

항암성 백금화합물의 신장독성에 관한 연구

최병기·박영숙·정세영*

동덕여자대학교 약학대학·경희대학교 약학대학*

Studies on the Mechanism of Nephrotoxicity Caused by Antitumor Platinum Complex

Byung Ki Choi, Young Sook Park, Se Young Choung*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University

College of Pharmacy, Kyung Hee University*

ABSTRACT

This study was designed to elucidate the mechanism of nephrotoxicity caused by antitumor agent tetrphosphine platinum (II) complex (RC-1), which was synthesized as a tetrphosphine Pt (II) derivatives recently.

Rats treated with RC-1 (20mg/kg/day) showed the increase of BUN value and malondialdehyde contents in kidney homogenate, compared to the control and which means the lipid peroxidation was a main cause of nephrotoxicity.

In order to investigate the cytotoxic mechanism of RC-1, we also tested and revealed the generation of oxygen free radicals derived from neutrophil stimulated by RC-1 and interaction of the oxygen free radicals with the erythrocyte membrane.

From the above results, we suggest that nephrotoxicity of general platinum (II) antitumor compounds as well as RC-1 were inhibited by radical scavengers.

서 론

현재 방광암, 고환종양, 전립선암, 요관종양, 난소암 등의 치료제로 사용되고 있는 cis-diaminodichloroplatinum (II) (cisplatin)이 1969년 Rosenberg 등¹⁾에 의하여 발견된 이래 백금항암제는 의학

품으로의 가치를 인정받게 되었다. 또한 보다 우수한 제 2 세대 백금항암제의 개발을 위하여 많은 유도체들이 합성되고 있으며, 이들의 항암성과 독성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.^{2~5)}

그러나 일반적으로 백금항암제는 신장, 위장관, 말초신경 및 골수 등에 강한 독성을 나타내므로 임상적 응용에 있어 큰 제한 요소로 작용하고 있다.

특히 cisplatin을 장기투여하는 말기 암환자에 있어서는 신장의 근위세뇨관(proximal tubule)의 심한 손상으로 사망하게 되는데 신장독성의 지표가 되는 blood urea nitrogen(BUN) 및 creatine치가 정상인의 수배까지 증가한다.^{6,7)}

Cisplatin의 위장관 장애로는 오심, 구토, 식욕부진, 변비, 설사 및 복부팽만감이 나타나며, 실험동물에 투여하였을 때의 설사는 독성지표로서도 이용되고 있다.

골수독성은 cisplatin이 DNA이중나선구조에 삽입되어 DNA복제가 불가능하게 되므로 장기간 투여한 환자에서 백혈구감소, 혈소판감소 및 적혈구의 감소에 의한 빈혈 등이 나타나게 된다.^{8,9)}

말초신경장애로는 손발의 마비가 일반적이며 언어장애, 두통, 시각장애가 나타나기도 한다.

흰쥐를 이용한 비임상시험 결과 임신전, 임신초기 투여에 의한 태아의 사망, 골격이상 등의 생식독성이 나타나며, *Salmonella typhimurium* TA 100 및 TA 98을 이용한 Ames test에서도 돌연변이원성이 인정되었다.¹⁰⁾

Cisplatin의 신장독성발현기전에 대해서는 cisplatin이 정상세포의 세포막과 핵막을 투과하여 DNA와 결합함으로써 renal cortical 복제가 억제되고 또한 renal ATPase 및 mitochondria의 기능이 저해되어 세포독성이 나타난다고 보고되어 있다.^{11~13)}

최근 신장 slice를 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 과산화지질생성량이 증가한다는 보고가 많이 나오면서 전이금속(轉移金屬)인 백금에 의한 전자이동이 oxygen free radical을 만들 가능성을 시사해주고 있다. 따라서 백금항암제의 독성발현기전을 규명하는 것은 독성경감방법 개발의 지름길이 될 뿐만 아니라 고용량의 장기치료를 가능하게 하여 암치료에의 임상적 응용을 기대할 수 있다.

현재까지의 백금항암제의 독성경감을 위한 시도는 첫째 cisplatin보다 신장독성이 적은 platinum analogue들의 개발로서, 현재 carboplatin이 개발되어 사용되고 있으나 cisplatin에 비하여 약효가 현저히 떨어지며 동시에 골수독성이 강하여 사용상 제

한이 있다.¹⁴⁾

김 등¹⁵⁾이 개발한 백금항암제는 독성이 약하고 항암효과는 더 좋으나 항암스펙트럼에서 cisplatin보다 떨어진다. 따라서 새로운 백금항암제의 개발은 연구개발비가 많이 들고 cisplatin보다 월등히 좋은 백금항암제를 개발하는 것은 쉽지 않다.

둘째 전해질을 체내 다량 투여함으로써 이노효과를 일으켜 신장에서 백금항암제가 저류하는 시간 즉 신장세포와 접촉하는 시간을 감소시키는 방법이다.¹⁶⁾ 실제로 mannitol을 병용투여하는 방법이 사용되고 있으나 배설촉진이라는 의미에서 백금항암제의 체내 반감기를 단축시켜 항암효과와 지속시간을 크게 감소시킨다.

