의 수유 후 체중을 측정하였다. 수유 후 새끼생쥐의 체중에서 수유 전 새끼생쥐 체중을 뺀 차이를 수유량으로 계산하였다.

### 7. 혈액 채취 및 광학현미경적 관찰을 위한 조직 절취

출산 후 3주째 실험이 종료된 후 각 실험군의 어미생쥐와 virgin군의 생쥐를 Avertin으로 마취하여 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 prolactin ELISA 분석에 사용하였다. 혈액을 채취한 후 혈액을 완전히 방혈시키고 Bouin's 용액으로 관류 고정하였으며 서혜부쪽의 유선을 절취하여 통상적인 방법으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였다. 포매 후 7  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하여 H&E(hematoxylin-eosin) 염색을 시행하여 광학현미경적 변화를 관찰하였다.

### 8. 면역조직화학 염색

면역조직화학적 염색을 위해 유선조직의 파라핀 절편을 7  $\mu$ m의 두께로 절단한 후 methanol에 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣은 용액에서 endogenous peroxidase를 제거하였다. 그 후 비특이적인 면역반응을 제거하기 위하여 30분간 정상혈청(normal serum, 1:50)으로 처리하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 AQP1(1:10, Santa Cruz, CA, USA), AQP3(1:20, abcam, UK), AQP5(1:20, abcam, UK)을 이용하였다. 일차항체의 희석배율은 구입한 회사에 따라 차이가 있으므로 각각의 항체에 대한 positive control test를 실시하여 항체 희석 배율을 정한 후 4°C의 moisture chamber에서 24시간 염색하였다. 2차 항체는 1차 항체 반응 후 0.1 M phosphate buffer(PB)로 수세과정을 거친 후에 Hsu 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 biotinylated anti-IgG(Vector Laboratories, Inc., CA, U.S.A.)를 1:200으로 희석한 후 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에서 30분간 반응시켰다. 그 후 3-3' diaminobenzidine를 0.1 M PB에 0.05%가 되도록 녹인 용액에 과산화수소를 0.005%가 되게 첨가하여 발색 반응을 관찰하였다. 반응이 끝난 조직들은 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 9. 혈청 내 prolactin 농도 측정

혈청내 Prolactin 농도는 Prolactin Mouse ELISA Kit(abcam, UK)를 구입하여 측정하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. Anti-mouse Prolactin antibody가 코팅된 microplate에 혈청시료 100  $\mu$ L씩 각 well에 분주하고 실온에서 2시간 30분 반응

시킨 후 wash buffer로 4회 세척하였다. Biotinylated anti-mouse prolactin detection antibody 100  $\mu$ L를 각 well에 넣고 실온에서 한 시간 반응 한 후 4회 wash buffer로 세척하였다. HRP-streptavidin solution 100  $\mu$ L를 각 well에 넣고 실온에서 45분 반응 한 후 4회 wash buffer로 세척하였다. TMB One-Step substrate 100  $\mu$ L 각 well에 넣고 실온에서 30분간 반응 시킨 후, 50  $\mu$ L Stop solution을 넣어 반응을 종료 시킨 후 microplate reader로 450 nm에서 측정하였다. 표준물질은 Recombinant Mouse Prolactin Standard를 사용하였다.

#### 10. 유선조직의 단백질 분리 및 AQP1, AQP3, AQP5의 발현량 분석

각 실험군의 유선조직 10 mg을 1% NP-40 lysis buffer(+protease inhibitor cocktail)를 사용하여 조직분쇄기로 단백질을 추출하였다(15,000 rpm, 10초간 2회). 추출한 단백질을 bradford법을 이용해 정량한 후 well 당 50  $\mu$ g씩 12% acrylamide gel에 loading 한 후 SDS-PAGE system을 이용하여 단백질 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 Transfer system을 이용해 PVDF membrane(0.2  $\mu$ m)에 1시간 동안 transfer를 한 다음 1시간 동안 5% skim milk로 blocking하였다. 각 1차 항체( $\beta$ -actin, AQP-1, -3, -5)를 overnight반응(각 1:200, 1:500, 1:8,000, 4 $^{\circ}$ C)하고 TBS-T(0.1% Tween 20)으로 4회 세척한 후, goat anti-rabbit or mouse IgG-HRP conjugated antibody (1:3000)를 1시간 동안 반응시켰다. 4회 세척 후 membrane을 ECL법을 이용해 화학상 이미지 분석시스템으로 촬영 후 분

석하였다<sup>17)</sup>.

#### 11. 통계분석

통계적 분석은 SPSS 23.0 for windows (SPSS Inc., USA)를 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 적용하였다. 각 구간 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 실시하였고, 통계적 유의수준은  $p < 0.05$ 로 실시하였다.

### III. 결 과

#### 1. 새끼생쥐의 체중변화

출산 후 3일째부터 21일째까지 매일 새끼생쥐의 무게를 측정된 결과 총 체중 증가량은 C군은  $8.06 \pm 0.49$  g, MH군은  $7.61 \pm 0.23$  g, TP군은  $7.93 \pm 0.71$  g, AQ군  $8.53 \pm 0.69$  g으로 AQ군의 체중이 가장 많이 증가하였으며 TP군과 MH군은 C군에 비해 체중이 감소되었다(Fig. 1). 이상의 한약재에서 새끼생쥐의 체중변화는 목통, 통초 및 왕불유행 순서대로 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1).

#### 2. 총수유량

출산 후 3일째부터 21일째까지 매일 새끼생쥐의 수유량을 측정된 결과 총 수유량은 C군  $8.34 \pm 0.37$  g, MH군  $9.56 \pm 0.51$  g, TP군  $10.06 \pm 0.92$  g, AQ군  $8.85 \pm 0.98$  g으로 C군에 비해 AQ군, MH, TP군 순서대로 증가하였으며, 통계적으로 유의하였다( $P < 0.05$ ), (Fig. 2). 이상의 한약재에서 총수유량은 통초, 왕불유행 및 목통 순서대로 증가하였다(Fig. 2).

