

- Cisplatin에 의한 흰쥐의 신장독성과 간기능에 苦參투여 효능에 관한 실험적 연구 -

大韓外官科學會誌 : 第14卷 第1號

The Journal of Oriental Medical Surgery,

Ophthalmology & Otolaryngology

Vol. 14, No 1, May 2001.

Cisplatin에 의한 흰쥐의 신장독성과 간기능에 苦參투여 효능에 관한 실험적 연구

¹OMD Ph. D. 成賢濟*, ²Ph. D. 尹裕植

1. 성현제 ; 한국한의학연구원 선임연구부장

2. 윤유식 ; 한국한의학연구원 선임연구원

* 본연구는 국무총리실 산업기술연구회 연구지원에 의해 수행되었음.

I. 緒 論

백금착화합물로서 알킬화제인 Cisplatin (*cis*-diaminedichloro platinum (II); CDDP)은 고환암, 난소암, 방광암의 치료를 위하여 FDA의 공인을 받은 후로 뇌, 부신피질, 유방, 자궁, 자궁경부, 자궁내막, 머리, 목, 식도, 폐, 피부, 전립선, 위, 뼈, 임파선, 영양세포(trophoblast)의 종양에 광범위하게 이용되고 있다. 특징적인 부작용으로 급성의 때로는 회복불가능한 신장손상이 초래되므로 환자에게 충분한 수분공급과 배설이 수행되어야 한다. 고용량의 cisplatin 처리 시에는 회복불가능한 renal tubule의 손상이 발생할 수 있으므로 대단히 조심하여야 한다. 환자의 신장기능이 지속적으로 점점되어야 하고 신장기능을 나타내는 지표인 혈청 creatinin이 1.5 mg/dL 이상으로 올라가는 경우에는 cisplatin 투여가 불가능하다. 그 밖의 부작용으로는 백혈구감소증, 혈소판 감소증, 빈혈 등의 조혈계 부작용, 메스꺼움, 구토, 식욕부진, 설사 등의 소화관계 부작용, 신장독성, 간독성, 신경계 부작용, 청력손상 등이 알려져 있다(1). 이러한 부작용은 실험동물을 이용한 기초연구를 통하여서도 잘 알려져 있다. 일본에서 수행된 Ueda 등에 의한 연구 결과에 의하면 cisplatin을 마우스에 투여한 경우 blood urea nitrogen (BUN)의 4배 증가, serum creatinin의 2배 증가, 소변량의 50% 감소가 관찰되어 신독성이 심각함이 관찰되었다. 또한 백혈구 치의 60% 감소, 혈소판의 70% 감소가 관찰되고 흉선과 비장의 중량이 크게 감소하여 조혈, 면역계의 부작용 역시 심각함이 판명되었다(2).

그동안 국내 한의학회에서는 실험적 연구로 마우스 및 래트에서 한약의 cisplatin의 부작용 억제효능을 규명하려는 연구가 수행되어져 왔다. 노영범은 보기제인 사군자탕과 보기보혈제인 십

전대보탕이 cisplatin의 간독성 및 신장독성을 억제함과 보혈제인 사물탕은 효과가 없음을 보고하였다(3). 또한 이영우는 cisplatin의 조혈계 독성에 의한 백혈구, 적혈구, 혈소판 감소증에 있어서 사군자탕과 십전대보탕은 효과가 있으나 사물탕은 효과가 없음을 보고하였다(4). 조종관은 소적백출산이 cisplatin의 조혈독성과 신장독성을 억제함을 보고하였다(5). 본 연구에서는 수종의 한약 단미제 중에서 cisplatin의 부작용을 억제하는 효능의 한약제를 검색한 결과, 苦參이 cisplatin의 항암효능은 유지하면서 신장독성을 선택적으로 억제함을 밝혀내었으므로 이를 보고하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 實驗動物

C57BL/6 계 및 ICR 계 생쥐(4주령, 수컷)을 대한실험동물센터(음성, 충북)에서 구입하여 사용하였다. 생존률 실험에는 ICR 계 생쥐가 사용되었고, 그 이외의 모든 실험에는 C57BL/6 계 생쥐가 사용되었다.