셋째 백금항암제의 자체 독성을 억제 또는 경감시키는 약물을 동시에 투여하는 방법으로 세포내에서 glutathione peroxidase의 조효소로서 이용되는 selenium 제제를 투여하는 방법이 널리 연구되고 있다. Selenium 제제 투여에 의하여 환원형 glutathione이 많아지면, 백금항암제에 의한 과산화지질생성량이 감소될 것이라는 가정하에서 연구가 시도되어 왔다.^{17~21)}

넷째 백금과 결합함으로써 세포독성을 발현하지 못하게 하는 metallothionein의 생합성을 유도하는 물질 즉 bismuth 제제를 투여하는 방법²²⁾이 있으나 selenium, bismuth는 그 자체가 독성을 가지는 중금속이므로 사용하는데 신중을 기하지 않으면 안된다.

이와 같이 백금항암제의 독성을 경감시키는 방법의 개발이 지연되고 있는 것은 백금항암제의 독성발현기전이 명확히 밝혀지지 않은데 기인한다고 사료된다.

본 연구에서는 새로 합성된 백금항암제인 tetrachloroaurate platinum (II) complex에 의한 신장독성이 백금화합물의 재흡수에 의하여 높은 농도로 농축되어 있는 신장에 존재하는 neutrophil을 자극하여 oxygen free radical을 비롯한 세포독성 물질이 다량 분비됨으로써 proximal tubular cell을 공격하여 세포손상을 일으킬 가능성을 시사해주는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 실험동물

체중이 150 ± 20 g인 Sprague-Dawley계 음성 흰 쥐를 서울대학교 중앙동물사육장에서 분양받아 1주간 기본사료로 적응시킨 다음 실험에 이용하였다.

2. *In vivo* 및 *in vitro*에서의 신장독성실험

1) BUN의 측정

흰쥐의 심장에서 채혈하여 실온에서 30분간 방치한 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액인 혈청을 분리하였다. 혈청에 대하여 Watson법²³⁾에 의하여 측정하였다.

2) 심장 homogenate의 malondialdehyde 측정

측정하기 5일 전에 생리식염수에 녹인 0.1mM RC-1을 복강내로 주사하고 흰쥐의 경동맥(頸動脈)을 절단하여 방혈사시키고 개복하여 신장을 적출한 다음 생리식염수로 혈액을 씻어내었다.

신장조직의 무게를 달고 그 무게의 5배에 해당되는 0.05M 인산완충용액(pH 7.4)를 넣고 얼음속에서 빙냉하여 균질액을 만들었다. 이 균질액 0.5ml와 10% SDS 0.4ml를 마개달린 시험관에 넣고 37°C에서 가온하여 30분간 가용화시킨 다음 시료로 하였다. 이 시료에 대하여 TBA법²⁴⁾으로 MDA 농도를 측정하였다.

3) 단백질의 정량

단백질 정량은 전향에서의 균질액 0.1ml를 취하여 Lowry법²⁵⁾에 의하여 정량하였다.

3. 신장독성 발현기전실험

1) neutrophil의 유도, 분리 및 조제

흰쥐에 체중 200g당 7.5ml의 비율로 6% sodium caseinate를 복강내 투여하여 neutrophil을 유도하고 15시간 후에 복강내를 heparin 함유 생리식염수(5000IU/ml)로 세척하였다. 세척액을 모아 4°C에서 1200rpm으로 7분간 원심분리하고 그 침전에 tris ammonium chloride(pH 7.2) 50ml를 가하고 빙수중에서 30분간 방치하였다.

다시 4°C에서 7분간 1200rpm으로 원심분리한 다음 침전을 Hank's BSS로 3회 세척하고 세포수를 측정하여 neutrophil의 농도를 Hank's BSS액으로 10^7 cells/ml로 조제하였다.

2) 적혈구의 분리 및 조제

적혈구는 Snyder 등의 방법²⁶⁾으로 분리한 다음 hemacytometer로 세포수를 측정하여 적혈구의 농도를 2×10^8 cells/ml로 조제하였다.