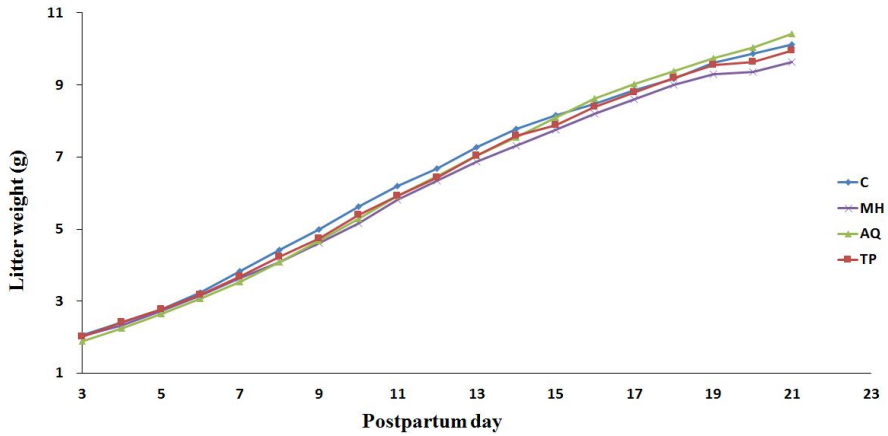


Fig. 1. Average litter weight from postpartum day 3 to 21 in experimental groups. Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

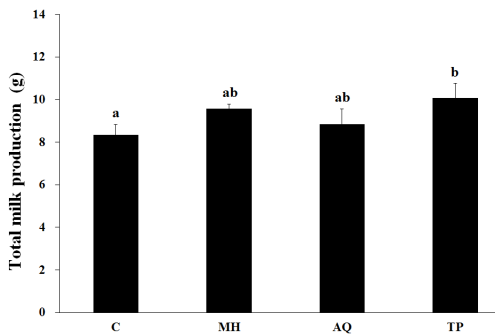


Fig. 2. Quantification of total accumulated milk production from postpartum day 3 to 21 in experimental groups.

Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration.

Each data represents a mean±SD. Different letters (a-d) are significantly different by Duncan's test (p<0.05).

### 3. 광학현미경적 관찰소견

3주간의 실험 종료 후 절취한 유선조직의 광학현미경적 구조를 관찰하기 위하여 H&E 염색(Fig. 3)과 Masson's trichrome 염색(Fig. 4)을 시행하여 관찰한 결과 C군에 비해 모든 실험군에서 유선조직의 세포 및 사이질 조직이 발달한 것을 관찰할 수

있었다. 유선조직의 발달정도는 C군에 비해 MH군, AQ군 및 TP군 순서대로 발달하였다(Fig. 3, 4).

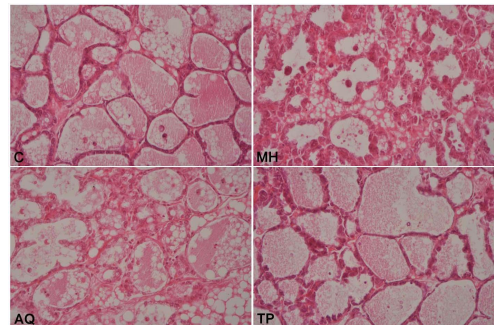


Fig. 3. Histological observation of lactating mammary glands of mice in experimental groups (H&E stain, ×200).

Well developed mammary glands were observed in MH, TP and AQ groups compared to C group. Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

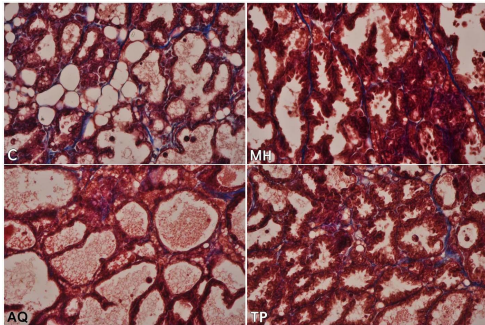


Fig. 4. Histological observation of lactating mammary glands of mice in experimental groups (Masson's trichrome, ×200).

Well developed mammary glands were observed in MH and AQ groups compared to C and TP groups.

Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

#### 4. 유선조직에서 prolactin receptor의 면역조직화학 염색 소견

3주간의 실험 종료 후 절취한 유선조직에서 prolactin receptor에 대한 면역조직화학적 염색법을 시행하여 염색 강도를 관찰한 결과 C군에 비해 AQ군과 MH군에서는 강한 면역 염색반응을 나타내었으나 TP군에서는 C군에 비해 미약한 염색반응을 나타내었다. Prolactin receptor에 대한 면역염색은 주로 유선포를 구성하는 분비상피세포에 강하게 표지되었다(Fig. 5).

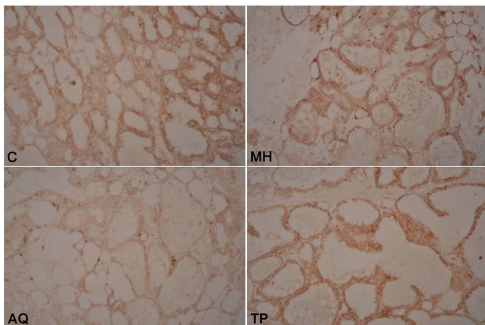


Fig. 5. Prolactin receptor immunohistochemical staining of lactating mammary gland of

mice in experimental groups.

Prolactin receptor immunostaining was found secretory epithelial cells of alveoli and ductal epithelial cells in mammary glands. AQ and MH groups were heavier density compare to C group.

Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

#### 5. 유선조직의 AQP1, AQP3, AQP5의 면역조직화학적 염색 소견

3주간의 실험 종료 후 절취한 유선조직에서 AQP1, AQP3 및 AQP5에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 염색 강도를 관찰한 바 AQP1에 대한 염색강도는 C군에 비해 TP군에서는 강하게 염색되었으나 AQ군은 C군과 유사한 면역염색반응을 나타내었다. 그러나 MH군에서는 C군에 비해 미약한 면역 염색반응을 나타내었다. AQP1에 대한 염색은 주로 유선포 주위의 모세혈관과 세정맥의 벽에 표지되었다(Fig. 6).