2) 시약

Cisplatin은 Sigma에서 구입하였고, BUN assay kit는 Wako 제품을 사용하였다. Fetal bovine serum과 DMEM medium, penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA 용액은 Gibco/BRL 제품을 사용하였다.

3) 생쥐 B16-BL6 흑색종 세포

B16-BL6 세포주는 미국 MD Anderson Cancer Center의 I.J.Fidler 박사로부터 분주 받아 사용하였다.

4) 실험약물의 조제

고삼은 충북 단양의 제품을 경동시장에서 구입하였다. 고삼 80g에 1 L의 증류수를 넣어 2시간동안 끓인 후 추출액을 따라내고 1 L의 증류수로 재탕하였다. 초당과 재탕액을 합하여 Rotary evaporator로 감압 농축시킨 후 동결건조기로 수분을 제거하여 14.9g (수율 18.6 %)의 엑스를 얻었다. 이 엑스를 곱게 가루내어 건조상태로 보관하다가 사용직전 증류수에 현탁시켜 투여하였다.

2. 實驗方法

1) 세포배양

액체질소에 보관된 B16-BL6 생쥐 흑색종 세포주를 37℃에서 재빨리 녹인 후 5 % Fetal bovine serum과 1 %의 penicillin/streptomycin 용액을 포함한 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5 % CO₂ 존재하에서 계대배양하였다. 계대배양회수 25회 이내의 세포가 실험에 사용되었다.

2) 종양 유도

배양된 B16-BL6 세포trypsin-EDTA 용액으로 배양용기로부터 분리하였다. Hemacytomter로 세포수를 계수하여 5×10⁶cell/ml의 농도로 맞추었다. C57BL/6 생쥐의 오른쪽 옆구리 부위의 털을 깎아낸 후, 마리당 0.1 ml 씩 피하 주사하였다. 피하주사 7일 후 종양이 형성된 것을 확인하였다.

3) 약제 투여

종양이 형성된 것을 확인하고 생쥐들을 대조군(Control), 고삼 투여군(KS), cisplatin 투여군(CDDP), 고삼/cisplatin(KS/CDDP) 투여군의 4개의 실험군으로 나누었다. 고삼/cisplatin 투여군은 0.5 g/Kg의 고삼추출물을 경구투여하고 2 mg/Kg의 cisplatin을 복강 주사하였다. Cisplatin 투여군은 동량의 증류수를 경구투여하고 2 mg/Kg의 cisplatin을 복강 주사하였다. 고삼 투여군은 0.5

g/Kg의 고삼을 경구투여하고 동량의 식염수를 복강주사하였다. 대조군은 동량의 증류수를 경구투여하고 식염수를 복강주사하였다. 1일 1회 씩 4일간 처리한 후 5일째와 6일째는 복강투여 없이 증류수 및 고삼의 경구투여만을 실시하였다. 16시간동안 절식시키고 7일째에 부검하였다. Cisplatin은 식염수에 녹인 후 4일 이내에 모두 사용하였다.

4) 동물 부검 및 장기적출

7일째 되는 날 동물의 체중을 재고 에테르로 마취시켜 고정판에 고정시킨 후 심장채혈하였다. 혈액을 EDTA를 포함한 tube에 넣고 섞어서 응고를 방지하고 5000 rpm으로 4분간 원심분리하여 혈액을 분리하였다.

5) BUN (Blood Urea Nitrogen) 정량

혈장으로부터 요소질소B test kit (Wako, Japan)을 이용하여 측정하였다.

6) GPT 활성도 측정

혈장으로부터 생화학분석기 (Synchron CX, Coulter, USA)를 사용하여 측정하였다.