3) Neutrophil에 의한 적혈구용혈 및 억제실험

분리한 neutrophil(10^7 cells/ml)에 0.1mM RC-1 단독 또는 여러 농도로 조제한 radical scavenger를 동시에 가하여 37°C에서 1시간 incubation시킨 다음 1200rpm에서 7분간 원심분리하고 상정액을 취하였다. 상정액에 적혈구(2×10^8 cells/ml)를 가하고 37°C에서 30분간 incubation한 다음 2000rpm에서 원심분리하고 상정액에 대하여 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 환원형 glutathione의 용혈억제실험

Neutrophil(10^7 cells/ml)에 1mM 및 10mM의 GSH액을 각각 가하여 37°C에서 30분간 incubation시킨 다음 1200rpm에서 7분간 원심분리시켰다. 침전된 neutrophil을 TBS(pH 7.4)로 현탁시키고 RC-1을 가한 다음 37°C에서 1시간 incubation하고 1200rpm에서 7분간 원심분리한 다음 상정액에 적혈구(2×10^8 cells/ml)를 가하여 37°C에서 30분간 incubation하였다. Incubation한 다음 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 적혈구의 지질과산화물 측정

분리한 neutrophil(10^7 cells/ml)에 RC-1 단독 또는 여러 농도로 조제한 radical scavenger를 동시에 가하여 37°C에서 1시간 incubation한 다음 1200rpm에서 7분간 원심분리하고 상정액을 취하였다. 상정액에 적혈구(2×10^8 cells/ml)를 가하고 37°C에서 30분간 incubation한 다음 2000rpm에서 5분간 원심분리하고 상정액을 취하여 TBA법²⁴⁾으로 MDA 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *In vivo* 및 *in vitro* 신장 독성

1) BUN 및 diarrhea 빈도

새로 합성된 백금항암제 RC-1은 cisplatin과는 구조적으로 착체화합물이 다르기는 하나 백금을 가지고 있고 항암효과를 나타내는 것으로 백금항암제의 공통적인 독성인 신장독성이 있을 것으로 생각되어 *in vivo*에서의 신장독성여부를 검토하였다.

일반적으로 신장독성이 나타났을 때의 parameter로는 혈중의 BUN, creatinine, 신장의 clearance, 전해질 배설능의 변화, 조직학적 및 병리학적인 병변생성을 볼 수 있다.

본 연구에서는 가장 신장독성을 용이하게 측정할 수 있으며 비교적 측정치의 variation이 작은 BUN치와 최종일에 흰쥐를 sacrifice하여 백금항암제의 신장독성의 지표가 되는 MDA량을 측정하였으며 또한 체중의 변화도 독성 발현의 한지표가 되므로 함께 관찰하였다.

흰쥐의 복강내에 생리식염수에 녹인 RC-1을 체중 kg당 10mg 및 20mg을 투여하여 3일, 4일째에 심장채혈하고 혈청을 얻은 뒤 BUN치를 측정하였으며 Table I에 그 결과를 나타내었다.

Table I. Renal toxicity of RC-1 in SD rat

Dose (mg/kg)	BUN ^a		Incidence of diarrhea on day 4(%)
	on day 3(mg/100ml)	on day 4(mg/100ml)	
Control RC-1	21.8±0.5	21.8±0.5	0
10	27.5±1.2	22.5±2.1	0
20	33.7±2.5*	41.5±3.0*	50

a; Values are means±S.D.

*; Significant as to control (p<0.05)

생리식염수만을 복강내 투여한 control군에 있어서는 3일째, 4일째에 정상적인 BUN치인 21.8±0.5mg/100ml이었으며 소화기 장애인 설사는 전혀 없었다.

그러나 RC-1을 10mg/kg으로 복강내 투여한 군에서는 3일째 27.5±1.2mg/100ml로 약 25%의 BUN치 증가를 볼 수 있었으나 4일째에는 정상치로 회복이 되었음을 알 수 있었다.

이때 설사도 처음 투여하였을 때 25%이던 것이 모두 회복되어 4일째에는 전혀 나타나지 않았다.

RC-1을 20mg/kg으로 복강내 투여한 군에서는 3일째 33.7±2.5mg/100ml로 약 75%의 BUN치의 증가를 보였고 4일째에는 두배의 수치를 보여 신장독성이 유도되었음을 알 수 있었다.

설사는 4일째에 실험군의 50%에 해당하는 설사 발생빈도를 나타내어 RC-1이 다른 백금항암제와 유사한 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

체중 변화에 있어서는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 10mg/kg 투여시에는 control과 별 차이가 없었으며, 20mg/kg 투여군에서만 체중의 감소가 다소 나타났다.

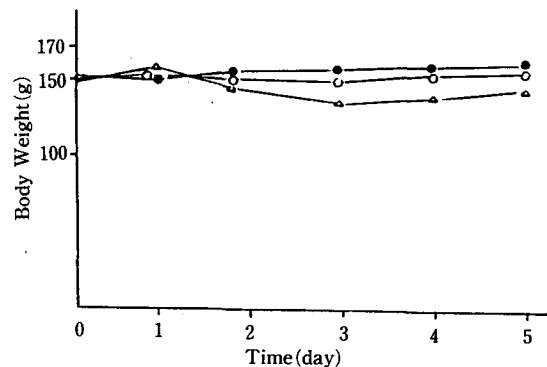


Fig. 1. Changes of the body weight in SD rat treated by RC-1
[●]; control, [○]; 10mg/kg, [△]; 20mg/kg.

2) 신장 homogenate의 MDA생성

RC-1 투여후 5일째 되던 날 sacrifice하여 신장을 육안으로 관찰한 다음 균질화하여 일부는 단백질량을 Lowry법에 의하여 측정하고 일부는 MDA치를 TBA법으로 측정하였다.