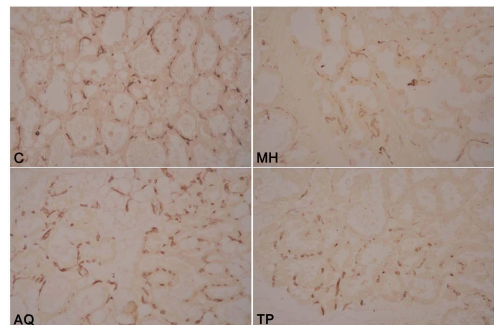


Fig. 6. AQP1 Immunohistochemical staining of lactating mammary gland of mice in experimental groups.

AQP1 immunostaining was found capillary and venule walls around alveoli in mammary glands. Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

AQP3에 대한 염색강도는 C군에 비해 MH군과 AQ군에서는 강하게 염색되었으나 TP군에서는 C군과 유사하게 미약한 면역 염색반응을 나타내었다. AQP3에 대한 염색은 주로 유선포를 구성하는 상피 세포에 강하게 표지되었다(Fig. 7).

AQP5에 대한 염색강도는 C군에 비해 MH군에서 강하게 염색되었으나 TP군과 AQ군에서는 C군에 비해 미약한 면역 염색반응을 나타내었다. AQP5에 대한 염색은 주로 유선포사이에 있는 일부 세포에서 강하게 표지되었다(Fig. 8).

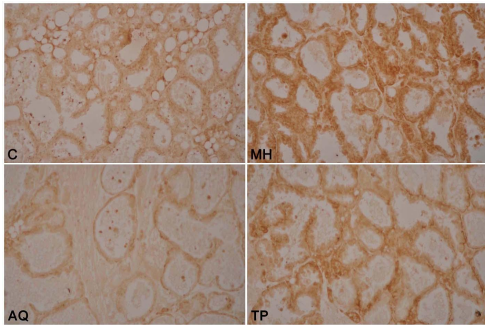


Fig. 7. AQP3 Immunohistochemical staining of lactating mammary gland of mice in experimental groups.

AQP3 immunostaining was found secretory epithelial cells of alveoli and ductal epithelial cells in mammary glands.

Control group : Lactating+H2O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

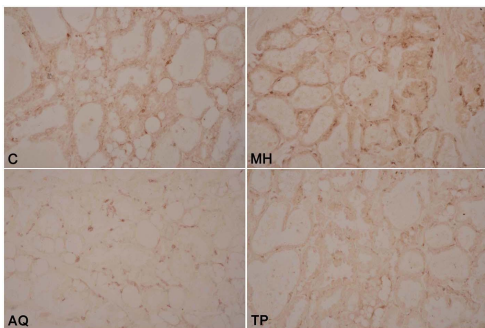


Fig. 8. AQP5 Immunohistochemical staining

of lactating mammary gland of mice in experimental groups.

AQP5 immunostaining was found interalveolar septal cells in mammary glands.

Control group : Lactating+H2O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

## 6. 혈청 내 prolactin 농도

실험 종료 후 혈청 내 prolactin 농도를 관찰한 결과 임신하지 않은 virgin군은 252.01 ±16.37 pg/mL, C군은 310.92±29.47 pg/mL으로 C군이 약간 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 각각의 실험군의 prolactin 농도를 관찰하면 MH군은 1014.44±51.83 pg/mL, TP군은 102.78±14.11 pg/mL, AQ군 667.05±58.66 pg/mL으로 MH군과 AQ군에서 유의성 있게 증가하였다(P<0.05)(Fig. 9). 이상의 한약재에서 혈청내 prolactin의 농도는 왕불유행, 목통 및 통초 순서대로 증가하였다(Fig. 9).

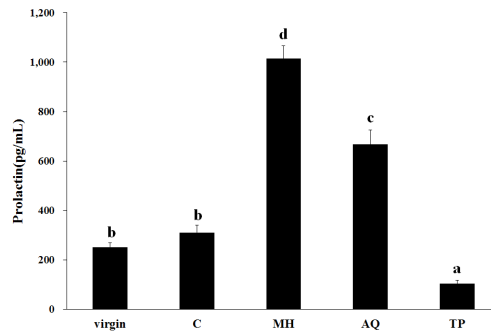


Fig. 9. Effects on the serum prolactin concentration after administration of MH, TP and AQ groups in prepartum or postpartum mice.

Virgin group; Control group : Lactating+H2O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

Each data represents a mean±SD. Different letters (a-d) are significantly different by Duncan's test (p<0.05).



### 7. 유선조직의 AQP1, AQP3, AQP5의 western blot 소견

실험종료 후 희생시킨 생쥐의 유선조직을 단백질 정량하여 AQP1, AQP3, AQP5에 대한 western blot을 시행하였다. AQP1의 발현은 C군은 virgin군에 비해 50% 이상 증가하였다. MH군은 C군보다 37% 감소하였고, TP군은 C군에 비해 37% 증가하였으며, AQ군은 C군과 차이를 나타내지 않았다. 이상의 한약재에서 유선조직 내 AQP-1의 양은 목통, 통초 및 왕불유행 순서대로 증가하였다(Fig. 10, 11).

AQP3의 발현은 virgin군에서는 거의 발현을 하지 않았으나 MH군은 C군보다 약 45%, AQ군은 40% 이상 증가하였으나 TP군은 C군에 비해 20% 이상 감소하였다. 이상의 한약재에서 유선조직 내 AQP-3의 양은 왕불유행, 목통 및 통초 순서대로 증가하였다(Fig. 10, 12).

AQP5의 발현은 virgin군에서 AQP-3와 마찬가지로 거의 발현되지 않았으나 MH군은 C군보다 51%가 증가하였고, TP군은 C군에 비해 약 20%가 증가하였으나 AQ군은 약 18% 정도 감소하였다(Fig. 10, 13). 이상의 한약재에서 유선조직 내 AQP-5의 양은 왕불유행, 통초 및 목통의 순서대로 증가하였다(Fig. 10, 12).