7) 통계학적 분석

생존분석은 GraphPad Prism software를 사용하여 Kaplan-Meier 방법으로 수행되었고 그 밖의 통계분석은 SPSS software를 사용하여 ANOVA test와 사후검정으로 LSD test에 의해 수행되었다.

III. 結 果

1. 신장독성에 미치는 효과

여러 화학요법제의 부작용중 신장독성은

cisplatin의 특징적인 부작용으로 알려져 있다 (1). 본 실험에서는 신장기능의 지표로 쓰이는 BUN(blood urea nitrogen) 수치를 측정하였다. BUN은 혈액중의 urea에 포함된 질소로 혈중 비단백질성 질소의 50%를 차지하며 급성뇨세관괴사, 급성사구체신염, 만성사구체신염 말기, 신경화증 말기, 다발성낭포신, 아미로이드신, 양측 신수종 말기 등의 경우에 증가한다고 알려져 있다 (6). 신장기능의 지표인 BUN 수치를 비교한 결과 cisplatin 단독투여시 대조군에 비해 2배이상 증가하여 cisplatin의 신장독성이 확인되었다(Fig. 1, Table 1). 반면 cisplatin/고삼 군의 BUN 값은 대조군과 같아서 고삼은 cisplatin의 신독성을 완전히 억제함을 알 수 있었다. 고삼 단독 투여시에는 대조군과 차이가 없어서 고삼 자체의 신장독성은 발견되지 않았다.

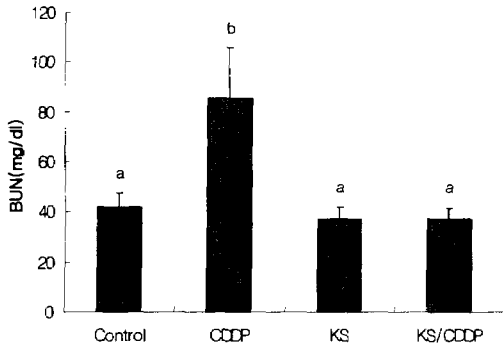


Fig. 1. Effect of KS on the increase of serum BUN induced by CDDP. Each column stands for Mean \pm s.e.m. Columns marked with different alphabet are statically different by One-Way ANOVA with post hoc. LSD test ($P < 0.05$). (CDDP: cisplatin, KS: 고삼)

Table 1. Effect of KS on the increase of serum BUN induced by CDDP. (CDDP: cisplatin, KS: 고삼)

	Control	CDDP	KS	KS/CDDP
BUN(mg/dl)	41.8 \pm 5.67 ^a	85.3 \pm 20.63 ^b	37.3 \pm 4.60 ^a	37.0 \pm 4.56 ^a

Each data is Mean \pm s.e.m.

2. 간기능에 미치는 영향

혈청 GPT는 GOT와 함께 간기능의 지표로 사용되며 급성간염과 중독성간염에서 현저하게 상승하고, 만성간염과 간경변에서도 완만하게 상승한다고 알려져 있다(8). GPT 수치를 비교한 결과 cisplatin군은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않아 cisplatin의 간기능에 미치는 부작용은 발견되지 않았다(Fig. 2, Table 2). Cisplatin/고삼 군도 대조군과 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 고삼 단독 처리군의 경우 GPT 수치가 대조군에 비해 유의적으로 감소되어 간기능을 약간 개선시킴이 발견되었다.