Wet weight를 측정하여 MDA생성량을 보는 경우에는 조직의 균일화 조건, 조직의 상태에 따라 변동이 심하므로 단백질정량을 하였으며, 육안으로

관찰시 control과 10mg/kg에서는 신장의 병변이 보이지 않았으나, 20mg/kg으로 투여하였을 때는 신장의 색상이 선명한 암갈색이 아닌 옅은 갈색을 띠고 있었으며 모양도 표면이 고르지 못한 것을 알 수 있었다.

MDA치의 변화는 control과 10mg/kg은 차이가 없었으며 20mg/kg 투여시에는 약 두배로 증가하는 결과를 보였다(Table II).

Cisplatin에 있어서도 저용량에서는 BUN치가 10~20배까지 증가하여도 MDA치는 2배정도 밖에 증가하지 않았다는 점에서 신장독성이 유도되었다고 추정된다.

Table II. Lipid peroxidation in rat kidney treated by RC-1

Dose(mg/kg)	MDA (nmole/mg protein) ^a
Control	0.25±0.06
RC-1	
10	0.24±0.03
20	0.51±0.08*

a; Values are means±S.D.

*; Significant as to control ($p < 0.05$)

2. 신장독성발현기전

1) Neutrophil 자극에 의한 세포독성작용

백금항암제의 독성발현기전을 밝히는 것은 독성 경감방법 개발의 지름길이 될 수 있으며 고용량 사용이 가능하게 되어 암치료에의 임상응용에 큰 공헌을 할 수 있을 것으로 기대된다.

이제까지의 백금항암제에 의한 신장독성발현기전에 관한 연구는 *in vivo*로 cisplatin을 투여한 다음 신장을 분리하여 과산화지질생성량을 측정하였을 때, proximal tubule의 병변발생과의 상관성^{28,29)}이 보였다거나, *in vitro*에서 신장 slice를 perfusion 시키며 cisplatin을 가하였을 때 과산화지질생성량과 slice의 호흡저하와의 사이에 상관성이 있다는 보고가 되고 있는 정도이다.³⁰⁾

또한 수은, 납 등 중금속은 신장독성을 나타내는

대표적인 화합물로 인정받고 있으며 최근의 보고에 의하면 이들이 metallothionein과 결합한 형태로 배설되는 과정에서 proximal tubule에 재흡수가 되고 따라서 proximal tubule에 특이적으로 독성을 나타낸다고 한다.^{31,32)}

따라서 본 실험에서는 백금항암제가 체내에서 신장으로 배설되는 과정에서 신장세포를 자극하여 생성된 metallothionein과 결합한 형태로 사구체를 여과하여 proximal tubule을 거치는 동안 metallothionein-pt complex가 재흡수되어 proximal tubular cell에 농축된 뒤 주위의 조직으로 diffusion되는 과정에서 주위의 neutrophil을 자극함으로써 세포독성물질을 분비하고, 이에 의하여 proximal tubule의 조직손상이 일어난다는 가설을 세우고 세포독성의 model로서 주 연구대상이 되는 적혈구에 대한 RC-1에 의해 자극된 neutrophil 상징액의 용혈정도를 측정함으로써 백금항암제 RC-1의 독성발현기전을 밝히고자 하였다.

Casein을 부강내 투여하여 백혈구를 유도한 다음 일정시간이 지나 부강액을 취하여 주로 neutrophil^{32,33)}에 해당되는 백혈구를 분리하여 RC-1을 가하고 원심분리하여 상징액을 취하였다. 이 상징액에는 여러가지 세포독성물질이 분비되었을 것으로 추정되므로 이 상징액과 적혈구를 37°C에서 일정시간 incubation한 다음 적혈구의 용혈정도를 측정하였다.

RC-1의 농도에 따른 적혈구 용혈을 본 결과 0.01 mM까지는 전혀 용혈이 일어나지 않았으며 0.01 mM과 0.05mM 사이에서 급격한 용혈증가가 일어나서 0.1mM에서는 거의 100%의 용혈이 일어나는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

RC-1의 농도에 따른 용혈의 증가는 37°C에서 30분으로 시간을 고정하여 측정하였으며 이는 대부분의 혈구독성이 있는 물질에 의한 용혈이 20분 이내에 끝난다는 보고에 따라 실시하였다.