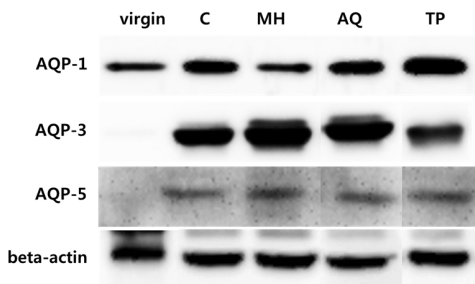


Fig. 10. Western blots of AQP1, AQP3, AQP5 in lactating mammary gland of mice in experimental groups.

Protein level of AQP1 in TP group was upregulated in lactating mice compared to other experimental groups. Protein levels of AQP3 and AQP5 in MH group were upregulated in lactating mice compared to other experimental groups. Virgin group; Control : Lactating+H2O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration

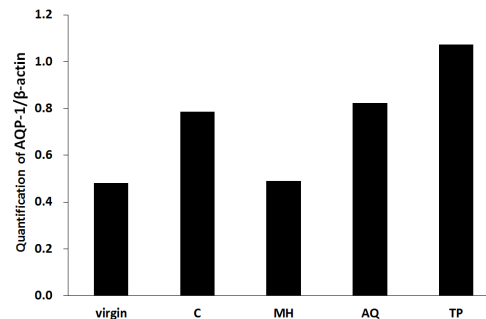


Fig. 11. Quantification of AQP1 of the western blots in lactating mammary gland of mice in experimental groups. Virgin group; Control group : Lactating+H2O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration. The protein signals were quantified by measuring the density of the signals on the western blot.

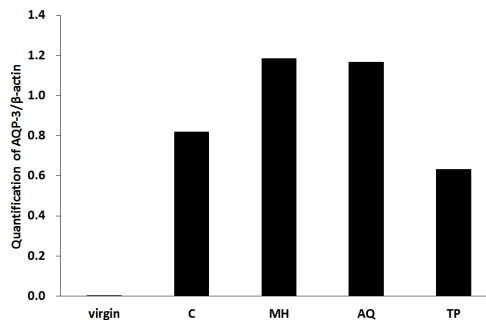


Fig. 12. Quantification of AQP3 of the western blots in lactating mammary gland of mice in experimental groups. Virgin group; Control group : Lactating+H2O, MH group : Lactating+MH administration, TP group : Lactating+TP administration, AQ group : Lactating+AQ administration. The protein signals were quantified by measuring the density of the signals on the western blot.

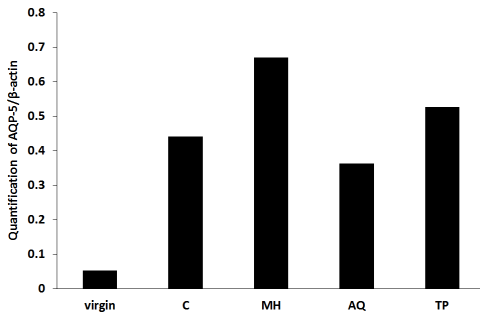


Fig. 13. Quantification of AQP5 of the western blots in lactating mammary gland of mice in experimental groups. Virgin group: Control group : Lactating+H<sub>2</sub>O. MH group : Lactating+MH administration. TP group : Lactating+TP administration. AQ group : Lactating+AQ administration. The protein signals were quantified by measuring the density of the signals on the western blot.

#### IV. 고찰

여성의 고학력화와 활발한 사회활동에 따른 만혼현상으로 고령임신과 출산이 점차 증가하는 추세이다. 이로 인해 난산과 제왕절개 분만 비율이 증가하고 있으며<sup>18)</sup>, 이러한 사회적 분위기 속에서 많은 여성들은 모유수유에 어려움을 겪고 있고 다수는 모유량 부족을 경험하고 있다<sup>19)</sup>.

2016년 국내에서 실시한 조사에 따르면, 완전 모유수유율은 18.3%에 불과하며 이는 WHO에서 조사한 수치의 절반에도 못 미치는 실정이다. 현재 모유수유를 하고 있지 않은 산모들의 주된 모유수유 중단 사유는 모유량 부족이 43.3%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다<sup>3)</sup>.

모유수유가 영아 영양공급의 유일한 방법이었던, 과거에는 전통적으로 수유부들에게 한약치료가 많이 시행되어 왔다. 한의학에서는 산후에 유즙이 심하게 적거나 없는 것을 ‘缺乳’, ‘産後乳汁不行’, ‘乳少’, ‘産後無乳汁’ 등이라 한다. 이러한

유즙부족의 병인병기는 氣血이 虛하여 유즙생성이 부족한 경우와 氣血은 왕성하나 肝氣鬱結로 유즙분비가 잘 되지 않는 경우로 구분할 수 있는데, 氣血虛弱 변증의 대표처방으로는 通乳丹, 猪蹄湯 등이 있으며, 肝氣鬱結 변증의 대표처방으로는 不乳通泉散, 通肝生乳湯 등이 활용된다<sup>20)</sup>. 이들 대표처방의 구성은 변증에 관계없이 왕불유행, 목통, 통초가 모두 증진을 목적으로 다용되고 있다.

국내에서 한약의 유즙분비 촉진에 대한 실험적 연구로는 通乳湯<sup>21)</sup>, 涌泉散<sup>4)</sup>, 加味四物湯<sup>5)</sup>, 生化湯<sup>22,23)</sup>, 補虛湯<sup>6)</sup>, 八物湯<sup>7)</sup> 등에 관한 복합처방에 대해 보고되었다. 위 연구들에서 유즙분비량의 변화를 측정하기 위한 지표들은 새끼생쥐의 체중변화, 혈청 중 prolactin, growth hormone, cortisol 측정, 유선조직 관찰, 유즙분비 관련 유전자 측정, 유선조직에서 prolactin 및 estrogen 수용체, oxytocin에 대한 면역조직화학염색 등을 이용하여 관찰하였다. 이들 연구에서 의미 있는 결과 지표의 추가 선정 및 한의학적 기전의 현대 의학적 재해석을 위하여 추가 연구의 필요성을 제시함에 따라 2016년 포유중인 생쥐에게 보허탕가감 투여 후 유선조직에서의 AQP 발현을 관찰한 연구<sup>8)</sup>가 발표되었다.