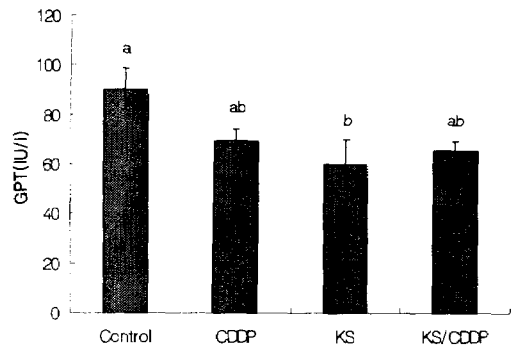


Fig. 2. Effect of KS on the concentration of serum GPT. Each column stands for Mean \pm s.e.m. Columns marked with different alphabet are statically different by One-Way ANOVA with post hoc. LSD test ($P < 0.05$). (CDDP: cisplatin, KS: 고삼)

Table 2. Effect of KS on the concentration of serum GPT. (CDDP: cisplatin, KS: 고삼)

	Control	CDDP	KS	KS/CDDP
GPT(IU/l)	90.4 \pm 8.59 ^a	69.4 \pm 4.84 ^{ab}	59.9 \pm 9.96 ^b	65.8 \pm 3.50 ^{ab}

Each data is Mean \pm s.e.m.

3. 종양성장 억제효과

고삼 투여군의 종양크기는 대조군에 비해 유의적인 차이가 없으므로 고삼은 자체적인 종양억제

능이 없는 것으로 관찰되었다. Cisplatin/고삼 병용 투여군의 경우는 종양의 크기에 있어서 cisplatin 단독 투여군에 비해 약간 증가하는 경향이 있었으나 통계분석 결과 유의성 있는 차이는 발견되지 않았으므로 고삼은 cisplatin의 항암효능에는 뚜렷한 영향이 없다고 판단된다 (Fig. 3 and Table 3). 이 결과는 고삼이 cisplatin의 항암효능은 유의적으로 억제하지 아니하면서 신장독성을 선택적으로 뚜렷이 억제함을 보여주고 있다.

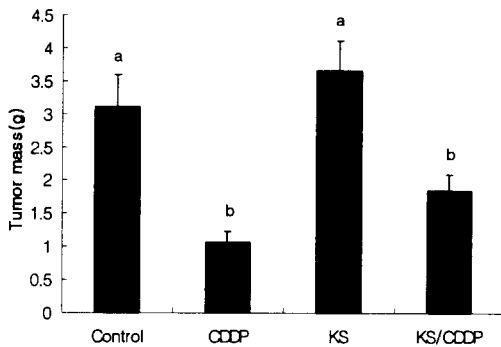


Fig. 3. Effect of KS on antitumor activity of CDDP. Each column stands for Mean \pm s.e.m. Columns marked with different alphabet are statically different by One-Way ANOVA with post hoc. LSD test ($P < 0.05$). (CDDP: cisplatin, KS: 고삼)

Table 3. Effect of KS on antitumor activity of cisplatin CDDP. (CDDP: cisplatin, KS: 고삼)

	Control	CDDP	KS	KS/CDDP
Tumor mass(g)	3.11 \pm 0.49 ^a	1.06 \pm 0.16 ^b	3.66 \pm 0.45 ^a	1.84 \pm 0.25 ^b

Each data is Mean \pm s.e.m.

IV. 考 察

고삼은 苦, 寒의 성미를 지니고 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利尿의 효능을 지닌 한약재로서 下焦濕

熱로 인한 황달, 이질, 대하, 음부가려움증에 활용되며, 농포창, 음, 버짐 및 열이 쌓여서 소변을 잘 못보고 아픈 증상에 효력을 보인다고 알려져 있다. 약리작용으로는 심장박동이상치료, 백혈구 감소증 치료, 관상동맥 혈류량 증가, 심장근육의 허혈증상 개선, 혈당 감소, 거담 및 친식 완화, 이뇨작용, 항염, 항알레르기, 진통 작용이 알려져 있다(10). 한방임상에서는 적리 황달 음 악성창양 등에 사용이 되고 있으며 한의학 논문에는 고삼의 실험동물에 대한 항당뇨작용(11), in vitro에서의 항암작용(12), 임상에서 附子 및 草烏 중독에의 응용사례 (13), in vitro에서의 항균작용 (14) 등이 보고되어 있다.