이를 확인하기 위하여 100% 용혈이 일어나는 0.1mM의 RC-1에 의한 적혈구 용혈의 시간에 따른 경시 변화를 보았다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 15분 지났을 때 이미

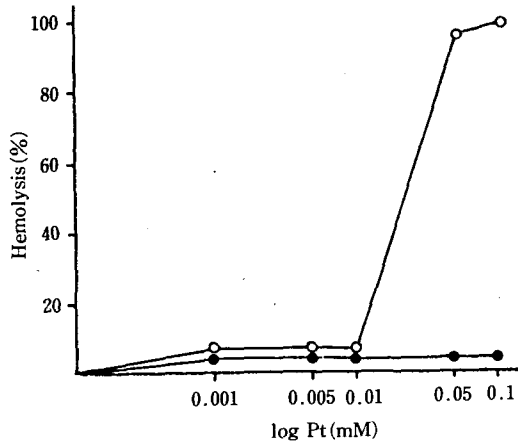


Fig. 2. Concentration dependent hemolysis of erythrocytes on neutrophils stimulated by RC-1 [○]; RC-1, [●]; Control

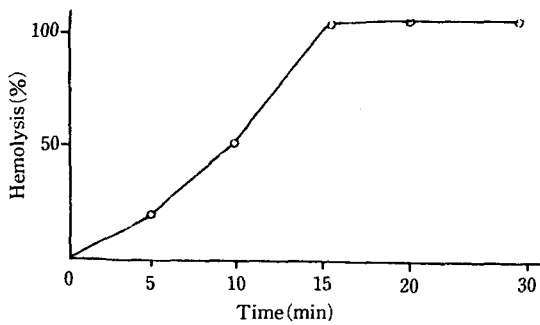


Fig. 3. Time dependent hemolysis by supernatant of neutrophils stimulated by 0.1mM RC-1 for 1hr.

100% 용혈이 일어났으며 따라서 이후의 실험은 incubation 시간을 30분으로 고정하여 실시하였다.

다음으로 neutrophil과 RC-1과의 incubation 시간에 따른 용혈정도의 변화를 보았다. 일반적인 백혈구자극제에 의한 자극은 대개 2시간 정도에서 생리활성물질의 분비가 완료된다고 보고³²⁾되어 있으므로 15분, 30분, 1, 2, 3 및 4시간이 경과되었을 때의 용혈정도를 측정하였다(Fig. 4).

그 결과 100% 용혈이 일어나는 0.1mM RC-1을 가하였을 때 1시간 incubation에 의하여 거의 100% 용혈이 일어났으며 그 후로는 별 차이가 없었다. 따라서 이후의 실험은 incubation 시간을 1시간으로 고정하여 실시하였다.

RC-1의 농도를 일정하게 하고 neutrophil 수를 변화시킬 경우 neutrophil 하나의 세포에 대한 백금항암제의 절대량이 변하게 되고 neutrophil에 대한 자극효과에 영향을 줄 수 있으므로 이를 검토하였다.

RC-1의 농도를 0.1mM, neutrophil 수를 $10^4 \sim 10^8$ cells/ml를 변화시킬 경우 적혈구 용혈은 $10^4 \sim 10^7$ cells/ml까지는 거의 100% 유지하여 변함이 없었으나, 5×10^7 cells/ml로 할 경우 용혈은 10%에도 못 미쳐 neutrophil에 대한 RC-1의 자극효과의 역치가 이 근처임을 알 수 있었다(Fig. 5).

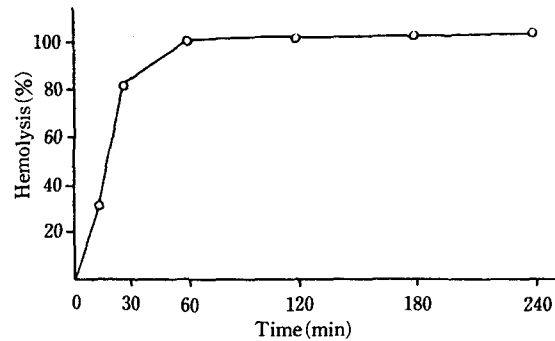


Fig. 4. Effects of neutrophils stimulation time by 0.1mM RC-1 on the hemolysis

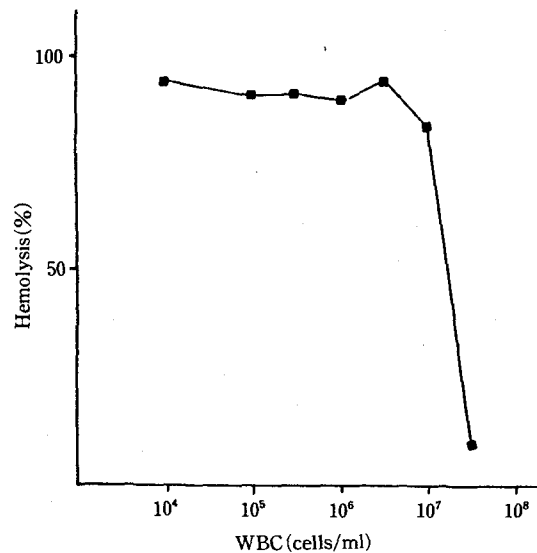


Fig. 5. Effects of neutrophil number on hemolysis induced by RC-1

2) Radical scavenger의 용혈억제작용

Neutrophil에 의한 적혈구용혈이 *in vivo* 독성 실험에서 과산화지질생성량인 MDA치의 증가와 동일하게 적혈구막의 지질과산화에 기인한다면 oxygen free radical scavenger에 의하여 neutrophil에서 분리된 radical이 제거되어 용혈이 억제될 것으로 생각되었다.