AQP는 세포막을 통한 선택적 수분 이동을 촉진시키는 통합막단백질군으로, 1990년대 초에 처음으로 그 존재가 밝혀졌다<sup>24)</sup>. AQP는 세포막에서 단단한 결합으로 수분의 이동을 위한 통로를 만들며, 세포막의 수분 투과성을 증가시키는데 중요한 역할을 한다<sup>25,26)</sup>. 유선에서 발견되는 AQP는 아직 그 기전이 명확히 밝혀지지 않았으나, 모유 분비와 관련이 있는 것으로

추정하고 있으며<sup>10-4)</sup>, 최근 연구에서 AQP1과 AQP3는 인간의 유선조직에서도 발견되었다<sup>27,28)</sup>.

이에 이 연구에서는 국내의 유즙분비 관련 실험연구가 복합처방중심으로 이루어져왔던 것과는 달리, 모유분비를 촉진하는 한약처방의 주요 구성 본초로 임상에서 사용되는 왕불유행, 목통, 통초의 통유작용을 실험적으로 검증하고자 분만 후 어미생쥐에게 개별본초의 에탄올추출물을 투여한 뒤 새끼 생쥐의 무게, 수유량 측정, 유선조직 관찰 및 유선조직에서 유즙분비와 관련된 AQP1,3,5<sup>10-3,15)</sup>를 관찰하였다.

왕불유행은 석죽과(Caryophyllaceae)에 속한 2년생 초본인 장구채(*Melandryum firmum*) 또는 기타 동속 근연식물의 열매가 익었을 때의 지상부를 건조한 것으로, 活血通經, 下乳消腫, 通經, 乳汁不通, 乳癰腫痛의 효능주치로 활용되었으며, 명명의 연유가 淋病에 이 약이 '王命이 있어도 능히 그 行함을 留하지 못한다'는 데서 비롯된 것으로, 淋病에 다용 되었다. 《本草從新》에서 “除風去痺, 止血定痛 利便通經, 催生下乳”이라 하였고<sup>29)</sup>, 《本草綱目》에서 “通血脈, 下乳汁之神品”이라 기재되어 있다<sup>30)</sup>. 乳汁不下를 치료하기 위한 通乳湯의 구성 본초로 천산갑, 저체 등과 함께 활용되었으며, 유선염의 치료에 응용되고 있다<sup>31)</sup>.

목통은 으름덩굴과(Ladizabalaceae)에 속한 落葉 纏繞灌木인 으름(*Akebia quinata Dene.*)의 木質莖을 건조한 것으로 강력한 이노작용이 있으며, 瀉火行水, 通利血脈, 婦女經閉, 乳汁不通의 효능주치로 활용되며, 방광적열로 응폐 및 임병에 八正散의 구성본초로 사용 되었으며, 《本草

綱目》에서 “入陽明胃經, 通氣上達而下乳汁.”이라 기재되어 있다<sup>30)</sup>. 산후 보약으로 다용되는 補虛湯에 유즙축진을 위한 목적으로 가미되어 다용되어 왔다<sup>31)</sup>.

통초는 두릅나무과(Araliaceae)에 속한 관목인 통탈목(*Tetrapanax papyriferus* (Hook.) K. Koch)의 莖髓를 건조한 것으로, 利水清熱, 通氣下乳의 효능주치로 활용되며, 《經史證類備用本草》에서는 “安心除煩, 通小腸, 下水, 破積聚血塊, 下乳.”이라 기재되어 있다<sup>32)</sup>. 濕熱로 인한 淋痛 諸症을 치료하기 위한 通草湯에 목통과 함께 활용되었으며, 유즙축진을 위한 通乳湯의 구성본초로 활용되었다<sup>31)</sup>.

이처럼 왕불유행, 목통, 통초는 모두 利水와 通乳의 작용이 있으며, AQP는 세포막의 수분투과성을 증가시키는데 중요한 역할을 하는 통합막단백질군<sup>14)</sup>으로 利水와 通乳의 작용이 있는 본초와의 연관성이 높을 것이라 판단하여 연구를 진행하였다.

이번 실험결과 새끼생쥐의 총 체중변화는 AQ군에서 가장 많은 증가를 보였고, MH군과 TP군은 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

관찰기간 동안의 총수유량의 평균값은 C군 8.34±0.37 g에 비해 TP군 10.06±0.92 g, MH군 9.56±0.51 g, AQ군 8.85±0.98 g으로 대조군에 비해 모든 실험군에서 증가하였으며, 통초 > 왕불유행 > 목통 순서로 통계적으로 유의하였다(P<0.05). 그러나 새끼생쥐의 기본 체중 및 변화량은 매우 적어 오차가 발생하기 쉽고, 표본수도 적었기 때문에 경향을 살펴볼 수는 있지만, 의미를 두기는 어려울 것이라 판단된다.

실험종료 후 유선조직의 광학현미경적

관찰 소견에서 모든 실험군의 유선조직은 대조군에 비하여 발달하였고, 발달 정도는 MH군, AQ군, TP군 순서였다.

실험 종료 후 혈청 내 prolactin 농도는 임신하지 않은 virgin군은  $252.01 \pm 16.37$  pg/mL, C군은  $310.92 \pm 29.47$  pg/mL으로 C군이 약간 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았다. 각각의 실험군의 prolactin 농도는 MH군은  $1014.44 \pm 51.83$  pg/mL, TP군은  $102.78 \pm 14.11$  pg/mL, AQ군  $667.05 \pm 58.66$  pg/mL으로 MH군과 AQ군에서 유의성 있게 증가하였다. 혈청 내 prolactin은 서로 다른 형태의 종류가 존재하여 다양한 생물학적 특성을 나타내므로 높아도 유즙의 양이 적을 수 있고, 낮아도 유즙의 양이 많을 수 있다. 포유자극 직후에 일시적 상승을 기대할 수 있으며, 다양한 호르몬들이 prolactin 분비에 관여하여 변동이 심함으로 모유양의 변화를 체크하는 지표로 삼기에는 적절치 않다고 하였다<sup>6)</sup>. 따라서 이 연구의 혈청 prolactin 농도 체크 시점으로 보았을 때 초기 모유분비에서의 촉진 가능성을 살펴 본 것이 아니므로, 의미를 두기는 어려울 것으로 판단하였다.