본 연구의 결과 cisplatin은 신장기능의 부작용을 지니며, 간장기능 및 심장/근육기능에의 부작용은 뚜렷하지 않았다. 한약재 고삼은 cisplatin의 항암효능은 억제하지 않으면서 신장독성을 선택적으로 뚜렷이 억제하였다. 고삼은 cisplatin을 이용한 암화학요법치료의 효능은 유지하면서 부작용만을 선택적으로 억제하기 위한 목적으로 임상활용이 가능하다.

V. 結 論

임상 암치료에 광범위하게 이용되는 화학요법제인 Cisplatin의 부작용 억제에 대한 고삼의 효능을 동물 실험을 통하여 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고삼은 Cisplatin의 투여에 의한 신장독성을 대조군 수준으로 억제하였다.
2. 고삼은 Cisplatin의 항암효과를 감소시키지 않았다.

3. 고삼은 자체적으로는 항암효과를 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보면 고삼은 Cisplatin의 항암효과는 감소시키지 않으면서 부작용만을 선별적으로 억제함을 알 수 있다. Cisplatin이 임상적으로 다양한 암의 치료에 사용되는 대표적인 화학요법제임을 생각할 때, 고삼은 화학요법의 치료율을 높이고 환자의 삶의 질을 향상시키기 위하여 임상에 이용이 가능한 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Skeel RT; Handbook of Cancer Chemotherapy Fifth Ed., Philadelphia, PA, USA, Lippincott Williams & Wilkins, pp.89-91, 1999
2. Ueda H, Sugiyama K, Yokota M, Matsuno K, Ezaki T; Reduction of cisplatin toxicity and lethality by sodium malate in mice, Biol. Pharm. Bull, 21(1), pp.34-43, 1998.
3. 노영범 ; Cisplatin 부작용에 대한 보익제(補益劑)의 실험적 연구, 방제학회지 3(1), pp.127-161, 1992
4. 이영우 ; 사군자탕(四君子湯), 사물탕(四物湯), 십전대보탕(十全大補湯) 및 보중익기탕(補中益氣湯)이 Cisplatin투여로 유발된 체중감소와 혈액변화에 미치는 영향, 방제학회지, 3(1), pp.81-125, 1992
5. 조종관 ; 소적백출산의 항암효과 및 Cisplatin부작용감소에 미치는 영향, 대전대논문집, 4(2), pp.255-272, 1996
6. 金井 泉, 金井 正光 ; 임상검사법제요, 서울, 고문사, p.776, 1993
7. 金井 泉, 金井 正光 ; 임상검사법제요, 서울, 고문사, p.731, 1993
8. 金井 泉, 金井 正光 ; 임상검사법제요, 서울, 고문사, p.496, 1993
9. 金井 泉, 金井 正光 ; 임상검사법제요, 서울, 고문사, p.485, 1993
10. 안덕균; 한국본초도감, 서울, 교학사, p.199, 1999.
11. 김진철, 김미려, 양재하, 최종백; 고삼(苦蔘)이 당뇨에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 동서의학, 16(3), pp.47-67, 1991
12. 유시용; 고삼의 항암활성 및 활성성분에 관한 연구, 대전대논문집, 5(2), pp.503-507, 1997
13. 이승무, 안일희, 이연정, 김형균, 김동웅; 급성 부자(附子) 초오(草烏) 중독에서 감두탕(甘豆湯)과 고삼(苦蔘)의 응용, 대한한의학회지(대한한학회보), 14(2), pp.399-405, 1993
14. 장준복, 이경섭, 송병기; 음호병(陰戶病)의 외용약으로 응용되는 오배자(五倍子), 애엽(艾葉), 고삼(苦蔘), 촉초(蜀椒) 및 황백(黃柏)의 항균과 소염효과, 대한한의학회지(대한한학회보), 14(2), pp.270-280, 1993