특히 oxygen free radical scavenger를 사용한 것은 신장이 혈액의 유출입량이 많으므로 인하여 산소를 비교적 많이 함유하고 있는 조직이므로 이들 산소에의 radical화에 따른 세포독성발현을 예상할 수 있기 때문이었다.

Radical scavenger^{34~36)}로는 천연항산화제인 Vit C, Vit E, GSH와 합성항산화제인 BHA, BHT, thiourea, mannitol 및 superoxide anion을 제거하는 SOD, 과산화수소를 제거하는 catalase를 사용하였다(Table III, IV).

Table III 및 IV에서와 같이 radical scavenger의 억제효과를 검토한 결과 Vit C, BHT가 10mM에서 60~70% 용혈억제가 있었으며 Vit E, BHA, mannitol 및 thiourea에 의해서도 강한 용혈억제가 나타났다. 용혈억제가 가장 강하게 나타난 것은 1mM GSH로 약 80%의 용혈억제작용을 나타내었다.

Table III. Inhibitory effects of various radical scavengers

Radical scavengers	Concentration (mM)	Hemolysis (%)
RC-1	0.1	95
Vit C	1	82
	10	20
GSH	1	16
	10	78
Mannitol	1	51
	10	42
Vit E	1	80
	10	38

[Vit.C]; Ascorbic acid, [GSH]; Reduced glutathione [Vit.E]; *dl-a* Tocopherol acetate

Table IV. Inhibitory effects of various radical scavengers

Radical scavengers	Concentration (mM)	Hemolysis (%)
RC-1	0.1	95
Thiourea	1	60
	10	39
BHA	1	45
	10	37
BHT	1	60
	10	20
Catalase	100unit	85
	200unit	0
	400unit	0
SOD	100unit	39
	200unit	0
	400unit	0

[BHA]; Butylated hydroxyanisole,
[BHT]; Butylated hydroxytoluene,
[SOD]; Superoxide dismutase

SOD는 100unit에서 약 40%의 억제효과를 보였고 200 및 400unit에서 용혈이 일어나지 않음으로써 superoxide anion이 용혈의 직접적인 원인임을 알 수 있었다.

Catalase는 100unit에서는 거의 용혈억제가 보이지 않았으나 200 및 400unit에서 완전한 용혈억제를 보임으로써 superoxide anion으로부터 생성된 H₂O₂에 의해서도 용혈을 일으키고 있음을 알 수 있었다.

이들 scavenger 중 용혈억제효과가 가장 큰 것으로 나타난 GSH에서는 100mM에서는 오히려 백금항암제 단독시와 비슷한 정도의 용혈을 보였으며 이는 GSH가 과량 존재함으로써 자신이 GS·radical을 형성하여 세포독성을 나타내거나 고농도의 GSH에 의한 neutrophil이 자극을 받아 세포상해성물질을 과량 내보냄으로써 오히려 용혈을 촉진시킨 결과로 보았다.

3) GSH에 의한 용혈 및 과산화지질생성억제

Radical scavenger 중 가장 강한 활성을 나타낸 GSH에 대하여 GSH의 농도를 0.01, 0.1, 1 및 10 mM로 변화시키며 용혈 및 과산화억제를 검토하였

다. 0.01mM에서 1mM까지는 현저한 용혈억제가 보였던 반면에 10mM에서는 다시 용혈이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

GSH의 농도를 1mM, 10mM로 고정하고 RC-1의 농도를 변화시켰을 때의 용혈억제 정도를 보았다. RC-1 0.01~0.05mM까지는 1mM, 10mM GSH에 의한 용혈은 control과 비슷한 정도까지 억제되였으나 RC-1 0.1mM에서는 Fig. 6의 결과와 동일하게 1mM GSH에 비하여 10mM GSH에서 오히려 더 큰 용혈이 일어났다(Fig. 7).

따라서 10mM GSH에서는 단순히 GSH에 의한 독성이 아니라 GSH와 RC-1이 상승효과에 의하여 세포에 자극을 주며 용혈을 유도하는 것으로 사료된다.

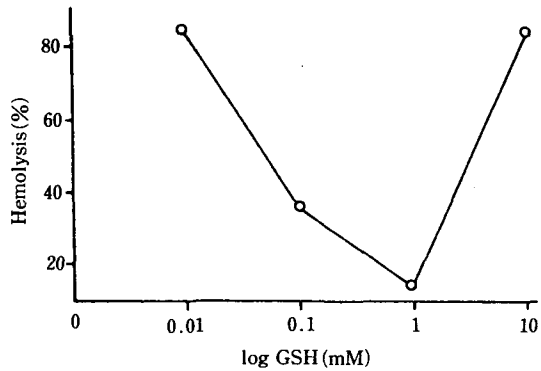


Fig. 6. Inhibition of hemolysis by reduced glutathione.