반면 유선조직의 prolactin receptor은 유즙생성 II기, 풍부한 모유가 분비되기 시작하는 시기에 모유생산을 좌우하는 지표로 볼 수 있으며, 모유의 생산을 좌우하는 것은 혈중 prolactin 농도가 아니라 prolactin receptor의 개수라는 것이 정설이다<sup>33)</sup>. 이 연구의 유선조직 prolactin receptor에 대한 면역조직화학적 염색에서는 대조군에 비하여 AQ군, MH군이 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 강한 면역반응이 나타내었고, TP군의 면역반응은 다소 약하게 나타났다. 이 등<sup>8)</sup>

의 연구에서는 prolactin receptor에 대한 면역조직화학적 염색에서 보허탕가감을 투여한 모든 실험군에서 유선조직의 유선포세포, 사이질세포, 사이질조직 및 혈관 등에 모두 강한 면역반응을 나타낸 것과는 다른 결과를 나타내었다. 이는 왕불유행과 목통이 유즙분비를 촉진함에 있어, 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 뚜렷한 영향을 주고 있음을 나타내는 것이다.

유선조직의 AQP에 대한 면역조직화학적 염색 소견에서 AQP1은 유선포의 사이질조직과 도관주위조직에 위치한 모세혈관과 세정맥의 벽에서 AQP3는 유선포를 구성하는 상피세포에서, AQP5는 유선포 사이의 일부 조직에서 강한 면역반응을 나타내었다. 이러한 결과는 이전의 설치류와 소를 이용한 유선의 AQP의 발현 위치에 대한 연구결과<sup>10,11,13)</sup>와 이 등<sup>8)</sup>의 연구와 유사하였다. 실험결과 AQP1은 TP군>AQ군=C군>MH군 순이었고, AQP3는 MH군, AQ군>TP군=C군, AQP5는 MH군>C군>AQ군, TP군 순이었다.

AQP1, AQP3, AQP5에 대한 western blotting을 시행하여 단백질 정량 분석한 결과 AQP1의 발현은 TP군>AQ군>C군>MH군 순서로, AQP3의 발현은 MH군>AQ군>C군>TP군 순서로, AQP5의 발현은 MH군>TP군>C군>AQ군 순서였다. AQP1, 3, 5 모두 Virgin군에 비하여 C군의 발현이 현저하였다.

Western blotting 결과에서 특히 AQP3는 virgin군에서 0.0051로 거의 발견되지 않았고, C군에서 0.8196, MH군에서 1.1851, AQ군에서 1.1668, TP군에서 0.6325로 분만 후에 확연히 증가하였고, 특히 MH군과 AQ군에서의 증가가 현저하였다. 이러한

결과는 virgin군이나 임신 중에 비하여 수유기에 AQP3의 발현이 확연하게 증가한다는 기존의 연구들과 유사하다<sup>8,12,13</sup>). 모유수유 동안에 유선조직에서는 상당한 양의 중성지방이 합성되고 분비되는데, 이때 AQP3가 물과 더불어 글리세롤 운송에 중요한 단백질로 작용할 것으로 보인다<sup>34</sup>). 한약복합처방의 두 연구<sup>8,13</sup>)에서도 AQP3는 모유의 분비에 있어서 매우 중요한 역할을 할 것으로 판단하였으며, 이 연구에서도 같은 근거를 제시하고 있다. 따라서 AQP3의 발현증가에 왕불유행과 목통은 현저한 효과가 있으며, 통초는 AQP3의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 이는 prolactin receptor의 면역조직화학적 염색 결과와 매우 일치하는 내용이다. 염색 결과 MH군과 AQ군에서 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 prolactin receptor에 대한 강한 면역반응을 나타냈다. TP군에서는 약한 면역반응을 나타내었다. AQP3 역시 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 강한 면역반응을 나타냈을 뿐만 아니라 MH군, AQ군도 대조군에 비해 강한 면역반응을 나타내었으나, TP군은 C군에 비해서 약한 면역반응이 나타났다. 즉 왕불유행과 목통은 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 작용을 하여 prolactin receptor와 AQP3의 발현을 증가시킴으로써, 수분과 글리세롤의 흡수와 분비에 긍정적으로 관여하고 있음을 알 수 있다.

Nazemi 등<sup>12</sup>)은 AQP1과 AQP3는 분만 후 포유과정 중에 급격히 증가하는데 AQP3는 분비상피세포의 기저막과 외막에 존재하여 수분의 이동에 관여하며, AQP1은 주로 모세혈관과 세정맥의 벽에서 확인되어 분비보다는 모유의 합성에 관여

하는 것으로 판단하였다. 반면, AQP5는 분비상피세포의 막에 위치하여 수분의 이동에 관여하는 하기는 하나 분만 후 포유 중에 급격히 증가하는 AQP1과 3에 비해 임신 중에 증가하고, 분만 후에 급격히 감소하는 양상을 보인다고 하였다. 그러나 Liu 등<sup>13</sup>)과 이 등<sup>8</sup>)의 연구에서 복합처방을 복용한 군의 AQP5의 Western blotting 결과 대조군과 virgin군에 비해 AQP5가 유의성 있게 증가하는 양상을 보였으며, 이 연구에서도 virgin군에서 0.0526, C군에서 0.4413, MH군에서 0.6697, AQ군에서 0.3625, TP군에서 0.5274로 MH군과 TP군에서 증가하는 양상을 보여, 분만 후 AQP5의 발현을 통한 수분대사 조절 가능성 또한 관찰할 수 있었다. 다만, 복합처방 연구와 이 연구에서 임신 중 유선에서의 측정값이 존재하지 않아, 절대적인 비교를 할 수 없는 아쉬움이 있으며, AQP3의 변화량처럼 크지 않아 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

AQP1은 주로 모세혈관벽에 존재하여 유즙의 분비보다는 합성에 관여할 것으로 보이는 단백질군으로 TP군이 1.0736으로 대조군 0.7852에 비해 면역조직화학적 염색 소견 및 Western blotting 결과 증가하는 양상을 보였다. 이는 Liu 등<sup>13</sup>)의 연구에서 복합처방군의 AQP1이 대조군과 비교하여 증가하지 않는 양상과는 다른 결과이다. 수유기에는 모세혈관망이 발달하기 때문에 AQP1의 발현은 virgin군에 비하여 대조군에서 더욱 강한 면역반응을 나타낸 것으로 보이며, 그러므로 대조군에 비하여 TP군에서 AQP1이 강한 면역 반응을 보이는 것은 실험군의 유선조직 모세혈관망이 더욱 발달하여 유즙분비를 촉진할 수 있음을 의미한다.

모유에는 FIL(feedback inhibitor of lactation)이라고 하는 작은 유청단백질이 들어있는데, FIL은 유방이 차 있을 때 모유 합성을 느리게 한다. 반대로 유방이 비워지고 FIL의 농도가 낮아지면 모유 합성 속도가 올라간다. 모유 생성을 지속하게 하는 능력은 시상하부와 연관된 자가분비기전에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>35)</sup>. 쉽게 말해, 유방이 비워지는 횟수, 비워지는 양이 늘면 늘수록 모유는 늘어날 수 있다는 것이다. 즉 모유가 많이 합성되기 위해서는 '얼마나 잘 배출되는가'가 중요한 요소로 작용함을 의미한다. 흔히 hydrochlorothiazide나 furosemide 성분의 이뇨제는 단순히 소변량을 증가시켜 체내 수분을 줄이고, 심하면 탈수 상태를 초래하며, 장기간 사용할 경우 모유생산을 줄이게 된다고 알려져 있다<sup>36)</sup>. 그러나 임상에서 모유축진을 위해 다용되는 왕불유행, 목통, 통초는 모두 이수작용을 한다. 따라서 이뇨제의 이수작용과 한약의 이수작용간에는 기전의 차이가 있음을 추론할 수 있다. 최근 일본을 중심으로 五苓散의 AQP를 매개로 한 뇌와 신장의 수분대사조절 메커니즘에 대한 연구가 발표되고 있는데, 그 중 한 연구에 따르면 五苓散은 AQP를 매개하여 체내 수분대사를 조절하고 생체 내 항성성을 유지하며 전해질이상 개선효과와 신장보호작용을 함께 가지고 있어, 일반적인 이뇨제와는 다른 기전으로 수분대사를 조절한다는 것이 밝혀졌다<sup>37,38)</sup>.

이 연구의 결과를 종합하였을 때, 왕불유행과 목통의 통유작용은 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 작용을 하여 prolactin receptor 및 AQP3, 5의 발현을

증가시킨다. 따라서, 세포막의 수분투과성을 증가시키고 글리세롤의 흡수 분비에 긍정적으로 관여하여 유즙의 배출을 증가시키고 유즙의 분비를 증가시킴을 확인할 수 있었다. 특히 왕불유행은 AQP3에 작용이 더 많은 것으로 판단되며, 추후 용량대비 연구가 필요할 것으로 사료된다. 통초는 왕불유행과 목통과는 달리 유선조직의 모세혈관 및 세정맥의 벽에 작용을 하여 AQP1의 발현을 증가시킬 것으로 예상되어지나, 그 발현차이가 크지 않고, 기존의 연구와 다른 부분이 있어 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

## V. 결 론

왕불유행, 목통, 통초의 유즙분비와 유즙분비 관련인자에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 분만 후 어미생쥐에게 개별 본초의 에탄올추출물을 복용시킨 뒤 새끼생쥐의 체중, 수유량 및 prolactin 호르몬 농도, 유선의 조직학적 변화, 면역조직화학적 염색반응 및 유선조직의 단백질 분리 및 western blotting 검사를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 새끼생쥐의 체중변화는 C군에 비해 AQ군은 증가, TP군과 MH군은 순서대로 감소를 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.
2. 수유기간 내 총수유량은 C군에 비해 TP군, MH군, AQ군 순서로 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ).
3. 유선조직의 광학현미경적 관찰 소견에서 모든 실험군의 유선조직은 대조군에 비하여 발달하였고, 발달 정도는

MH군, AQ군, TP군 순서였다.

4. 유선조직의 prolactin receptor에 대한 면역조직화학적 염색에서는 대조군에 비하여 AQ군, MH군이 유선포를 구성하는 분비 상피세포에 강한 면역반응을 나타내었고, TP군의 면역반응은 다소 약하게 나타났다.
5. 유선조직의 AQP에 대한 면역조직화학적 염색 소견에서 AQP1은 유선포 주위에 위치한 모세혈관과 세정맥의 벽에서, AQP3는 유선포를 구성하는 상피세포에서, AQP5는 유선포 사이의 일부 사이질 조직에서 강한 면역반응을 나타내었다. AQP1은 TP군>AQ군=C군>MH군 순이었고, AQP3는 MH군, AQ군>TP군=C군, AQP5는 MH군>C군>AQ군, TP군 순이었다.
6. 혈청 내 prolactin 농도는 C군, virgin 군에 비하여 MH군, AQ군에서 유의성 있게 증가하였으며(p<0.05), TP군은 감소였으나 통계적 유의성은 없었다.
7. Western blot 소견에서 AQP1의 발현은 TP군>AQ군>C군>MH군 순서대로, AQP3의 발현은 MH군>AQ군>C군>TP군 순서대로, AQP5의 발현은 MH군>TP군>C군>AQ군 순서였다. AQP1,3,5 모두 Virgin군에 비하여 C군의 발현이 현저하였다.

이상의 결과로 목통, 통초, 왕불유행의 투여는 출산 후 생쥐의 prolactin 농도를 증가시키고, 유선조직에서 prolactin receptor 및 AQP의 발현을 증가시켜 유선조직을 발달시킴으로써 모유분비를 증가시키는 효과가 있을 것으로 보인다.