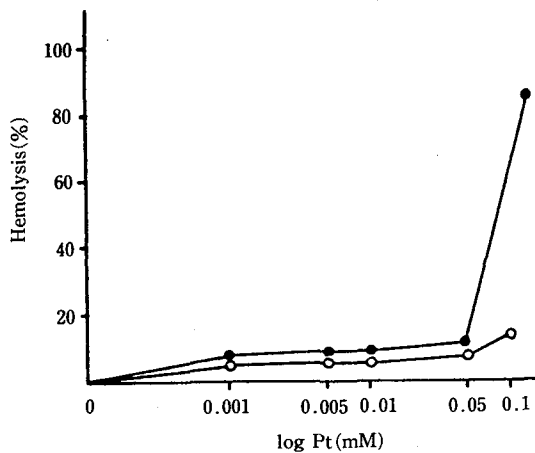


Fig. 7. Inhibition of hemolysis by reduced glutathione. [○]; 1mM GSH, [●]; 10mM GSH

다음으로 GSH에 의한 용혈억제가 과산화지질 억제에 의한 것임을 보기 위하여 적혈구에 있어서의 MDA 생성억제를 보았다.

RC-1에 의한 적혈구 용혈시 MDA 생성량은 Fig. 8에서 나타난 바와 같이 농도의 증가에 따라 동일하게 증가하는 경향을 볼 수 있었으며 RC-1의 농도를 1mM로 고정시키고 GSH의 농도를 0.01~1mM에서의 MDA생성량을 보았을 때 GSH의 농도의존적으로 MDA생성량이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 9).

이상의 실험결과를 종합하여 보면, RC-1 백금향

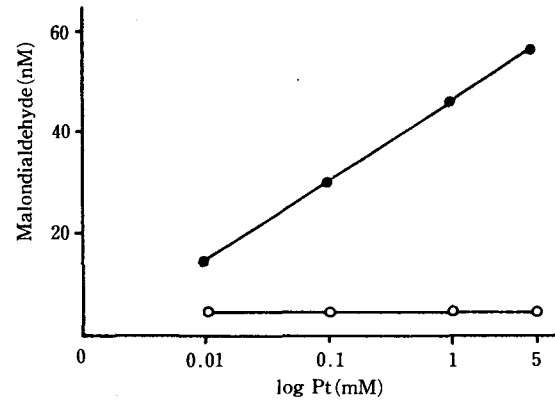


Fig. 8. Lipid peroxidation induced by RC-1 [○]; Control, [●]; RC-1

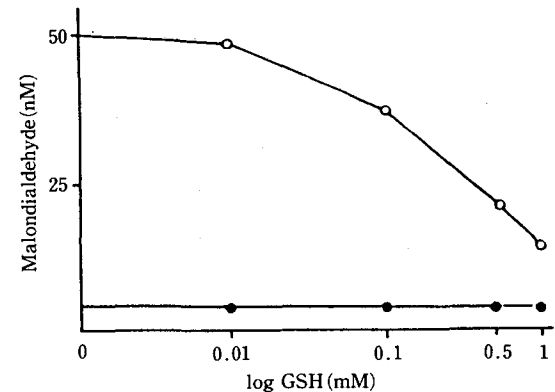


Fig. 9. Inhibition of lipid peroxidation by reduced glutathione [○]; GSH, [●]; Control

암제에 의한 용혈독성은 RC-1이 neutrophil을 자극하고 자극에 의하여 생성된 oxygen free radical이 외부로 방출되면서 적혈구막의 과산화를 촉진시키고 또한 인지질의 분해를 촉진시킴으로써 적혈구막 손상에 이어 적혈구의 파괴가 일어난다는 것을 알 수 있었다.