- Received : Apr 26, 2018
- Revised : Mar 01, 2018
- Accepted : Mar 16, 2018

## References

1. Gabay MP. Galatogues: Medications that induce lactation. J Hum Lact. 2002;18(3):274-9.
2. Sim TF, et al. Perspectives and attitudes of breastfeeding women using herbal galactagogues during breastfeeding: a qualitative study. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2014;14(1):216.
3. Choi EJ, et al. A Survey of Breatfeeding in Korea. Korean Institute for health and social affairs. 2016:17, 33.
4. Lee SH, Kang HS. The effect of *Yongchun-san* in the hypogalactia in a mouse. J Korean Obstet Gynecol. 1996;9(1):191-20.
5. Lee JK, Kang HS. Effect of *Gami-samul-tang* on Incomplete Milk Secretion in Postpartum Rats. The Journal of Jeahan Oriental Medical Academy. 1996;1(1):94-105.
6. Lee EH, Kim TH. Effects of *Boheo-tang* and *Boheo-tang* plus *Cervi Pantotrichum Cornu* : on Lactation in Postpartum mice. J Korean Obstet Gynecol. 2008;21(4):1-16.
7. Song YH, Kim TH. Effect on Factors Related Lactation after Administration of *Palmul-tang* Purpose. J Korean Obstet Gynecol. 2010;23(1):12-29.

8. Lee AY, et al. Effects of *Boheo-tang-gagam* on Milk Production and Factors Related Lactation in Postpartum Mice. *J Korean Obstet Gynecol.* 2016;29(1): 35-52.
9. Endo M, et al. Water channel(Aquaporin1) expression and distribution in mammary carcinomas and glioblastomas. *Microvasc Res.* 1999;58:89-98.
10. Matsuzaki T, et al. Expression and immunolocalization of water-channel aquaporins in the rat and mouse mammary gland. *Histochem Cell Biol.* 2005;123(4-5):501-12.
11. Mobasher A, et al. Cellular localization of aquaporin along the secretory pathway of the lactating bovine mammary gland: an immunohistochemical study. *Acta Histochem.* 2011;113(2):137-49.
12. Nazemi S, et al. Reciprocity in the developmental regulation of aquaporins 1, 3 and 5 during pregnancy and lactation in the rat. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e106809.
13. Liu H, et al. An herbal galactagogue mixture increases milk production and aquaporin protein expression in mammary glands of lactating rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:760585.
14. King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:619-48.
15. Hua Y, et al. Expression and significance of aquaporins during pregnancy. *Frontiers in Bioscience.* 2013;18(4):1373-83.
16. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(6):816-21.
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Biotechnology.* 1992;24:145-9.
18. Park HJ, et al. Pregnancy outcomes in women aged 35 and older. *J Korean Obstet Gynecol.* 2006;49(10):2066-74.
19. Cho JS, Ahn SH. Development and Evaluation of Breastfeeding Promotion Program for Mothers with Breast Engorgement following Cesarean Birth. *J Korean Acad Nurs.* 2014;44(2):170-8.
20. The Society of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology. 3rd ed. *Oriental Obstetrics & Gynecology.* Seoul:Euseongdang. 2016:833-7.
21. Song IS. Effect of *Tongyu-tang* and *Gamitongyu-tang* on the Incomplete Milk Secretion of Postpartum Rats. Department of Oriental Medicine, Graduate School, Kyungsan University. 1995.
22. Park SW, et al. Effects of *Boheo-tang* and *Saengwha-tang* on blood components and hormone content in postpartum rats. *J Korean Obstet Gynecol.* 2001; 14(2):118-28.
23. Park JC. A study on the postpartum efficacy. Department of Oriental Medicine, Graduate School, Kyungsan University. 1990.
24. Agre P, Kozono D. Aquaporin water



- channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett. 2003; 555:72-8.
25. Bwoun D, et al. Localization of the CHIP28 water channel in reabsorptive segments of the rat male reproductive tract. Eur J Cell Biol. 1993;61:264-73.
  26. King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. Annu Rev Physiol. 1996;58:619-48.
  27. Mobasher A, Wray S, and Marples D. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. Journal of Molecular Histology. 2005;36(1-2):1-4.
  28. Mobasher A, Barrett-Jolley R. Aquaporin water channels in the mammary gland: from physiology to pathophysiology and neoplasia. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2014; 19(1):91-102.
  29. Wu YL. BenCaoCongXin(本草從新). 2nd ed. Seoul:Haenglim Publisher. 1972:57.
  30. Li SZ. BenChaoGangMu(本草綱目). 1st ed. Beijing:People's Medical Publishing House. 1982:1063, 1317, 1319.
  31. Ju YS. Ungok Herbology. 2nd ed. Jeonju:Woosuk press. 2013:731-2, 735-6, 997-8.
  32. Tang SW. ZhongXiuZhengHuoJingShi ZhengLeiBeiYongBenCao(重修政和經史證類備用本草). Taipei:SMC Publishing Inc.. 1976:200.
  33. Riordan J, Gill-Hopple K, Angeron J. Indicators of effective breastfeeding and estimates of breast milk intake. J Hum Lact. 2005;21(4):406-12.
  34. Garton GA. The composition and biosynthesis of milk lipids. Journal of Lipid Research. 1963;4:237-54.
  35. Mannel R, Martens PJ, Walke M. The Core Curriculum for Lactation Consultant Practice. Seoul:The Minjok Medicine News. 2010:123-6, 447-9.
  36. Cursino T, et al. Diuretics vs. placebo for postpartum blood pressure control in preeclampsia (DIUPRE): a randomized clinical trial. Reproductive Health. 2015;12:66.
  37. Michiko J, Naotoshi S. Effect of Goreisan on the urinary concentrating ability and the expressions of aquaporins in 5/6 nephrectomized rats. Folia Pharmacol. Jpn. 2014;143(2):65-8.
  38. Kurita T, et al. Effects of *Gorei-san*: A Traditional Japanese Kampo Medicine, on Aquaporin 1,2,3,4 and V2R mRNA Expression in Rat Kidney and Forebrain. J. Med. Sci. 2011;11(1):30-8.