결 론

새로이 합성된 백금항암제 tetrphosphine계 platinum (II) complex인 RC-1의 *invivo*, *in vitro*에서의 신장독성 및 독성발현기전을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RC-1 (20mg/kg/day)의 투여로, 혈중 BUN치의 증가 및 신장조직의 malondialdehyde의 생성량을 증가시키는 것으로 보아 신장독성을 나타냄을 확인할 수 있었다.
2. RC-1의 신장독성 model로서 RC-1을 neutrophil에 가하여 neutrophil mediated erythrocyte cytotoxicity를 측정하면 농도 및 시간 의존적으로 oxygen free radical을 생성하여 적혈구용혈을 일으켰다.
3. RC-1에 의한 neutrophil 자극에 따른 적혈구 용혈은 oxygen free radical에 의한 세포내 및 외막을 구성하는 인지질의 과산화에 기인하였다. 위의 결과를 종합하여 보면 RC-1은 백금항암제로 기존의 cisplatin에 비하여 신장독성은 약하였으며 neutrophil을 자극하여 신장독성을 일으킬 가능성이 있으므로 항암제로 사용되기 위하여 항산화제인 radical scavenger를 병용투여하여 독성을 경감시킬 필요가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Rosenberg, B., van Camp, L., Trosko, J.E. and Mansour, V.H.: *Nature* (London), 222, 385 (1969).
2. Braddock, P.D., Connors, T.A., Jones, M., Khokhar, A.R. Melzack, D.H. and Tobe, M.L.: *Chem. Biol. Interactions*, 1, 145 (1975).
3. Rose, W.C., Schurig, J.E., Huftalen, J.B. and Bradner, W.T.: *Cancer Treat. Rep.* 66, 135 (1982).
4. Schwartz, P., Meischen, S.J., Gale, G.R., Alkines, L.M., Smith, A.B. and Walker, E.M.: *Cancer Treat. Rep.* 61, 1519 (1977).
5. Noji, M., Hanai, M., Ohmori, T., Tashiro, T., Suzuki, K. and Kidani, Y.: *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3439 (1988).
6. Fillastre, J.P. and Rauguenez-Viotte, G.: *Toxicol. Lett.*, 46, 163-175 (1989).
7. Tanaka, H., Ishikawa, E. and Teshima, S.: *Toxicol. Pathol.*, 14, 247-257 (1986).
8. Prestayko, A.W., Crooke, S.T. and Carter, S. K.: New York Academic Press, Inc., (1980).
9. Van Hoff, P.P., Schilsky, R., Reichert, C.M., Reddick, R.L., Rozenewig, M., Young, R.C. and Muggia, F.M.: *Cancer Treat. Rep.* 63, 1527-1531 (1979).
10. Sherman, S.F. and Lippard, S.J.: *Chem. Rev.*, 87, 1153-1181 (1989).
11. Gorden, J.A. and Gotton, V.H.: *Am. J. Physiol.*, 250, F991-F998 (1986).
12. Litterst, C.L. and Weiss, R.B.: Martinus Nijhoff Publishers, London 771 (1987).
13. Sarfstein, R.: *Int. J. Andrology*, 10, 325-346 (1987).
14. Rose, W.C. and Schurig J.E.: *Cancer Treat. Rev.*, 12, (suppl A) 1-9 (1985).
15. Kim, D.K., Kim, G.H., Gam, J.S., Cho, Y.B., Kim, H.T.: Design synthesis and structure-activity relationship of third generation antitumor platinum complexes, International congress of new drug development 8, 18-24 (1991), Seoul, Korea.
16. Ozols, R.F., Cordon, B.J., Jacob, J. Wesley, M. N., Ostohega, Y. and Young, R.C.: *Ann. Intern. Med.*, 100, 19-24 (1984).
17. Berry, J.P., Pauwells, C., Tlouzeau, S. and

- Lespinats, G.: *Cancer Res.*, 44, 2864-2868 (1984).
18. Salonen, J.T., Salonen, R., Lappeteläinen, R., Maenpää, P.H., Alfthan, G. and Puska, P.: *Br. Med. J.*, 290, 417-420 (1985).
19. IP, C. and Sinha, D.K.: *Cancer Res.*, 41, 31-34 (1984).
20. Milner, J.A. and Hsu, C.Y.: *Cancer Res.*, 41, 1652-1656 (1981).
21. Nagamura, A., Satoh, M. and Imura, N.: *J. Pharm. Dyn.*, 7, 217-220 (1984).
22. Choung, S.Y.: *Bull. K.H. Pharm. Sci.*, Vol. 16, 189-199 (1988).
23. Watson, D.: *Clin. Chim. Acta*, 14, 571 (1966).
24. Stocks, J., Kemp, M. and Dormandy, T.L.: *Lancet*, 1, 266 (1971).
25. Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Farr, A.L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
26. Snyder, L.M., Sauberman, N., Condara, H., Dolan, J., Jacobs, J., Szymanski, I. and Fortier, N.L.: *Br. J. Haematol.*, 48, 435 (1981).
27. Tay, L.K., Bregman, C.L., Masters, B.A. and Williams, P.D.: *Cancer Res.*, 48, 2538-2543 (1988).
28. Choie, D.D., del Campo, A.A. and Guarino, A.M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 55, 245-252 (1980).
29. Porter, G.A. and Bennett, W.M.: *Am. J. Physiol.*, 241, F1-F8 (1981).
30. Maher, J.F., Brenner, B.M. and Rector, F.C.: *The Kidney*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Vol. II, Chapter 31.
31. Clark, R.A. and Klebanoff, S.J.: *J. Immunol.*, 122, 2605-2610 (1979).
32. Stephen, J. Weiss: *J. Biol. Chem.*, Vol. 255, No. 20, 9912-9917 (1980).
33. Niki, E.: *Chem. Phys. Lipids*, 44, 227-253 (1987).
34. Minami, M. and Yoshikawa, H.: *Clin. Chem.*, 92, 337 (1977).
35. Fujii, S., Dale, G.L. and Beutler, E.: *Blood* Vol. 63, No. 5, 1096-1101 (1984).